

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MODULATION DE LA POPULATION DE BASOPHILES DURANT L'INFECTION DE SOURIS BALB/C  
PAR *PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI* : ÉTUDE COMPARATIVE CHEZ DES SOURIS TYPE  
SAUVAGE ET DES SOURIS DÉFICIENTES EN LE FACTEUR INHIBITEUR DE LA MIGRATION DE  
MACROPHAGES (MIF)

MÉMOIRE DE RECHERCHE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
DESAUTELS, FRANÇOIS-PIERRE

PRINTEMPS 2014

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

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche, la Dr. Tatiana Scorza, à qui je dois plusieurs choses; la motivation nécessaire à l'achèvement de ce mémoire étant l'une des moindres.

J'aimerais aussi souligner le support que j'ai reçu de mes collègues au laboratoire, notamment de Diane Tshikudi Malu, d'Esther Dalko, de Mathieu Cambos, de Nilson Jesus Quintana, de Jorge Cueva Vargas, ainsi que de tous les autres avec qui j'ai pu travailler au sein du laboratoire du D<sup>re</sup>. Scorza, en particulier de Jaime Sanchez Dardon.

J'aimerais finalement remercier mes proches qui m'ont empêché d'exploser à maintes reprises.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | i  |
| TABLE DES MATIÈRES .....  | ii |
| LISTE DES FIGURES .....   | iv |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS COMMUNES.....                               | x  |
| RÉSUMÉ.....   | xi |
| CHAPITRE I  |    |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE .....   | 1  |
| 1.1 La problématique .....  | 1  |
| 1.2 L'état des connaissances .....                                  | 5  |
| 1.2.1 Le cycle de vie de Plasmodium.....                            | 5  |
| 1.2.2 Les métabolites malariaux .....                               | 7  |
| 1.2.3 L'hémozoïne .....   | 7  |
| 1.2.4 Le stress oxydatif et la malaria.....                         | 8  |
| 1.2.5 La réponse immunitaire adaptative .....                       | 10 |
| 1.2.6 La malaria chez les souris .....                              | 12 |
| 1.2.7 L'élimination du parasite.....                                | 13 |
| 1.2.8 Les basophiles .....  | 14 |
| 1.2.9 Les mastocytes .....  | 16 |
| 1.2.10 Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages..... | 17 |
| 1.3 Les hypothèses de travail.....                                  | 20 |
| CHAPITRE II   |    |
| MANIPULATIONS.....  | 21 |
| 2.1 La méthodologie.....  | 21 |
| 2.1.1 Infections.....   | 21 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1.2 | Quantification de la parasitémie.....   | 21 |
| 2.1.3 | Prélèvements des cellules des souris.....   | 22 |
| 2.1.4 | Marquages des cellules de la moelle et de la rate de souris infectées et naïves par cytofluorométrie..... | 22 |
| 2.1.5 | Différenciation de basophiles in vitro et sécrétion d'IL-4.....   | 23 |
| 2.1.6 | Dosage des IgE.....   | 23 |
| 2.1.7 | Dosage d'IL-4.....  | 23 |
| 2.1.8 | Analyses statistiques.....  | 24 |
| 2.2   | Résultats.....  | 25 |
| 2.2.1 | Analyse de la population des basophiles et mastocytes chez les souris naïves. ...                         | 25 |
| 2.2.2 | Effet de l'infection par la souche non-virulente <i>P. c. adami</i> DK (jour 4 post-infection).....       | 27 |
| 2.2.3 | Effet de l'infection par la souche virulente <i>P. c. adami</i> DS (jour 4 post-infection)                | 31 |
| 2.2.4 | Effet de l'infection par la souche non-virulente <i>P. c. adami</i> DK (jour 8 post-infection).....       | 33 |
| 2.2.5 | Niveaux d'immunoglobulines (Ig)E dans le sérum des souris TS et MIF KO infectées.....                     | 35 |
| 2.2.6 | Différenciation de cellules hématopoïétiques en basophiles in vitro.....                                  | 36 |
| 2.3   | Discussion des résultats.....   | 37 |
|       | CCONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....   | 42 |
|       | RÉFÉRENCES.....   | 45 |

## LISTE DES FIGURES

| Figure   | Page |
|--|------|
| 1.1 Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> chez l'Homme. (A) Le cycle hépatique, durant lequel les sporozoïtes véhiculés par les moustiques infectent des cellules du foie, devenant des trophozoïtes (1,2). Le noyau des trophozoïtes se divise en 8-20 copies, et le tout se nomme un schizonte (3). Le schizonte se rompt et libère des mérozoïtes dans le sang (4) et les mérozoïtes infectent les GRs (5). Le mérozoïte devient un trophozoïte, et recommence le cycle schizogonique, propageant l'infection dans le sang (6). Certains mérozoïtes deviennent des gamétocytes lorsqu'ils entrent dans le sang (7) et ces gamétocytes sont subséquemment ingérés par les moustiques (8). Le parasite se reproduit sexuellement dans le moustique (9-11), et des nouveaux sporozoïtes sont générés. Figure tirée du site internet du Center for disease control. | 6    |
| 1.2 Schéma démontrant la différenciation des cellules T auxiliaires CD4. Suite à la stimulation du récepteur des cellules T (TCR) par le peptide antigénique relié à la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA), les cellules T naïves se différencient vers un profil $T_H1$ ou $T_H2$ , en fonction des cytokines auxquelles elles seront exposées. Figure tirée du site de Nature.  | 10   |
| 1.3 Cinétique de parasitémie suite à l'infection par <i>P. c. adami</i> souche DK chez la souris BALB/c TS et MIF KO (Tshikudi Malu <i>et al</i> , 2011).  | 19   |

| Figure  | Page |
|---|------|
| 2.1 Discrimination par cytofluorométrie de flux des basophiles et mastocytes dans un échantillon de rate de souris BALB/c TS naïve. Une suspension cellulaire de la rate a été préparée (voir méthodologie pour les détails) et les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-FCR $\epsilon$ -FITC et anti-cKIT-PE. Les basophiles (cellules FCR $\epsilon$ <sup>+</sup> et cKIT <sup>+</sup> ) constituent 0.9% de cet échantillon, et les mastocytes (cellules FCR $\epsilon$ <sup>+</sup> et cKIT <sup>+</sup> ), 1.36%. | 25   |
| 2.2 Quantification cytofluorométrique du pourcentage des basophiles (cellules FCR $\epsilon$ <sup>+</sup> et cKIT <sup>+</sup> ) dans la rate et la moelle osseuse de souris BALB/c TS et MIF KO naïves. (A) Pourcentage relatif par rapport à toutes les cellules présentes (n $\geq$ 5). (B) Nombre absolu de basophiles recensées (n $\geq$ 4).  | 26   |
| 2.3 Quantification cytofluorométrique du pourcentage des mastocytes (cellules FCR $\epsilon$ <sup>+</sup> et cKIT <sup>+</sup> ) dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO naïves. (A) Pourcentage relatif par rapport à toutes les cellules présentes (n $\geq$ 5). (B) Nombre absolu de mastocytes recensées (n $\geq$ 4).   | 27   |

| Figure  | Page |
|---|------|
| 2.4 Profil des basophiles (FCR $\epsilon^+$ et cKIT) présents dans la rate chez des souris TS et MIF KO au 4e jour d'infection avec la souche <i>P. c. adami</i> DK. (A) Parasitémie mesurée par l'analyse de frottis sanguins au 4e jour post-infection chez les individus TS et MIF KO (n=4). (B) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la rate prélevée des souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n $\geq$ 5). (C) Nombre absolu de basophiles calculés en fonction du nombre de cellules dans la rate et le pourcentage estimé par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n $\geq$ 4). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées (***, *; p<0.001 et 0.05) et entre les souris TS et MIF KO infectées ( $\Psi$ , p<0.05) en utilisant un TEST Student. | 28   |
| 2.5 Profil des mastocytes (cellules FCR $\epsilon^+$ et cKIT $^+$ ) présents dans la rate chez des souris TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche <i>P. c. adami</i> DK. (A) Pourcentages de mastocytes déterminés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n $\geq$ 3). (B) Nombre absolu de mastocytes estimés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n $\geq$ 3). Les données ont été comparées entre les souris TS infectes et MIF KO infectées ( $\Psi$ , p<0.05) avec un TEST Student.  | 29   |

| Figure  | Page |
|---|------|
| <p>2.6 Profil des basophiles (FCR<math>\epsilon^+</math> et cKIT) présents dans la moelle chez des individus TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de basophiles observés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n<math>\geq</math>3). (B) Nombre absolu de basophiles observés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n<math>\geq</math>3). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées (***P&lt;0.01) par un TEST Student.</p>                  | 30   |
| <p>2.7 Pourcentage de parasitémiées évalué par frottis sanguins chez des souris BALB/c TS et MIF KO au 4e jour post infection avec la souche DS (n<math>\geq</math>3). Les données ont été comparées entre les souris TS infectées et MIF KO infectées (<math>\Psi</math>, p&lt;0.05) avec un TEST Student.</p>   | 31   |
| <p>2.8 Profil des basophiles (FCR<math>\epsilon^+</math> et cKIT) dans la rate des souris TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche <i>P. c. adami</i> DS. Gauche: pourcentage de basophiles déterminé par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n<math>\geq</math>4). Droite : nombre absolu de basophiles estimés en fonction du rendement en cellules et les pourcentages mesurés par cytofluorométrie (n<math>\geq</math>3). Les données ont été comparées entre les souris TS infectées et MIF KO infectées (<math>\Psi</math>, p&lt;0.05) avec un TEST Student.</p> | 32   |

| Figure   | Page |
|--|------|
| <p>2.9 Profil des basophiles (FCR<math>\epsilon^+</math> et cKIT) présents dans la rate chez des individus TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de parasitémie mesurées lors de frottis sanguins au 8e jour post-infection chez les souris TS et MIF KO (n<math>\geq</math>5). (B) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n<math>\geq</math>5). (C) Nombre absolu de basophiles dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n<math>\geq</math>4). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées et MIF KO naïves et infectées (**<math>P</math>&lt;0.01; *<math>P</math>&lt;0.05) par un TEST Student.</p> | 33   |
| <p>2.10 Profil des basophiles (FCR<math>\epsilon^+</math> et cKIT) présents dans la moelle chez des individus TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n<math>\geq</math>3). (B) Nombre absolu de basophiles estimés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n<math>\geq</math>3). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées et MIF KO naïves et infectées (**<math>P</math>&lt;0.01; *<math>P</math>&lt;0.05) par un TEST Student.</p>  | 34   |
| <p>2.11 Quantification par ELISA des IgE de pools sériques (n=3) de souris BALB/c TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK (n<math>\geq</math>2).</p>  | 35   |

| Figure  | Page |
|---|------|
| 2.12 Différentiation des basophiles <i>in vitro</i> à partir de cellules pluripotentes de la moelle osseuse de souris BALB/c TS et MIF KO. (A) Pourcentages des basophiles (cellules FCR $\epsilon$ <sup>+</sup> cKIT) obtenus par cytofluorométrie (n=3), suite a la stimulation des cellules de la moelle osseuse de souris TS et MIF KO avec de l'IL-3 (30 ng/mL) durant 4 jours. (B) Concentration en IL-4 détectée par ELISA dans les milieux de différenciation suite à la différenciation (n≥4). | 36   |

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS COMMUNES

|                    |  |
|--------------------|--|
| DK                 | <i>Plasmodium chabaudi adami</i> souche DK           |
| DS                 | <i>Plasmodium chabaudi adami</i> souche DS           |
| ERO                | Espèces réactives d'oxygène                          |
| GR                 | Globule rouge  |
| GSH                | Glutathion   |
| GSSG               | Disulfide de Glutathion                              |
| Hb                 | Hémoglobine  |
| HE                 | Hémine   |
| HZ                 | Hémozoïne  |
| IFN- $\gamma$      | Interféron gamma                                     |
| Ig(x)              | Immunoglobulines de type x                           |
| IL-3               | Interleukine-3                                       |
| IL-4               | Interleukine-4                                       |
| KO                 | Knockout (MIF-KO)                                    |
| M $\phi$           | Macrophage   |
| MIF                | Facteur d'inhibition de migration des macrophages    |
| NBNT               | Cellules non-B non-T                                 |
| Redox              | Statut Oxydoréductif                                 |
| T <sub>H</sub> (x) | lymphocytes T auxiliaires CD4 <sup>+</sup> de type x |
| TLR                | Toll-like receptor                                   |
| TS                 | Type Sauvage   |

## RÉSUMÉ

La résolution de l'infection par *Plasmodium*, agent responsable du paludisme, semble être favorisée par un titre élevé en immunoglobuline G (IgG) cytophile, tandis que la prédominance des immunoglobulines E (IgE) ou IgG non-cytophiles ne sont pas protectrices. La production de ces classes particulières d'anticorps découle d'une réponse immunitaire adaptative de type T<sub>H</sub>1 (IgG cytophiles) ou T<sub>H</sub>2 (IgE, IgG non-cytophiles). Chez les souris BALB/c, modèle animal très utilisé pour les études en immunologie, la sélection du type de réponse adaptative est déterminée par la présence précoce d'interleukine 4 (IL-4) lors de la réponse innée à l'infection. La source de cet IL-4 chez des modèles infectieux causés par des trématodes et nématodes (*Nippostrongylus brasiliensis* et *Schistosoma mansoni*) a été identifiée comme étant des granulocytes, soit des basophiles (cellules FCR $\epsilon$ +cKIT) ou des mastocytes (cellules FCR $\epsilon$ +cKIT+). Nous avons démontré que des souris BALB/c qui n'expriment pas le Facteur Inhibiteur de la Migration des Macrophages (Souris MIF KO) produisent moins d'IL-4 lors de la phase précoce (jour 4) d'infection par *Plasmodium chabaudi adami* DK (modèle expérimental de malaria), comparativement aux souris de type sauvage (Souris wild-type : TSTS). Dans la présente étude, nous avons évalué si le profil d'expansion de la population de granulocytes diffère chez les souris déficientes en MIF par rapport aux souris TS, lors de l'infection par *P. c. adami* DK. A titre de comparaison, la souche *P.c. adami* DS qui confère une réponse précoce avec un plus fort biais T<sub>H</sub>2 a été aussi utilisée. Nous avons évalué indirectement dans quelle mesure les basophiles et mastocytes pourraient être impliqués dans la production d'IL-4 lors de l'infection malarique. Pour ce faire, un double marquage avec anticorps spécifiques au FCR $\epsilon$  et cKIT a permis d'étudier l'évolution des populations de basophiles (cellules FCR $\epsilon$ +cKIT-) et mastocytes (cellules FCR $\epsilon$ +cKIT+) chez les souris TS et MIF KO durant l'infection. Nous avons aussi mesuré la production d'IgE sanguin ainsi qu'effectué des expériences de différenciation de cellules pluripotentes chez ces souris dans le but de mesurer l'étendue d'un possible phénotype qui favorise l'expansion des granulocytes chez les deux génotypes. Nos résultats montrent que les basophiles représentent la population qui rentre en expansion le jour 4 post-infection chez les souris TS durant l'infection avec la souche DK et la souche virulente DS, et tel qu'attendu, cette expansion est d'avantage accentuée durant l'infection par la souche DS. Dans les deux cas d'infection évalués, l'expansion des basophiles était nettement affaiblie chez les souris MIF KO infectées. Nos données ont démontré que les souris MIF-KO sécrètent moins d'IgE que les souris TS, et une différenciation plus faible des précurseurs en basophiles a été constatée à partir de précurseurs de la moelle osseuse des cellules MIF KO. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que durant l'infection, le MIF facilite l'expansion des basophiles par un mécanisme qui reste à être déterminé.

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 La problématique

La malaria est une maladie tropicale affectant l'Homme, qui est responsable de plus d'un million de morts infantiles à chaque année (Pierce et Miller, 2009). La mortalité associée à la malaria est si importante qu'elle a permis la sélection de l'allèle d'hémoglobine S, allèle offrant une résistance à la malaria sévère lorsque hétérozygote et ce, malgré le fait que l'homozygotie de cet allèle entraîne l'anémie falciforme, une autre maladie ayant un haut taux de mortalité (Molineaux, 1985). L'agent causal de la malaria est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire, *Plasmodium sp.*, qui a pour vecteur le moustique de la sous-famille *Anophelinae*.

Le parasite *Plasmodium* possède un cycle de vie complexe, ayant une phase sexuée chez son vecteur et une phase asexuée chez son hôte vertébré. *Plasmodium* est inoculé sous forme de sporozoïte chez l'Homme par une piqûre de moustique. Les sporozoïtes infectent les cellules hépatiques et, six à seize jours plus tard provoquent leur rupture et le relâchement subséquent de mérozoïtes dans le sang. Ces derniers infecteront les globules rouges (GR), entraînant ultimement leur lyse et la réinfection subséquente d'autres GR par les mérozoïtes libérés (Girard *et al.*, 2007). Lors de cette rupture, des produits issus du métabolisme parasitaire ainsi que des GRs eux-mêmes seront relâchés dans le sang, notamment l'hème (HE) dérivé de l'hémoglobine (Hb) (Pamplona *et al.*, 2007) et l'hémozoïne (HZ), ou pigment malarique, un polymère de protoporphyrine IX issu de la détoxification de l'HE par *Plasmodium* (Coban *et al.*, 2007). La déplétion subséquente des GRs et l'accumulation de ces produits contribuent aux symptômes associés au paludisme.

Il a été observé chez l'Homme qu'il existe une corrélation entre un titre élevé d'immunoglobulines (Ig) G ayant une haute affinité de fixation pour les récepteurs

Fc des cellules phagocytes (IgG cytophiles) et moins de morbidité (Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992; Rogerson, Wijesinghe et Meshnick, 2010). À l'inverse, des concentrations élevées en IgE et en isotypes IgG non cytophiles sont caractéristiques d'un état clinique détérioré chez des personnes infectées (Tangteerawatana *et al.*, 2007). La production de ces différents isotypes d'anticorps est dépendante en partie du type de cytokines secrétées par les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> (T helpers, abrégés T<sub>H</sub>). Lors du déroulement de la réponse immunitaire adaptative, la prolifération de ces cellules mène éventuellement à l'apparition d'un profil de cytokines particulier. Deux populations prédominantes de lymphocytes T CD4 auxiliaires, T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2, sont responsables des profils de cytokines différentes, et en général la réponse immunitaire se polarise vers l'un de ces deux types (Romagnani, 1997). Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type T<sub>H</sub>1 secrètent de l'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), cytokine qui favorise la production d'IgG cytophiles par les lymphocytes B lors de la commutation de classe. Ces anticorps interagissent avec des cellules qui expriment de récepteurs spécifiques à leurs régions Fc et facilitent la phagocytose et élimination des cellules infectées. Les lymphocytes T<sub>H</sub>2 sont caractérisés par la sécrétion d'interleukine-4 (IL-4), cytokine qui favorise la production d'IgE ainsi que d'IgG non-cytophiles par les lymphocytes B. Ainsi, les réponses de type T<sub>H</sub>1 à une infection par *Plasmodium* sont désirables, les IgG cytophiles subséquentement produits conférant une immunité protectrice tout en participant à l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps, un processus par lequel les parasites opsonisés par ceux-ci sont liés par les récepteurs Fc des monocytes, menant à la sécrétion d'inhibiteurs de croissance parasitaire (Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992). Les réponses de type T<sub>H</sub>2 ne contribuent pas à la résolution de l'infection. Elles ralentissent l'élimination de l'infection mais aussi elles contribuent à la pathologie par la formation de complexes immuns IgE pro-inflammatoires (Maeno et Perlmann, 2000).

L'induction des réponses de type  $T_H2$  dépend de cellules capables de produire d'IL-4 très tôt durant l'infection, afin de promouvoir la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules  $T_H2$ , lesquelles ensuite sont les productrices principales d'IL-4 (Swain *et al.*, 1990). Dans ce contexte, des cellules non-B non-T (NBNT) répondant à l'IL-3 ont déjà été identifiées comme étant productrices primaires d'IL-4 durant des infections par le trématode *Schistosoma mansoni* (Williams *et al.*, 2004). Des recherches subséquentes portant sur des souris infectées par *Plasmodium chabaudi chabaudi* ont identifié les basophiles/mastocytes comme étant la source probable de la majorité de l'IL-4 au pic de l'infection (Helmbly, Kullberg et Troye-Blomberg, 1998). Les basophiles ont par ailleurs été identifiés comme contributeurs principaux à la production d'IL-4 par les cellules NBNT durant l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis*, un nématode parasite du système gastro-intestinal provoquant une forte réponse  $T_H2$  (Min *et al.*, 2004). Il a aussi été déterminé que les basophiles sont capables d'induire par eux-mêmes le développement de lymphocytes  $T_H2$  *in vitro* sous certaines conditions (Yoshimoto *et al.*, 2009). Les mastocytes sont aussi soupçonnés de contribuer au démarrage de la réponse  $T_H2$ , puisque lorsqu'ils sont exposés à des substances oxydantes, ils sécrètent de l'IL-4. De plus, il a été démontré que les mastocytes sont sensibilisés à la production et à la sécrétion d'IL-4 par leur statut d'oxydoréduction – le stress oxydatif augmentant la production de cette cytokine (Wolfreys et Oliveira, 1997). Comme les basophiles et les mastocytes partagent des origines et propriétés similaires, il est possible qu'un mécanisme redox-dépendant soit responsable de l'activation des deux types cellulaires (Swindle et Metcalfe, 2007 ; Yoshimaru *et al.*, 2002).

Les produits de dégradation de l'Hb par le parasite, l'HE et l'HZ, sont reconnus comme des oxydants qui stimulent les macrophages (M $\phi$ ) à phagocyter

d'avantage des GRs oxydés (Cambos et Scorza, 2010) et qui génèrent de métabolites secondaires par interaction directe avec les lipides membranaires des GRs (Arruda, Graça-Souza et Barja-Fidalgo, 2005 ; Carney *et al.*, 2006). L'HE libre issue des GR parasités est d'une importance particulière en raison de son hydrophobicité élevée, permettant au fer hautement oxydant contenu dans son anneau protoporphyrrique IX de traverser les membranes cellulaires et d'influencer la machinerie cellulaire en générant des espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Ferreira *et al.*, 2008). L'ingestion de ces substances par les M $\phi$  stimule la sécrétion du Facteur d'Inhibition de la Migration des Macrophages (MIF), une cytokine pro-inflammatoire ayant entre autres un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse ainsi qu'un rôle possible en tant que modulateur de la réponse T<sub>H</sub>2 (Tshikudi Malu *et al.*, 2011 ; Martiney *et al.*, 2000).

Nous avons démontré que des souris BALB/c qui n'expriment pas le MIF (Souris MIF KO) produisent moins d'IL-4 lors de la phase précoce (jour 4) d'infection par *Plasmodium chabaudi adami* DK (modèle expérimental de malaria), comparativement aux souris de type sauvage (Souris wild-type : TS). Nous émettons l'hypothèse que la présence de MIF permet l'expansion des granulocytes producteurs d'IL-4 lors de la phase précoce d'infection. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué si le profil d'expansion de la population de granulocytes diffère chez de souris déficientes en MIF par rapport aux souris TS, lors de l'infection par *P. c. adami* DK.

## 1.2 L'état des connaissances

### 1.2.1 Le cycle de vie de Plasmodium

La malaria est causée chez l'Homme par l'une des cinq espèces de protozoaires du genre *Plasmodium*, soit *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, *P. falciparum* et *P. knowlesi*. Transmis à leur hôte par une piqûre de moustique du genre *Anopheles*, les sporozoïtes migrent jusqu'au foie où ils infecteront des hépatocytes de façon asymptomatique pendant approximativement six jours (Figure 1.1 1 à 4). Les sporozoïtes auront à ce point mené à la création de dizaines de milliers de mérozoïtes. Ceux-ci se retrouveront dans le sang, infectant ainsi les GRs (Figure 1.1 5). Le stade sanguin de la maladie comporte des formes sexuées ainsi qu'asexuées: les premières mènent à la production de 8-20 nouveaux mérozoïtes durant chaque période de 48 heures et sont responsables des signes associés à la malaria, notamment l'apparition de frissons importants, l'augmentation de la sudation et l'apparition de fièvre de par le fait qu'elles provoquent la rupture des GR affectés lors de leur sortie (Figure 1-1 6). Certains mérozoïtes deviendront des gamétocytes non-pathogènes hors des érythrocytes et serviront à la reproduction sexuée et à la transmission du parasite lors d'une piqûre subséquente par un moustique *Anopheles* (Greenwood et al., 2008 ; Sadanand, 2010) (Figure 1.1 7 à 12).

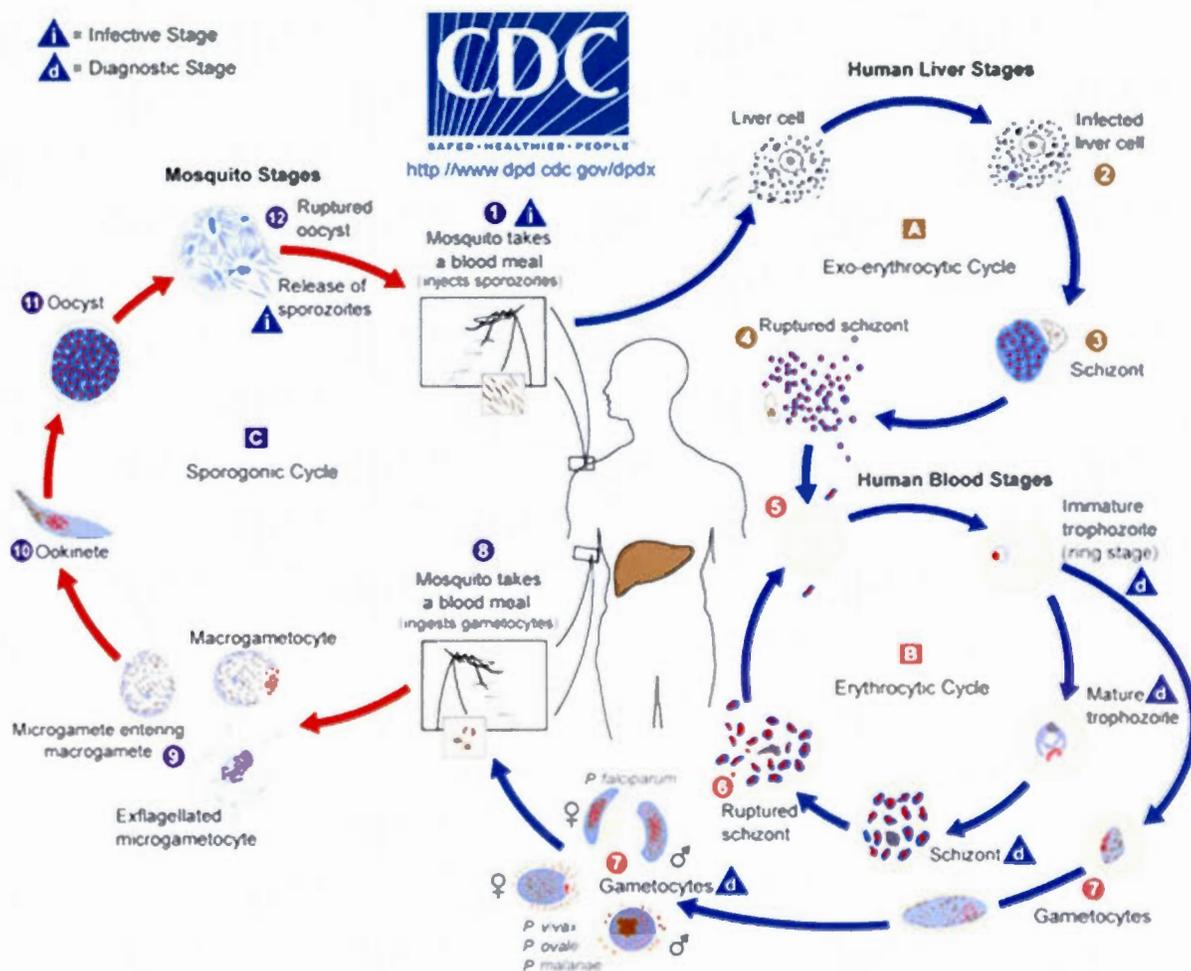


Figure 1.1 : Cycle de vie de *Plasmodium* chez l'Homme. (A) Le cycle hépatique, durant lequel les sporozoïtes véhiculés par les moustiques infectent des cellules du foie, devenant des trophozoïtes (1,2). Le noyau des trophozoïtes se divise en 8-20 copies, et le tout se nomme un schizonte (3). Le schizonte se rompt et libère des mérozoïtes dans le sang (4) et les mérozoïtes infectent les GRs (5). Le mérozoïte devient un trophozoïte, et recommence le cycle schizogonique, propageant l'infection dans le sang (6). Certains mérozoïtes deviennent des gamétocytes lorsqu'ils entrent dans le sang (7) et ces gamétocytes sont subséquentement ingérés par les moustiques (8). Le parasite se reproduit sexuellement dans le moustique (9-11), et des nouveaux sporozoïtes sont générés. Figure tirée du site internet du Center for disease control<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>

### 1.2.2 Les métabolites malariaux

Lors de l'infection intra-érythrocytaire, le parasite se nourrit de l'Hb de l'hôte afin de produire des acides aminés libres ainsi que pour réguler sa pression osmotique (Lew, Tiffert et Ginsburg, 2003). Ceci mène à l'accumulation d'HE libre potentiellement toxique qui résulterait en l'inhibition du métabolisme du parasite, et éventuellement à sa lyse (Orjih *et al.*, 1981).

Ainsi, pour se protéger des effets oxydants de l'HE, *Plasmodium* possède un mécanisme de détoxification de l'HE par lequel l'HE libre produite lors de cette digestion est convertie en un polymère insoluble nommé hémozoïne (HZ) (Carney *et al.*, 2006). Ainsi, suite à la digestion de l'Hb par *Plasmodium*, de l'HE oxydé, de l'HZ ainsi que des EROs sont produits par le mécanisme malarique de détoxification de l'HE (Fitch et Kanjanangulpan, 1987 ; Omodeo-Salè *et al.*, 2005). Ces métabolites sont subséquentement relâchés lors de la lyse des GRs infectés, en plus de composantes cellulaires comme des fragments de membranes lipidiques (Sherman, 1998).

### 1.2.3 L'hémozoïne

L'HZ issue de la rupture des GR est rapidement phagocytée par des neutrophiles et monocytes avoisinants. Des études par microscopie confocale ont déterminé que l'HZ est observable plus de 72h suivant son ingestion, ce qui implique que l'HZ est réfractaire à la destruction usuelle par flambée oxydative qui est réservée au matériel phagocyté, ainsi qu'à la dégradation par l'enzyme hème-oxygénase-1 (Schwarzer *et al.*, 2001). L'HZ est capable de générer des métabolites secondaires hautement réactifs en interagissant avec lipides membranaires des érythrocytes, comme le 4-hydroxy-2-nonenal et l'acide 15-S-hydroxyeicosatetraénoïque. Ceci semble être le mécanisme par lequel l'HZ inhibe sa destruction par la flambée

oxydative, puisque l’HZ purifiée de débris de GRs n’inhibe plus la flambée oxydative (Carney *et al.*, 2006). En plus d’affecter la flambée oxydative, l’HZ perturbe plusieurs autres fonctions cellulaires, notamment la phagocytose, la destruction de bactéries, de mycètes ou de cellules cancéreuses ingérées (Carney *et al.*, 2006 ; Schwarzer *et al.*, 1998) et la réponse à l’IFN- $\gamma$  (Schwarzer *et al.*, 1998). Une augmentation de la concentration en HZ stimule par ailleurs la sécrétion de molécules immunomodulatrices comme la prostaglandine E<sub>2</sub> ainsi que le MIF (Martiney *et al.*, 2000).

Il a aussi été démontré que l’HZ est en mesure d’agir comme ligand de Toll-Like Receptor 9 (TLR-9) - un récepteur à reconnaissance de motifs généraux - et donc comme activateur des cellules portant ce récepteur au niveau de l’immunité innée (Coban *et al.*, 2007). Au niveau de l’immunité adaptative, l’HZ a été identifiée comme une substance capable de moduler l’activité des cellules dendritiques, menant à une plus faible activation de lymphocytes T (Millington *et al.*, 2006). Il existe deux types d’HZ utilisés expérimentalement, soit l’HZ synthétique synthétisée en laboratoire – nommé dans la littérature  $\beta$ -hématine - et l’HZ native purifiée de sources primaires. Cette distinction est importante dans la mesure où les deux ne génèrent les mêmes réactions dans des conditions identiques (Coban *et al.*, 2007).

L’HZ a aussi été démontrée comme étant en mesure de provoquer directement la sécrétion de MIF, une cytokine ayant un rôle important au niveau de la régulation de la réponse immunitaire adaptative (Martiney *et al.*, 2000).

#### 1.2.4 Le stress oxydatif et la malaria

Il est important de se rappeler que la modulation de l’état redox par *Plasmodium* et ses métabolites peut potentiellement mener à des effets autres que l’endommagement des cellules affectées. Des EROs sont produites de façon

constitutive par le métabolisme cellulaire, notamment au niveau de la chaîne de transport d'électrons des mitochondries (Murphy, 2009). Les EROs sont aussi utilisées par les cellules phagocytaires comme outil pour disposer de leur cible de phagocytose par l'entremise de la flambée oxydative (Klebanoff, 1980). Néanmoins, les EROs peuvent causer d'importants dommages à l'environnement cellulaire lorsque leur production dépasse la capacité des mécanismes de détoxification du corps, ce qu'on nomme le stress oxydatif. Il existe toutefois une gradation des effets liés à l'augmentation des niveaux d'EROs. En effet, des perturbations mineures de l'état redox semblent faire partie des nombreux mécanismes de signalisation employés par les cellules pour contrôler leurs processus biochimiques en contrôlant l'activation de protéines comme les MAP kinases (Fujimura *et al.*, 2010b ; Jay Forman et Torres, 2001 ; Ushio-Fukai, 2009). Au niveau du système immunitaire, par exemple, la signalisation par EROs est particulièrement importante pour la polarisation  $T_H1/ T_H2$  (Frossi *et al.*, 2008 ; Kikuchi *et al.*, 2010). Le stress oxydatif exercé par les EROs diminue les niveaux d'antioxydants dans l'environnement cellulaire, en particulier les niveaux de GSH, l'antioxydant le plus important produit par le corps. Il a été démontré qu'une telle réduction des niveaux de GSH cellulaire est corrélée avec un affaiblissement du profil  $T_H1$  et une augmentation conséquente du profil  $T_H2$  (Peterson *et al.*, 1998). Une étude subséquente a identifié le même phénomène au niveau des  $M\phi$ , qui deviennent polarisés  $T_H1/ T_H2$  en fonction de leur ratio GSH/GSSG. Les  $M\phi$  sécréteront de l'IL-12 ou de l'IL-10 en fonction de leur ratio de GSH/GSSG intracellulaire, soit élevé ou faible, respectivement. Ces cytokines agissant comme régulateurs importants de la polarisation  $T_H1/ T_H2$  dans le corps, l'état redox des  $M\phi$  est donc en mesure de moduler le dénouement des réponses immunitaires environnantes (Kidd, 2003 ; Murata *et al.*, 2002).

## 1.2.5 La réponse immunitaire adaptative

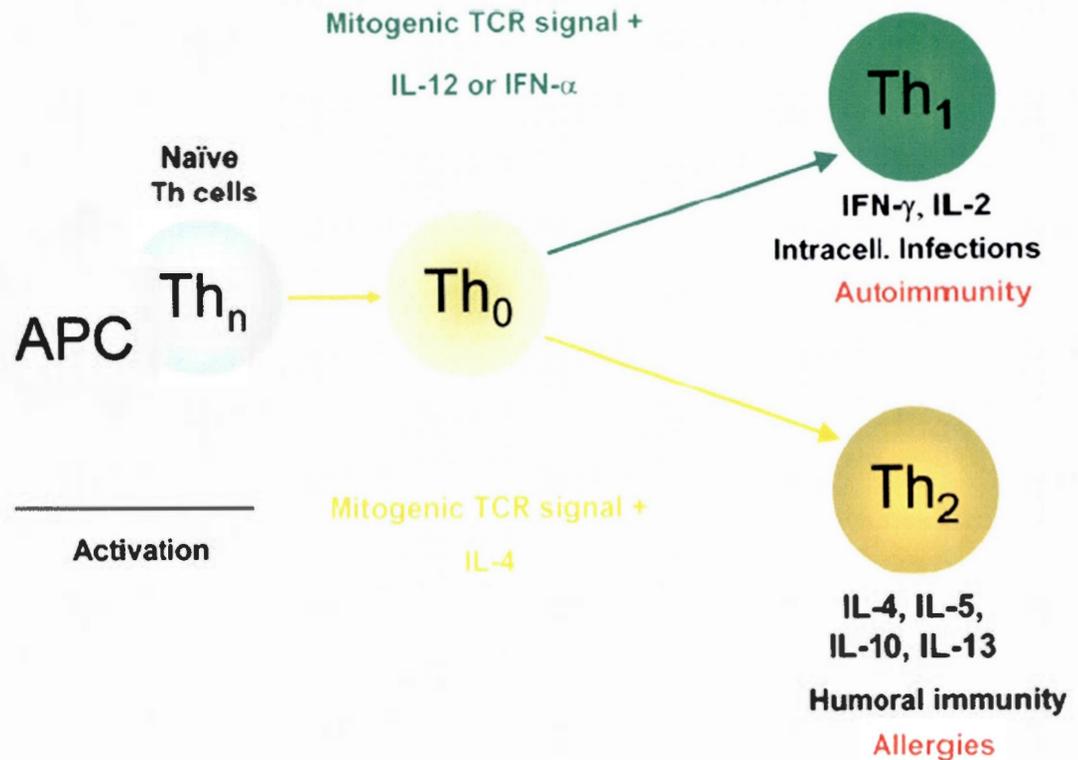


Figure 1.2 : Schéma démontrant la différenciation des cellules T auxiliaires CD4. Suite à la stimulation du récepteur des cellules T (TCR) par le peptide antigénique relié à la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ( CMH II) d'une cellule présentatrice d'antigène (APC), les cellules T naïves  $Th_0$  se différencient vers un profil  $Th_1$  ou  $Th_2$ , en fonction des cytokines auxquelles elles seront exposées. Figure tirée du site de Nature<sup>2</sup>.

Durant la malaria, l'immunité adaptative dépend de la capacité des cellules T auxiliaires CD4 ( $T_H$ ) à s'engager dans une voie, le plus souvent  $T_H1$  ou  $T_H2$  afin

<sup>2</sup>

[http://www.nature.com/jidsp/journal/v9/n1/fig\\_tab/5640125f1.html?url=/jidsp/journal/v9/n1/full/5640125a.html](http://www.nature.com/jidsp/journal/v9/n1/fig_tab/5640125f1.html?url=/jidsp/journal/v9/n1/full/5640125a.html)

d'activer les fonctions nécessaires à l'élimination du parasite (Figure 1.2). Deux signaux sont requis pour l'activation des cellules T CD4, soient la stimulation du récepteur de cellules T ( $R_cT$ ) avec un complexe peptide-complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) présenté par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et la co-stimulation des récepteurs CD28 des cellules T CD4 par des molécules accessoires, soient B7-1 ou B7-2, issues des CPA (Rincon, Flavell et Davis, 2001). La différenciation subséquente en cellule  $T_{H1}$  ou  $T_{H2}$  dépend du rapport en cytokines dans l'environnement cellulaire, soit IL-12, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  pour les  $T_{H1}$  et IL-4, IL-13 et IL-6 pour les  $T_{H2}$  (Kindt *et al.*, 2006).

L'état redox joue aussi un rôle important dans le développement de ces types cellulaires, le stress oxydatif les poussant vers un phénotype  $T_{H2}$  (King *et al.*, 2006 ; Snelgrove *et al.*, 2006). Suite à ceci, les lymphocytes  $T_{H1}$  ou  $T_{H2}$  exprimeront le récepteur d'IL-2 tout en sécrétant la cytokine elle-même, mécanisme faisant office de signal de prolifération (Rincon, Flavell et Davis, 2001). Dans le cas des cellules  $T_{H1}$ , les cellules dendritiques activées par la stimulation de leurs TLR par des produits du non-soi, comme des peptides d'origine parasitaire, exprimeront davantage le CMH II ainsi que les cytokines IL-6, IL-23 et plus particulièrement l'IL-12 et les signaux co-stimulateurs nécessaires à l'activation cellulaire (Mikhak et Luster, 2009). En réponse, les lymphocytes  $T_{H1}$  secrètent de l'IFN- $\gamma$  qui stimulera les CD $\phi$  et M $\phi$  environnants à produire d'avantage d'IL-12 (Kim *et al.*, 2004) ainsi qu'à inhiber l'expansion des populations  $T_{H2}$  (Kindt *et al.*, 2006).

L'activation du phénotype  $T_{H2}$  est un phénomène encore très peu connu durant la pathologie malarique. Il est bien connu qu'un environnement où il y a prédominance de substances oxydantes mène préférentiellement à des réponses de type  $T_{H2}$  (Kikuchi *et al.*, 2010; Tripathi, Singh et Arora, 2008). Paradoxalement, malgré le fait que l'IL-4 soit l'une des cytokines les plus importantes sécrétées par

les lymphocytes  $T_H2$ , ceux-ci ont besoin d'une source externe de cette cytokine afin d'entamer leur différenciation en  $T_H2$  (Kindt *et al.*, 2006). De plus, les cellules dendritiques ne peuvent pas induire ce type de réponse puisqu'elles sont incapables de produire l'IL-4 (Macatonia *et al.*, 1993). Ainsi, il doit exister un type cellulaire autre que les cellules dendritiques qui est responsable de la production initiale d'IL-4 nécessaire aux réponses  $T_H2$ .

#### 1.2.6 La malaria chez les souris

L'infection par *Plasmodium* est résolue par une réponse  $T_H1$  et  $T_H2$ . En effet, la phase aigüe de la malaria est maîtrisée par les réponses de type  $T_H1$ . Il a en effet été déterminé que lors d'une infection, la production de la cytokine  $T_H1$ -modulante IFN- $\gamma$  augmente dramatiquement jusqu'au pic infectieux. La réponse  $T_H2$  prend la relève lorsqu'une infection devient chronique, mais est aussi soupçonnée comme étant nécessaire à la clairance complète du parasite. En effet, l'immunité à long terme contre *Plasmodium* dépend d'anticorps spécifiques IgG1 chez la souris, qui découlent d'une réponse  $T_H2$  efficace (Taylor-Robinson, 1995). Une exploration plus approfondie des détails de cet équilibre  $T_H1/T_H2$  est possible par l'entremise de l'utilisation de deux souches de *Plasmodium chabaudi adami*, les souches DK et DS. La souche DK est une souche qui provoque une infection qui est résolue après 12 jours d'infection, est qui est un très bon modèle pour étudier la réponse immunitaire adaptative (Taylor-Robinson, 1995). La souche DS se réplique plus rapidement, est induite une infection mortelle, en partie parce qu'elle génère une production plus importante d'IL-4 que la souche DK lors de la phase précoce d'infection (3-4<sup>e</sup> jour d'infection) (Phillips, 2010).

### 1.2.7 L'élimination du parasite

Des études impliquant le transfert passif d'anticorps ont permis de déterminer que l'immunité protectrice contre *Plasmodium* dépend du type et de la quantité d'anticorps antiparasitaires présents dans le sérum du patient (Cohen, McGregor et Carrington, 1961), soient les Ig cytophiles IgG1/IgG3 chez les humains et les IgG2a chez les souris, ayant comme mécanisme d'action principal l'inhibition anticorps-dépendante à médiation cellulaire (ADCI) des cellules affectées. La production d'IFN- $\gamma$  est essentielle pour la production de ces anticorps, mais bloque la production d'IgG et d'IgE, qui contribuent grandement à la pathologie en stimulant la libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes, et aussi dans le cas de malaria cérébrale par la formation de complexes immuns pro-inflammatoires (Bouharoun-Tayoun et Druilhe, 1992 ; Snapper, Peschel et Paul, 1988).

Ainsi, l'infection chez la souris BALB/c par *P. c. adami*, l'espèce de parasite utilisée dans notre laboratoire, est contrôlée par l'activation des M $\phi$  et par la commutation isotypique de la production d'anticorps produits par les lymphocytes B d'IgM à IgG cytophiles sous l'égide des lymphocytes T<sub>H</sub>1 (Taylor-Robinson, 2010). Il a été observé que les souris infectées par *Plasmodium c.chabaudi* AS, un parasite qui ressemble *P.c. adami* DK, développent une réponse robuste de type T<sub>H</sub>2, et ce particulièrement autour du pic de parasitémie (8<sup>e</sup> jour d'infection). Des analyses cytofluorométriques de lymphocytes spléniques et sanguins ont montré qu'il existe une population de NBNT répondant à l'IL-3 qui est activée concurremment, soit entre 9 et 23 jours après l'infection avec un pic à 15 jours. Cette population en expansion corrèle avec l'apparition d'une population cellulaire qui, suite à une stimulation par l'IL-3, produit de l'IL-4 et de l'IL-6 de façon partiellement indépendante à une stimulation par le récepteur à haute affinité des IgE (Fc $\epsilon$ ) (Helmbly, Kullberg et Troye-Blomberg, 1998). Des études subséquentes ont été

effectuées en utilisant *Schistosoma mansoni*. Ce dernier est un trématode parasite cliniquement important chez l'Homme, causant une pathologie qui initialement est superficiellement similaire à celle issue de *Plasmodium*, qui s'appelle la bilharziose intestinale. Il a été déterminé que durant la bilharziose, l'infection par *S. mansoni* induit une réponse de type  $T_H2$ . Il a aussi été possible d'identifier chez les souris affectées une population cellulaire Fc $\epsilon$ R-positive, représentant 0.53% des cellules NBNT isolées de rates de souris et produisant de l'IL-4 lorsque exposée à des antigènes parasitaires (Williams *et al.*, 2004).

Ces observations suggèrent que les cellules NBNT sont probablement des basophiles et/ou des mastocytes, et qu'elles sont impliquées dans la production initiale d'IL-4, responsable du développement d'une réponse de type  $T_H2$ . Les deux types cellulaires sont notamment sensibles à l'IL-3, expriment le Fc $\epsilon$ R de façon constitutive, (Lantz *et al.*, 1998 ; Pawankar, 2001) et sont d'ailleurs connues comme étant en mesure de produire rapidement de l'IL-4 (Min *et al.*, 2004 ; Weiss et Brown, 2001).

#### 1.2.8 Les basophiles

Les basophiles sont les granulocytes les moins communs du sang, tant chez l'humain que chez la souris, composant moins d'un pour cent de leur nombre total. Ils sont présents dans la moelle et la rate dans des proportions similaires. Les basophiles sont générés dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs granulocyte-monocyte, tout comme les mastocytes. Leur cycle de vie, qui dure quelques jours, les voit arriver à maturation dans la moelle osseuse, puis être évacués dans le sang, où ils restent jusqu'à leur élimination (Schroeder, 2009; Huang *et al.*, 2009; Karasuyama *et al.*, 2007; Galli et Wedemeyer, 2000). Jusqu'à très récemment, il a été difficile d'isoler les basophiles en partie à cause de leur court cycle de vie, mais aussi dû au

fait que ces cellules n'exhibent pas de marqueurs de surface spécifiques. Leur identification est possible en effectuant un marquage double pour détecter le phénotype  $Fc\epsilon R^+$  et  $ckit^-$  (Huang *et al.*, 2009, Crocker *et al.*, 2004; Angata *et al.*, 2001.).

Suite au développement d'un modèle murin permettant de localiser facilement l'IL-4 par Min *et al.* (2004), il a été constaté que les basophiles expriment constitutivement de l'IL-4. Il a d'ailleurs été démontré que des infections associées à une polarisation  $T_H2$ , telles que l'infection avec *Nippostrongylus brasiliensis*, un nématode parasite, se caractérisent par une accumulation de basophiles partiellement IL-3-dépendante mais  $Fc\epsilon R$ -indépendante. Ces cellules sont une source importante d'IL-4 pour l'organisme, ayant un pic de production autour du 9<sup>e</sup> jour d'infection. La production d'IL-4 par les basophiles ne nécessite pas la présence d'IL-4 préalable, ni une stimulation au niveau du  $Fc\epsilon R$ . Néanmoins, l'IL-3 et l'IL-18 produites par les lymphocytes T  $CD4^+$  augmentent la production d'IL-4 par les basophiles. Les lymphocytes T  $CD4^+$  et le système IL-3/IL-3R sont aussi nécessaires pour la migration des basophiles d'un tissu à l'autre durant l'infection (Min *et al.*, 2010 ; Min *et al.*, 2004). L'augmentation de production d'IL-4 a été associée à une prolifération des basophiles, dont la population passe de 0.6% des cellules recensées dans la moelle osseuse jusqu'à 1.5% durant l'infection. Leur production d'IL-4 a d'ailleurs une origine différente de celle des lymphocytes T  $CD4^+$ , puisque les basophiles n'expriment pas GATA-3, le facteur de transcription régulant la production d'IL-4 par les lymphocytes  $T_H2$  (Min *et al.*, 2004).

Expérimentalement, les basophiles sont souvent activés par l'entremise d'un pontage des IgE fixés sur leurs  $Fc\epsilon RI$  (Sokol et Medzhitov, 2010). Par l'intermédiaire d'une présentation antigénique via le CMH II, les basophiles semblent capables de promouvoir la prolifération des lymphocytes T  $CD4^+$  de façon spécifique à l'antigène vers le phénotype  $T_H2$  et provoquent une augmentation du rapport IgE/IgG1

(Perrigoue *et al.*, 2009 ;Yoshimoto *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les basophiles seraient le type principal de CPA lors d'une réponse de type  $T_H2$  (Mikhak et Luster, 2009). En plus du pontage des IgE, il existe d'autres mécanismes d'activation chez les basophiles, notamment l'activation par des protéases de manière FCR $\epsilon$  indépendante. Sokol *et al* (2010) ont démontré que le traitement des basophiles avec des protéases telle la papaine les amènent à sécréter de l'IL-4, tout en exprimant davantage le CMH II ainsi que les molécules de co-stimulation requises pour l'activation des lymphocytes T CD4 $^+$ .

### 1.2.9 Les mastocytes

Les mastocytes, comme les basophiles, sont des granulocytes provenant de la moelle osseuse. Contrairement aux basophiles, ils ont un cycle de vie similaire à celui des macrophages : expulsés dans le sang, ils ne terminent leur maturation que lorsqu'ils sont entrés dans un tissu vascularisé, où ils survivent pendant quelques mois. Une revue de la littérature n'a permis de découvrir aucune valeur comparative quant à l'abondance des mastocytes dans différents tissus (Galli, Borregaard et Wynn, 2011; Galli et Wedemeyer, 2000). Tout au plus il ne devrait pas y avoir de mastocytes matures circulant dans le sang - les mastocytes se développent dans la moelle, et ne deviennent matures seulement lorsqu'ils sont rendus dans leurs tissus cibles (Chen *et al*, 2005). Les mastocytes sont identifiés par leur récepteurs de surface - Fc $\epsilon$ R $^+$  et Ckit $^+$  (Galli, Borregaard et Wynn, 2011; Ryan *et al*; 2007 Galli *et al*, 2005)

La production d'IL-4 par les mastocytes semble être gérée de façon plus directe que chez les basophiles. Le mécanisme principal de sécrétion d'IL-4 est régi par une stimulation au niveau du FcR $\epsilon$  par des IgE (Weiss et Brown, 2001). Une sécrétion subséquente est rapidement possible, puisque les mastocytes sont en

mesure de ré-initier la transcription des gènes codant pour cette cytokine 15 minutes après la sécrétion initiale. Il a été observé qu'une flambée oxydative a lieu dans les mastocytes suite à la stimulation par l'IgE, et qu'une suppression des EROs produites inhibe la sécrétion d'IL-4 (Yoshimaru *et al.*, 2002). Ainsi, l'état redox des mastocytes est un mécanisme modulateur important de leur état fonctionnel (Swindle et Metcalfe, 2007; Wolfreys et Oliveira, 1997), les EROs agissant comme activateurs pour ces cellules. Il a par ailleurs été établi que le stress oxydatif cause via la production d'EROs une sensibilisation à la sécrétion d'IL-4 chez ces cellules (Wolfreys et Oliveira, 1997).

#### 1.2.10 Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages

Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par l'hypophyse ainsi que par les M $\phi$  et les lymphocytes T (Bucala, 1996). La production de MIF est constitutive à bas niveaux, mais aussi induite, étant provoquée par la sécrétion de glucocorticoïdes, et semble avoir pour effet de modérer leur action sur le système immunitaire (Donnelly et Bucala, 1997). Le MIF est aussi sécrété par les M $\phi$  et les lymphocytes T lors d'une exposition aux lipopolysaccharides (LPS) issus des membranes cellulaires externes des bactéries gram négatives. Le MIF annule de manière dose-dépendante l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la production de cytokines pro-inflammatoires chez les M $\phi$  stimulés par des LPS Sakamoto *et al.*, 2002). Son expression est constitutive, mais est plus grande pour les cellules de type T<sub>H</sub>2 (Bacher *et al.*, 1996).

Le MIF joue un rôle important au niveau de la régulation de l'inflammation dans le corps et est impliqué dans la genèse des réactions d'hypersensibilité de type IV (Bloom et Bennett, 1966 ; David, 1966). Plus récemment, un lien entre le MIF et les réactions d'hypersensibilité de type I comme l'asthme a été démontré (Wu *et al.*,

2009). L'asthme est une pathologie générée par une réponse de type  $T_H2$ , qui amène à un état d'hypersensibilité chronique face à des allergènes par activation de cellules granulocytes, et qui se solde par l'inflammation des voies respiratoires. L'intensité de cette pathologie semble être corrélée au niveau d'expression du rapport entre les facteurs de transcription T-BET et GATA3, qui régissent respectivement l'expression des phénotypes  $T_H1$  versus  $T_H2$  (Choy *et al.*, 2011; Kidd, 2003).

Le MIF est un élément d'intérêt lors des pathologies inflammatoires  $T_H2$ -dépendantes, notamment au niveau de l'asthme, du contrôle de pathologies helminthiques et lors des réactions allergiques (Cho et Moon, 2010 ; Kobayashi *et al.*, 2006 ; Mizue *et al.*, 2005 ; Stavitsky *et al.*, 2003). Le MIF agit comme un régulateur de la thioredoxine et des glucocorticoïdes, jouant un rôle important dans la réponse antioxydant du corps (Flaster *et al.*, 2007 ; Kondo *et al.*, 2004). Lors de la réponse immunitaire, le MIF régit plusieurs facteurs pertinents au dénouement de l'infection. Au niveau des  $M\phi$ s, le MIF augmente l'expression des TLR-4 et du facteur de transcription nucléaire  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (Roger *et al.*, 2001). Le MIF cause aussi chez les  $M\phi$ s une augmentation de la production de  $H_2O_2$  et de NO. Des études antérieures effectuées par notre laboratoire ont montré que le MIF semble avoir un effet sur la clairance parasitaire de *Plasmodium chabaudi adami* DK (Figure 1.3).

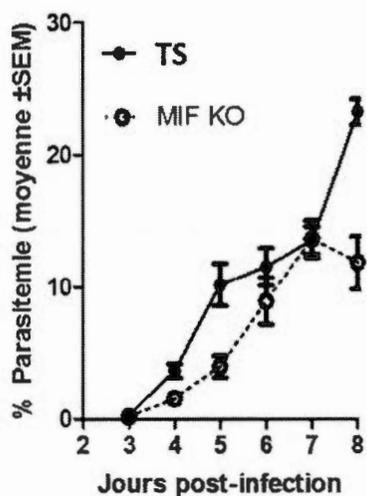


Figure 1.3 : Cinétique de parasitémie suite à l'infection par *P. c. adami* souche DK chez la souris BALB/c TS et MIF KO (Tshikudi Malu *et al*, 2011).

Il a été démontré par notre laboratoire que le MIF joue un rôle dans la régulation redox des cellules, puisque les cellules spléniques MIF-KO possèdent un ratio de GSH/GSSG plus élevé ainsi qu'un niveau d'EROs plus bas que les cellules sauvages (Scorza T, résultats non publiés). De plus, la sécrétion du MIF lui-même dépend de l'état redox environnant. Fukuzawa *et al* (2002) ont démontré qu'un environnement hautement oxydant était en mesure de provoquer la sécrétion de MIF déjà présent dans des vésicules cellulaires.

### 1.3 Les hypothèses de travail

Une étude effectuée dans notre laboratoire montre que lors d'une infection par *P.c. adami* DK, les souris BALB/c MIF KO génèrent moins d'IL-4 au début de l'infection (jour 4) et contrôlent mieux l'infection (Tshikudi Malu *et al*, 2011). Nous proposons que chez les souris exprimant le MIF, la production précoce d'IL-4 lors de l'infection par *P.c. adami* DK est induite par les basophiles ou les mastocytes, étant donné que de cultures de cellules de la rate de souris, exemptées de cellules T par triage magnétique, sont les productrices les plus importantes d'IL-4. Cette réponse est nettement plus faible chez de cellules en provenance de souris MIF KO infectées. Le présent projet a eu pour but de comparer l'effet de l'infection par *P. c. adami* sur la population de basophiles dans la moelle, sang et rate de souris TS et MIF KO infectées, les jours 4 et 8 d'infection. Nous avons utilisé les souches DK et DS, pour corroborer si de différences existent entre les deux types d'infection, connues pour générer moins et plus d'IL-04 durant la phase précoce d'infection, respectivement.

Ainsi, les objectifs visés par le présent projet ont été les suivants :

1. Identifier la population de granulocytes (basophiles versus mastocytes) en expansion durant la phase précoce d'infection par *P.c. adami* souches DK et DS.
2. Comparer cette réponse chez des souris déficientes en MIF.
3. Comparer la capacité de précurseurs de la moelle osseuse de souris TS et MIF KO à se différencier en basophiles *in vitro*, et à sécréter de l'IL-4

Afin de compléter les objectifs mentionnés ci-haut, la production d'IgE par des souris TS et KO au pic infectieux a été comparée, afin de corroborer d'avantage le lien entre le génotype et la prédisposition  $T_H1/T_H2$ .

## 2 MANIPULATIONS

### 2.1 La méthodologie

#### 2.1.1 Infections

Les infections ont été effectuées chez des souris femelles BALB/c MIF-KO ( $n \geq 3$  par expérience) âgées de six à huit semaines (un don de couples reproducteurs du Dr. Abhay Satoskar, Ohio State University). Des souris femelles ont été choisies à cause de leur capacité intrinsèque de résister plus à l'infection (Klein *et al*, 2008), c'est qui justifie plus leur utilisation du point de vue éthique. Des souris BALB/C femelles TS du même âge ont été utilisées comme contrôles (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). La souche *P. c. adami* DK a été utilisée pour la majorité des infections (Isolat 556KA, gracieuseté de D. Walliker, University of Edinburgh). La souche létale *P. c. adami* DS expériences (gracieuseté de Terence Spithill, McGill) fut utilisée dans certaines. La malaria a été induite chez les souris par injection de  $10^4$  GR parasites provenant de stabilats issus de souris préalablement infectées par voie intrapéritonéale. Les manipulations ont été effectuées en accord avec les normes du Comité institutionnel de protection des animaux de l'Université du Québec à Montréal (protocole 0511-720-0512).

#### 2.1.2 Quantification de la parasitémie

La parasitémie a été confirmée commençant 3 jours après l'infection, par l'analyse d'un frottis sanguin effectué suite à un prélèvement de sang à l'extrémité de la queue des souris. Le frottis sanguin a subséquemment été fixé au méthanol et par la suite coloré avec du Giemsa 10% dans du PBS (Sigma, Montréal, Québec, Canada).

Le pourcentage de GRs parasités fut établi par observation visuelle d'un champ de microscope (Scorza *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Prélèvements des cellules des souris

Les animaux ont été euthanasiés par inhalation de CO<sub>2</sub> au temps spécifié. La rate a été isolée chirurgicalement puis homogénéisée dans 5 mL de RPMI 1640 (Thermo Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Les cellules de moelle osseuse ont été extraites par lavage de la cavité médullaire du fémur avec du RPMI 1640. Les cellules ont été recueillies dans des pétris de culture (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada). Les GRs présents furent lysés par l'addition d'une solution de NH<sub>4</sub>Cl 8.3g/L durant 3 min (Sigma, Saint Louis, Montana, USA). Subséquemment, les cellules ont été lavées dans 10 mL de RPMI-1640 et le culot ajusté à une concentration de  $4 \times 10^6$  cellules/mL, dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% FBS 1% HEPES, de la pénicilline et de la streptomycine 75µg/mL (considéré comme le milieu complet) (Invitrogen, Montréal, Québec, Canada).

### 2.1.4 Marquages des cellules de la moelle et de la rate de souris infectées et naïves par cytofluorométrie

Les différents types cellulaires ont été marqués à l'aide d'anticorps spécifiques conjugués à des fluorochromes, soient FcεR-FITC et C-kit-PE, tous deux ciblés chez la souris (Biolegend, San Diego, California, USA). L'échantillon fut quantifié par cytofluorométrie à l'aide d'un cytofluoromètre FACscan. Pour les cellules issues de la moelle osseuse et de la rate, 500 µL d'une solution de  $10^6$  cellules/mL ont été préparés pour chaque type cellulaire, et par la suite marqués par l'ajout d'un microlitre (1µg/mL concentration finale) de chaque anticorps. Après une incubation de 10 min à la noirceur, les échantillons ainsi traités ont à leur tour été quantifiés

par cytofluorométrie à l'aide d'un cytofluoromètre FACscan. Les marquages effectués ont permis de déterminer le pourcentage des basophiles (cellules FcεR+cKIT-) dans la moelle osseuse et rate, et des mastocytes (cellules FcεR-cKIT+) dans la rate. Ces dernières atteignent leur maturation dans des tissus.

#### 2.1.5 Différenciation de basophiles in vitro et sécrétion d'IL-4

Pour les essais de différenciation, la moelle osseuse de souris TS et MIF KO a été isolée stérilement des fémurs par centrifugation (100 g/10 min), et les cellules ont été resuspendues à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans du milieu complet additionné de 30 ng/mL d'IL-3 (Stemcell, Vancouver, British Columbia, Canada), puis incubées 4 jours à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été analysées pour la quantification de cellules FcεR+cKIT- à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes, soit FcεR-FITC et cKIT-PE (Biolegend, San Diego, California, USA).

#### 2.1.6 Dosage des IgE

Un dosage des IgE durant le pic d'infection (Jour 8) a été effectué. Le sang des souris TS et MIF KO (n= 3) fut recueilli par ponction cardiaque lors de leur euthanasie, et un pool de sérum fut préparé à partir de celui-ci par centrifugation (1200 g, 30 minutes). La détermination de la concentration d'IgE a été faite par ELISA chez le sérum dilué 1/20 par l'entremise de l'utilisation d'un kit (Biolegend, San Diego, California, USA) selon les instructions du manufacturier.

#### 2.1.7 Dosage d'IL-4

Le surnageant issu des cultures de moelle osseuse a été isolé. La détermination de la concentration d'IL-4 a été faite par ELISA par l'entremise de l'utilisation d'un kit (Biolegend, San Diego, California, USA) selon les instructions du manufacturier.

### 2.1.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Des analyses de type test de t non-paramétriques furent effectuées pour des expériences avec au moins 3 réplicas, les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

## 2.2 Résultats

### 2.1.1 Analyse de la population des basophiles et mastocytes chez les souris naïves.

Afin de comparer les génotypes sauvages et MIF KO utilisés dans notre étude, les populations de basophiles et mastocytes ont été d'abord comparées chez des souris BALB/c sauvages (TS) et MIF-KO naïves (en absence d'infection), en compilant les données de toutes les expériences réalisées avec des souris BALB/c naïves comme contrôles. Pour chaque population et organe (moelle et rate pour les basophiles; rate pour les mastocytes), les pourcentages et nombres absolus de basophiles (cellules  $FCR\epsilon^+cKIT^-$ ) et mastocytes (cellules  $FCR\epsilon^+cKIT^+$ ) ont été estimés par cytofluorométrie en flux, tel que représenté dans la figure 2.1.

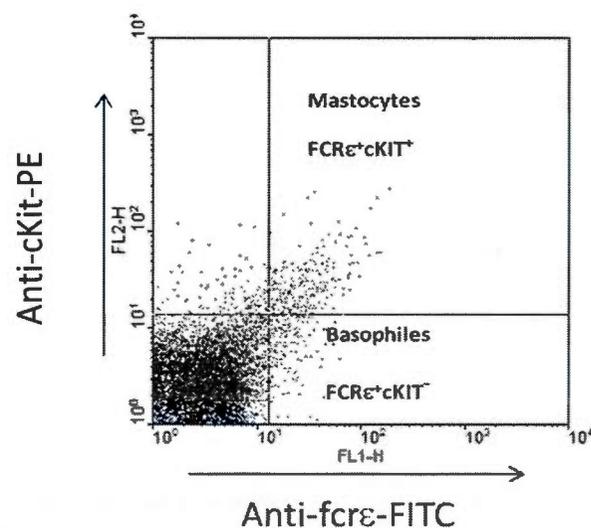


Figure 2.1: Discrimination par cytofluorométrie de flux des basophiles et mastocytes dans un échantillon de rate de souris BALB/c TS naïve. Une suspension cellulaire de la rate a été préparée (voir méthodologie pour les détails) et les cellules ont été marquées avec des anticorps anti- $FCR\epsilon$ -FITC et anti-cKIT-PE. Les basophiles (cellules  $FCR\epsilon^+$  et  $cKIT^-$ ) constituent 0.9% de cet échantillon, et les mastocytes (cellules  $FCR\epsilon^+$  et  $cKIT^+$ ), 1.36%.

Chez les souris naïves, aucune différence significative n'a été constatée entre les génotypes sauvages (TS) et MIF KO par rapport aux pourcentages de basophiles présentes dans la rate (Figure 2.2 A) et la moelle osseuse (Figure 2.2 B).

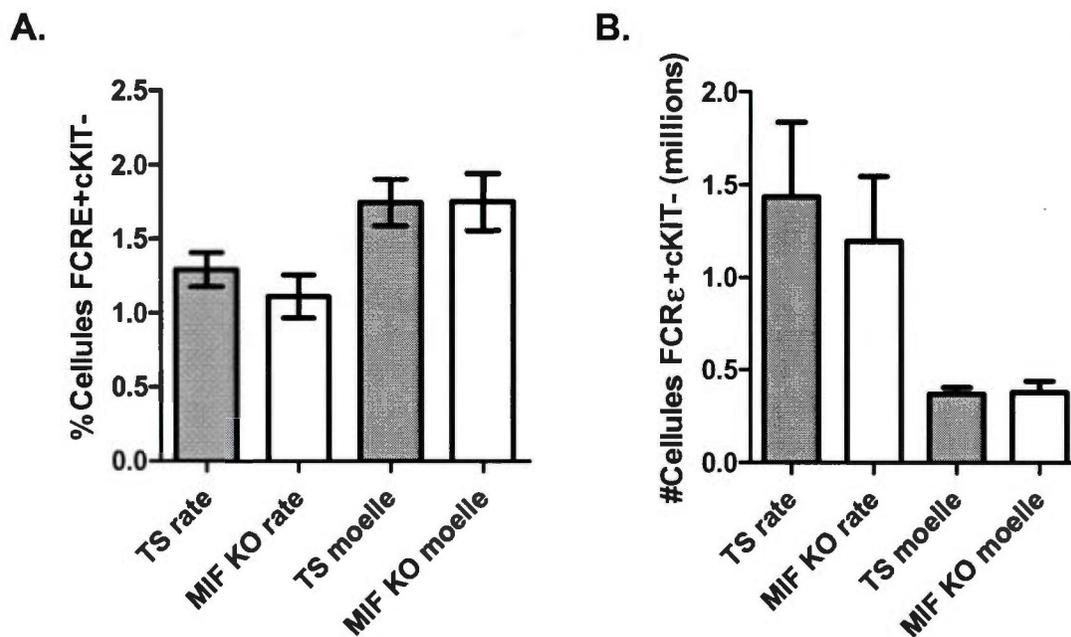


Figure 2.2: Quantification cytofluorométrique du pourcentage des basophiles (cellules FCRε<sup>+</sup> et cKIT<sup>-</sup>) dans la rate et la moelle osseuse de souris BALB/c TS et MIF KO naïves. (A) Pourcentage relatif par rapport à toutes les cellules présentes (n≥5). (B) Nombre absolu de basophiles recensées (n≥4).

La même observation a été effectuée au niveau des mastocytes (Figure 2.3). Puisque les mastocytes se trouvent sur leur forme différenciée seulement hors de la moelle osseuse, une quantification dans celle-ci n'a pas été effectuée.

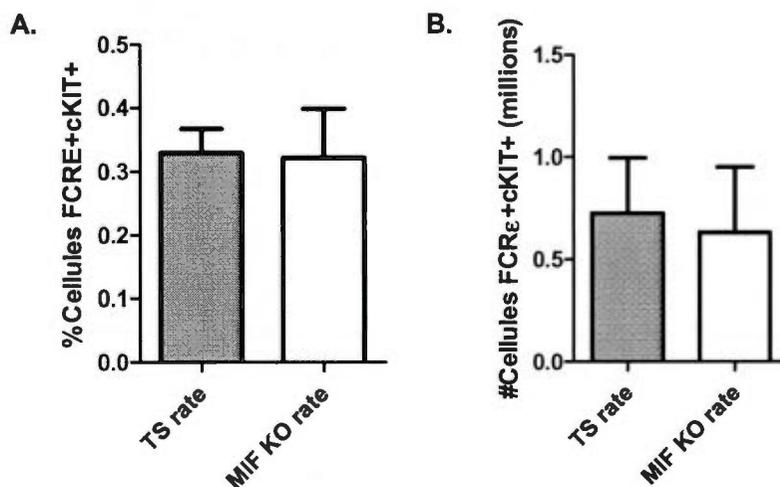


Figure 2.3: Quantification cytofluorométrique du pourcentage des mastocytes (cellules FCRε+ et cKIT+) dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO naïves. (A) Pourcentage relatif par rapport à toutes les cellules présentes (n≥5). (B) Nombre absolu de mastocytes recensées (n≥4).

### 2.2.2 Effet de l'infection par la souche non-virulente *P. c. adami* DK (jour 4 post-infection).

Nous avons évalué l'effet de l'infection par *P. c. adami* DK sur les populations de basophiles et mastocytes dans la moelle et rate. Le 4e jour de l'infection avec la souche DK représente la phase précoce qui précède l'activation des mécanismes immuns adaptatifs. Une étude préliminaire (Tshikudi Malu et al., 2011) a démontré une parasitémie plus faible chez les souris MIF KO ainsi qu'une diminution significative de la production d'IL-4 par les splénocytes de souris MIF KO le jour 4 post-infection avec *P.c. adami* DK. Nous avons corroboré cette baisse de la parasitémie chez des souris MIF KO infectées par rapport aux contrôles TS infectés (Figure 2.4 A). Les souris TS ont développée une parasitémie de 1.03%, soit plus de deux fois celle de la cohorte MIF KO, 0.48%.

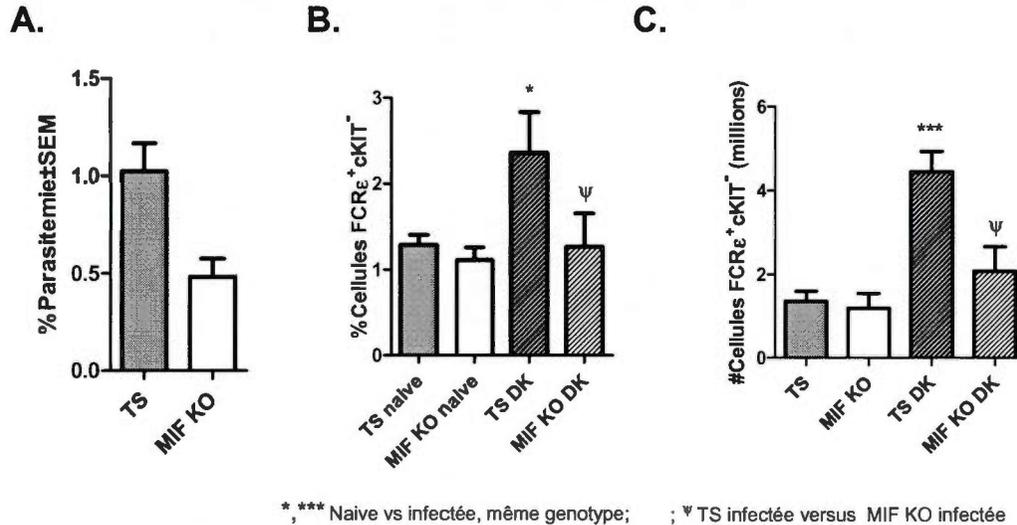


Figure 2.4: Profil des basophiles (FCRε<sup>+</sup> et cKIT<sup>-</sup>) présents dans la rate chez des souris TS et MIF KO au 4e jour d'infection avec la souche *P. c. adami* DK. (A) Parasitémie mesurée par l'analyse de frottis sanguins au 4e jour post-infection chez les individus TS et MIF KO (n=4). (B) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la rate prélevée des souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n≥5). (C) Nombre absolu de basophiles calculés en fonction du nombre de cellules dans la rate et le pourcentage estimé par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n≥4). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées (\*\*\*, \*, p<0.001 et 0.05) et entre les souris TS et MIF KO infectées (Ψ, p<0.05) en utilisant un TEST Student.

Chez les souris TS, l'infection par DK a amenée à une augmentation significative du pourcentage et du nombre absolu de basophiles dans la rate, ceux-ci passant de 1.29% à 2.36%, et de  $1.35 \times 10^6$  cellules à  $4.45 \times 10^6$  cellules, respectivement (Figure 2.4 B; p<0.05). Cet effet était plutôt modeste chez les souris MIF KO, chez lesquelles aucun effet significatif a été constaté au niveau des basophiles dans la rate. La comparaison entre les génotypes TS et MIF KO a révélé une différence significative au niveau du pourcentage ainsi que du nombre de basophiles dans la rate, les souris TS en possédant un nombre plus élevé, soit de 2,36% versus 1.26% et  $4.45 \times 10^6$  cellules versus  $2.07 \times 10^6$  cellules, respectivement (Figure 2.4; p<0.05).

L'impact causé par l'infection par *P. c. adami* DK sur les populations de mastocytes a aussi été étudiée le jour 4 post-infection. La figure 2-5 compile les résultats concernant l'analyse des pourcentages et nombres de cellules  $FCR\epsilon^+cKIT^+$  dans la rate. Au 4e jour post-infection avec la souche *P. c. adami* DK, le pourcentage de mastocytes dans la rate est comparable à celui observé chez des individus en l'absence d'infection chez les individus TS et MIF KO. Par contre, comparativement aux souris TS qui voient le nombre absolu de mastocytes augmenter dans la rate par rapport au contrôle, une diminution significative du nombre de mastocytes dans la rate a été constatée chez les échantillons des souris MIF KO suite à l'infection (Figure 2.5 B;  $p < 0.05$ ).

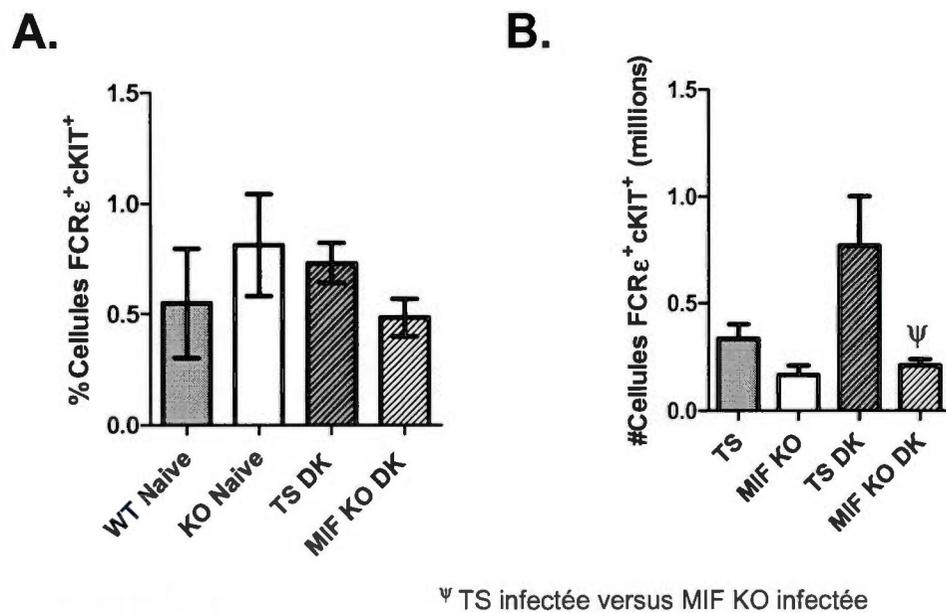


Figure 2.5: Profil des mastocytes (cellules  $FCR\epsilon^+$  et  $cKIT^+$ ) présents dans la rate chez des souris TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche *P. c. adami* DK. (A) Pourcentages de mastocytes déterminés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection ( $n \geq 3$ ). (B) Nombre absolu de mastocytes estimés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection ( $n \geq 3$ ). Les données ont été comparées entre les souris TS infectées et MIF KO infectées ( $\Psi$ ,  $p < 0.05$ ) avec un TEST Student.

La population de basophiles a aussi été étudiée dans la moelle des souris infectées. La quantification des basophiles présents dans la moelle osseuse au 4e jour post-infection avec la souche DK (Figure 2.5) a montré une même tendance générale, mais moins marquée comparativement à l'analyse des rates. La proportion de basophiles a augmentée de façon significative dans la moelle osseuse des souris TS après infection (Figure 2.6 A;  $p < 0.001$ ), mais une augmentation statistiquement non-significative du nombre absolu de basophiles a été estimée. Chez les souris MIF KO, l'infection n'a pas induit de modifications des pourcentages ou nombres de basophiles dans la moelle osseuse (Figure 2.6 B).

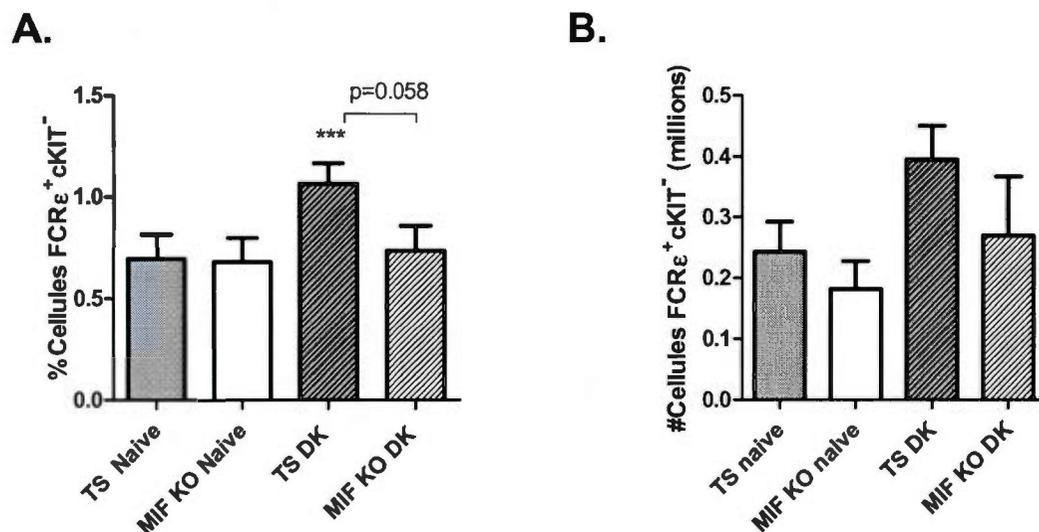


Figure 2.6: Profil des basophiles (FCRε<sup>+</sup> et cKIT<sup>-</sup>) présents dans la moelle chez des individus TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de basophiles observés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n≥3). (B) Nombre absolu de basophiles observés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection (n≥3). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées (\*\*\* $P < 0.01$ ) par un TEST Student.

### 2.2.3 Effet de l'infection par la souche *virulente P. c. adami* DS (jour 4 post-infection)

Nous avons comparé ensuite l'impact de l'infection par *P. c. adami* DS sur les populations de basophiles et mastocytes, le jour 4 post-infection. Cette souche génère une infection létale pour les souris, qui se manifeste par une hausse importante de la parasitémie le jour 7-8 post-infections, par rapport à l'infection par la souche DK. Les parasitémies générées sont néanmoins relativement comparables entre les souches DK et DS le jour 4 post-infection (Cambos M et al., 2010). La figure 2.7 montre les pourcentages de globules rouges infectés chez les souris TS et MIF KO le 4ème jour d'infection avec la souche DS. Une plus faible parasitémie a été constatée chez des souris MIF KO par rapport aux souris TS ( $p < 0.05$ ).

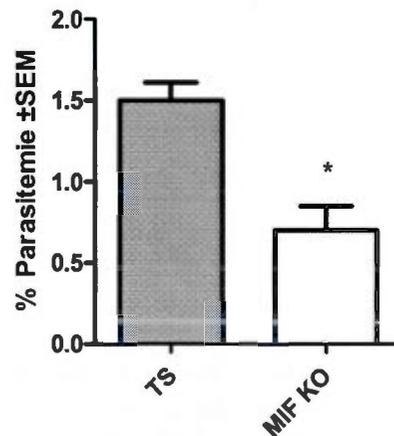


Figure 2.7: Pourcentage de parasitémies évalué par frottis sanguins chez des souris BALB/c TS et MIF KO au 4<sup>e</sup> jour post infection avec la souche DS ( $n \geq 3$ ). Les données ont été comparées entre les souris TS infectées et MIF KO infectées ( $\Psi$ ,  $p < 0.05$ ) avec un TEST Student.

La figure 2.8 compile les résultats d'expériences réalisées avec la souche *P. c. adami* DS. Une hausse significative des pourcentages et du nombre de basophiles a été constatée chez les souris TS et MIF KO et cet effet était moins significatif chez les souris KO, qui ont montré 2.90% versus 4.61% de basophiles ( $p < 0.05$ ). Le nombre absolu de basophiles dans la rate semblait plus important chez les souris TS, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives.

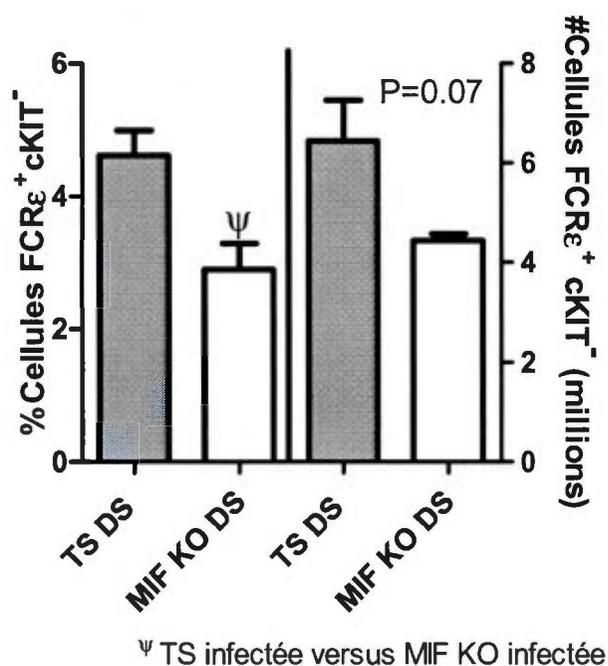


Figure 2.8: Profil des basophiles (FCR $\epsilon^+$  et cKIT $^-$ ) dans la rate des souris TS et MIF KO au 4e jour post-infection avec la souche *P. c. adami* DS. Gauche: pourcentage de basophiles déterminé par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 4e jour post-infection ( $n \geq 4$ ). Droite: nombre absolu de basophiles estimés en fonction du rendement en cellules et les pourcentages mesurés par cytofluorométrie ( $n \geq 3$ ). Les données ont été comparées entre les souris TS infectées et MIF KO infectées ( $\Psi$ ,  $p < 0.05$ ) avec un TEST Student.

### 2.2.4 Effet de l'infection par la souche non-virulente *P. c. adami* DK (jour 8 post-infection)

Afin de vérifier si la progression de l'infection amenée à une différence dans la modulation de populations des basophiles et mastocytes, des souris TS et MIF KO ont été sacrifiées le jour 8 post-infection avec la souche *P. c. adami* DK. Le 8e jour d'infection, soit au pic infectieux, une différence significative entre les parasitémies des souris TS et MIF KO a été toujours constatée (Figure 2.9, A;  $p < 0.05$ ). Les souris TS ont développée des parasitémies de 15.58% versus 8.18% chez les souris MIF KO. L'évaluation des populations de basophiles et mastocytes dans la rate a révélée une augmentation comparable et importante du nombre absolu de basophiles autant chez les souris TS que chez les souris MIF KO, par rapport aux contrôles. Une expérience similaire avec des souris infectées par la souche *P. c. adami* DS n'a pas pu être effectuée, étant donné que la parasitémie élevée de cette souche ne permet pas l'expérimentation selon les normes du comité institutionnel d'éthique animal

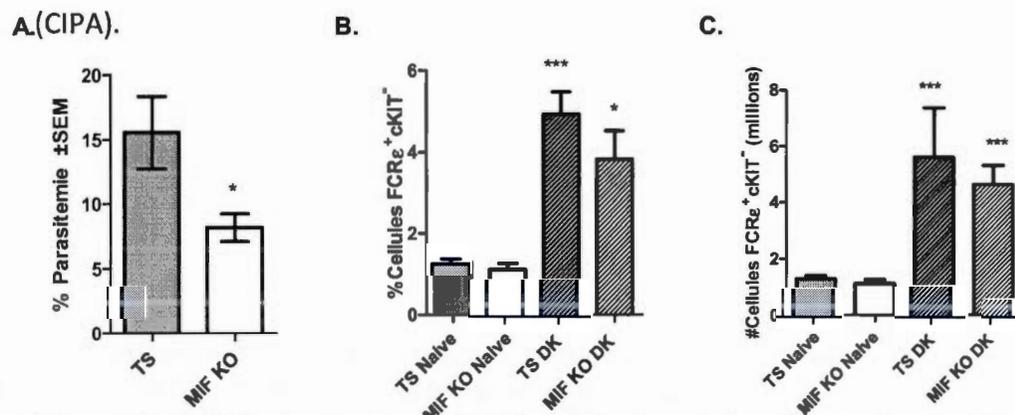


Figure 2.9: Profil des basophiles (FCRε<sup>+</sup> et cKIT) présents dans la rate chez des individus TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de parasitémie mesurées lors de frottis sanguins au 8e jour post-infection chez les souris TS et MIF KO (n≥5). (B) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n≥5). (C) Nombre absolu de basophiles dans la rate de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n≥4). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées et MIF KO naïves et infectées (\*\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ) par un TEST Student.

Les populations de basophiles dans la moelle osseuse des individus TS et KO au 8e jour post infection (Figure 2.10) ont changé de manière comparable à la rate. Le pourcentage ainsi que le nombre absolu de basophiles ont augmentés de façon significative chez les souris TS et KO par rapport à leurs contrôles respectifs.

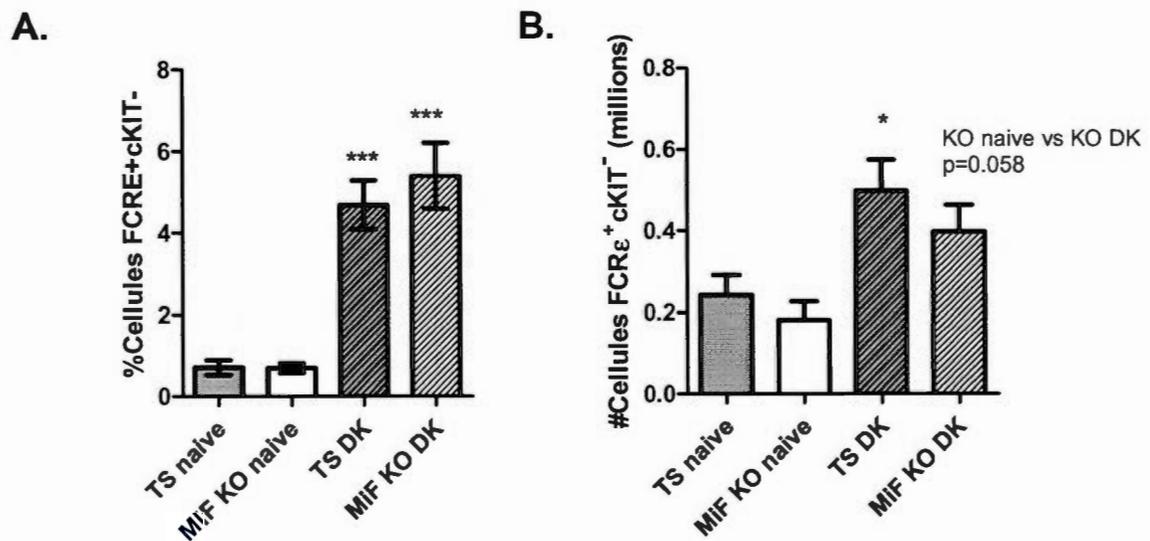


Figure 2.10: Profil des basophiles (FCRE<sup>+</sup> et cKIT<sup>-</sup>) présents dans la moelle chez des individus TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK. (A) Pourcentage de basophiles déterminés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n≥3). (B) Nombre absolu de basophiles estimés par cytofluorométrie dans la moelle de souris BALB/c TS et MIF KO, naïves et au 8e jour post-infection (n≥3). Les données ont été comparées entre les souris TS naïves et infectées et MIF KO naïves et infectées (\*\*\*P<0.01; \*P<0.05) par un TEST Student.

### 2.2.5 Niveaux d'immunoglobulines (IgE) dans le sérum des souris TS et MIF KO infectées

Tel qu'expliqué plus haut, les niveaux d'IgE sont d'excellents indices par rapport au dénouement de la pathologie malarique. Les niveaux d'IgE des souris ont donc été quantifiés afin de voir l'influence des génotypes TS et MIF KO. Nos résultats ont indiqué une augmentation importante du nombre de basophiles dans la rate des souris TS et MIF KO le jour 8 post-infection. Une quantification de la concentration en IgE de sérum de souris BALB/c au pic infectieux a été effectuée.

La figure 2.11 montre les résultats de l'analyse d'IgE dans deux pools de sérum en provenance des deux expériences indépendantes (chacune avec 3 souris par catégorie). Des concentrations d'IgE sérique dans l'ordre de 50-120 ng/mL ont été estimées chez des souris TS, mais avec une variabilité importante entre les deux pools testés. Les échantillons de sérum de souris MIF KO ont donné moins de variabilité dans les mesures, avec des concentrations d'IgE de 22-24 ng/mL.

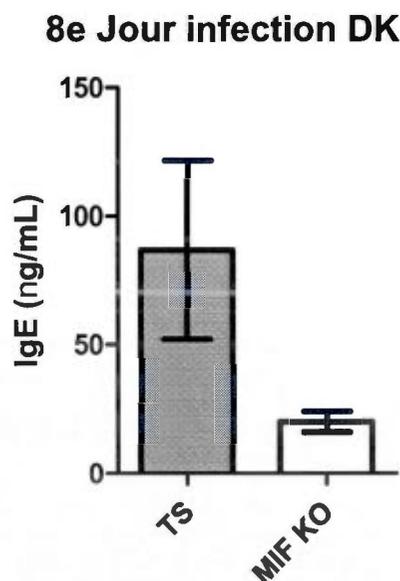


Figure 2.11: Quantification par ELISA des IgE de pools sériques (n=3) de souris BALB/c TS et MIF KO au 8e jour post-infection avec la souche DK (n≥2).

### 2.2.6 Différentiation de cellules hématopoïétiques en basophiles *in vitro*

Nos données expérimentales (*in vivo*) ont mis en évidence une expansion relativement plus importante de la population de basophiles et mastocytes chez des souris TS infectées. Afin de vérifier si la capacité intrinsèque des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse de se différencier en basophiles différencie chez des cellules TS versus MIF KO, des suspensions cellulaires des moelles osseuses de souris BALB/c TS et MIF KO ont été stimulées avec de l'IL-3 (voir session de méthodologie pour les détails) durant 4 jours (Figure 2.12).

Les pourcentages de basophiles déterminés suite à cette différenciation étaient statistiquement inférieurs chez les cultures avec des cellules MIF KO. Néanmoins, une analyse par ELISA de la concentration en IL-4 des surnageants des milieux de différenciation n'a pas révélé des différences entre les cellules TS et MIF KO.

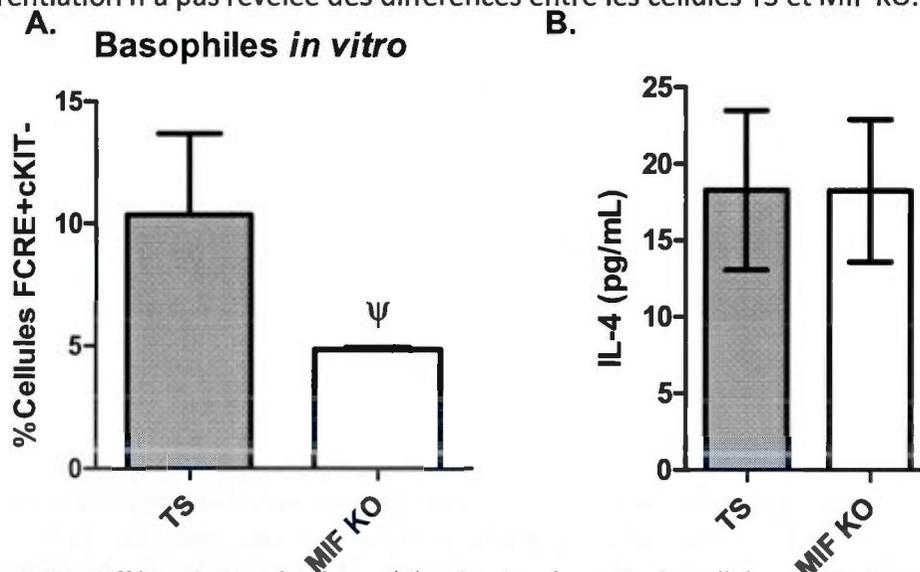


Figure 2.12: Différenciation des basophiles *in vitro* à partir de cellules pluripotentes de la moelle osseuse de souris BALB/c TS et MIF KO. (A) Pourcentages des basophiles (cellules FCRE<sup>+</sup>cKIT<sup>+</sup>) obtenus par cytofluorométrie (n=3), suite à la stimulation des cellules de la moelle osseuse de souris TS et MIF KO avec de l'IL-3 (30 ng/mL) durant 4 jours. (B) Concentration d'IL-4 détectée par ELISA dans les milieux de différenciation suite à la différenciation (n≥4).

### 2.3 Discussion des résultats

L'objectif principal visé par cette étude était d'identifier la population cellulaire qui produit potentiellement de l'IL-4 durant la phase précoce d'infection par *P. c. adami* chez la souris BALB/c. Dans ce but, deux souches parasitaires, DK et DS qui diffèrent au niveau de leur létalité et de leur capacité à induire l'inflammation ont été utilisées.

Les basophiles et mastocytes sont de populations cellulaires théoriquement en mesure de stimuler la différenciation de cellules T CD4 en T<sub>H2</sub>, par leur sécrétion rapide d'IL-4. Cette cytokine ne contribue pas à la résolution du pic d'infection et favorise la production d'IgE non protectrices.

L'inclusion du MIF dans cette étude est pertinente dans la mesure où il a été démontré que cette protéine exerce un effet important dans des pathologies dominées par des réponses de type T<sub>H2</sub>, notamment dans le cas des réactions allergiques (Das *et al*, 2011, Yoshishisa *et al*, 2011). Des études préalables ont été en mesure de démontrer que le MIF pro-inflammatoire et qu'il en mesure de promouvoir la production d'IL-4, ce qui dirige vers une réponse de type T<sub>H2</sub>, tout en réduisant la production d'IFN- $\gamma$ , une cytokine T<sub>H1</sub>-modulante (Tshikudi *et al*, 2011, Prieto-Lafuente *et al*, 2009).

Nous avons estimés par cytofluorométrie de flux les populations de basophiles et mastocytes dans la moelle osseuse et la rate des souris naïves. Les cellules ont été discriminées en fonction de l'expression des récepteurs FCR $\epsilon$  et cKIT. Les cellules FCR $\epsilon^+$ /cKIT $^-$  ont été identifiées comme des basophiles, et les cellules FCR $\epsilon^+$ /cKIT $^+$ , comme des mastocytes (Fig 2-1). Les résultats obtenus sont précieux dans la mesure où des quantifications de ces populations cellulaires sont extrêmement rares à retrouver dans la littérature.

Nous avons comparé en premier instance les pourcentages de basophiles et mastocytes chez de souris TS naïves. Nos résultats montrent que chez les souris, indépendamment du génotype TS ou MIF KO, les pourcentages de basophiles varient en fonction de l'organe. Les basophiles constituent environ 1.25% des cellules de la rate et 1.75% des cellules recensées dans la moelle (Fig 2-2). Les mastocytes sont minoritaires et représentaient environ 0.3% des cellules de la rate autant chez des souris BALB/c TS naïves et MIF KO (Fig 2-3). Le fait qu'en absence d'infection les niveaux des basophiles et mastocytes étaient comparables entre les souris TS et MIF KO suggère que les différences constatées suite à l'infection dépendent d'une modulation distincte par le système immunitaire innée en absence de MIF.

L'infection par *P. c. adami* DK a amené à une augmentation du pourcentage de basophiles dans la rate le jour 4 post-infection, tant chez les individus TS que MIF KO (Fig 2-4), mais cette augmentation était significativement plus élevée chez des souris TS. Au jour 4 post-infection, une différence au niveau de la parasitémie était déjà constatée entre les deux types de souris, en indiquant un meilleur contrôle de l'infection chez des souris déficientes en MIF, et ces résultats corroborent d'expériences précédentes (Tshikudi Malu *et al*, 2011). Au niveau de la moelle osseuse, la différence entre les souris TS et MIF KO infectées aux niveaux de basophiles était encore plus évidente le jour 4 post-infection. En effet, une expansion de la population des basophiles a été constatée chez les individus TS, en contraste avec les individus MIF KO, chez qui les niveaux de basophiles restaient similaires aux souris non-infectées (Fig 2-6). Aucune différence significative n'était mesurée au niveau des pourcentages de mastocytes dans la rate indépendamment du type de souris (Fig. 2-5). Ainsi, au 4e jour post-infection, les basophiles sont en expansion, tandis que les pourcentages de mastocytes restent semblables par

rapport aux souris naïves. Ces résultats indiquent que le MIF favorise l'expansion des basophiles durant la phase précoce de l'infection.

L'évaluation de la progression de l'infection par la souche DS a mis en évidence des parasitémies plus élevées (Fig. 2-8), et une expansion plus importante des basophiles dans la rate par rapport à l'infection par DK. Cette observation est en accord avec notre hypothèse reliant les basophiles avec la production accrue d'IL-4 lors de la malaria, et en corrélation avec une réponse  $T_H2$  prédominante durant l'infection par DS et reportée par une autre équipe de recherche (Phillips, 2010). Par rapport aux souris TS, chez qui les parasitémies par DS étaient plus importantes que par DK le jour 4 post-infection, les souris MIF KO ont développée des parasitémies comparables entre les deux souches (Fig. 2-4 et 2-7). Les pourcentages de basophiles dans la rate chez les souris TS infectées par DS ont doublé par rapport aux niveaux observés chez leur contrepartie DK. Toutefois le pourcentage de basophiles restait significativement inférieur chez les individus MIF KO par rapport aux individus TS. Au 8e jour de l'infection par DK, la population de basophiles dans la rate a atteint un pourcentage encore plus élevé qu'au 4e jour (Fig. 2-9). Cependant, il n'y a plus de différence significative entre les souris TS et MIF KO. Au niveau de la moelle osseuse, les mêmes tendances peuvent être observées (Fig. 2-10). Les données obtenues avec la souche DS concordent avec celles obtenues avec la souche DK quant aux effets du MIF sur l'expansion des basophiles.

Les ELISAS sanguins pour les IgE représentent un moyen rapide d'évaluer la réponse  $T_H2$  des différents cas à l'étude. Les expériences de dosage d'IgE ont démontré qu'au 8e jour d'infection avec DK, les individus TS ont beaucoup plus d'IgE que leur contreparties KO (Fig. 2-11). Il est ainsi possible de spéculer que dans notre modèle, les souris TS exhibent un biais vers les réponses de type  $T_H2$ , qui est reliée à la présence de MIF. Le MIF doit être en mesure d'affecter la sécrétion d'IgE par un

mécanisme inconnu. Puisque la sécrétion d'IgE dépend de l'activité des cellules B, il est possible que le MIF ait une influence sur ce type cellulaire.

Les expériences de différenciation *in vitro* ont pour leur part permis de voir que les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse des individus KO se différencient moins bien en basophiles que celles des individus TS, même si leur aptitude à sécréter l'IL-4 reste inaltérée (Fig. 2-12).

Il est possible de réunir ces différentes expériences afin d'élucider les différences au niveau de la progression de l'infection parasitaire des individus TS et KO. En l'absence d'infection, les deux génotypes démontrent des pourcentages de population de basophiles et de mastocytes similaires. Cependant, au 4<sup>e</sup> jour de l'infection avec DK, la population de basophiles des individus TS et KO augmente, tandis que la population de mastocytes ne change pas. Cette hausse dans le pourcentage de basophiles coïncide avec la production précoce d'IL-4 lors de l'infection (Tshikudi Malu et al., 2011). Comme la production d'IgE antigène-spécifiques n'a lieu en moyenne qu'à partir du 7<sup>e</sup> jour, ces données semblent indiquer que si les basophiles sont responsables de cette réponse, cette dernière doit être indépendante de la présence d'IgE. Dans ce contexte, Sokol *et al* (2010) rapportent qu'il existe des moyens d'activation des basophiles déclenchés par certains allergènes et/ou composants de parasites, notamment avec des infections helminthiques (Herbst *et al*, 2012, Min *et al*, 2010). Cette activation mène à la sécrétion de plusieurs cytokines, notamment l'IL-4, mais n'aboutit pas à la dégranulation de basophiles (Sokol *et al*, 2008). La différence au niveau de la progression de l'infection entre les individus TS et MIF KO semble donc être basée sur l'amplitude de l'augmentation du pourcentage de population des basophiles. Les

individus MIF KO ont des pourcentages de basophiles dans la rate strictement inférieurs à ceux des souris TS au 4<sup>e</sup> jour de l'infection. Les expériences avec DS, une souche qui est encore plus létale et T<sub>H</sub>2 modulante que DK viennent supporter les données de DK. Cependant, au 8<sup>e</sup> jour de l'infection, les divergences entre les individus TS et KO disparaissent.

### 3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Suite à nos résultats, il est tentant de décerner la responsabilité de la production précoce d'IL-4 aux basophiles, lors de l'infection par *P. c. adami*. Leur population cellulaire entre en expansion suite à une infection par *P. c. adami* DK le jour 4 d'infection, moment où la production d'IL-4 a lieu de manière précoce (Tshikudi Malu et al., 2011).

Malgré le fait que les mastocytes prédominent dans plusieurs tissus (Abraham *et al*, 1998), et sont en mesure de produire de l'IL-4 rapidement, les mastocytes ne sont pas entrés en expansion au 4<sup>e</sup> jour de l'infection. De plus, l'activation des mastocytes pour produire de l'IL-4 requiert un pontage de ses récepteurs FcεRI par des IgE à haute affinité (Watanabe *et al*, 2006), ce qui n'est pas possible en début de l'infection, parce que les IgE n'ont pas été encore produites. Il existe néanmoins des méthodes d'activation alternatives pour les mastocytes, notamment par stimulation de leurs TLR, mais des études ciblant ces mécanismes d'activation, n'ont pas abouti à la production d'IL-4 (Hofmann *et al*, 2009).

Les basophiles ont pu contribuer à la production d'IL-4 précoce parce que leur nombre a augmenté le 4<sup>e</sup> jour de l'infection, tant dans la rate que dans la moelle osseuse. Ce type cellulaire, quoiqu'en circulation constante dans le sang, doit être recruté lors d'infections (Galli *et al*, 2000) mais l'activation de leur sécrétion d'IL-4 ne requiert pas de signal spécifique (Sokol *et al*, 2010) et ces cellules transportent des vésicules contenant de l'IL-4 préformé, leur permettant de la sécréter rapidement. Les basophiles humains ont même été décrits comme étant capables de catalyser leur propre activation en sécrétant de l'IL-3 (Gibbs, 2006).

Les mastocytes, quant à eux, ne sont pas d'une importance négligeable en ce qui a trait au paludisme. En effet, il est fort probable qu'ils soient les contreparties à biais

T<sub>H</sub>1 des basophiles. Non seulement les mastocytes sont en mesure de sécréter du TNF- $\alpha$ , une cytokine T<sub>H</sub>1-modulante, mais ils en transportent aussi en vésicules préformées, prêtes pour la sécrétion (Gibbs *et al*, 2006). De plus, cette cytokine est en mesure d'être sécrétée par une activation non-spécifique (Hoffman *et al*, 2009).

Ainsi, il semble que les basophiles soient la population de cellules NBNT qui entre en expansion lors de la phase précoce de l'infection par *P. c. adami* DK/DS chez les souris BALB/c. La contribution du MIF dans ce type de pathologie semble être de diriger le système immunitaire vers des réponses de type T<sub>H</sub>2. Ceci est visible au niveau des pourcentages de basophiles chez les individus KO, qui sont inférieurs par rapport aux niveaux mesurés chez les souris TS. Ces conclusions sont supportées par les dosages d'IgE ainsi que les expériences *in vitro* ayant été effectuées. Les niveaux clairement inférieurs d'IgE produits par les souris KO ainsi que les biais de leurs cellules hématopoïétiques pointant aussi dans cette direction.

Donc, il est proposé que la clairance efficace de *P. c. adami* DK/DS chez la souris BALB/c repose sur la succession efficace d'une immunité de type T<sub>H</sub>1 en début d'infection et d'une immunité de type T<sub>H</sub>2 en fin d'infection. Et c'est ici que se situe le rôle du MIF. En temps que cytokine à biais T<sub>H</sub>2, dont la sécrétion est modulée par la présence de métabolites comme l'HE, libéré lors de l'hémolyse paludique, le MIF joue un rôle clé dans le dénouement de l'infection paludique. Chez une souris TS, par exemple, des protéines du parasite peuvent augmenter la sécrétion de MIF. L'HE relâché durant l'infection sera aussi en mesure d'augmenter la production de MIF, ainsi que celle de l'IL-4, ce qui imposera un biais vers une réponse de type T<sub>H</sub>2 et qui nuira au contrôle du parasite. Ceci explique les résultats obtenus dans des études précédentes, où les cohortes MIF-KO semblaient combattre l'infection plus efficacement que leurs contreparties TS, ce biais n'ayant pas lieu. Ceci concorde avec d'autres études, où il a été démontré qu'une activation exagérée des

basophiles nuit à la clairance parasitaire (Pelleau *et al*, 2012). Ces mécanismes doivent pourtant être étudiés davantage, et plusieurs outils ont été développés qui peuvent faciliter une recherche future. Les souris 4Get, modelant la production d'IL-4 en fusionnant son gène avec la GFP, des anticorps monoclonaux anti-MIF ou encore désactivant pour les basophiles pourraient être des cibles d'études intéressantes en vue d'explorer les potentiels biomédicaux de ces percées.

## RÉFÉRENCES

Abraham, S.N., et M. Arock. 1998. Mast cells and basophils in innate immunity. Elsevier, 373-381 p.

Akin, C. 2007. «What does a basophil do?». Blood, vol. 110, no 3, p. 790-791.

Arinobu, Y., H. Iwasaki, M.F. Gurish, S. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D.G. Tenen, K.F. Austen et K. Akashi. 2005. «Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, no 50, p. 18105.

Arruda, MA, AV Graça-Souza et C Barja-Fidalgo. 2005. «Heme and innate immunity: new insights for an old molecule». Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 100, p. 799-803.

Arruda, Maria Augusta, Adriano G. Rossi, Marta S. de Freitas, Christina Barja-Fidalgo et Aurélio V. Graça-Souza. 2004. «Heme Inhibits Human Neutrophil Apoptosis: Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase, MAPK, and NF- $\kappa$ B». The Journal of Immunology, vol. 173, no 3, p. 2023-2030.

Atamna, H., et H. Ginsburg. 1995. «Heme degradation in the presence of glutathione». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no 42, p. 24876.

Bacher, M., C.N. Metz, T. Calandra, K. Mayer, J. Chesney, M. Lohoff, D. Gemsa, T. Donnelly et R. Bucala. 1996. «An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no 15, p. 7849.

Balla, G., GM Vercellotti, U. Muller-Eberhard, J. Eaton et HS Jacob. 1991. «Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species». *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 64, no 5, p. 648.

Bloom, B.R., et B. Bennett. 1966. «Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity». *Science*, vol. 153, no 3731, p. 80.

Bouharoun-Tayoun, H, et P Druilhe. 1992. «*Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity». *Infect. Immun.*, vol. 60, no 4, p. 1473-1481.

Bucala, R. 1996. «MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response». *The FASEB Journal*, vol. 10, no 14, p. 1607-1613.

Cambos, M., Bazinet, S., Abed, E., Sanchez-Dardon, J., Bernard, Charlotte., Moreau, R., Olivier, M. et Scorza, T. «The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages». *International Journal for Parasitology*. Vol 40, no 9, p. 1003-1012.

Carney, Clare, Alexandra Schrimpe, Kristin Halfpenny, Reese S. Harry, Crystal Miller, Malgorzata Broncel, Sarah Sewell, Jacob Schaff, Ravinder Deol, Melissa Carter et David Wright. 2006. «The basis of the immunomodulatory activity of malaria pigment (hemozoin)». *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 11, no 7, p. 917-929.

Cho, Y.S., et H.B. Moon. 2010. «The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Asthma». *Allergy, asthma & immunology research*, vol. 2, no 3, p. 183.

Chen, C-C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L., Galli, S. J., «Identification of mast cell progenitors in adult mice.» *PNAS*, vol. 102, no 32, P.11408-11413.

Coban, Cevayir, Ken J. Ishii, Toshihiro Horii et Shizuo Akira. 2007. «Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite». *Trends in Microbiology*, vol. 15, no 6, p. 271-278.

Cohen, S., IA McGregor et S. Carrington. 1961. «Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria». *Nature*, vol. 192, p. 733-737.

Das, R., Moss, J. E., Robinson, E., Roberts, S., Levy, R., Mizue, Y., Leng, L., McDonald, C., Tigelaar, R. E., Herrick, C. A., Bucala, R., «Role of macrophage migration inhibitory factor in the Th2 immune response to epicutaneous sensitization.» *Journal of Clinical Immunology*, vol. 4, p. 666-680.

David, J.R. 1966. «Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 56, no 1, p. 72.

Denburg, JA. 1992. «Basophil and mast cell lineages *in vitro* and *in vivo* [published erratum appears in *Blood* 1992 Aug 1; 80 (3): 855]». *Blood*, vol. 79, no 4, p. 846-860.

Dondorp, AM, F Omodeo-Sale, K Chotivanich, D Taramelli et NJ White. 2003. «Oxidative stress and rheology in severe malaria». *Redox Report*, vol. 8, no 5, p. 292-294.

Donnelly, S.C., et R. Bucala. 1997. «Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease». *Molecular Medicine Today*, vol. 3, no 11, p. 502-507.

Falcone, F.H., D. Zillikens et B.F. Gibbs. 2006. «The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity». *Experimental dermatology*, vol. 15, no 11, p. 855-864.

Ferreira, Ana, József Balla, Viktória Jeney, György Balla et Miguel Soares. 2008. «A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?». *Journal of Molecular Medicine*, vol. 86, no 10, p. 1097-1111.

Fitch, C D, et P Kanjanangulpan. 1987. «The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no 32, p. 15552-15555.

Flaster, H., J. Bernhagen, T. Calandra et R. Bucala. 2007. «The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity». *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no 6, p. 1267.

Frossi, B., M. De Carli, M. Piemonte et C. Pucillo. 2008. «Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells». *Molecular immunology*, vol. 45, no 1, p. 58-64.

Fujimura, Yoshinori, Hayato Higo, Satomi Yano, Koji Yamada et Hirofumi Tachibana. 2010. «The Impact of Redox State on Regulation of the High-Affinity IgE Receptor

Expression». In *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Masamichi Kamihira, Yoshinori Katakura et Akira Ito, p. 259-264: Springer Netherlands.

Fukuzawa, J., J. Nishihira, N. Hasebe, T. Haneda, J. Osaki, T. Saito, T. Nomura, T. Fujino, N. Wakamiya et K. Kikuchi. 2002. «Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no 28, p. 24889-24895.

Furuta, Takahisa, Takane Kikuchi, Yoichiro Iwakura et Naohiro Watanabe. 2006. «Protective Roles of Mast Cells and Mast Cell-Derived TNF in Murine Malaria». *The Journal of Immunology*, vol. 177, no 5, p. 3294-3302.

Gadsby, Naomi, Richard Lawrence et Richard Carter. 2009. «A study on pathogenicity and mosquito transmission success in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi adami*». *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no 3, p. 347-354.

Galli, Stephen J., Niels Borregaard et Thomas A. Wynn. 2011. «Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils». *Nat Immunol*, vol. 12, no 11, p. 1035-1044.

Galli, Stephen J., et Mindy Tsai. 2010. «Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity». *European Journal of Immunology*, vol. 40, no 7, p. 1843-1851.

Ganley-Leal, L.M., P.N.M. Mwinzi, C.B. Cetre-Sossah, J. Andove, A.W. Hightower, D.M.S. Karanja, D.G. Colley et W.E. Secor. 2006. «Higher percentages of circulating mast cell precursors correlate with susceptibility to reinfection with *Schistosoma mansoni*». *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 75, no 6, p. 1053-1057.

Girard, Marc P., Zarifah H. Reed, Martin Friede et Marie Paule Kieny. 2007. «A review of human vaccine research and development: Malaria». *Vaccine*, vol. 25, no 9, p. 1567-1580.

Graca-Souza, Aurelio V., Maria Augusta B. Arruda, Marta S. de Freitas, Christina Barja-Fidalgo et Pedro L. Oliveira. 2002. «Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes». *Blood*, vol. 99, no 11, p. 4160-4165.

Greenwood, B. M., D. A. Fidock, D. E. Kyle, S. H. Kappe, P. L. Alonso, F. H. Collins et P. E. Duffy. 2008. «Malaria: progress, perils, and prospects for eradication». *J Clin Invest*, vol. 118, no 4, p. 1266-1276.

Helmby, Helena, Marika Kullberg et Marita Troye-Blomberg. 1998. «Expansion of IL-3-responsive IL-4-producing non-B non-T cells correlates with anemia and IL-3

production in mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria». *European Journal of Immunology*, vol. 28, no 8, p. 2559-2570.

Herbst, T., J. Esser, M. Prati, M. Kulagin, R. Stettler, M.M. Zaiss, J.P. Hewitson, P. Merky, J.S. Verbeek et C. Bourquin. 2012. «Antibodies and IL-3 support helminth-induced basophil expansion». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no 37, p. 14954-14959.

Hershko, A.Y., et J. Rivera. 2010. «Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity». *Immunology letters*, vol. 128, no 2, p. 98-104.

Hida, Shigeaki, Sho Yamasaki, Yuzuru Sakamoto, Masaya Takamoto, Kazushige Obata, Toshiyuki Takai, Hajime Karasuyama, Kazuo Sugane, Takashi Saito et Shinsuke Taki. 2009. «Fc receptor [gamma]-chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils». *Nat Immunol*, vol. 10, no 2, p. 214-222.

Hill, David A., Mark C. Siracusa, Michael C. Abt, Brian S. Kim, Dmytro Kobuley, Masato Kubo, Taku Kambayashi, David F. LaRosa, Ellen D. Renner, Jordan S. Orange, Frederic D. Bushman et David Artis. 2012. «Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation». *Nat Med*, vol. 18, no 4, p. 538-546.

Hilton, J., RJ Dearman, MS Boylett, I. Fielding, DA Basketter et I. Kimber. 1996. «The mouse IgE test for the identification of potential chemical respiratory allergens: considerations of stability and controls». *Journal of Applied Toxicology*, vol. 16, no 2, p. 165-170.

Hofmann, Alison M., et Soman N. Abraham. 2009. «New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens». *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no 6, p. 679-686.

Jakeman, G. N., A. Saul, W. L. Hogarth et W. E. Collins. 1999. «Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes». *Parasitology*, vol. 119, no 02, p. 127-133.

Jamur, M.C., A.C.G. Grodzki, A.N. Moreno, L.F.C. de Mello, M.V.D. Pastor, E.H. Berenstein, R.P. Siraganian et C. Oliver. 2001. «Identification and isolation of rat bone marrow-derived mast cells using the mast cell-specific monoclonal antibody AA4». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 49, no 2, p. 219.

Jay Forman, Henry, et Martine Torres. 2001. «Redox signaling in macrophages». *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 22, no 4-5, p. 189-216.

Jeney, Viktoria, Jozsef Balla, Akihiro Yachie, Zsuzsa Varga, Gregory M. Vercellotti, John W. Eaton et Gyorgy Balla. 2002. «Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme». *Blood*, vol. 100, no 3, p. 879-887.

Kalesnikoff, J., et S.J. Galli. 2008. «New developments in mast cell biology». *Nature immunology*, vol. 9, no 11, p. 1215-1223.

Kidd, P. 2003. «Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease». *Alternative medicine review*, vol. 8, no 3, p. 223-246.

Kikuchi, N., Y. Ishii, Y. Morishima, Y. Yageta, N. Haraguchi, K. Itoh, M. Yamamoto et N. Hizawa. 2010. «Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance». *Respiratory research*, vol. 11, no 1, p. 31.

Kim, Jin-Man, Hyunsoo Kim, Soon Bok Kwon, Soo Young Lee, Sung-Chang Chung, Dae-Won Jeong et Byung-Moo Min. 2004. «Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 325, no 1, p. 101-108.

Kindt, T.J., R.A. Goldsby, B.A. Osborne et J. Kuby. 2006. *Kuby immunology*: WH Freeman, 574 p.

King, M.R., A.S. Ismail, L.S. Davis et D.R. Karp. 2006. «Oxidative stress promotes polarization of human T cell differentiation toward a T helper 2 phenotype». *The Journal of Immunology*, vol. 176, no 5, p. 2765.

Klebanoff, S.J. 1980. «Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes». *Annals of internal medicine*, vol. 93, no 3, p. 480.

Klein, P. W., Easterbrook, J. D., Lalime, E.N., et Klein, S.L., «Estrogen and progesterone affect responses to malaria infection in female C57BL/6 mice.» *Gender Medicine*, vol. 5, no 4, p. 423-433.

Kobayashi, M., Y. Nasuhara, A. Kamachi, Y. Tanino, T. Betsuyaku, E. Yamaguchi, J. Nishihira et M. Nishimura. 2006. «Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced airway inflammation in rats». *European Respiratory Journal*, vol. 27, no 4, p. 726.

Kondo, N., Y. Ishii, A. Son, J. Sakakura-Nishiyama, Y.W. Kwon, M. Tanito, Y. Nishinaka, Y. Matsuo, T. Nakayama et M. Taniguchi. 2004. «Cysteine-dependent immune regulation by TRX and MIF/GIF family proteins». *Immunology letters*, vol. 92, no 1-2, p. 143-147.

Lantz, Chris S., Jurg Boesiger, Chang Ho Song, Nicolas Mach, Takahiko Kobayashi, Richard C. Mulligan, Yukifumi Nawa, Glenn Dranoff et Stephen J. Galli. 1998. «Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites». *Nature*, vol. 392, no 6671, p. 90-93.

Lew, Virgilio L., Teresa Tiffert et Hagai Ginsburg. 2003. «Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells». *Blood*, vol. 101, no 10, p. 4189-4194.

Macatonia, Steven E., Chyi-Song Hsieh, Kenneth M. Murphy et Anne O'Garra. 1993. «Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from  $\alpha\beta$  TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN- $\gamma$  production is IFN- $\gamma$ -dependent». *International Immunology*, vol. 5, no 9, p. 1119-1128.

Maeno, Y, et P Perlmann. 2000. «IgE deposition in brain microvessels and on parasitized erythrocytes from cerebral malaria patients». *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 63, no 3, p. 128.

Martiney, JA, B Sherry, CN Metz, M Espinoza, AS Ferrer, T Calandra, HE Broxmeyer et R Bucala. 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*, vol. 68, no 4, p. 2259.

Metcalf, D.D. 2008. «Mast cells and mastocytosis». *Blood*, vol. 112, no 4, p. 946-956.

Metz, Martin, et Marcus Maurer. 2007. «Mast cells – key effector cells in immune responses». *Trends in Immunology*, vol. 28, no 5, p. 234-241.

Mikhak, Z, et AD Luster. 2009. «The emergence of basophils as antigen-presenting cells in Th2 inflammatory responses». *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 1, no 2, p. 69.

Millington, OR, C Di Lorenzo, RS Phillips, P Garside et JM Brewer. 2006. «Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function». *Journal of Biology*, vol. 5, no 2, p. 5.

Min, B, S Kim, M Prout, H Ramshaw, A Lopez et G Le Gros. 2010. «Basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3 but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3». *The Journal of Immunology*, vol. 184, no Meeting Abstracts 1, p. 86.19.

Min, B, M Prout, J Hu-Li, J Zhu, D Jankovic, ES Morgan, JF Urban, AM Dvorak, FD Finkelman et G LeGros. 2004. «Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite». *The Journal of experimental medicine*, vol. 200, no 4, p. 507.

Mizue, Y., S. Ghani, L. Leng, C. McDonald, P. Kong, J. Baugh, SJ Lane, J. Craft, J. Nishihira et SC Donnelly. 2005. «Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no 40, p. 14410.

Molineaux, L. 1985. «The impact of parasitic diseases and their control on mortality, with emphasis on malaria and Africa». In *Health Policy, Social Policy, and Mortality Prospects*, A. Lopez J. Vallin, p. 13-44. Liege, Belgique: Ordina Editions.

Murata, Y., T. Shimamura, T. Tagami, F. Takatsuki et J. Hamuro. 2002. «The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content». *International Immunopharmacology*, vol. 2, no 5, p. 673-689.

Murphy, M.P. 2009. «How mitochondria produce reactive oxygen species». *Biochemical Journal*, vol. 417, no Pt 1, p. 1-13.

Namazi, MJ, et RS Phillips. 2010. «Immune responses of NIH mice infected with avirulent and virulent strains of *Plasmodium chabaudi adami* single and mixed infections». *The Korean journal of parasitology*, vol. 48, no 1, p. 23.

Nuchsongsin, Forradee, Kesinee Chotivanich, Prakaykaew Charunwatthana, Omodeo-Sale Fausta, Donatella Taramelli, Nicholas P. Day, Nicholas J. White et Arjen M. Dondorp. 2007. «Effects of Malaria Heme Products on Red Blood Cell Deformability». *Am J Trop Med Hyg*, vol. 77, no 4, p. 617-622.

Obata, K., K. Mukai, Y. Tsujimura, K. Ishiwata, Y. Kawano, Y. Minegishi, N. Watanabe et H. Karasuyama. 2007. «Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation». *Blood*, vol. 110, no 3, p. 913-920.

Ohmori, K., Y. Luo, Y. Jia, J. Nishida, Z. Wang, K.D. Bunting, D. Wang et H. Huang. 2009. «IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen». *The Journal of Immunology*, vol. 182, no 5, p. 2835-2841.

Omodeo-Salè, Fausta, Anna Motti, Arjen Dondorp, Nicholas J. White et Donatella Taramelli. 2005. «Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products». *European Journal of Haematology*, vol. 74, no 4, p. 324-332.

Orjih, AU, HS Banyal, R Chevli et CD Fitch. 1981. «Hemin lyses malaria parasites». Science, vol. 214, no 4521, p. 667-669.

Pamplona, Ana, Ana Ferreira, Jozsef Balla, Viktoria Jeney, Gyorgy Balla, Sabrina Epiphanio, Angelo Chora, Cristina D. Rodrigues, Isabel Pombo Gregoire, Margarida Cunha-Rodrigues, Silvia Portugal, Miguel P. Soares et Maria M. Mota. 2007. «Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria». Nat Med, vol. 13, no 6, p. 703-710.

Pawankar, R. 2001. «Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network». Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, vol. 1, no 1, p. 3-6.

Pelleau, S., S. Diop, M.D. Badiane, J. Vitte, P. Beguin, F. Nato, B.M. Diop, P. Bongrand, D. Parzy et R. Jambou. 2012. «Enhanced Basophil Reactivities during Severe Malaria and Their Relationship with the Plasmodium falciparum Histamine-Releasing Factor Translationally Controlled Tumor Protein». *Infection and immunity*, vol. 80, no 8, p. 2963-2970.

Perrigoue, Jacqueline G., Steven A. Saenz, Mark C. Siracusa, Eric J. Allenspach, Betsy C. Taylor, Paul R. Giacomin, Meera G. Nair, Yurong Du, Colby Zaph, Nico van Rooijen, Michael R. Comeau, Edward J. Pearce, Terri M. Laufer et David Artis. 2009. «MHC class II-dependent basophil-CD4<sup>+</sup> T cell interactions promote TH2 cytokine-dependent immunity». *Nat Immunol*, vol. 10, no 7, p. 697-705.

Peterson, Jeffrey D., Leonore A. Herzenberg, Kristine Vasquez et Carl Waltenbaugh. 1998. «Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no 6, p. 3071-3076.

Pierce, Susan K., et Louis H. Miller. 2009. «World Malaria Day 2009: What Malaria Knows about the Immune System That Immunologists Still Do Not». *The Journal of Immunology*, vol. 182, no 9, p. 5171-5177.

Porto, BN, LS Alves, PL Fernández, TP Dutra, RT Figueiredo, AV Graça-Souza et MT Bozza. 2007. «Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no 33, p. 24430.

Prieto-Lafuente, L., Gregory, W. F., Allen, J. E., Maizels, R. M. «MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages.» *Journal of Leukocyte biology*, vol. 85, no 5, p. 844-854.

Rincon, M., R.A. Flavell et R.J. Davis. 2001. «Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes». *Oncogene*, vol. 20, no 19, p. 2490-2497.

Roger, T., J. David, M.P. Glauser et T. Calandra. 2001. «MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4». *Nature*, vol. 414, no 6866, p. 920-924.

Rogerson, Stephen J., Rushika S. Wijesinghe et Steven R. Meshnick. 2010. «Host immunity as a determinant of treatment outcome in *Plasmodium falciparum* malaria». *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 10, no 1, p. 51-59.

Romagnani, Sergio. 1997. «The Th1/Th2 paradigm». *Immunology Today*, vol. 18, no 6, p. 263-266.

Sadanand, S. 2010. «Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs». *Yale J Biol Med*, vol. 83, no 4, p. 185-191.

Sakamoto, Wataru, Katsutoshi Fujie, Sadao Isomura, Masayuki Kaga, Takao Kohgo, Nobuhiro Yamada et Jun Nishihira. 2002. «Secretion of macrophage migration inhibitory factor differs from interleukin-6 in hydrogen peroxide- and LPS-stimulated human fibroblasts». *International Immunopharmacology*, vol. 2, no 8, p. 1123-1131.

Schneider, E., A.F. Petit-Bertron, R. Bricard, M. Levasseur, A. Ramadan, J.P. Girard, A. Herbelin et M. Dy. 2009. «IL-33 activates unprimed murine basophils directly *in vitro* and induces their *in vivo* expansion indirectly by promoting hematopoietic *gro* TSh factor production». *The Journal of Immunology*, vol. 183, no 6, p. 3591.

Schroeder, J.T., K.L. Chichester et A.P. Bieneman. 2009. «Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functional responses in allergic disease». *The Journal of Immunology*, vol. 182, no 4, p. 2432-2438.

Schwarzer, E, M Alessio, D Ulliers et P Arese. 1998. «Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes». *Infection and immunity*, vol. 66, no 4, p. 1601-1606.

Schwarzer, E, G Bellomo, G Giribaldi, D Ulliers et P Arese. 2001. «Phagocytosis of malarial pigment haemozoin by human monocytes: a confocal microscopy study». *Parasitology*, vol. 123, no 02, p. 125-131.

Scorza, Tatiana, Stefan Magez, Lea Brys et Patrick De Baetselier. 1999. «Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression». *Parasite Immunology*, vol. 21, no 11, p. 545-554.

Sherman, IW. 1998. *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*: Amer Society for Microbiology, 1ere édition.

Snapper, CM, C. Peschel et WE Paul. 1988. «IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide». *The Journal of Immunology*, vol. 140, no 7, p. 2121.

Snelgrove, R.J., L. Edwards, A.E. Williams, A.J. Rae et T. Hussell. 2006. «In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection». *The Journal of Immunology*, vol. 177, no 8, p. 5509.

Sokol, Caroline L., Gregory M. Barton, Andrew G. Farr et Ruslan Medzhitov. 2008. «A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses». *Nat Immunol*, vol. 9, no 3, p. 310-318.

Sokol, Caroline L., et Ruslan Medzhitov. 2010. «Role of basophils in the initiation of Th2 responses». *Current Opinion in Immunology*, vol. 22, no 1, p. 73-77.

Stavitsky, A.B., C. Metz, S. Liu, J. Xianli et R. Bucala. 2003. «Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum* infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity». *Parasite Immunology*, vol. 25, no 7, p. 369-374.

Swain, SL, AD Weinberg, M English et G Huston. 1990. «IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors». *The Journal of Immunology*, vol. 145, no 11, p. 3796.

Swindle, Emily J., et Dean D. Metcalfe. 2007. «The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes». *Immunological Reviews*, vol. 217, no 1, p. 186-205.

Tangteerawatana, P., S. M. Montgomery, H. Perlmann, S. Looareesuwan, M. Troye-Blomberg et S. Khusmith. 2007. «Differential regulation of IgG subclasses and IgE antimalarial antibody responses in complicated and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria». *Parasite Immunology*, vol. 29, no 9, p. 475-483.

Taylor-Robinson, A.W. 1995 «Regulation of Immunity to Malaria: Valuable Lessons Learned from Murine Models». *Parasitology Today*, vol. 11, no 9m p. 334-342.

Taylor-Robinson, A.W. 2010. «Regulation of immunity to Plasmodium: Implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design». *Experimental Parasitology*, vol. 126, no 3, p. 406-414.

Tripathi, P., BP Singh et N. Arora. 2008. «Mutated glutathione-S-transferase reduced airway inflammation by limiting oxidative stress and Th2 response». *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no 10, p. 1413-1419.

Tshikudi Malu, D., Bélanger, B. , Desautels, F., Kelendji, K., Dalko, E., Sanchez-Dardon, J., Leng, L., Bucala, R., Satoskar, A. R. et Scorza, T. 2011. «Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Downregulator of Early T Cell-Dependent IFN- $\gamma$  Responses in Plasmodium chabaudi adami(556 KA)-Infected Mice». *Journal of Immunology*, Vol. 186, no 11, p. 6271-6279.

Ushio-Fukai, M. 2009. «Compartmentalization of Redox Signaling Through NADPH Oxidase-Derived ROS». *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 11, no 6, p. 1289-1299.

Wedemeyer, J., et S.J. Galli. 2000. «Mast cells and basophils in acquired immunity». *British medical bulletin*, vol. 56, no 4, p. 936-955.

Wedemeyer, J., M. Tsai et S.J. Galli. 2000. «Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity». *Current Opinion in Immunology*, vol. 12, no 6, p. 624-631.

Weiss, Deborah L., et Melissa A. Brown. 2001. «Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression». *Immunological Reviews*, vol. 179, no 1, p. 35-47.

Williams, Megan E., Marika C. Kullberg, Susan Barbieri, Patricia Caspar, Jay A. Berzofsky, Robert A. Seder et Alan Sher. 2004. «F $\epsilon$ c receptor-positive cells are a major source of antigen-induced interleukin-4 in spleens of mice infected with *Schistosoma mansoni*». *European Journal of Immunology*, vol. 23, no 8, p. 1910-1916.

Wolfreys, Karen, et David B. G. Oliveira. 1997. «Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function». *European Journal of Immunology*, vol. 27, no 1, p. 297-306.

Wu, J., S. Fu, X. Ren, Y. Jin, X. Huang, X. Zhang et J. Bai. 2009. «Association of MIF promoter polymorphisms with childhood asthma in a northeastern Chinese population». *Tissue Antigens*, vol. 73, no 4, p. 302-306.

Yoshihisa, Y., Makino, T., Matsunaga, K., Honda, A., Abe, R., Shimizu, H., Shimizu T.

«Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation.» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 131, no 4, p. 925-931.

Yoshimaru, T., Y. Suzuki, T. Matsui, K. Yamashita, T. Ochiai, M. Yamaki et K. Shimizu. 2002. «Blockade of superoxide generation prevents high-affinity immunoglobulin E receptor-mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils». *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 32, no 4, p. 612-618.

Yoshimoto, T., H. Tsutsui, K. Tominaga, K. Hoshino, H. Okamura, S. Akira, W.E. Paul et K. Nakanishi. 1999. «IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no 24, p. 13962.

Yoshimoto, Tomohiro, Koubun Yasuda, Hidehisa Tanaka, Masakiyo Nakahira, Yasutomo Imai, Yoshihiro Fujimori et Kenji Nakanishi. 2009. «Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells». *Nat Immunol*, vol. 10, no 7, p. 706-712.