

Université du Québec à Montréal

Université Lille Nord de France

Ecole Doctorale Biologie-Santé

**THÈSE**

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Esther DALKO**

Le 3 avril 2015, à Lille

**Rôle modulateur de l'hème sur la réponse des lymphocytes T  
et des cellules gliales  
Impact sur la physiopathologie du paludisme grave**

Directrice de thèse

Dr. Tatiana SCORZA

Directrice de thèse

Dr. Sylviane PIED

Dr. Ana PAMPLONA	Instituto de Medicina Molecular, Lisbonne	Rapporteur
Pr. Serge NATAF	Université Lyon 1, Lyon	Rapporteur
Dr. Lucie LAMONTAGNE	UQÀM, Montréal	Examineur
Pr. Michel SALZET	USTL, Lille	Examineur
Dr. Tatiana SCORZA	UQÀM, Montréal	Examineur
Dr. Sylviane PIED	CIIL, Lille	Examineur



À mes parents, À ma famille



« Nem kérsz egy zsömlét ?»

Apa, 2014 nyarán, a Parno Graszt koncertjén

« A salàta elegànsabb mint a répa »

Anyának a filozofiàja





*Autoportrait*, Albrecht Dürer (1521)

Kunsthalle, Breme





## RESUME

La phase érythrocytaire du cycle de *Plasmodium* est caractérisée par une hémolyse importante et la libération d'hème chez l'Hôte. Grâce à ses activités pro-oxydantes et immunomodulatrices, l'hème contribuerait au dysfonctionnement de la réponse immune observée durant le paludisme grave. Ainsi, ce travail de thèse avait pour but de clarifier le rôle de l'hème sur la réponse des lymphocytes T et des cellules gliales au cours du neuropaludisme et de l'anémie palustre sévère dans des modèles murins de paludisme. De plus, nous avons étendu nos études au paludisme chez des patients infectés par *P. falciparum* manifestant différents phénotypes cliniques. D'après nos résultats l'hème diminue la réponse délétère de type 1 des lymphocytes T CD4 et des microglies chez les modèles murins. Alors que cette réponse est essentielle à la clairance du parasite, le prétraitement des souris BALB/c avec l'hème induit une parasitémie plus faible, en comparaison au groupe non traité, qui est également associée à une anémie liée à une dysérythropoïèse. Cependant, l'injection d'hème chez des souris C57BL/6 pendant l'infection les protège du neuropaludisme en diminuant le recrutement des lymphocytes T, la réponse de type M1 des microglies et la production de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau. Par l'étude réalisée dans l'Odisha en Inde nous avons corroboré l'ensemble de ces résultats avec des données cliniques, et montrons que les niveaux plasmatiques d'hème augmentent chez les patients atteints de neuropaludisme et corrèlent positivement avec les cytokines IP-10, IL-10, TNF-alpha et MCP-1. Nous soulignons dans notre étude la complexité de la physiopathologie du paludisme grave.



## ABSTRACT

During the erythrocytic phase of the parasite Plasmodium, large amounts of heme are released in circulation. Due to its pro-oxidant, and immunomodulating activities, heme might be responsible for the alterations of the immune response that were reported during severe malaria. Thus, the objectives of this work were to clarify the impact of heme on the response of T lymphocytes and glial cells in rodent models of severe malarial anemia, and cerebral malaria. In addition, we have also looked at the relationship between heme levels and malaria severity in a human cohort of *P. falciparum*-infected patients manifesting mild and severe malaria. Heme decreased the pro-inflammatory type 1 response of CD4 T lymphocytes and microglia cells in rodent models. Despite the essential role of this response for the elimination of the parasite, BALB/c mice that were preconditioned with heme before infection had lower parasitemia compared to the untreated group. However, heme induced stronger anemia during the infection that was concomitant with alterations in erythropoiesis. In addition, heme injection during infection protected partly C57BL/6 mice from developing cerebral malaria by preventing T cell recruitment to the brain, the M1 response of microglia cells, and the production of pro-inflammatory cytokines by brain cells. Interestingly, we show from our field study in Odisha, India, that plasma heme levels increased with the severity of malaria, and more specifically during cerebral malaria, and correlated positively with the plasma levels of four cytokines: IP-10, IL-10, TNF-alpha and MCP-1. Herein we underscore the complexity of the pathophysiology of severe malaria.



## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer mes plus profonds remerciements à mes deux directrices de thèse, Dr. Tatiana Scorza, Professeure à l'Université du Québec à Montréal, et Dr. Sylviane Pied, Directrice de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique, de m'avoir entraînée dans cette extraordinaire aventure. Merci à toutes les deux et de m'avoir guidée sans condition tout au long de ces années, de m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même et d'avoir fait de mon Doctorat une expérience inoubliable, riche scientifiquement et humainement. Je vous en serai toujours très reconnaissante !

Je remercie chaleureusement Dr. Ana Pamplona, investigatrice principale au Instituto de Medicina Molecular (Lisbonne), et Pr. Serge Nataf, Praticien Hospitalier et Professeur des Universités à l'Université Lyon 1, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Je suis également très reconnaissante envers Dr. Lucie Lamontagne, Professeure à l'Université du Québec à Montréal, et envers Pr. Michel Salzet, Professeur des Universités à l'Université Lille 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime ma gratitude à Pr. Shobhona Sharma, Professeure et Présidente du Département des Sciences Biologiques au Tata Institute of Fundamental Research (Mumbai) ainsi que à Dr. Balachandran Ravindran, Directeur du Institute of Life Sciences (Bhubaneswar), de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de leur équipe. Je suis réellement reconnaissante d'être une « deuxième

génération » de SIGID, et espère pouvoir continuer à participer à ce précieux réseau pour les années à venir. Merci également à l'ensemble des étudiants et personnels de Mumbai, Bhubaneswar, et Rourkela, ainsi qu'à Karo d'avoir enrichi mon séjour en Inde. धन्यवाद !

Mes sincères remerciements vont ensuite à Dr. Martin Oliver, Professeur à l'Université McGill, rencontré en 2009 à la suite d'un stage et sans qui mon parcours professionnel et personnel serait certainement différent.

Je tiens également à remercier Dr. Isabelle Wolowczuk, Directrice de Recherche CNRS, Pr. Christophe Biot, Professeur des Universités à l'Université Lille 1, et Dr. Robert Moreau, Professeur à l'Université du Québec à Montréal, pour leur investissement et leurs regards critiques apportés au travers des séminaires et comités de suivi de thèse. Merci également à tous les collaborateurs qui ont participé à ce travail : Dr. Constantin Fesel, investigateur principal au Instituto Gulbenkian de Ciença (Oeiras), Dr. Florent Auger et Nicolas Durieux, Responsables Techniques de la Plate-forme d'Imagerie du Vivant de la Faculté de Médecine de l'Université Lille 2, et Dr. Emeric Deruy, anciennement Responsable du plateau de cytométrie en flux au BioImaging Center Lille-Nord de France.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à Pr. Pierre-André Cazenave, Professeur Émérite à l'Université Pierre et Marie Curie, Professeur honoraire de l'Institut Pasteur de Paris et un des piliers de SIGID, pour la richesse de son savoir, et sa participation infaillible à l'ensemble de nos travaux.

Un grand merci à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de partager bureaux, paillasses et pipettes au sein de l'équipe de recherche de Tatiana Scorza à l'Université du Québec à Montréal, et de l'équipe « Immunologie Fondamentale

et Clinique des Maladies Parasitaire » au Centre d'Infection et d'Immunité de Lille. Merci à tous pour votre bonne humeur, et votre disponibilité. Je tiens tout particulièrement à souligner que sans l'aide de Delphine et Fabien, une très grosse partie de ce travail aurait été impossible. Mille mercis ! Bravo et merci à toutes les stagiaires qui ont également participé d'une manière ou une autre à ce travail. Mes révérences pour avoir su me supporter.

Je remercie également tout le personnel administratif du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, de l'Université du Québec à Montréal et de l'Université Lille 1 pour leur contribution indiscutable, et à tous les niveaux.

Je n'oublie bien évidemment pas de remercier de tout cœur ma famille. Merci à mes parents pour leur présence constante et leur soutien inébranlable. « Megköszönni azt a sok szeretetet, megértést, törődést, gondozást, támaszt nem lehet. Szülő iránti szeretet örök, elmúlni sose tud, és az élet egyre erősebbé kovácsolja ». Merci à mes deux perles, Anna et Cécilia, d'être là, encore et toujours. « Hoppà, cuppà ! Zsàààmo ! » Sajnos a Parno Graszt nem lép fel tézis védéseken de « csak azért is szeretem a családom ». Je tiens également à adresser une pensée à mes grands parents, et aux proches qui nous ont quittés au cours de ces années.

Merci à Yoyo pour son inoubliable bal musette à l'accordéon, ses bonnes blagues et ses précieux conseils.

إلى كريم حبيبي ... شكراً لإيمانك بنا ودعمك الامحدود!  
"غير انت , اللي دخلت قلبي"

Et pour finir, je tiens à adresser mes sincères remerciements à mes ami(e)s de toujours et de partout, à mes consœurs, confrères, foons et colocs' pour leur présence infailible dans les bons comme dans les mauvais moments ! Merci pour ces superbes années passées avec vous, et il y en aura encore d'autres. Je vous aime !

Ce travail de thèse est le résultat de riches collaborations, elles-mêmes issues de rencontres avec des personnes passionnées et passionnantes. Cette cohésion est le moteur de la Recherche. Merci à tous !



---

## TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	vii
ABSTRACT....	ix
REMERCIEMENTS .....	xi
LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	13
ABBREVIATIONS .....	15
INTRODUCTION.....	17
Partie I. ÉTAT DE L'ART .....	23
Chapitre 1. L'hème.....	25
1. Structure de l'hème .....	25
2. Synthèse de l'hème.....	27
3. Dégradation de l'hème .....	30
3.1. Dégradation enzymatique par l'hème oxygénase.....	30
3.2. Neutralisation de l'hémoglobine et de l'hème .....	33
3.2.1. L'hémopexine.....	33
3.2.2. L'albumine .....	34
4. Activités biologiques de l'hème.....	35

---

4.1. Hème et hémoprotéines.....	37
4.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène.....	37
4.3. Modification de l'expression génique .....	38
4.4. Mort cellulaire .....	39
4.5. Augmentation de la mobilité cellulaire .....	41
4.6. Antigénicité .....	41
5. Conséquences physiopathologiques.....	42
Chapitre 2. Le paludisme .....	45
1. Définition .....	45
2. L'agent pathogène : <i>Plasmodium</i> .....	45
2.1. Généralités.....	46
2.2. Espèces .....	46
3. Épidémiologie .....	48
4. Cycle parasitaire.....	49
4.1. Hôte invertébré.....	49
4.2. Hôte vertébré.....	51
5. Formes cliniques.....	52
5.1. Période d'incubation.....	52
5.2. Accès simples.....	52
5.3. Le paludisme grave.....	53
5.4. L'anémie palustre sévère.....	55
5.5. Le neuropaludisme .....	55
Chapitre 3. La physiopathologie du paludisme grave .....	59

---

1. Approches expérimentales.....	59
2. Physiopathologie du neuropaludisme .....	60
2.1. Séquestration des globules rouges et activation des cellules endothéliales.	61
2.2. Activation des cellules du parenchyme cérébral.....	63
2.3. Les lymphocytes T .....	65
2.4. Rupture de la BHE .....	68
2.5. Rupture du flux axonal, démyélinisation des axones.....	68
3. Physiopathologie de l'anémie palustre sévère .....	71
3.1. Élimination des globules rouges infectés .....	71
3.2. Destruction des globules rouges sains.....	73
3.3. Anomalies dans la production des globules rouges .....	75
3.3.1. Erythropoïèse physiologique.....	76
3.3.2. Dysérythropoïèse au cours de l'anémie palustre .....	77
Partie II. RÉSULTATS .....	81
Chapitre 1. Modulation de la réponse des lymphocytes T CD4 par l'hème.....	83
1. Contexte du travail.....	83
2. Matériels et méthodes complémentaires à l'Article 1 .....	85
2.1. Hème .....	85
2.2. Souris.....	85
2.3. Essais avec les cellules de la rate .....	86
2.3.1. Élimination des lymphocytes B.....	86
2.3.2. Traitement des cellules avec l'anticorps anti-IA/IE.....	87

---

2.3.3. Traitement des cellules avec les antioxydants.....	87
2.4. Marquages par cytométrie en flux .....	87
2.4.1. Statut redox des cellules .....	87
2.4.2. Phénotypes des cellules.....	88
2.5. Analyses statistiques .....	88
3. Résultats.....	90
3.1. Hémolysé et immunomodulation.....	90
3.1.1. Activation des lymphocytes T CD4 et induction d'une réponse Th2 par la phénylhydrazine.....	90
3.1.2. Expansions des cellules promotrices de la réponse Th2.....	94
3.2. Immunomodulation des lymphocytes T CD4 l'hème .....	96
3.2.1. Activation des lymphocytes T CD4 par l'hème.....	96
3.2.2. Rôle des cellules présentatrices d'antigènes.....	96
3.2.3. Rôle des espèces réactives de l'oxygène.....	97
3.3. Modulation de la réponse des lymphocytes T CD4.....	101
3.4. Analyse <i>in vivo</i> : impact de l'hème sur la clairance du parasite .....	103
3.4.1. Modulation de la réponse lymphocytaire, et impact sur l'érythropoïèse (Article 1).....	103
3.4.2. Absence de rôle des mastocytes et des polynucléaires basophiles dans l'induction de la réponse Th2.....	115
4. Résumé et discussion des résultats du Chapitre 1 .....	115
Chapitre 2. Place de l'hème dans la physiopathologie du paludisme grave chez l'Homme.....	121
1. Contexte du travail.....	121
2. Présentation du site d'étude .....	123

---

2.1. Endémicité du paludisme en Inde et dans l'Odisha .....	123
2.2. Cuttack .....	126
2.3. Santé des populations Odissi .....	127
3. Participants .....	128
4. Matériels et méthodes complémentaires aux Articles 2 et 3 .....	129
4.1. Considérations éthiques.....	129
4.2. Analyse des paramètres biologiques .....	129
4.3. Quantification de la parasitémie.....	130
4.4. Dosage de HO-1 .....	131
4.5. Analyse du polymorphisme de <i>HMOX1</i> .....	131
4.6. Analyse de l'activité enzymatique de HO-1 .....	132
5. Résultats.....	135
5.1. Parasitémie et sévérité.....	135
5.2. Rôle de l'hème dans la sévérité du paludisme .....	135
5.2.1. Biomarqueurs d'hémolyse et de parasitémie.....	135
5.2.2. Hème et manifestations cliniques (Article 2) .....	137
5.2.3. Concentration en activité de HO-1.....	163
5.2.4. Polymorphisme de <i>HMOX1</i> .....	167
5.3. EPO et sévérité du paludisme (Article 3).....	171
6. Résumé et discussion des résultats du Chapitre 2 .....	187
Chapitre 3. Réponses des cellules gliales à l'hème et ses conséquences sur la physiopathologie du neuropaludisme.....	193
1. Contexte du travail.....	193

---

2. Matériels et méthodes complémentaires à l'Article 4.....	196
2.1. Analyse de l'expression de HO-1 par cytométrie en flux .....	196
2.2. Analyse de l'expression de <i>CD16</i> et <i>CD32</i> .....	196
2.3. Analyse de l'expression génique des cellule du cerveau .....	197
3. Résultats.....	197
3.1. Réponse des astrocytes et des microglies à l'hème .....	197
3.1.1. Phénotype des cellules .....	200
3.1.2. Production de cytokines <i>in vitro</i> .....	201
3.1.3. Expression de <i>HMOX1</i> et de cytokines par les cellules du cerveau ....	201
3.2. Impact sur le neuropaludisme .....	205
3.2.1. Effet de l'hème sur la survie des souris infectées .....	205
3.2.2. Modulation de la réponse des microglies et des astrocytes par l'hème au cours de l'infection (Article 4) .....	208
4. Résumé et discussion des résultats du chapitre 3.....	249
Partie III. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....	255
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	257
1. Origine de l'hème libre.....	257
1.1. Cycle érythrocytaire du parasite.....	257
1.2. Élimination des globules rouges sains .....	257
1.3. Rôle de l'hémopexine .....	259
2. Facteurs influençant l'accumulation d'hème .....	260
2.1. Diminution des niveaux d'hémopexine : dégradation ou altération de sa production ?.....	260

---

2.2. Polymorphisme de <i>HMOX1</i> .....	263
3. Hème et paludisme grave.....	265
3.1. Anémie sévère .....	266
3.2. Insuffisance rénale palustre et neuropaludisme.....	267
4. Rôle immunomodulateur de l'hème .....	269
4.1. Modulation de la production des cytokines par l'hème .....	270
4.1.1. IP-10 et MCP-1 .....	270
4.1.2. TNF- $\alpha$ .....	271
4.1.3. IL-10.....	272
4.2. Impact de l'hème sur la polarisation et l'activation des lymphocytes T CD4.....	274
5. Rôle protecteur de l'hème au cours du neuropaludisme .....	275
5.1. Impact sur les cellules du parenchyme cérébral .....	277
5.2. Impact de l'hème sur le recrutement des lymphocytes et les monocytes..	278
CONCLUSION.....	281
Partie IV. ANNEXES .....	283
ANNEXE 1.....	285
ANNEXE 2.....	297
Partie V. RÉFÉRENCES.....	325
Partie VI. PARTICIPATIONS AUX CONGRÈS .....	367
PRÉSENTATIONS ORALES .....	369
PRÉSENTATIONS PAR POSTER.....	371





---

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de l'hème et de l'hémine.....	25
Figure 2. Structure des différentes hèmes .....	26
Figure 3. Étapes de la synthèse de l'hème .....	29
Figure 4. Étapes de dégradation de l'hème.....	31
Figure 5. Activités biologiques de l'hème libre.....	36
Figure 6. Structure d'un mérozoïte de <i>Plasmodium</i> . .....	45
Figure 7. Distribution de <i>P. vivax</i> et <i>P. falciparum</i> .....	47
Figure 8. Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> .....	50
Figure 9. Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'anémie palustre sévère.....	70
Figure I.1. Diminution de l'hémopexine par la phénylhydrazine. ....	89
Figure I.2. L'injection de phénylhydrazine active les lymphocytes T CD4.....	92
Figure I.3. Le traitement avec la phénylhydrazine diminue la réponse Th1.....	93
Figure I.4. Augmentation du nombre de mastocytes et de polynucléaires basophiles après injection de phénylhydrazine. ....	95
Figure I.5. Activation <i>in vitro</i> des lymphocytes T CD4 par l'hème. ....	98
Figure I.6. L'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème nécessite les CPA. ....	99

---

Figure I.7. L'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème n'est pas associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène.....	100
Figure I.8. L'hème inhibe la réponse Th1. ....	102
Figure I.9. L'injection d'hème n'affecte pas les cellules promotrices de la réponse Th2.....	114
Figure II.1. Localisation de l'État d'Odisha en Inde. ....	124
Figure II.2. Paysages et modes d'habitations en Odisha. ....	125
Figure II.3. Situation de Cuttack.....	126
Figure II.4. HRP-2 augmente avec la sévérité du paludisme. ....	134
Figure II.5. Corrélation de HRP-2 avec l'hème plasmatique. ....	136
Figure II.6. Les niveaux plasmatiques de HO-1 augmentent dans les cas de neuropaludisme. ....	165
Figure II.7. L'activité enzymatique de HO-1 est plus faible dans les cas de neuropaludisme. ....	166
Figure II.8. Fréquences du nombre de répétitions (GT) dans le promoteur de <i>HMOX1</i> . ....	169
Figure II.9. Profils génétiques en fonction de la sévérité du paludisme.....	170
Figure II.10. Niveaux d'hème en fonction du génotype de <i>HMOX1</i> .....	170
Figure III.1. Augmentation de l'expression de HO-1.....	198
Figure III.2. Activation des astrocytes et microglies par l'hème. ....	199
Figure III.3. L'hème favorise le profile M2 des microglies.....	202
Figure III.4. Modulation de la production des cytokines. ....	203
Figure III.6. Expression génique par les cellules du cerveau .....	204

---

Figure III.7. Les effets protecteurs de l'hème vis à vis du neuropaludisme dépendant de sa concentration.....	206
Figure III.8. Le traitement des souris avec l'hème n'affecte par la parasitémie. ....	207
Figure 10. Hème et hépatopathies. ....	263



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des hémoprotéines .....	26
Tableau 2. Manifestations cliniques et biologiques d'un accès grave chez l'adulte et l'enfant .....	54
Tableau 3. Couple d'amorces pour l'amplification de la séquence d'intérêt dans le promoteur de <i>HMOX1</i> .....	132
Table 4. Corrélation entre les niveaux plasmatiques de HO-1, d'hème total et d'hémopexine en fonction du tableau clinique de l'infection. ....	164
Tableau 5. Couple d'amorces pour amplification des séquences d'intérêt.....	196



## ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide 5-aminolévulinique
ARN	Acide ribonucléique
BFUE-E	Unité d'éclosion érythrocytaire
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C	Allèle court
CD	Cluster de différenciation
CFU-E	Unité formant des colonies érythrocytaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrice d'antigène
ELISA	Dosage immuno-enzymatique sur support solide
EPO	Érythropoïétine
EPO-R	Récepteur de l'érythropoïétine
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GM-CSF	Facteur de croissance de la lignée granulo-monocytaire
GSH	Glutathion réduit
HMOX	Gène codant HO
HO	Heme oxygénase
HRP	Peroxydase de raifort
HRP-2	Protéine riche en histidine – 2
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire
IFN	Interféron

---

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IP	Protéine induite par l'IFN- $\gamma$
IRM	Imagerie par résonance magnétique
L	Allèle long
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Protéine chimio-attractante des monocytes
MIF	Facteur inhibiteur de migration des macrophages
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
NOS	Oxyde nitrique synthase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PfEMP	Protéine membranaire des érythrocytes spécifique de <i>P. falciparum</i>
RSP	Protéine de surface des anneaux
SVF	Sérum de veau foetal
TCR	Récepteur des cellules T
Th	Lymphocyte T auxiliaire
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UA	Unité arbitraire

Tous les noms de gènes ont été écrits en lettres majuscules et italiques



## INTRODUCTION

L'agent infectieux responsable du paludisme, *Plasmodium*, a été décrit pour la première fois par le Dr. Alphonse Laveran en 1880. Lorsque le génome entier de *P. falciparum* clone 3D7 a été séquencé en 2002, l'opinion publique, ainsi que de nombreux chercheurs pensaient que l'endémie pourrait être facilement maîtrisée. Douze ans plus tard, plus de 40% de la population mondiale vit toujours en zone endémique pour le paludisme, et la réduction de son endémicité mondiale représente encore aujourd'hui le sixième « objectif du millénaire pour le développement » (OMD) adopté en 2000 par les 193 États membres de l'Organisation des Nations Unies.

Au début du XXI<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses campagnes de lutte contre le paludisme ont été entreprises, notamment en Algérie, par les Drs. Edmond et Etienne Sergent, relayées en 1955 par le Programme d'Eradication Mondiale du Paludisme (*Global Malaria Eradication Program*). Les premières mesures, basées sur l'utilisation massive de pesticides et l'assèchement des marais insalubres, ont contribué à l'élimination du paludisme dans les pays développés dans les années 1960. La mise en place de campagnes complémentaires à la fin du XXI<sup>ème</sup> siècle aura également permis de faire reculer ce fléau dans de nombreux pays en voie de développement. Cependant, des parasites ont développé des résistances aux traitements, et le peu d'alternatives thérapeutiques préoccupe les organisations non gouvernementales ainsi que les institutions de santé. La situation actuelle est d'autant plus complexe que,

---

malgré les mesures de prévention mises en place par de nombreux pays, les bouleversements des pratiques agricoles, les déplacements de populations liés ou non aux guerres ainsi que les changements climatiques seraient responsables d'une résurgence des cas de paludisme dans le monde.

En plus d'être un problème de santé publique mondiale, le paludisme est à la fois associé à la pauvreté et considéré comme un vecteur de pauvreté. En effet, les organisations gouvernementales investissent dans la santé de leur population en finançant à hauteur de plusieurs millions de dollars la mise en place et l'entretien de dispensaires de santé, ainsi que l'achat de médicaments antiparasitaires et de moustiquaires. Ceci contribue à une croissance économique ralentie des pays à forte transmission parasitaire par rapport à celle des pays exempts de paludisme [1].

Malgré ces mesures, les populations restent fragilisées par les infections à répétition, incapables de travailler, ou d'aller à l'école pour ce qui est des plus jeunes. Par ailleurs, suite à des siècles de cohabitation, *Plasmodium* a exercé une pression de sélection sur le génome humain favorisant des allèles codant des protéines érythrocytaires défectueuses chez l'Homme. Ceux-ci associés aux séquelles cognitives engendrées par les formes graves de paludisme, comme le neuropaludisme et l'anémie sévère, contribuent à l'impact sociétal et démographique accablant du paludisme [1, 2].

Lors de la prise d'un repas sanguin par un moustique *Anopheles* infecté, des parasites sont injectés à l'Homme et, malgré un cycle complexe associé à une première phase hépatique, ce n'est qu'après l'infection des globules rouges qu'apparaissent les premiers signes cliniques. Le Dr. Laveran avait par ailleurs qualifié l'agent responsable du paludisme d'hématozoaire, celui-ci vivant exclusivement dans les vaisseaux sanguins. Pendant cette phase, suite à la

---

rupture de globules rouges parasités et de globules rouges sains, de nombreuses molécules immunogènes sont libérées dans la circulation. Ainsi, comme le rapportait Albert Dastre en 1902, l'accumulation de pigment ferrugineux, ou « mélanine », dans les organes a été rapidement associée aux fièvres palustres. Récemment, une accumulation systémique de la fraction non protéique de l'hémoglobine, ou hème, a également été décrite dans les cas de paludisme symptomatique au Brésil [3].

L'hème lié aux protéines est essentiel à la survie des organismes aérobies, puisqu'il participe non seulement au transport de l'oxygène lorsqu'il est associé à l'hémoglobine mais aussi à l'activité catalytique des cytochromes de la chaîne respiratoire mitochondriale. *A contrario*, l'hème libre est associé à de nombreux processus inflammatoires et immunomodulateurs.

Lors d'une infection palustre, le parasite dégrade l'hémoglobine, libérant ainsi des fragments d'hème libre. Bien que l'hème soit majoritairement détoxifié sous forme d'hémozoïne, la réponse inflammatoire associée à l'infection contribue à la lyse des globules rouges sains, et l'hémoglobine qui est libérée est oxydée, déversant ainsi dans la circulation systémique ses fragments d'hème.

Par ailleurs, les formes sévères de paludisme sont associées à un dysfonctionnement de la réponse immune et, notamment de la réponse des cellules gliales et des lymphocytes T. L'objectif global de cette étude a donc été de définir les implications de l'hème dans la physiopathologie du paludisme grave. Plus spécifiquement, nous avons cherché à identifier le rôle de l'hème dans (i) la clairance du parasite, dans (ii) la physiopathologie de l'anémie sévère et dans celle du (iii) neuropaludisme. Pour ce faire, nous avons étudié la réponse des lymphocytes T et des cellules gliales à l'hème dans des modèles de paludisme murin. Cette thèse s'articule donc autour de trois axes principaux :

- Analyse de la réponse des lymphocytes T à l'hème,
- Analyse de la réponse des cellules gliales à l'hème et
- Impact de l'hème sur le développement du paludisme grave.

L'ensemble de ces études ont été associées à des investigations au sein d'une cohorte de patients infectés par *P. falciparum* en Inde, dans le cadre du Laboratoire International Associé *System Immunology and Genetics of Infectious Diseases* (LIA SIGID ; [www.sigid.org](http://www.sigid.org)) en collaboration avec Pr. Shobhona Sharma (Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai), Dr. Balachandran Ravindran (Institute of Life Sciences, Bhubaneswar) et Dr. Bidyut Das (SCB Medical College, Cuttack). En dehors du continent africain, l'Inde est le pays le plus touché par le paludisme ; entre 2001 et 2013, 16% des cas ont été recensés dans la région Asie du sud-est de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont 58% attribués à l'Inde seule [4]. En 2014, parmi les 3516 articles publiés sur le paludisme et disponibles sur PubMed, seuls 138 relataient des études de « terrain » réalisées en Inde. De plus, les tableaux cliniques des patients indiens diffèrent de ceux rapportés par les nombreuses études réalisées sur le continent africain ; en Inde ce sont principalement les adultes qui développent des formes graves de paludisme, qui de plus sont souvent la combinaison de plusieurs atteintes organiques. Nous soulignons donc ainsi l'originalité de notre étude.

Cette thèse est issue d'un travail initié en 2011, au sein de l'équipe de Dr. Tatiana Scorza, à l'Université du Québec à Montréal, et poursuivi à partir de 2012 au sein de l'équipe « Immunologie Fondamentale et Clinique des Maladies Parasitaires », du Dr. Sylviane Pied au Centre d'Infection et d'Immunité de Lille. Mes travaux de thèse se sont déroulés entre la France, le Canada et l'Inde et ont été réalisés en cotutelle entre l'Université Lille 1 et l'Université du

---

Québec à Montréal, sous la direction du Dr. Sylviane Pied, Directrice de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), et du Dr. Tatiana Scorza, Professeur à l'Université du Québec à Montréal.

En plus de mon séjour de 4 mois en Inde, ces 3 années et demi auront été marquées par des travaux collaboratifs avec Dr. Constantin Fesel (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras), Dr. Florent Auger (Faculté de Médecine de l'Université Lille 2, Lille), Dr. Robert Moreau (Université du Québec à Montréal, Montréal), et Pr. Pierre-André Cazenave (Université Pierre et Marie Curie et Institut Pasteur de Paris, Paris).

Les expériences réalisées à l'Université du Québec à Montréal ont reçu le soutien du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) ainsi que du Centre de recherche des Interactions Hôte-Parasite, subventionné par les Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). Les expériences réalisées à l'Institut Pasteur de Lille ont, quant à elles, reçu le soutien du CNRS, de l'Inserm, de l'Institut Pasteur de Lille et de l'Université Lille 2. J'ai bénéficié d'un contrat doctoral de trois ans de l'Université Lille 1, du Prix du Jeune Chercheur de la Fondation des Treilles qui m'aura permis de prolonger ma thèse de quelques mois, et d'une bourse de « Mobilités sortantes » de la Région Nord-Pas de Calais pour les déplacements effectués entre Montréal et Lille. L'ensemble des études menées en Inde a été rendu possible grâce au Prix Raman-Charpak, attribué par le Centre Franco-Indien pour la Promotion de la Recherche Avancée (CEFIPRA) et grâce au Département des Actions Internationales du Collège Doctoral de l'Université Lille Nord de France par le financement du projet dans le cadre du programme « Ouverture Internationale des Etudes et de la Formation Doctorale en Région Nord-Pas-de-Calais ».



# **PARTIE I. ETAT DE L'ART**

---





## CHAPITRE 1. L'HÈME

### 1. Structure de l'hème

L'hème est une protoporphyrine constituée de quatre anneaux pyroles reliés à un atome de fer par des atomes de nitrogènes. L'activité catalytique de l'hème est principalement centrée sur son atome de fer, capable de changer son statut redox, et donc de passer de l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) à l'état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), et inversement [5]. Lorsque l'atome de fer est à l'état ferreux, le complexe est appelé ferroprotoporphyrine, ou hème, alors que lorsque le fer est à l'état ferrique, ce complexe est une ferriprotoporphyrine, ou hème. Dans le deuxième cas, la molécule porte une charge positive, et est donc en conséquence liée à un anion<sup>1</sup> (Figure 1).

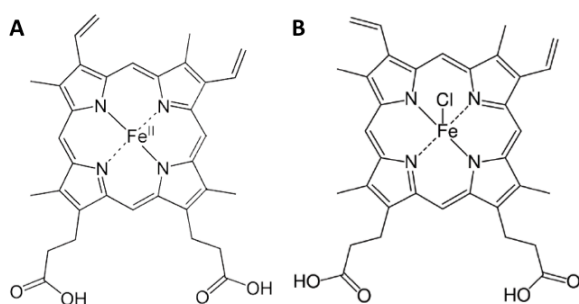


Figure 1. Structure de (A) l'hème et de (B) l'hémine.

<sup>1</sup> Le terme hème sera utilisé tout au long du texte comme terme générique, sans distinction des différents états de valence.

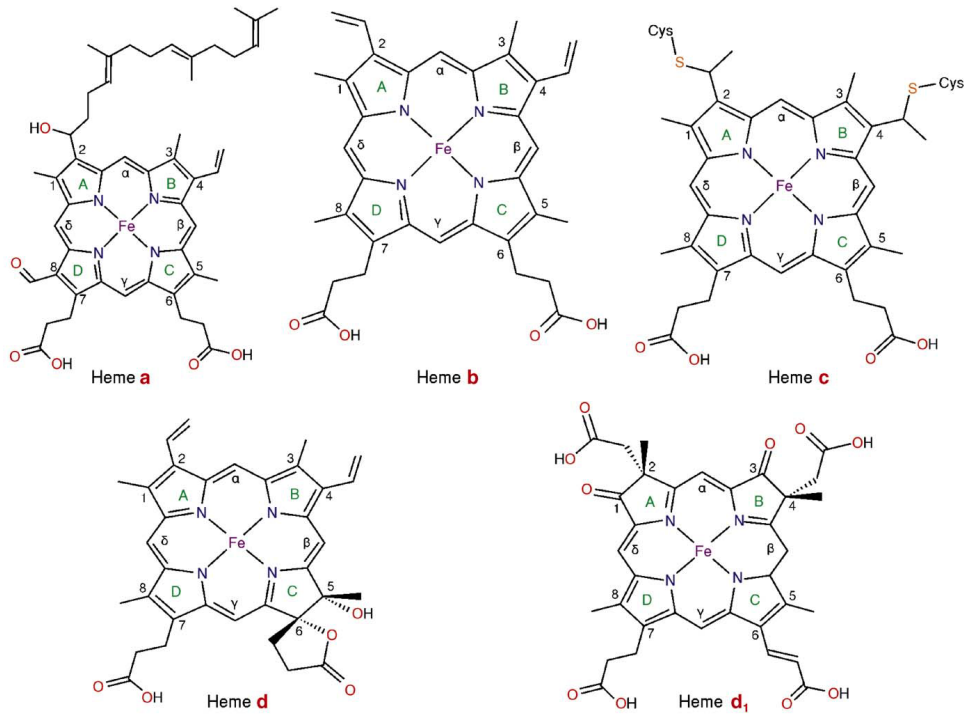


Figure 2. Structure des différentes hèmes [6].

Tableau 1. Classification des hémoprotéines [6, 7].

Fonction	Catégorie d'hémoprotéine	Nbre/Type d'hème
Transport d'électrons	Cytochrome c	1/c
	Cytochrome c oxydase	2/a
	Cytochrome c réductase	2/b, 1/c
	Cytochrome cd <sub>1</sub>	1/c, 1/d1
Transport de gaz	Hémoglobine	4/b
	Myoglobine	1/b
Activité catalytique	Cytochrome P450	1/b
	Catalase I	1/b
	Oxyde nitrique synthase	2/b
Récepteur	Guanylate cyclase soluble	1/b

---

Il existe cinq structures d'hèmes a, b, c, d et d<sub>1</sub> (Figure 2). L'hème b est la forme la plus représentée et également la structure de base à partir de laquelle les structures a, c et d ont dérivé. L'hème b est constitué de 4 groupements méthyles (positions 1, 3, 5 et 8), deux groupements vinyles (positions 2 et 4) et de deux groupements acides propanoïques (positions 6 et 7) (Figure 2). Toutes ces structures sont liées à des protéines spécifiques, ou hémoprotéines, par des interactions qui leurs sont propres (Tableau 1).

## 2. Synthèse de l'hème

Bien que toutes les cellules nucléées synthétisent de l'hème, 75% de la production totale est assurée par les cellules érythroïdes de la moelle osseuse pour la synthèse d'hémoglobine. Les hépatocytes sont également d'importants producteurs d'hème, nécessaire à la synthèse de cytochrome P450 qui est impliqué dans de nombreux processus métaboliques, notamment dans la dégradation des xénobiotiques [8].

La première étape de la synthèse de l'hème prend place dans la mitochondrie. Une molécule d'acide 5-aminolévulinique (ALA) est formée à partir d'une molécule de glycine convertie par l'ALA synthase en présence de succinyl-coenzyme A (Figure 3, Étape 1). Les quatre étapes suivantes ont lieu dans le cytosol. En présence de phosphate de pyridoxal, l'ALA déshydratase catalyse la formation de porphobilinogène à partir de deux molécules d'ALA (Figure 3, Étape 2). Quatre molécules de porphobilinogène sont ensuite converties en hydroxyméthylbilane par la porphobilinogène désaminase (Figure 3, Étape 3). L'étape de conversion de l'hydroxyméthylbilane en uroporphyrinogène peut suivre une voie non-enzymatique, ou une voie catalysée par deux enzymes qui agissent simultanément, l'uroporphyrinogène synthétase et

---

l'uroporphyrinogène isomérase (Figure 3, Étape 4). La décarboxylation de l'uroporphyrinogène en coproporphyrinogène est assurée par l'uroporphyrinogène décarboxylase (Figure 3, Étape 5), qui est suivi par une décarboxylation oxydative en protoporphyrinogène IX par la coproporphyrinogène oxydase au niveau de la mitochondrie (Figure 3, Étape 6). Les deux dernières étapes de la synthèse de l'hème sont assurées dans la mitochondrie par la protoporphyrinogène oxydase et la ferrochélatase, la dernière enzyme catalysant l'insertion du fer dans la protoporphyrine IX et formant ainsi l'hème (Figure 3, Étapes 7 et 8). L'hème synthétisé dans la mitochondrie est par la suite transporté dans le cytosol où il est lié aux apoprotéines pour la formation des hémoprotéines [5, 6, 8].

La synthèse de l'hème est régulée par les niveaux d'hème libre, par l'intermédiaire de deux mécanismes de rétroaction négative : un premier qui inhibe l'activité et la synthèse de l'ALA synthase, donc la conversion de la glycine en ALA, et un deuxième qui bloque la capture de fer par la transferrine [6, 9].

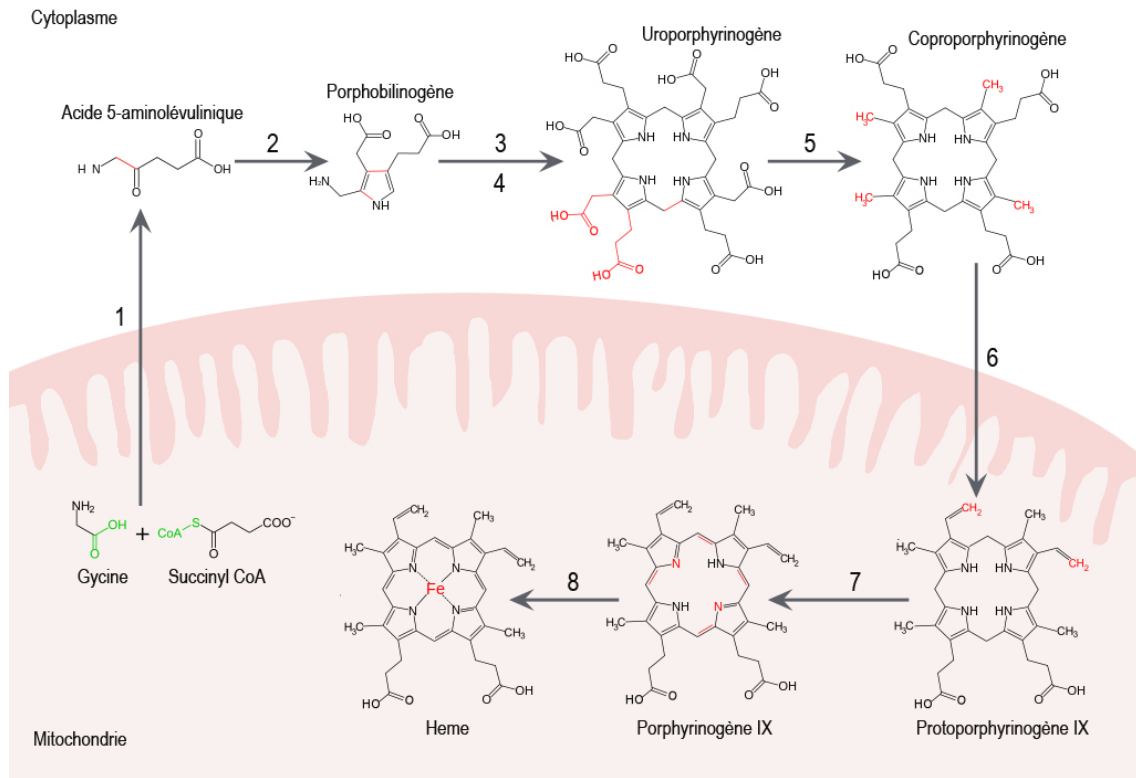


Figure 3. Étapes de la synthèse de l'hème

Enzymes impliquées : étape 1, acide 5-aminolévulinique synthase ; étape 2, acide 5-aminolévulinique déshydratase ; étape 3, porphobilinogène désaminase ; étape 4, uroporphyrinogène synthétase et uroporphyrinogène isomérase ; étape 5, uroporphyrinogène décarboxylase ; étape 6, coproporphyrinogène oxydase ; étape 7, protoporphyrinogène oxydase ; étape 8, ferrochélatase.

---

### **3. Dégradation de l'hème**

La dégradation de l'hème fait intervenir un mécanisme enzymatique catalysé par l'hème oxygénase (HO). Cependant, dans les cas d'hémolyses, l'hème libéré en circulation est pris en charge par des protéines plasmatiques, l'hémopexine et l'albumine, qui assurent son transport vers les cellules responsables de son catabolisme par l'HO.

#### **3.1. Dégradation enzymatique par l'hème oxygénase**

L'hème est majoritairement dégradé au sein des globules rouges sénescents phagocytés par les cellules du système réticulo-endothélial. Suite à la dégradation de la fraction protéique de l'hémoglobine, la globine, les molécules d'hème sont libérées et prises en charge par les enzymes des cellules du système réticulo-endothélial. En présence de dioxygène, fourni essentiellement par le système nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH)/cytochrome P450 réductase, l'HO induit une ouverture de l'anneau de la protoporphyrine IX au niveau d'un pont méso- de la structure carbonée. Ceci conduit à la libération du fer, et de monoxyde de carbone [10]. La structure carbonée résiduelle forme la biliverdine, qui est ensuite prise en charge par la biliverdine réductase (Figure 4) [10]. Le fer libre est quant à lui pris en charge par la ferritine, une protéine également impliquée dans la régulation de la sidérémie (Figure 4) [11].

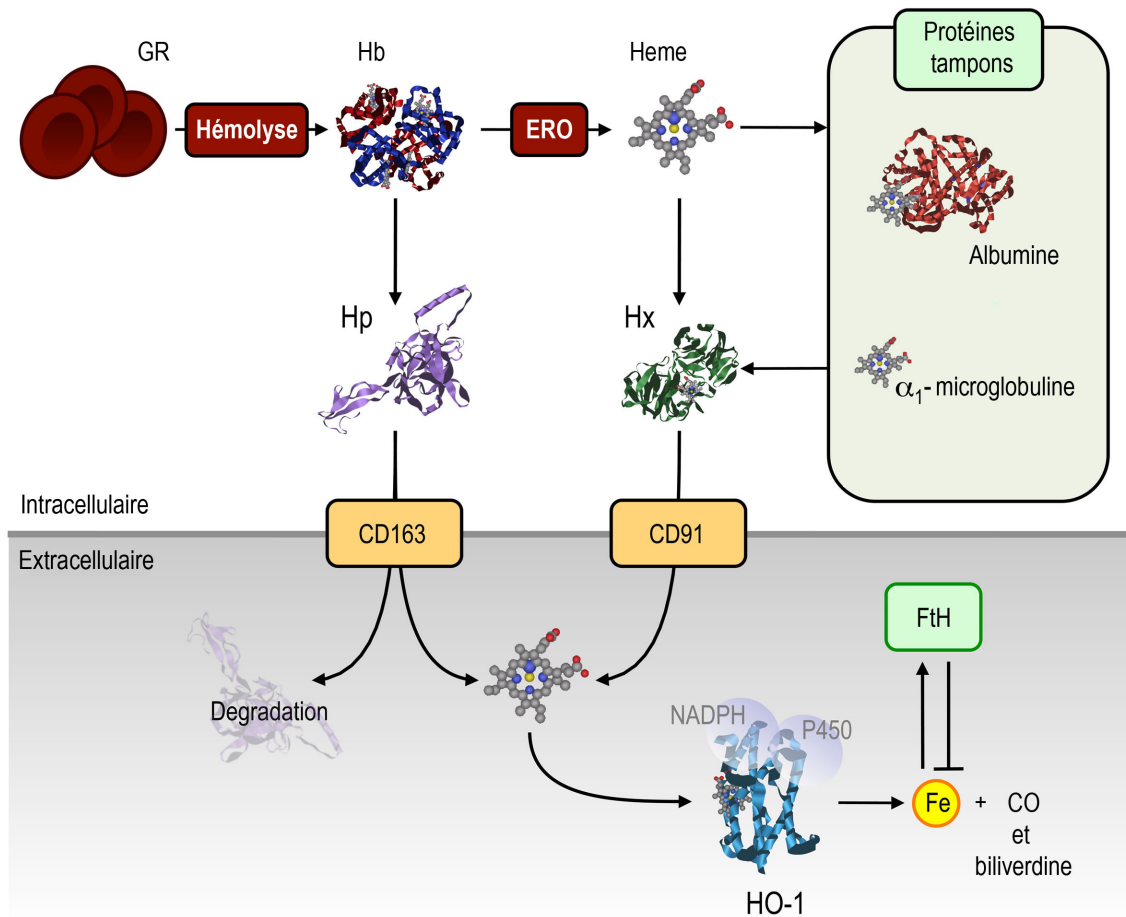


Figure 4. Étapes de dégradation de l'hème (Modifié de Larsen et al. [7])

Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène ; FtH, ferritine ; GR, globules rouges ; Hb, hémoglobine ; HO-1, heme oxygénase-1 ; Hp, haptoglobine ; Hx, hémopexine.

---

L'HO est une protéine de la famille des HSP20, et dont au moins 2 isoformes sont exprimées chez les cellules mammifères : l'HO-1 et l'HO-2. Une troisième isoforme, l'HO-3, n'a été décrite que chez le rat [8, 12]. L'HO-1 et l'HO-2 ne partagent que 40% d'homologie, et sont exprimées par deux gènes distincts. Néanmoins, les structures de l'HO sont conservées entre les espèces, avec respectivement plus de 80% et 90% d'homologie pour l'HO-1 et l'HO-2 de la souris, du rat et de l'Homme [8].

Tel que revu par Wagener et al., le gène codant l'HO-2 (*HMOX2*) est constitutivement exprimé par les cellules eucaryotes, alors que l'expression de *HMOX1* est quant à elle induite [8]. Chez le mammifère, *HMOX1* est notamment exprimé par les cellules du foie, de la rate, du cerveau, et des poumons [8, 12, 13]. Ainsi, dans les conditions physiologiques, la dégradation de l'hème est principalement assurée par l'HO-2, alors qu'en cas de hausse importante des niveaux d'hème, l'expression de HO-1 est augmenté pour assurer son catabolisme [14].

L'hème est le principal facteur responsable de la hausse d'expression de *HMOX1* [15]. Néanmoins, les stimuli pro-inflammatoires et pro-oxydants, l'hypoxie, et le lipopolysaccharide (LPS) y contribuent également [8, 12, 16].

L'HO étant une protéine intracellulaire, le transport de l'hème libre aux cellules responsables de sa dégradation est indispensable. L'hémopexine est la principale protéine impliquée dans ce phénomène, alors que l'albumine participe également à la neutralisation de l'hème libre circulant [11].



### **3.2. Neutralisation de l'hémoglobine et de l'hème**

Bien que la majorité des érythrocytes sénescents sont phagocytés par les macrophages au cours du vieillissement des globules rouges, une partie subit une lyse intravasculaire. L'hémoglobine libérée est d'abord neutralisée par l'haptoglobine, et le complexe hémoglobine-haptoglobine est phagocyté par les monocytes/macrophages grâce au récepteur membranaire cluster de différenciation (CD) 163 (Figure 4) [17]. L'hème est ensuite dégradé par le système HO tel que décrit précédemment.

Dans les situations d'hémolyses intravasculaires importantes, la capacité neutralisante de l'hémoglobine par l'haptoglobine est vraisemblablement dépassée, tel que suggéré par la diminution des niveaux d'haptoglobine mesurés dans les sérums de patients atteints d'hémoglobinopathies ou d'anémies hémolytiques auto-immunes [18]. A cause de son instabilité, l'hémoglobine libre est spontanément dégradée en dimères, qui sont rapidement oxydés en méthémoglobine en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La protoporphyrine ferrique est libérée en circulation à partir de cet intermédiaire [10]. La détoxification de l'hème nécessite une première phase de neutralisation par des molécules circulantes. L'hémopexine ainsi que l'albumine sont les principales protéines impliquées dans ce processus (Figure 4) [17].

#### **3.2.1. L'hémopexine**

L'hémopexine est une protéine plasmatique, monomérique, de 60kDa. Sa synthèse est principalement assurée par les cellules hépatiques bien qu'une production par les neurones et les astrocytes ait également été rapportée [19, 20]. L'expression de l'hémopexine est constitutive, mais elle est également

---

augmentée dans les situations inflammatoires chez les modèles murins d'encéphalite autoimmune, d'ischémie cérébrale et d'infection par *P. yoelii* 17XNL [19-22]. Chez l'Homme, la concentration sérique du précurseur de l'hémopexine augmente chez les individus atteints d'accès simples à *P. falciparum* en Inde [23].

L'hémopexine se lie à l'hème avec la plus grande affinité connue, et neutralise l'activité catalytique de l'hème [11]. Par la suite, le complexe hème-hémopexine est reconnu par le récepteur CD91. Ce récepteur est majoritairement présent à la surface des macrophages, des hépatocytes et des neurones (Figure 4) [10, 17]. Une fois dans la cellule, le complexe est dissocié dans les lysosomes, puis l'hème est dégradé par l'HO. Le devenir de l'hémopexine est encore incertain, mais comme ses niveaux plasmatiques diminuent avec l'hémolyse il semblerait que l'hémopexine soit dégradé de façon concomitante par la cellule [17, 18].

L'injection d'hème chez des souris 129Sv déficientes en hémopexine est responsable d'une accumulation d'hème dans le foie, qui est associée à une réponse inflammatoire importante absente chez les souris sauvages. De plus, les souris déficientes en hémopexine sont atteintes d'une rupture de la perméabilité vasculaire au niveau du foie, des poumons et de la rate [24]. Ainsi, la synthèse d'hémopexine est essentielle pour prévenir l'accumulation de l'hème, et ses effets délétères.

### 3.2.2. L'albumine

La deuxième protéine la plus importante dans le processus de neutralisation de l'hème circulant est l'albumine. Sa structure de 65KDa est composée d'une seule chaîne à trois domaines homologues [25]. L'albumine est la protéine la

---

plus abondante dans le sang, et de cette façon le complexe hème-albumine se formerait plus rapidement que le complexe hème-hémopexine [11]. Néanmoins, l'affinité de l'hème pour l'albumine est 10.000 fois plus faible que pour l'hémopexine, et aucun récepteur ou mécanisme permettant la reconnaissance du complexe hème-albumine n'a pour le moment été décrit [17]. Ainsi, en cas de libération systémique d'hème, il est vraisemblable que l'albumine assure la neutralisation rapide de l'hème libre par un effet « tampon », et l'hème libre serait par la suite transféré à l'hémopexine [17].

#### **4. Activités biologiques de l'hème**

L'hème est une molécule essentielle au métabolisme des organismes aérobies, car lié aux hémoprotéines il participe à de nombreuses fonctions biologiques, notamment au métabolisme, au transport d'oxygène et à la croissance cellulaire [6, 11]. Cependant, l'hème libre est délétère par la formation de radicaux libres. Il induit également des modifications dans l'expression de nombreux gènes, qui contribuent par ailleurs à l'apoptose et/ou à la nécrose des cellules. L'hème est aussi responsable de l'augmentation de la motilité cellulaire, et possède des propriétés antigéniques (Figure 5).

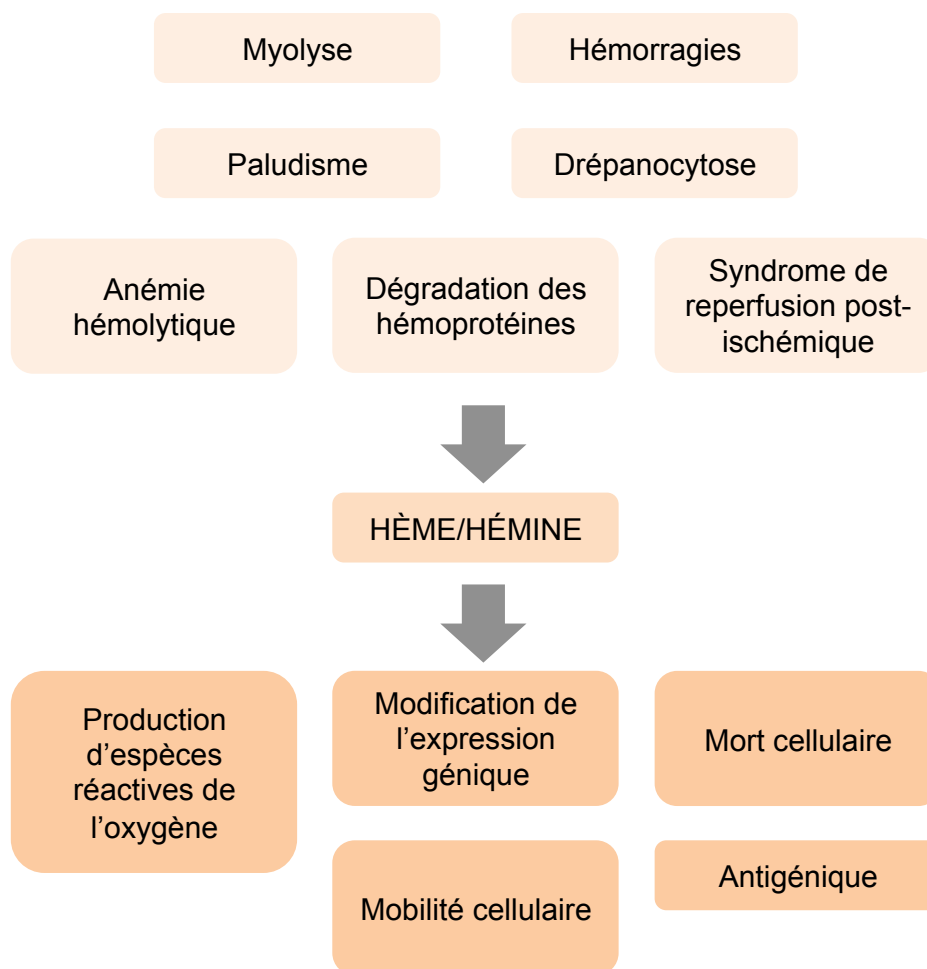


Figure 5. Activités biologiques de l'hème libre (D'après Kumar et al.[11]).

#### 4.1. Hème et hémoprotéines

L'activité physiologique des hémoprotéines est portée par le fer présent au centre du noyau pyrrol suite à sa capacité à changer son état redox de façon réversible [5]. Couplé au cytochromes c, au cytochrome c oxydase et au cytochrome réductase, le fer participe à la respiration cellulaire dans la mitochondrie, en assurant le transport des électrons entre les différents complexes de la chaîne respiratoire [6]. L'hème porte l'activité catalytique des catalases, de l'oxyde nitrique synthase (NOS), de la cyclo-oxygénase, et du cytochrome P450, et couplé à la structure protéique de la guanylate cyclase soluble il participe à la libération de guanosine monophosphate cyclique un second messenger important de la signalisation cellulaire [6, 11]. Au sein de la myoglobine et de l'hémoglobine, l'hème assure le transport et le stockage de l'oxygène [11].

#### 4.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène

En présence de peroxyde d'hydrogène, et du  $\text{Fe}^{2+}$  présent au centre de la porphyrine IX il y a formation de radicaux libres *via* la réaction de Fenton [26]:



Le caractère lipophile de l'hème lui permet de se lier aux phospholipides membranaires ou circulants, il s'intercalerait également dans les doubles feuilletts lipidiques grâce à sa petite taille et sa structure planaire. L'hème induit ainsi la peroxydation des lipides membranaires, et des lipoprotéines circulantes, telles que les lipoprotéines de faibles densités. Ces phénomènes ont pour conséquences une augmentation de la rigidité membranaire, une plus grande fragilité des cellules et leur lyse [27-29].

---

Similairement à ce qui a été décrit pour les lipides, l'hème induit l'oxydation des protéines membranaires et circulantes [11], un phénomène qui est souvent associé à leur dégradation. Cette réaction est sensible au traitement par des antioxydants, et elle est également dépendante de la température et du pH du milieu de la réaction [30].

### 4.3. Modification de l'expression génique

L'hème agit comme un régulateur extracellulaire ou intracellulaire de l'expression génique, soit en se liant à une protéine de surface, soit par internalisation après reconnaissance du complexe hème-hémopexine par le CD91 [6]. De cette façon, il module l'expression de gènes codant différentes protéines telles que la globine, et l'HO-1. Ce contrôle peut se faire à plusieurs niveaux de la synthèse des protéines, soit en modifiant la transcription des gènes, l'expression des facteurs de transcription, la stabilité des acides ribonucléiques (ARN) messagers, par l'épissage ou les modifications post-traductionnelles [8, 31].

La modulation de l'expression génique induite par l'hème peut altérer la différenciation cellulaire [6, 32]. Par exemple, en se liant au facteur de transcription Bach2, l'hème inhibe la maturation des lymphocytes B en plasmocytes ainsi que la commutation de classe des anticorps [31]. L'hème inhibe également la maturation des granulocytes, et participe à la mise en circulation de formes immatures, dont la réponse anti-infectieuse est inadéquate pour l'élimination des pathogènes intracellulaires [21].

Suite à l'activation de facteurs de transcription, l'hème participe à la modulation de l'expression de cytokines. Par exemple, l'hème induit *in vitro* l'expression des gènes codant le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , et

---

l'interleukine (IL)-1 $\beta$  par les astrocytes [33], et d'IL-8 par les polynucléaires neutrophiles [34]. Chez les microglies et les macrophages, l'hème stimule la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , et d'IL-10 [35-38]. Cependant, l'augmentation de la production en IL-10 induite par l'hème chez les macrophages est également associée à son caractère pro-oxydant, c'est à dire suite à la déplétion en glutathion réduit (GSH) intracellulaire [38].

#### 4.4. Mort cellulaire

Alors que l'hème induit la mort de nombreux types cellulaires, notamment des macrophages, et des astrocytes, il a un effet anti-apoptotique chez les polynucléaires neutrophiles [33, 39-43]. Ainsi, les voies de signalisation impliquées dans la mort ou la survie cellulaire sont différemment stimulées par l'hème en fonction des cellules étudiées.

L'hème induit l'apoptose et la nécrose de cultures primaires d'astrocytes de souris et de rat, avec une prédominance pour la nécrose, telle que suggérée par l'inhibition partielle et transitoire de la mort des cellules avec le traitement par un inhibiteur de caspase [33, 41]. *In vitro*, l'hème active la NADPH oxydase et stimule l'expression du NOS inductible (iNOS) suite à l'activation préalable du facteur de transcription Nf- $\kappa$ b. Ensemble, iNOS et NADPH oxydase induisent la production d'ERO et de dérivés nitrés par les astrocytes, ce qui a pour conséquence la déplétion en GSH intracellulaire et enfin la mort de ces cellules [33]. La kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) semble également induire la nécrose des astrocytes, mais par un mécanisme indépendant de la production des ERO [41]. ERK est impliqué dans les voies de signalisation qui potentialisent la croissance et/ou la mort cellulaire, mais les mécanismes d'induction de ERK par l'hème ont encore incertains.

---

ERK est également impliqué dans la voie de signalisation induite suite à la stimulation du récepteur de type Toll (TLR)-4. Chez les macrophages péritonéaux issus de souris C57BL/6, l'hème induit la production *in vitro* de TNF- $\alpha$  par un mécanisme qui implique TLR-4 et l'activation subséquente de ERK [35, 40]. Par la suite, la liaison de TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR1 active Janus kinase, responsable de la production d'ERO, et de cette façon de la nécrose des macrophages [40]. Suite à la phagocytose des érythrocytes sénescents par les macrophages J774A.1, la production d'ERO par l'hème induit également l'apoptose de ces cellules [39]. Chez les cellules provenant de souris déficientes en TLR-4, la nécrose des macrophages induite par l'hème est inhibée, mais est rétablie par le traitement des cellules avec TNF- $\alpha$ , indiquant bien l'importance de TNF- $\alpha$  dans ce phénomène [40].

Contrairement aux autres cellules, les polynucléaires neutrophiles quiescents expriment fortement des molécules pro-apoptotiques, tel que Bad. Suite à une stimulation par un « facteur de survie », comme l'IL-8, l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> est majorée [44, 45]. En traitant les polynucléaires neutrophiles avec de nombreux inhibiteurs spécifiques de facteurs de signalisation, en présence d'hème, Arruda et al. ont montré que l'hème induit l'activation de la NADPH oxydase, et de ERK ainsi que la translocation nucléaire de ERK. *In fine*, l'induction de cette voie de signalisation a pour conséquence la dégradation de Bad et la synthèse de Bcl-X<sub>L</sub> [45]. Ainsi, contrairement à ce qui a été décrit pour les autres cellules, l'hème aurait un effet protecteur sur les polynucléaires neutrophiles en inhibant leur apoptose.



---

#### 4.5. Augmentation de la mobilité cellulaire

L'injection d'hème dans la cavité pleurale de rats induit le recrutement rapide de polynucléaires neutrophiles au site d'injection [34, 46], et l'hème induit également la migration des polynucléaires neutrophiles *in vitro* [34, 46]. D'après Graça-Souza et al., ce phénomène est médié par la capacité de l'hème à induire un réarrangement des filaments d'actine chez les polynucléaires neutrophiles [34]. Cependant, les voies de signalisations impliquées n'ont pas encore été complètement élucidées, mais nécessiteraient vraisemblablement l'activation de la protéine kinase C et ERK [34, 46].

Chez les souris déficiente en hémopexine, le recrutement de polynucléaires neutrophiles est plus faible au niveau du site d'infection polybactérien après l'induction d'un sepsis, en comparaison aux souris sauvages [47]. Alors que les niveaux d'hème augmentent avec l'infection, l'effet préventif de l'hémopexine sur la motilité des polynucléaires neutrophiles semble être lié à sa capacité neutralisante de l'hème [47]. En favorisant le recrutement de polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire, ainsi qu'en inhibant l'apoptose de ces cellules tel que décrit dans le paragraphe précédent, l'hème pourrait participer à l'induction et au maintien d'une réponse inflammatoire importante. L'hème a également un rôle immunomodulateur associé à sa capacité à induire ou à modifier la production en cytokines des cellules, et à activer les lymphocytes T.

#### 4.6. Antigénicité

La présentation de peptides antigéniques *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) a pour conséquence l'activation des lymphocytes T. L'hème induit l'activation des lymphocytes T CD4 avec une restriction liée au CMH de classe II, mais

---

également en fonction de l'haplotype du CMH. Par exemple, chez la souris d'haplotype H-2<sup>s</sup> l'activation de lymphocytes T CD4 est induite avec une plus grande fréquence, que pour l'haplotype H-2<sup>d</sup> ou H-2<sup>b</sup> [48, 49]. De façon intéressante, l'hème induit l'activation des lymphocytes T CD4 avec une fréquence plus importante que lorsqu'elle résulte d'une stimulation secondaire par un peptide antigénique [48]. Ces résultats suggèrent que l'hème n'active pas les lymphocytes T CD4 par un mécanisme propre aux antigènes conventionnels, et plusieurs V<sub>β</sub> (V<sub>β</sub>1, V<sub>β</sub>4 ou V<sub>β</sub>6) de TCR réactifs à l'hème ont été identifiés [49].

Pour expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses ont été proposées. Premièrement, l'hème pourrait modifier la structure du site de fixation des peptides antigéniques au niveau du CMH, ou se lier à un site de fixation présent sur le CMH, mais qui est différent de celui des antigènes peptidiques. Deuxièmement, l'hème pourrait se lier aux peptides, altérer leur conformation, et ainsi modifier le répertoire de reconnaissance [48-50].

## 5. Conséquences physiopathologiques

L'augmentation de la synthèse et/ou la diminution du catabolisme de l'hème contribuent à son accumulation en circulation. En excès, l'hème participe à la physiopathologie des maladies hémolytiques chroniques, infectieuses, et inflammatoires par les mécanismes cités précédemment [7]. Par exemple, au cours de la drépanocytose, les érythrocytes sont fragilisés suite à l'augmentation de leur rigidité membranaire et se lysent facilement lors de leur passage dans les microcapillaires sanguin. La libération quasi-permanente et systémique d'hème participerait au stress oxydatif omniprésent au cours de cette maladie hémolytique chronique [7, 51]. De même, les accidents

---

vasculaires cérébraux sont associés à une libération et à une accumulation d'hème au niveau du cerveau, qui par la suite stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par les microglies et les astrocytes et induit l'apoptose des cellules du parenchyme cérébrale [37, 52]. Enfin, l'accumulation d'hème au cours de sepsis sévères ou d'infections par *Plasmodium* participerait à la gravité et à la mortalité des infections chez les modèles murins [10, 53]. Néanmoins, le rôle de l'hème dans la physiopathologie du paludisme n'a pas encore été clairement élucidé.



## CHAPITRE 2. LE PALUDISME

### 1. Définition

Le paludisme, ou malaria, est une maladie infectieuse provoquée par des protozoaires du genre *Plasmodium*. L'infection est exclusivement transmise à l'hôte mammifère lors de la prise de repas sanguin de moustique femelle du genre *Anopheles* [54]. Quelques rares cas de transmissions par transfusion sanguine ont été rapportés ; au total 130 à 150 cas ont été recensés entre 1960 et 1989 en France [55].

### 2. L'agent pathogène : *Plasmodium*

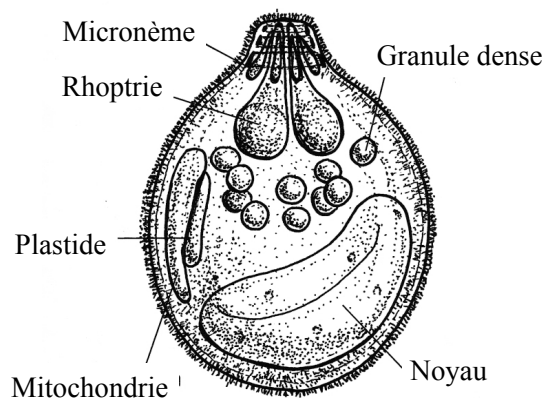


Figure 6. Structure d'un mérozoïte de *Plasmodium* (D'après Preiser et al. [56]).

## 2.1. Généralités

*Plasmodium* appartient à la division des Apicomplexa, qui comprend également d'autres pathogènes du genre *Babesia*, *Toxoplasma* et *Cryptosporidium* [57]. Les Apicomplexa sont des parasites intracellulaires obligatoires capables d'envahir différents types cellulaires. Ce groupe phylogénique est caractérisé par la présence d'un complexe apical (Figure 6) [56] :

1. Les rhoptries sont piriformes, reliées à la membrane par un conduit, et sont organisées par paires.
2. Les micronèmes sont fusiformes, et reliés aux conduits des rhoptries.
3. Les granules denses sont des structures rondes présentes dans le cytoplasme, au nombre de 20 unités au maximum.

Le rôle de ces organelles sera discuté lors de la description du cycle parasitaire.

## 2.2. Espèces

Il existe différentes espèces de *Plasmodium* qui infectent spécifiquement mammifères, oiseaux ou lézards. Seulement quatre d'entre elles sont anthroponotiques : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Une dernière espèce d'origine simienne, *P. knowlesi*, est également responsable de nombreuses infections chez l'Homme [4]. Ces espèces sont différentes par leur pathogénicité et par leur distribution géographique. Ici, seuls *P. falciparum* et *P. vivax* seront évoqués car ce sont les espèces les plus distribuées, mais également celles impliquées dans le développement des formes graves de paludisme.

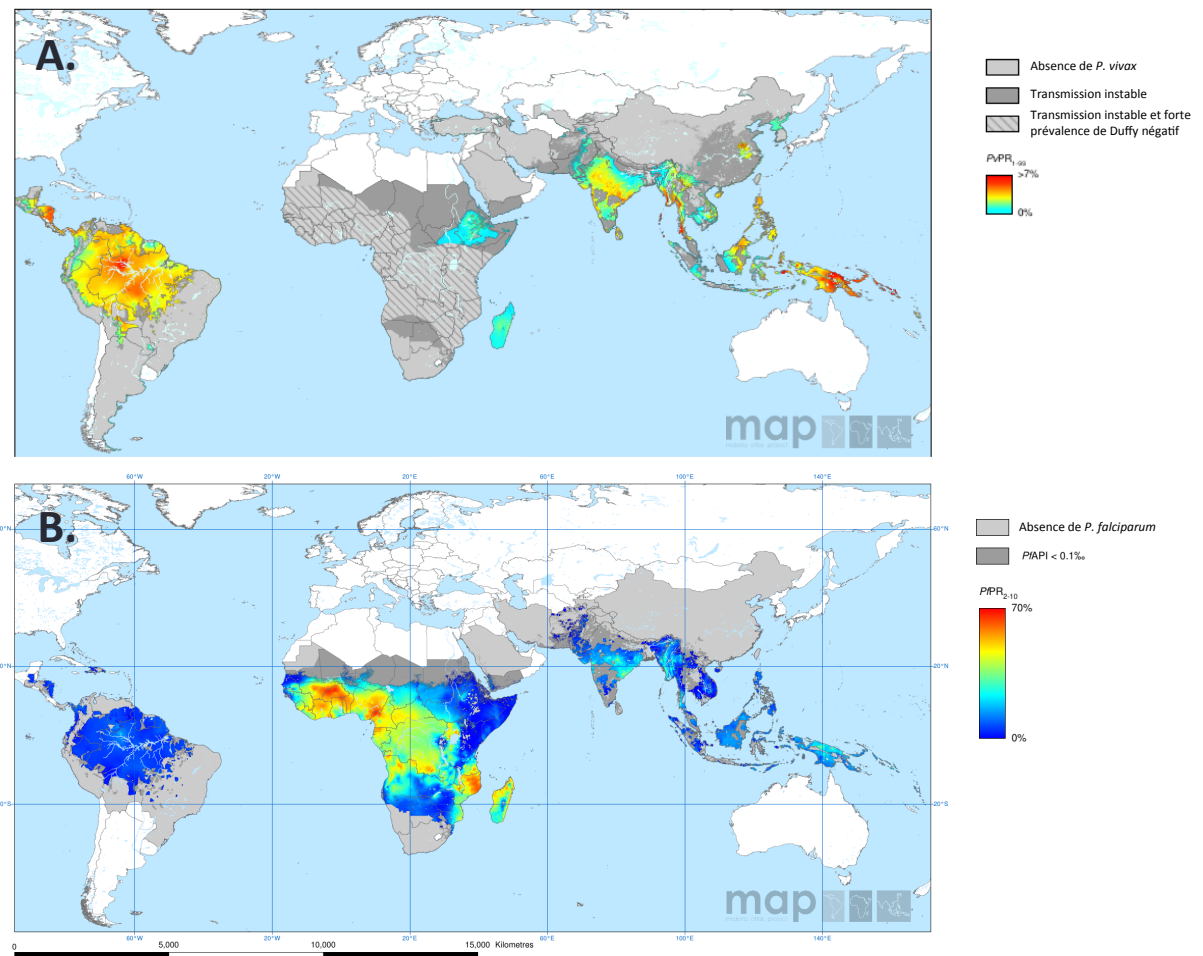


Figure 7. Distribution de (A) *P. vivax* et (B) *P. falciparum* (D'après Malaria Atlas Projet, 2010)

---

*P. falciparum* est l'agent responsable des formes les plus graves de paludisme, et de cette façon du plus grand nombre de mortalité associé à l'infection [4]. *P. falciparum* est largement distribué en Afrique, ainsi que dans la majorité des Tropiques [58] (Figure 7.A).

*P. vivax* est généralement responsable d'infections non compliquées, mais de plus en plus de cas graves ont été décrits pour cette espèce suite à l'utilisation des techniques de diagnostic moléculaire. Des formes hypnozoïtes peuvent persister chez l'hôte et être responsables d'une réémergence de l'infection des semaines, voire des mois plus tard (Figure 8). Chaque année, *P. vivax* infecte 80-300 millions d'individus en Afrique, en Amérique du Sud, en Asie du Sud et du Sud-Est. À lui seul, il représente 80% des infections par *Plasmodium* en Asie du Sud/Sud-Est, et 70% des infections en Amérique [59] (Figure 7.B).

### 3. Épidémiologie

En 2012 le paludisme était endémique dans 104 pays, dont 45 situés en Afrique, faisant 3,3 milliards de personnes à risque d'infection [60]. Cependant, à cause de l'insuffisance de diagnostic, du manque de surveillance et de moyens techniques, ces chiffres sous-estiment vraisemblablement l'ampleur du fléau. Snow et al. ont d'ailleurs suggéré que les chiffres publiés par l'OMS ne reflèteraient que 50% de l'ensemble des cas dans le monde [61]. D'après l'OMS, 198 millions de cas et près de 584.000 décès ont été estimés pour 2013. Les individus développant un paludisme sont surtout des enfants ; 78% de la mortalité associée au paludisme survient chez des enfants de moins de 5 ans [4].

D'après le Centre National de Référence du Paludisme pour la France Métropolitaine, le nombre de cas de paludisme d'importation en France a triplé



---

entre 1996 et 2000 ; plus de 80% des cas d'importation étaient liés à une infection par *P. falciparum*, parmi lesquels 7% des patients ont développé un paludisme grave [62].

## 4. Cycle parasitaire

Tel que représenté par la Figure 8, le cycle de *Plasmodium* implique deux hôtes : un hôte vertébré chez lequel a lieu la phase de reproduction asexuée, et le moustique femelle du genre *Anopheles* chez qui prend place la phase de reproduction sexuée.

### 4.1. Hôte invertébré

Des gamétocytes sont ingérés par l'*Anopheles* lors de la prise de repas sanguin par le moustique chez un individu infecté. Les globules rouges infectés libèrent les gamétocytes dans le tube digestif du moustique et chaque gamète femelle fusionne avec un gamète mâle pour former un zygote diploïde, qui par la suite se différencie en ookinète mobile. De par leur mobilité, les ookinètes migrent dans la paroi du tube digestif et forment des oocystes. La croissance et la division de chaque oocyste produit des milliers de formes haploïdes actives que sont les sporozoïtes. Ces derniers envahissent les glandes salivaires du moustique, et sont injectés à l'hôte lors de la prise d'un nouveau repas sanguin (Figure 8) [57].

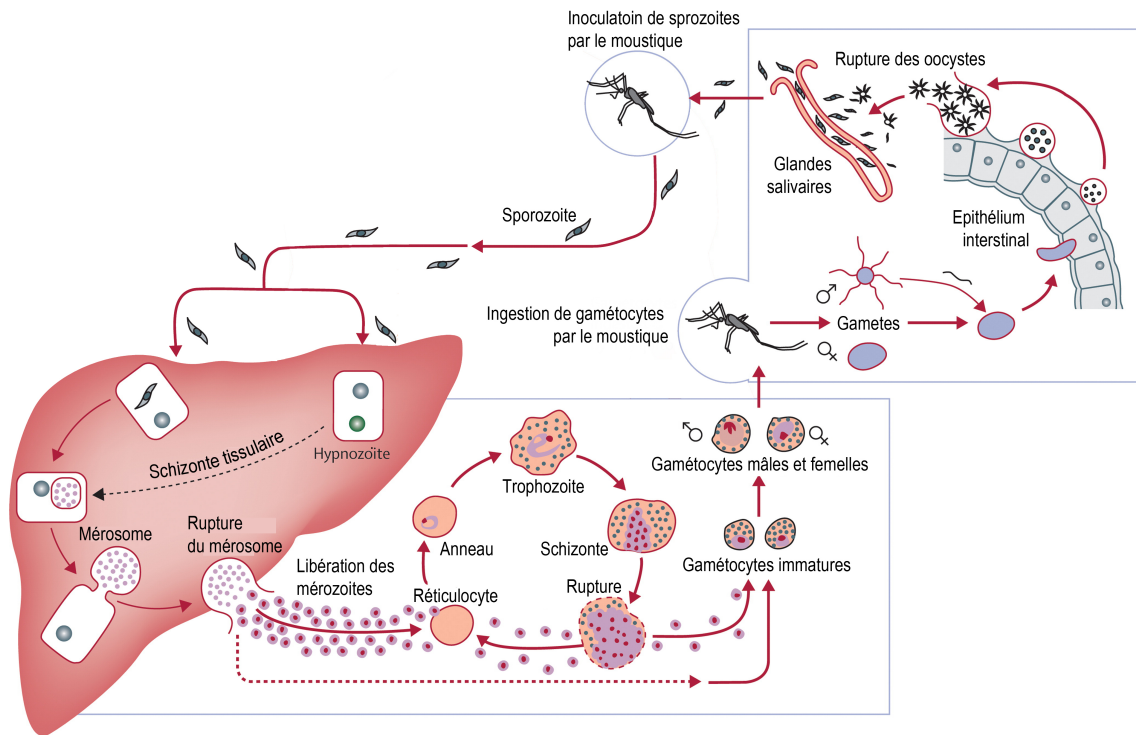


Figure 8. Cycle de vie de *Plasmodium* (D'après Mueller et al. [59]).

## 4.2. Hôte vertébré

Chez l'hôte vertébré, l'infection débute par l'injection intradermique de sporozoïtes par *Anopheles* [63]. Les parasites gagnent rapidement le foie grâce à la circulation sanguine, et traversent le cytosol de plusieurs cellules notamment des cellules de Kupffer, sans les détruire. Les sporozoïtes infectent ensuite les hépatocytes par invagination de la membrane cellulaire, formant ainsi une vacuole parasitophore [57]. À ce stade, le parasite se divise par réplication asexuée, ou schizogonie exo-érythrocytaire, donnant en moyenne 2.000 à 40.000 mérozoïtes en fonction de l'espèce [57]. Les mérozoïtes sont ensuite libérés dans la circulation sanguine par bourgeonnement des hépatocytes infectés, ou mérosomes. Ainsi encapsulés, les parasites sont protégés des cellules phagocytaires [64]. Cette phase hépatique dure en moyenne 5 à 14 jours chez l'Homme, et est cliniquement silencieuse [57].

Les mérozoïtes qui quittent le foie, passent ensuite dans le système sanguin et infectent les globules rouges : c'est la phase érythrocytaire. L'invasion des érythrocytes se fait de façon similaire à celle des hépatocytes. Les organelles du complexe apical jouent un rôle majeur lors de cette étape : après fixation du parasite sur la membrane du globule rouge, les micronèmes et rhoptries permettent l'induction de l'invagination de la membrane cellulaire [56, 57]. Le parasite s'engouffre ensuite dans la dépression ainsi créée et se déplace tout au long de la jonction serrée. De cette façon, il y a formation de nouveau d'une vacuole parasitophore. Les granules denses sont libérées lors de la phase tardive de l'invasion, et participent à la phase finale de formation de la vacuole parasitophore ainsi qu'au remodelage de la membrane érythrocytaire [56]. Pendant chaque cycle érythrocytaire de 48-72h, les mérozoïtes se différencient une première fois en trophozoïtes, puis, par divisions nucléaires, en schizontes

---

érythrocytaires [57, 59] (Figure 8). Lors de la rupture des schizontes mûrs, les mérozoïtes sont libérés dans la circulation ; chaque schizonte de *Plasmodium* libère 5 à 40 mérozoïtes en fonction de l'espèce considérée [57]. Cette phase s'accompagne de l'infection de milliers de globules rouges, entraînant l'apparition de signes cliniques liés à l'infection par *Plasmodium*.

## 5. Formes cliniques

### 5.1. Période d'incubation

La durée de la période d'incubation dure en général une dizaine de jour, mais elle peut varier en fonction de différents facteurs, tel que le niveau d'immunité acquise contre le parasite ou la prise d'un traitement prophylactique ou curatif [57, 65]. Cette période d'incubation est associée à la phase hépatique du parasite.

### 5.2. Accès simples

Les signes cliniques apparaissent lors de la phase érythrocytaire du parasite. Pendant cette phase il y a libération systémique du contenu érythrocytaire, qu'il soit d'origine parasitaire ou provenant de l'hôte. Les accès simples sont caractérisés par une périodicité de 48h (« fièvre tierce ») ou de 72h (« fièvre quarte ») en fonction de l'espèce en cause, chaque cycle étant lié à la rupture synchrone des globules rouges [57].

Le plus souvent, les accès simples se développent en trois phases [57]. Une première période de tremblements dure 10-15 minutes, pendant laquelle le malade souffre de froid et d'incapacité motrice. Elle est suivie par une deuxième phase associée à une sensation de chaleur extrême et généralement

---

accompagnée d'une fièvre agitée à plus de 40°C. Enfin, la troisième phase est caractérisée par des sueurs profuses, et une sensation de bien-être qui conduit le plus souvent le patient dans un sommeil profond.

Souvent, la périodicité des fièvres est perdue à cause d'une rupture asynchrone des globules rouges [57]. Les symptômes des accès simples ressemblent à ceux d'un syndrome grippal ; la majorité des patients présentent pyrexie (plus de 92% des cas), tremblements (79% des cas), céphalée (70% des cas), et hypersudation (64% des cas) [65]. D'autres symptômes communs tel que nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, myalgies, vertiges, malaise, et toux sèches accompagnent très souvent la maladie, ainsi que des signes physiques comme une tachycardie, un ictère, une pâleur, une hypotension orthostatique, une hépatomégalie et une splénomégalie [65].

### **5.3. Le paludisme grave**

Toute infection par *Plasmodium* peut conduire à des complications. D'après l'OMS, le paludisme grave est défini par l'atteinte vitale de au moins un organe, caractérisée biologiquement ou cliniquement [66]. Bien que jusqu'alors peu fréquentes, les complications à *P. vivax* ressemblent à ce jour de plus en plus aux formes graves induites par *P. falciparum* ; neuropaludisme, hépatopathie, insuffisance rénale et anémie palustre sévère sont des complications communes à ces deux espèces [59, 66, 67]. D'après l'OMS, le diagnostic de paludisme grave peut être confirmé dès lors que (i) des formes asexuées de *Plasmodium* sont observées sur un frottis sanguin, (ii) au moins un des signes cliniques décrits dans le Tableau 2 est présent chez le patient et que (iii) toutes les autres causes pouvant être responsable des symptômes exprimés ont été exclues [68].

Les formes de paludisme grave varient en fonction de l'âge des individus, et du niveau de transmission du paludisme [69]. Ainsi, dans les régions de forte endémicité où la transmission est annuelle, ce sont surtout les enfants de moins de 5 ans qui développent des formes graves, alors que dans les régions où la transmission est saisonnière, les formes graves touchent les enfants et les adultes [65, 68]. L'anémie palustre sévère et le neuropaludisme sont les deux formes les plus graves de paludisme, mais les tableaux cliniques rapportés diffèrent également en fonction de l'âge des patients tel que illustré par le Tableau 2. De cette façon, les manifestations graves de paludisme rapportées en Inde touchent une population très hétérogène, et sont également caractérisées par des tableaux cliniques très disparates.

Tableau 2. Manifestations cliniques et biologiques d'un accès grave chez l'adulte et l'enfant (D'après l'OMS, 2012 [66]).

Manifestations cliniques et biologiques	Adultes	Enfants
Détresse respiratoire	++	++
Convulsions	++	+++
Prostration	+/-	++
Jaunisse	+/-	++
Hypoglycémie	+	++
Acidose métabolique	++	++
Œdème pulmonaire	+	+/-
Insuffisance rénale	++	+/-
Troubles de l'hémostase	++	+/-
Anémie palustre sévère	++	+++

#### **5.4. L'anémie palustre sévère**

L'anémie est défini cliniquement par un taux d'hémoglobine  $< 11\text{g/dL}$  dans les pays en voie de développement [70]. L'anémie palustre sévère est normocytaire et est définie par un taux d'hémoglobine  $< 5\text{g/dL}$  (et/ou un hématocrite  $< 15\%$ ) chez l'enfant, et un taux d'hémoglobine  $< 7\text{g/dL}$  (et/ou un hématocrite  $< 20\%$ ) chez l'adulte, sans considérer le niveau de la parasitémie [66]. Une parasitémie  $> 10.000$  globules rouges infectés/ $\mu\text{L}$  de sang était pendant longtemps considéré comme un critère de diagnostic de l'anémie palustre sévère, mais son application est aujourd'hui limitée car il ne prend pas en compte les variabilités liées à l'âge et au niveau de transmission du paludisme ; tous les cas d'anémies palustre sévères ne sont pas associés à une forte parasitémie, et inversement, une forte parasitémie périphérique n'est pas prédictive d'une anémie sévère [71-75].

Les infections à *Plasmodium* causent une immunosuppression et favorisent les co-infections, qui contribuent à la morbi-mortalité des anémies palustres sévères [74, 76]. De plus, suite à une pression de sélection, les hémoglobinopathies ou les déficits en glucose-6-phosphate déshydrogénase sont fréquents dans les zones de forte transmission du paludisme, et les déficits alimentaires communs aux pays en voie de développement sont responsables d'anémies chroniques. Ainsi, l'anémie sévère dans les pays endémiques pour le paludisme est souvent d'origine multifactorielle.

#### **5.5. Le neuropaludisme**

Plus de 18% des cas de neuropaludisme sont mortels dans les régions endémiques au paludisme [77]. Le neuropaludisme est caractérisé par des troubles neurologiques chez des individus infectés par *P. falciparum*, et

---

diagnostiqué par un score de Glasgow  $< 11$  chez les adultes, ou un score de Blantyre  $< 3$  chez les enfants [66]. Ces scores permettent d'estimer le niveau de conscience des individus, car ils sont calculés en attribuant une valeur à des signes verbaux, moteurs et à la motricité oculaire des patients.

Dans 50 à 80% des cas, les enfants atteints de neuropaludisme développent des convulsions, souvent répétées et prolongées, ainsi que des signes d'une atteinte du tronc cérébral. Une augmentation de la pression intracrânienne, un œdème cérébral, des troubles de la respiration (hyperventilation, respiration de Kussmaul), ou des atteintes de la motricité sont également fréquents, ainsi que les anomalies de la posture telles que rigidité décérébrée, décortiquée et opisthotonos [78].

Chez l'adulte, le neuropaludisme fait généralement partie d'un ensemble de défaillances organiques pouvant regrouper des complications pulmonaires, une insuffisance rénale, une acidose métabolique ou une anémie sévère [77]. Depuis quelques années les cas d'insuffisances rénales liées au paludisme augmentent en Inde et sont de plus en plus associées aux atteintes cérébrales [79]. Le tableau clinique classique est constitué d'une pyrexie, d'un malaise général, de céphalées, d'arthralgies et de délires faisant souvent suite à un coma [77]. Ce coma est quant à lui caractérisé par une déviation conjuguée des yeux (ou divergence des deux yeux), une rigidité extrapyramidale, un trismus et par une rigidité décérébrée et décortiquée [77, 80].

Bien que 20% des adultes meurent des suites d'un neuropaludisme, les séquelles sont plus rares que chez les enfants [77, 80, 81]. Les séquelles les plus graves, comme les tétraparésies, ou les états végétatifs conduisent au décès des individus, mais des déficits intellectuels peuvent également subsister tels que



---

des difficultés d'apprentissage, ou des troubles du comportement [2, 81]. Chez les enfants, la sévérité des déficits neurocognitifs est corrélée à la sévérité de l'accès grave, ainsi qu'à l'âge des individus et au nombre d'accès [2].



---

## CHAPITRE 3. LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME GRAVE

### 1. Approches expérimentales

Les études de la physiopathologie du paludisme chez l'Homme sont très limitées pour des raisons d'éthique et de pratique. Elles sont le plus souvent rétrospectives et réalisées à partir d'échantillons sanguins. Ces études sont très souvent sujettes à une forte variabilité interindividuelle, notamment car l'histoire infectieuse et immunologique des patients n'est pas maîtrisée.

De cette façon, l'utilisation des modèles animaux a très fortement contribué à la compréhension de la physiopathologie du paludisme grave. Bien qu'ils ne reproduisent pas à l'identique la pathologie humaine, ils sont essentiels car ils permettent d'aborder des analyses et expérimentations irréalisables chez l'Homme, de prélever des échantillons rares, et de corrélérer la cinétique de la physiopathologie avec l'apparition des signes cliniques [82, 83].

L'infection des souris C57BL/6 ou CBA par *P. berghei* ANKA représentent deux des modèles murins de référence pour l'étude du neuropaludisme [84]. Les souris développent un syndrome cérébral proche de celui décrit chez l'Homme, qui est également associé à une parasitémie très faible. Après 6 à 10 jours d'infection, les souris sont atteintes de paralysies, de troubles locomoteurs et respiratoires évoluant rapidement vers un coma et la mort. Néanmoins, alors

que le neuropaludisme induit la mort des souris dans quasiment 100% des cas, ou, une mortalité par hyperparasitémie, il n'est fatal chez l'Homme « que » dans 18% des cas [77].

Cependant, il n'existe pas de consensus clair quant aux modèles murins d'anémie palustre sévère. Les souris C57BL/6 et les souris BALB/c infectées par *P. chabaudi* AS ont largement été utilisées pour étudier les mécanismes impliqués dans l'anémie palustre sévère. Chez les souris C57BL/6 infectées par *P. chabaudi* AS, une perte de 75% des érythrocytes a été décrite au pic de parasitémie [85], alors que chez les souris BALB/c infectées avec *P. chabaudi adami* ou *P. chabaudi* AS chez qui nous notons une diminution importante des taux d'hémoglobine et de l'hématocrite après 7 jours d'infection [86, 87].

Il est indéniable que les modèles animaux contribuent à la compréhension de la physiopathologie du paludisme grave, mais les échantillons récoltés chez l'Homme révèlent des différences entre le paludisme murin et humain. Par exemple, les souches murines induisent rarement des infections chroniques, contrairement aux infections chez l'Homme [82], et les parasitémies mesurées chez les souris infectées par *P. chabaudi* peuvent atteindre des parasitémies très élevés comparativement aux taux observés chez l'Homme. Pour cette raison, il est primordial de dissocier les résultats collectés chez l'Homme de ceux obtenus chez la souris, tout en considérant les données murines comme une éventualité chez l'Homme. Cependant, chez l'Homme, comme chez la souris, la physiopathologie du paludisme grave est d'origine multifactorielle.

## **2. Physiopathologie du neuropaludisme**

La physiopathologie du neuropaludisme est complexe et implique des composantes mécaniques et immunologiques [78, 88]. La séquestration

---

cérébrale des globules rouges parasités et sains a été le premier mécanisme incriminé dans le développement du neuropaludisme. Cette adhérence entraîne des altérations hémorhéologiques, pouvant aller jusqu'à l'obstruction des microcapillaires sanguins, et une hypoxie du parenchyme cérébral, tel que suggéré par l'accumulation d'acide lactique dans le liquide céphalorachidien (LCR) [78, 88, 89]. Plusieurs études réalisées chez l'Homme et chez le modèle murin suggèrent également l'implication d'une réponse immunitaire délétère qui inclue l'activation des cellules du parenchyme cérébral, le recrutement de cellules mononuclées dans le cerveau, et la production d'anticorps dirigés contre des antigènes du cerveau [84, 88, 90]. L'ensemble de ces mécanismes contribuerait *in fine* à la démyélinisation des neurones et à l'altération du flux axonal [91, 92]. Tel que démontré chez le modèle murin, le processus de démyélinisation est graduel, et atteint son pic au moment de la mort des animaux. Cependant les modalités de participation de ces cellules dans la neuropathologie restent à ce jour encore inconnues chez l'Homme.

### **2.1. Séquestration des globules rouges et activation des cellules endothéliales**

D'après l'analyse de coupes de cerveaux, la séquestration cérébrale de globules rouges infectés est constatée chez a peu près l'ensemble des patients décédés du neuropaludisme [92-96], mais ce phénomène est également partagé avec des patients impaludés et décédés sans complications neurologiques [94]. Néanmoins, la charge parasitaire cérébrale, calculée comme étant le pourcentage de globules rouges parasités dans le cerveau, est plus élevée dans les cas de neuropaludisme, en comparaison aux patients infectés par *P. falciparum* mais ne développant pas de neuropaludisme [94].

---

La séquestration cérébrale des globules rouges serait la conséquence de plusieurs mécanismes conjointement impliqués: (i) l'augmentation de la rigidité membranaire, et (ii) l'adhésion des globules parasités aux cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Premièrement, la déformabilité caractéristique des érythrocytes diminue avec la différenciation intracellulaire du parasite, et est associée à son développement intra-érythrocytaire. Cette rigidité accrue est notamment causée par l'expression de protéines plasmodiales qui interagissent avec le cytosquelette du globule rouge [97]. Pour cette raison, ce sont surtout des formes matures du parasites qui sont retrouvées dans les cerveaux des patients décédés de neuropaludisme [93, 94]. De plus, l'expression de la protéine plasmodiale PfEMP (pour protéine membranaire des érythrocytes spécifique de *P. falciparum*)-1 à la surface des érythrocytes permet leur liaison aux différentes molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales, comme la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM)-1, dont l'expression augmente sur les coupes de cerveaux de patients décédés de neuropaludisme [93, 98]. Les souris C57BL/6 déficientes en ICAM-1 sont résistantes au neuropaludisme conjointement à une diminution de la séquestration cellulaire ce qui démontre l'importance de ce récepteur dans la physiopathologie du neuropaludisme [99]. Bien que la biomasse parasitaire [100], ou le nombre de globules rouges infectés, augmente dans le cerveau au cours du neuropaludisme murin [99], les globules rouges n'adhèrent pas à l'endothélium vasculaire mais semblent plutôt être piégés dans les veinules post-capillaires obstruées par les lymphocytes [101]. Le rôle des lymphocytes est discuté dans les paragraphes suivants.

Enfin, l'augmentation de l'expression de ces molécules d'adhésion est un marqueur d'activation des cellules endothéliales, qui, une fois activées

---

produisent des chimiokines telles que la protéine chimio-attractante des monocytes (MCP)-1 et la protéine induite par l'interféron (IFN)- $\gamma$  [IP]-10 [102, 103]. De plus, la liaison du ligand à ICAM-1 est responsable de réarrangements du cytosquelette des cellules endothéliales, qui, associé à leur apoptose, pourrait participer à la rupture de la BHE [104].

## 2.2. Activation des cellules du parenchyme cérébral

La BHE est une structure unique, constituée notamment de cellules endothéliales et d'astrocytes, dont le but est d'assurer un milieu optimal pour le fonctionnement des neurones, en contrôlant l'apport d'électrolytes et de métabolites ainsi que l'extravasation des cellules immunitaire dans le cerveau [103]. Plus spécifiquement, les astrocytes sont des cellules du parenchyme cérébral qui participent au maintien de l'intégrité de la BHE en contrôlant l'homéostasie du système nerveux central [88, 103]. Les analyses de coupes de cerveaux de patients décédés de neuropaludisme rapportent une redistribution non homogène des astrocytes dans le parenchyme cérébral (astrogliose) qui caractérise l'activation de ces cellules [91, 92]. Chez la souris CBA infectée par *P. b. ANKA*, une astrogliose est observée dès le troisième jour, et cet effet s'amplifie jusqu'au développement du neuropaludisme [88]. Outre les astrocytes, les microglies sont également des cellules du parenchyme cérébrale impliquées dans la physiopathologie du neuropaludisme, ainsi que dans d'autres maladies neurodégénératives [105]. Ces cellules sont dérivées de la lignée macrophagiques, et ont pour rôle la surveillance immunologique dans le cerveau et la réparation neuronale [105]. Chez les patients décédés de neuropaludisme, les microglies adoptent une forme amiboïde et expriment le CMH de classe II et CD68, et ces modifications suggèrent leur activation et la stimulation de leur activité phagocytaire [93, 106]. Des résultats similaires ont

---

été décrits chez la souris CBA à partir du troisième jour d'infection par *P. b. ANKA* [88].

D'après l'analyse *in situ* de coupes des cerveaux de souris, les astrocytes et les microglies expriment des ARN messagers codant TNF- $\alpha$  dès le cinquième jour de l'infection, avec une augmentation importante au jour d'apparition du syndrome neurologique (jour 7) [88]. Ceci est associé à la production de la protéine TNF- $\alpha$  par ces cellules au septième jour [88]. De plus, en réponse à une stimulation *in vitro* par un extrait antigénique de *P. berghei*. ANKA, la lignée astrocytaire KT-5 exprime les chimiokines MCP-1 et IP-10 [107]. De façon intéressante, les astrocytes, les microglies et les cellules endothéliales produisent également les cytokines et chimiokines TNF- $\alpha$ , IL-10 IP-10 et MCP-1 [88, 103, 105], et les niveaux de TNF- $\alpha$  et IL-10 ou d'IP-10 circulants sont augmentés chez patients atteints de neuropaludisme, en comparaison aux contrôles (non infectés, accès simple, ou autres cas graves de paludisme) [108-110]. Cependant, il semblerait que ces cytokines aient un rôle distinct dans la physiopathologie du neuropaludisme.

Le rôle de TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie du neuropaludisme est au cœur de controverses. Certaines études rapportent une augmentation des niveaux de TNF- $\alpha$  mesurés dans le LCR et le plasma de patients atteints de neuropaludisme en comparaison aux individus contrôles (non infectés, ou autres cas graves de paludisme), qui corrèle également avec l'apparition des déficits neurologiques [108, 111], alors que d'autres ne rapportent pas d'augmentation des niveaux de TNF- $\alpha$  circulant chez l'Homme [109, 112]. De plus, contrairement aux souris déficientes en TNFR-2 (le récepteur de TNF- $\alpha$ ), qui sont résistantes au neuropaludisme, les souris déficientes en TNF- $\alpha$  ne le sont pas [113], et les souris C57BL/6 déficientes en TNF- $\alpha$  présentent également une altération de



---

remyélinisation suite à un traitement au cuprizone, un inducteur de la démyélinisation, en comparaison aux souris sauvages [114]. Ainsi, ces derniers résultats suggèrent plutôt un rôle protecteur du TNF- $\alpha$  dans les cas d'atteintes de la myéline. Le fait que, contrairement aux souris sauvages, les souris C57BL/6 déficientes en IL-10 présentent des complications neurologiques suite à leur infection par *P. c. adami*, indique un effet protecteur de l'IL-10 vis à vis du neuropaludisme [115]. Au contraire, l'IP-10 est étroitement lié au développement du neuropaludisme, tel que suggéré par les souris C57BL/6 déficientes en IP-10, qui sont résistantes au neuropaludisme [116, 117]. De plus, des niveaux augmentés en IP-10 dans le sérum, le plasma ou le LCR sont associés au neuropaludisme chez l'Homme [109, 112]. Tel que son nom l'indique, la production de la chimiokine IP-10 est dépendante de l'IFN- $\gamma$ . De plus, sa production par les cellules du cerveau est étroitement liée au recrutement des lymphocytes T CD4 et CD8 [116, 117].

### **2.3. Les lymphocytes T**

Alors que chez le modèle murin plusieurs études ont montré le rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie du neuropaludisme [88], leur intervention au cours du neuropaludisme humain ne semble être que partielle, car toutes les analyses de coupes de cerveaux humains ne rapportent pas de séquestration de cellules mononuclées au niveau des microcapillaires cérébraux [92, 94, 96]. Chez les souris 129.B6 infectées par *P. berghei* ANKA, la déplétion des lymphocytes T CD8 au sixième jour de l'infection prévient le développement du neuropaludisme, ainsi que la déplétion des lymphocytes T CD4 avant et au quatrième jour l'infection [118]. Cependant, la déplétion des lymphocytes T CD4 au sixième jour de l'infection n'est pas associée à une protection [118], et le transfert chez les souris résistantes de cellules T CD4

---

isolées de souris infectées promeut le recrutement des CD8 dans le cerveau [100]. L'ensemble de ces résultats suggère l'implication séquentielle de ces lymphocytes dans la physiopathologie du neuropaludisme.

Grâce à son rôle d'organe épurateur, la rate élimine les globules rouges parasités de l'organisme qui sont par la suite phagocytés et pris en charge par les CPA. En parallèle à ce phénomène et après la détection d'antigènes, des CPA du cerveau migrent dans la rate. De cette façon, la rate devient le siège d'activation des lymphocytes T suite à la reconnaissance spécifique du complexe CMH-peptide antigénique présenté par les CPA par le TCR. Par la suite, les cellules T activées migrent dans le cerveau, un phénomène qui est concomitant avec l'apparition des signes cliniques [119]. Cependant, les cellules T CD8 et T CD4 ont un rôle distinct dans la physiopathologie du neuropaludisme.

Les cellules T CD8 sont des cellules cytotoxiques qui une fois activées migrent au site inflammatoire, et induisent l'apoptose des cellules cibles par un mécanisme associé à la production de perforine/granzyme ou à la reconnaissance de Fas par son ligand, FasL. Chez les souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA, la majorité des lymphocytes T CD8 qui migrent dans le cerveau expriment la perforine [113], et les souris C57BL/6 déficientes en perforine sont résistantes au neuropaludisme bien que la migration des cellules T CD8 ne soit pas altérée [120]. Cependant, 50% des souris C57BL/6 déficientes en Fas développent un neuropaludisme [121], ou un syndrome neurologique auto-résolutif suite à l'infection par *P. berghei* ANKA [122]. L'activité cytolytique des cellules T CD8 au cours du neuropaludisme serait de cette façon principalement due à la production de perforine/granzyme. Chez l'Homme, les taux de Fas et de Fas-L mesurés dans le plasma ou le LCR sont

---

significativement plus élevés dans les cas de neuropaludisme en comparaison aux individus non infectés, ce qui suggère également l'implication de ce mécanisme pro-apoptotique associé à la physiopathologie du neuropaludisme chez l'Homme [109, 112].

Les lymphocytes T CD4 ont un rôle auxiliaire à la réponse immunitaire de par leur production de cytokines. Par ailleurs, le type de cytokines produites par les cellules T CD4 dépend de l'orientation de leur réponse Th1 ou Th2. La réponse Th1 qui est induite par l'IL-12 est caractérisée par la production d'IFN- $\gamma$ , alors que IL-4 et IL-10 induisent la polarisation des cellules T CD4 naïves Th0 en Th2, majoritairement productrices d'IL-4 [123]. Tel que nous l'avons évoqué précédemment, les dosages de cytokines réalisés sur des échantillons humains donnent des résultats rétrospectifs, et il est difficile de discriminer les cytokines impliquées dans le réseau physiopathologique. Néanmoins, dans les cas d'infections par *P. falciparum* les niveaux d'IFN- $\gamma$  sont comparables entre les différents groupes de patients, voire même plus faible chez les patients atteints de neuropaludisme, par rapport aux patients atteints de paludisme non grave [108, 109, 112, 124]. De plus, chez les enfants impaludés, les niveaux plasmatique d'IFN- $\gamma$  sont plus élevés chez les Fulanis que chez les Dogons, deux ethnies maliennes qui sont respectivement résistantes et sensibles aux formes graves de paludisme [125]. Au contraire, les souris C57BL/6 déficientes en IFN- $\gamma$  sont résistantes au neuropaludisme murin [100], ainsi que les souris déplétées en cellules T CD8 au moyen d'un anticorps spécifique [126]. Alors que les travaux réalisés chez les souris indiquent que la production splénique d'IFN- $\gamma$  commence plusieurs jours avant l'apparition du syndrome neurologique, puis diminue à la mort des souris [100, 107], nous proposons qu'une cinétique de production similaire puisse se produire chez l'Homme et

---

pourrait de cette façon expliquer les faibles niveaux d'IFN- $\gamma$  mesurés chez les patients atteints de neuropaludisme.

#### **2.4. Rupture de la BHE**

La réponse inflammatoire induite suite au recrutement des lymphocytes T cytotoxiques et pro-inflammatoires, à la séquestration des globules rouges et à l'activation des cellules endothéliales, des astrocytes et des microglies participerait à la rupture de la BHE chez la souris [101, 127, 128]. De façon intéressante, le bulbe olfactif est le premier site cérébral atteint, puis la rupture de la BHE se généralise à l'ensemble du cortex et du cervelet au moment du développement du neuropaludisme murin [127, 128]. Chez l'Homme, le neuropaludisme est également associé à la rupture de la BHE tel que suggéré par la diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées [occludine, zonula occludens-1 et vinculine] en comparaison aux contrôles (sepsis sévères et atteintes du système nerveux central sans paludisme) et par l'extravasation du fibrinogène sur les coupes de cerveaux de patients décédés [92, 98]. La perte de l'intégrité de la BHE expose les cellules du parenchyme cérébral aux protéines plasmatiques et aux antigènes parasitaires, et pourrait ainsi contribuer à la rupture du flux axonal et à la démyélinisation qui sont associées au neuropaludisme humain et murin.

#### **2.5. Rupture du flux axonal, démyélinisation des axones**

La myéline est principalement constituée de sphingomyéline et participe au maintien des fibres neuronales en recouvrant les axones, et favorise une transmission plus rapide de l'influx nerveux. La destruction de la myéline cause une rupture du flux axonal et peut générer des maladies neurodégénératives, ou des affections post-traumatiques [129]. La rupture du flux axonal et la

---

démyélinisation des neurones sont des caractéristiques communes à la physiopathologie du neuropaludisme humain et murin. Chez l'Homme, la rupture du flux axonal lors du neuropaludisme a été révélée par le dosage de tau, une protéine impliquée dans le maintien des microtubules des axones, et donc indirectement dans le transport axonal. Les concentrations de tau mesurées dans le LCR augmentent avec la gravité et la durée du coma chez les patients infectés par *P. falciparum* [130, 131]. De plus, l'accumulation du précurseur de la  $\beta$ -amyloïde sur les coupes de cerveaux humain décédés de neuropaludisme confirme l'importance de la rupture du flux axonal dans le développement de la maladie [91, 92]. Chez les souris CBA infectées par *P. berghei* ANKA, des signes de démyélinisation et de rupture de flux axonal sont visibles dès le cinquième jour de l'infection, et ces signes s'amplifient avec l'évolution de la maladie jusqu'à atteindre un pic à la mort des animaux [127].

Les mécanismes de démyélinisation et de rupture du flux axonal sont encore incertains, mais ils semblent être fortement associés à l'obstruction des microvaisseaux sanguins suite à la séquestration cellulaire car elle diminue les apports d'oxygène ainsi que l'élimination de métabolites (comme le lactate), et de cytokines cytotoxiques [88]. De même, l'accumulation de neurotransmetteurs neurotoxiques, comme l'acide quinoléique, un agoniste des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate, a été rapporté dans le LCR de patients atteints de neuropaludisme [132]. De plus, les cellules mononuclées recrutées dans le cerveau semblent jouer un rôle actif dans les processus d'atteintes cérébrales, car les hémorragies « en anneau » décrites sur des coupes de cerveaux co-localisent avec les lésions axonales et les cellules recrutées [91, 92]. Chez le modèle murin, la démyélinisation coïncide avec l'activation des astrocytes et des microglies, ainsi qu'avec le recrutement des leucocytes [127].

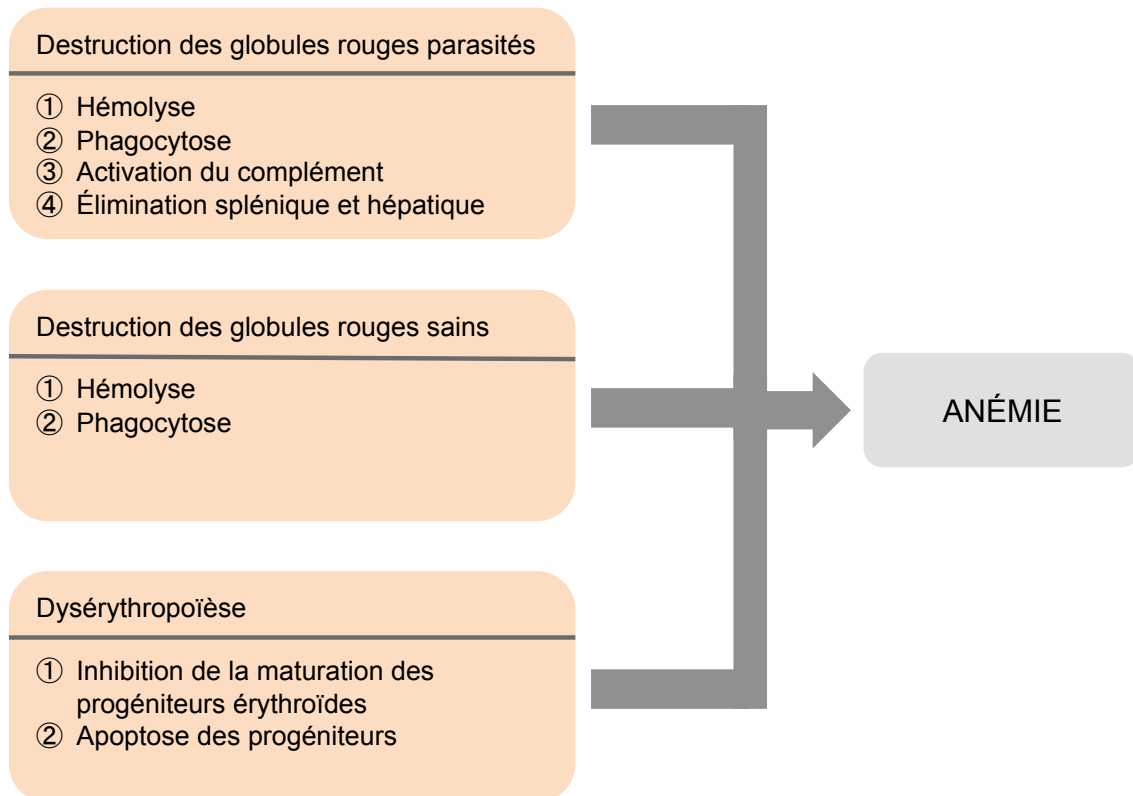


Figure 9. Mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'anémie palustre sévère.

### **3. Physiopathologie de l'anémie palustre sévère**

Comme pour le neuropaludisme, l'étiologie de l'anémie palustre sévère est complexe. L'étude de la physiopathologie de l'anémie palustre sévère a longtemps été négligée, mais il est maintenant clairement établi qu'elle est le résultat d'une destruction excessive des globules rouges parasités et sains et d'une anomalie dans la production érythrocytaire (Figure 9). L'âge, le statut immunitaire et les polymorphismes génétiques sont des facteurs qui influencent grandement l'anémie [74].

#### **3.1. Élimination des globules rouges infectés**

L'infection par le parasite et la destruction des globules rouges par le parasite et les cellules immunitaires contribuent au développement de l'anémie palustre sévère.

Les cellules phagocytaires ont un rôle actif dans le processus d'élimination des globules rouges parasités. D'après Turrini et al., la phagocytose des globules rouges parasités par les macrophages/monocytes est dépendante de l'opsonisation des érythrocytes infectés par les immunoglobulines (Ig) G, suivi par l'activation du complément [133]. Les globules rouges infectés se comportent comme des globules rouges sénescents, tel que suggéré par l'implication des anticorps anti-Band3 dans le processus de phagocytose des trophozoïtes [133]. De façon intéressante, la phagocytose des érythrocytes infectés est d'autant plus importante que le stade des parasites est avancé. Ce phénomène concorde avec l'augmentation du métabolisme parasitaire, mais aussi avec les altérations membranaires des érythrocytes, telle que l'externalisation des phospholipides de la membrane interne, et l'expression de protéines plasmodiales [133].

---

Outre ces mécanismes, le développement intra-érythrocytaire du parasite entraîne une diminution de la déformabilité des globules rouges qui est associée à l'avancement du stade parasitaire. En effet, la pression et le temps nécessaire pour faire entrer des globules rouges parasités dans une micropipette de 3µm de diamètre sont plus élevés pour les érythrocytes infectés avec les formes matures (trophozoïtes et schizontes) que ceux infectés avec les formes anneaux [97]. Nash et al. proposent que l'augmentation de la rigidité des globules rouges est le résultat de réarrangements et d'interactions des protéines parasitaires avec les protéines du cytosquelette [97]. Ainsi, une diminution de la déformabilité a pour conséquence un passage plus difficile des érythrocytes infectés dans les microcapillaires sanguins, pouvant aboutir non seulement à des complications hémorhéologiques, mais aussi à une fragilisation et à une rupture des érythrocytes infectés. De plus, la séquestration des globules rouges plus rigides au niveau de la rate et du foie favorise leur phagocytose et leur destruction par les cellules du système réticulo-endothélial.

La parasitémie périphérique, mesurée par frottis sanguin, n'est pas toujours associée à l'anémie [72, 73, 75, 134-137]. Tel que nous l'avons cité précédemment, l'infection par *Plasmodium* est associée à une séquestration de globules rouges dans les organes profonds, ce qui pourrait expliquer la discordance entre le taux d'hémoglobine et la parasitémie périphérique mesurés. D'autres études complémentaires seraient nécessaires pour évaluer la contribution de la rupture des globules rouges infectés dans l'anémie palustre sévère. Par exemple, une corrélation du taux d'hémoglobine avec la biomasse parasitaire totale, permettrait d'apprécier la parasitémie dans les organes profonds et périphériques en fonction de la sévérité de l'anémie palustre sévère chez l'Homme. Néanmoins, des mécanismes complémentaires à la destruction



---

des globules rouges infectés semblent être également impliqués dans la physiopathologie de l'anémie palustre sévère.

### 3.2. Destruction des globules rouges sains

Des globules rouges sains sont également détruits dans la rate et le foie au cours de l'anémie palustre sévère. Pour chaque globule rouge parasité lysé, il a été estimé que environ dix globules rouges sains seraient également détruits, le tout probablement causé par des dommages membranaires de types oxydatifs [138].

Chez l'Homme, le taux d'acides gras membranaires polyinsaturés est significativement plus faible chez les patients atteints de paludisme grave, en comparaison aux contrôles et le taux d'antioxydant membranaire  $\alpha$ -tocophérol diminue proportionnellement avec le taux d'hémoglobine, et d'avantage chez les patients atteints d'anémie palustre sévère [139]. Ainsi, l'élimination des globules rouges non infectés pourrait impliquer un stress oxydatif important. *In vitro*, la culture des globules rouges infectés avec des globules rouges sains accélère le processus de senescence des globules rouges non infectés [140]. Le stress oxydatif associé au paludisme est responsable de l'oxydation des lipides, et de l'exposition des résidus phosphatidylsérine à la surface des érythrocytes. Dans ce contexte, une augmentation du pourcentage de globules rouges marqués par l'annexine V, un composé fluorescent qui se lie à la phosphatidylsérine, a été constaté chez des individus souffrant d'anémie palustre sévère en comparaison aux accès simples [136]. Les érythrocytes « oxydés » sont ensuite éliminés par les macrophages spléniques.

Les individus atteints d'anémie palustre sévère présentent une splénomégalie plus importante que ceux atteints par une autre forme de paludisme, grave ou

---

simple, et la taille de la rate corrèle négativement avec le taux d'hémoglobine, ce qui témoigne d'une augmentation de l'activité phagocytaire dans cet organe [72, 136, 141]. Au cours de l'infection, les taux de néoptérine plasmatiques augmentent, et d'autant plus dans les cas d'anémies palustres sévères [136, 142], et ses niveaux élevés persistent chez des individus ayant reçu un traitement antipaludique dont l'anémie n'a pas été corrigée [143]. Alors que la néoptérine est produite par les macrophages/monocytes activés, l'ensemble de ces données montre l'importance de ces cellules dans la physiopathologie de l'anémie palustre sévère. *In vitro*, la phagocytose des globules rouges provenant d'individus atteints d'anémie palustre sévère est significativement plus importante que celle des globules rouges provenant de patients contrôles asymptomatiques ou symptomatiques, et chez la souris, la déplétion de cellules phagocytaire retarde le développement de l'anémie [72, 136, 144].

La phagocytose des globules rouges sains au cours du paludisme semble également impliquer la reconnaissance de protéines d'origine parasitaire par les phagocytes, telle RSP (pour protéine de surface des anneaux)-2, présentes à la surface des érythrocytes sains [145]. Curieusement, le pourcentage de globules rouges non infectés exprimant RSP-2 à leur surface est plus important que le pourcentage de cellules parasitées, ce qui corrèle également avec un index de phagocytose des globules rouges plus élevé [nombre de globules rouges sains ou infectés pour 100 macrophages/monocytes comptés] [145]. Dans ce contexte, il a été proposé que l'expression de RSP-2 à la surface des érythrocytes sains provienne de tentatives d'infections échouées par des mérozoïtes. De façon intéressante, le taux d'IgG anti-RSP-2 est plus élevé chez les enfants atteints d'anémie palustre sévère [146], et les globules rouges provenant d'individus atteints d'anémie palustre sévère ont significativement

---

plus d'IgG à leur surface que les globules rouges prélevés de patients asymptomatiques ou atteints d'accès simples [72]. La reconnaissance des globules rouges par des anticorps pourrait également activer la voie classique du complément, tel que suggéré par une augmentation de patients positifs pour le test de Coombs direct mixte [anti-IgG et anti-C3] chez des sujets atteints d'anémie palustre sévère. De plus, des taux plus faibles d'hémoglobine sont constatés chez des patients positif pour le test de Coombs direct en comparaison aux patients négatifs [141]. L'anémie palustre sévère est également associée à une diminution de l'expression des régulateurs d'activation du complément, CR1 et CD55, à la surface des globules rouges [72, 136]. Cependant, l'hémolyse directe induite suite à l'activation du complément semble avoir une très faible contribution dans la physiopathologie de l'anémie palustre sévère tel que suggéré par un manque d'association entre la positivité du test de Coombs et l'hémoglobinurie. De même, bien que des cas d'anémies hémolytiques auto-immunes associée à l'infection par *Plasmodium* aient été rapportés dans la littérature, leur contribution reste rare [141, 147].

### **3.3. Anomalies dans la production des globules rouges**

Outre la destruction des globules rouges sains et des globules rouges parasités, l'érythropoïèse est perturbée au cours de l'infection par *Plasmodium*. Cette perturbation résulterait (i) d'une absence de réponse des cellules érythroïde à une stimulation par l'érythropoïétine (EPO), (ii) d'une diminution de la production d'EPO et/ou encore (iii) d'une production de cytokines responsables de l'inhibition de l'érythropoïèse.

### 3.3.1. Erythropoïèse physiologique

Dans les conditions homéostatiques, l'érythropoïèse a lieu dans la moelle osseuse. La différenciation des cellules souches hématopoïétique et l'engagement des progéniteurs multipotents vers la lignée érythroïde sont les premières étapes de la production de globules rouges. Les unités d'éclosions érythrocytaires (BFU-E) sont les premiers progéniteurs spécialisés de la lignée érythroïde, qui se différencient en unité formant des clones érythrocytaires (CFU-E). Les BFU-E et CFU-E ont été ainsi nommées suite à leur capacité à former des colonies sur un milieu semi-solide de méthylcellulose. Par la suite, les CFU-E se différencient en proérythroblastes, puis en érythroblastes – basophiles, polychromatophiles, acidophiles – et enfin en réticulocytes [148]. La synthèse d'hémoglobine a lieu chez les proérythroblastes et les érythroblastes, puis, les érythroblastes procèdent à une énucléation pour laisser place aux réticulocytes. Ces derniers migrent dans le compartiment sanguin, où la diminution de leur volume corpusculaire est associée leur différenciation terminale en érythrocytes.

L'EPO joue un rôle majeur dans la production des érythrocytes. La délétion du gène codant EPO n'est pas viable chez les souris, et les embryons homozygotes montrent un déficit dans la production d'érythrocytes matures [149]. L'activité de l'EPO est lente, et nécessite en moyenne 3 à 4 jours pour induire la formation de nouveaux érythrocytes [150]. La liaison de l'EPO à son récepteur (EPO-R) stimule l'expression de nombreux gènes associés à la survie cellulaire, à la prolifération et à la différenciation des progéniteurs érythroïdes, tel que le facteur de transcription anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> qui est d'ailleurs indispensable à la maturation de la lignée érythrocytaire [151, 152]. La production d'EPO est permanente pour assurer le renouvellement quotidien des érythrocytes. Elle est

principalement assurée par les reins à l'âge adulte, et la régulation de sa transcription est fortement dépendante de la pression artérielle en dioxygène, et nécessite la stimulation des éléments de réponse à l'hypoxie [153, 154]. Ainsi, la production en EPO augmente en cas d'hémorragie, d'hémolyse et d'aplasie médullaire, mais aussi lors d'anémies fonctionnelles associées à une diminution de la pression artérielle en dioxygène, tel que durant les intoxications au monoxyde de carbone ou lors d'un séjour à haute altitude [153].

### 3.3.2. Dysérythropoïèse au cours de l'anémie palustre

Les enfants atteints d'anémie palustre sévère présentent une réticulocytopénie, malgré une augmentation de l'EPO associée à une hyperplasie cellulaire détectée dans la moelle osseuse. Par ailleurs, les érythroblastes sont de structure anormale chez ces patients [138, 155, 156]. Chez la souris C57BL/6, la cellularité, le nombre de progéniteurs érythroïdes médullaires, et la réticulocytose diminuent avec l'anémie palustre sévère [86, 157], et l'injection d'EPO au cours de l'infection par *P. chabaudi* AS ne rétabli pas les valeurs normales de globules rouges et de réticulocytes [158]. De façon intéressante, le traitement de souris infectées avec de l'EPO, est associé à un taux d'érythroblastes spléniques deux fois plus faible que chez les souris naïves traitées avec l'EPO [137], suggérant une inhibition de l'érythropoïèse associée à l'infection. De plus, les lysats de globules rouges infectés, mais pas de globules rouges sains, inhibent *in vitro* l'expansion des progéniteurs érythroïdes CD34<sup>+</sup> issus de sang de cordon et cultivés en présence de EPO, d'IL-3 et de facteur de croissance des cellules souches [155]. Il semblerait donc que des facteurs libérés lors de l'infection soient à l'origine d'une altération de la réponse à l'EPO.

---

Dans ce contexte, l'hémozoïne inhibe l'expansion et la maturation des progéniteurs érythroïdes *in vitro*, en induisant l'apoptose des cellules [155, 159]. De façon intéressante, le nombre de monocytes périphériques contenant de l'hémozoïne corrèle négativement avec le taux d'hémoglobine chez l'Homme infecté par *P. falciparum* [155, 156, 160], ou avec l'hématocrite chez la souris infectée par *P. chabaudi* AS [137]. De plus, des biopsies de moelle osseuse réalisées chez des enfants développant une anémie palustre sévère montrent une accumulation d'hémozoïne dans les cellules myéloïdes, et le nombre de cellules myéloïdes ayant phagocyté l'hémozoïne corrèle avec le nombre d'érythroblastes de structure anormales, et indirectement avec l'hématocrite [155]. Les macrophages présents dans les îlots érythroblastiques sont des cellules essentielles à la maturation des érythroblastes qui semblent être capables d'inhiber les effets délétères de l'hémozoïne, en la phagocytant, et en favorisant ainsi l'expansion érythroïde [159]. Néanmoins, *in vitro*, l'hémozoïne induit également la production du facteur inhibiteur de migration des macrophages (MIF) par les monocytes humains et les macrophages murins [86].

*In vitro*, le MIF inhibe l'expansion clonale des BFU-E et CFU-E cultivés sur milieu semi-solide, ainsi que la différenciation des lignées de progéniteurs érythroïdes murin MEL et humains K562 [86]. En accord avec ces observations, McDevitt et al. montrent également que les souris BALB/c déficientes en MIF développent une anémie plus modérée que les souris sauvages suite à une infection par *P. chabaudi* AS, et que cette observation est vraisemblablement liée à l'augmentation du nombre de colonies de BFU-E et CFU-E [86]. Bien que les niveaux plasmatiques de MIF augmentent chez l'Homme au cours de l'infection par *P. falciparum* [86], ils semblent diminuer avec la sévérité de

---

l'anémie palustre chez des enfants kenyans [160]. D'après l'étude de Awandare et al., la production *ex vivo* de MIF par les cellules mononuclées du sang périphérique diminue avec la sévérité de l'anémie [160], suggérant un impact différent de du MIF au cours de l'érythropoïèse murine et humaine.

D'autres cytokines ont montré jouer un rôle modulateur important au cours de l'anémie palustre sévère. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  agissent en synergie avec le MIF, en inhibant *in vitro* l'expansion clonale des progéniteurs érythroïdes humains (CD34<sup>+</sup>) et murins (CFU-E et BFU-E) [86, 155]. Chez les souris BALB/c, la transfusion de TNF- $\alpha$  au cours de l'infection par *P. berghei* est responsable d'une diminution du nombre de CFU-E et BFU-E médullaires et spléniques formés *in vitro* [161]. Ainsi, le TNF- $\alpha$  semble avoir un impact délétère sur l'érythropoïèse. Cependant, les résultats obtenus chez l'Homme sont contradictoires quant à l'augmentation ou à la diminution des niveaux plasmatiques de TNF- $\alpha$  mesurés chez des patients atteints d'anémie palustre [161-163]. Néanmoins, l'anémie liée à l'infection par *P. falciparum* est fortement associée à une altération de la réponse pro-inflammatoire telle que suggérée par la diminution du ratio IL-10/TNF- $\alpha$ , en comparaison aux autres formes de paludisme grave ou simple [161-164]. Cependant, la stimulation *in vitro* des macrophages dérivés de cellules mononuclées du sang périphérique avec de l'IL-10 augmente leur production en hépcidine, une hormone peptidique responsable de l'inhibition de l'absorption du fer, essentiel à la formation de l'hémoglobine et donc à l'érythropoïèse [165]. De plus, des cellules mononuclées du sang périphérique mises sur milieu semi-solide de méthylcellulose, et stimulées avec IL-10, forment moins de BFU-E que les cellules non traitées, vraisemblablement par l'inhibition de la production de facteur de croissance de la lignée granulo-monocytaire (GM-CSF) par les

---

macrophages. En effet, GM-CSF est essentiel à l'expansion érythroïde [166]. Ainsi, l'IL-10 semble également avoir un impact délétère sur l'érythropoïèse en modulant la réponse des macrophages. L'ensemble de ces résultats souligne la complexité de la physiopathologie de l'anémie palustre sévère.



## **PARTIE II. RESULTATS**

---



---

## CHAPITRE 1. MODULATION DE LA REPONSE DES LYMPHOCYTES T CD4 PAR L'HEME

### 1. Contexte du travail

La réponse de type 1 est développée à travers l'action des macrophages de phénotype M1 (producteurs d'IL-12) et des lymphocytes T CD4 Th1, qui produisent *in fine* des hauts niveaux d'IFN- $\gamma$  et des faibles niveaux d'IL-10. En contrepartie, la production importante d'IL-4 et d'IL-10 est associée à la réponse de type 2, qui est générée conjointement par des macrophages de type M2, et des lymphocytes T CD4 Th2.

Les patients affectés par des maladies hémolytiques chroniques, congénitales ou auto-immunes, développent une susceptibilité aux infections à pathogènes intracellulaires qui est évocatrice d'une anomalie dans la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate ; plusieurs données suggèrent que les maladies hémolytiques sont associées à une réponse de type 2. En effet, les concentrations sériques d'IL-4 et d'IL-10 de patients atteints de drépanocytose sont plus élevées que chez les individus sains, tandis que les niveaux de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 restent inchangés [167-169]. Similairement, les cellules de sang périphérique provenant de patients atteints d'anémie hémolytique auto-immune produisent moins d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12, mais plus d'IL-4 et d'IL-10 que les

---

cellules provenant d'individus sains, après leur stimulation *ex vivo* avec du LPS [170], ou de la phytohémagglutinine [171].

Alors que les maladies hémolytiques sont associées à des niveaux élevés d'hème circulant, il a été montré que l'hème favorise la polarisation fonctionnelle des macrophages vers un phénotype M2, en partie par une déplétion du GSH intracellulaire [38, 172]. Ainsi, la libération d'hème au cours de l'hémolyse pourrait favoriser l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil de type 2. Les macrophages sont des CPA, et les cytokines qu'ils produisent conditionnent par la suite la réponse des lymphocytes T CD4 auxiliaires naïves, Th0, en Th1 ou Th2 [123, 173]. Ainsi, nous suggérons que l'hème favorise la réponse de type 2, et module la réponse des lymphocytes T CD4 en Th2 similairement à ce qui a été décrit pour les macrophages.

Dans ce chapitre nous avons analysé les effets de l'hème sur l'activation et la modulation de la réponse des lymphocytes T CD4. Pour cela, nous avons soumis des souris BALB/c à des épisodes hémolytiques par injections de phénylhydrazine, et nous avons ensuite caractérisé l'impact de l'hème sur l'activation et la modulation de la réponse des lymphocytes T CD4 *in vitro* et *in vivo*. Au cours de la phase érythrocytaire de l'infection par *Plasmodium*, la production d'IFN- $\gamma$  est essentielle à l'élimination du parasite [174, 175]. Pour cette raison, nous avons également étudié l'impact de la modulation de la réponse Th1/Th2-dépendante de l'hème sur la clairance du parasite lors de l'infection des souris BALB/c par *P. c. adami* DK.

---

## 2. Matériels et méthodes complémentaires à l'Article 1

### 2.1. Hème

Dans le but d'analyser *in vitro* et *in vivo* la réponse des cellules à l'hème, une solution stock d'hème (Hemin BioXtra porcine, Sigma) de 25mg/mL a été préparée dans du NaOH 0,1M. Cette solution a par la suite été diluée dans du tampon phosphate salin (PBS) pour obtenir la concentration finale souhaitée. Le pH de la solution a été vérifié avant chaque utilisation.

Le LPS peut être souvent à l'origine de contaminations de produits biologiques commerciaux, et pourrait biaiser de cette façon nos résultats. Afin d'éliminer l'endotoxine possiblement présente, la solution stock d'hème a été passée sur une colonne en résine ToxinEraser™ (GenScript) préalablement saturée, et en suivant les indications du fabricant.

### 2.2. Souris

Pour analyser les effets de l'hémolyse sur la réponse de type 1 et 2, des souris BALB/c ont reçu des injections de phénylhydrazine (40mg/Kg dans 100µL). Deux injections intrapéritonéales ont été administrées à 24 h d'intervalle, à la suite desquelles les souris ont été euthanasiées 6 jours plus tard. Des souris naïves ont été maintenues dans les mêmes conditions d'hébergement, mais n'ont pas reçu de traitement. La rate et la moelle osseuse du tibia et du fémur ont été prélevées, et les globules rouges ont été lysés avec la solution RBC Lysing Buffer Hybri-max (Sigma).

Le nombre de lymphocytes T CD4 totaux, de lymphocytes TCD4 activés, de polynucléaires neutrophiles et de mastocytes ont été analysés par cytométrie en

flux. Des cellules de la rate et de la moelle osseuse ont également été stimulées *ex vivo* pour estimer la production en cytokines par un dosage immunoenzymatique sur support solide (ELISA).

### **2.3. Essais avec les cellules de la rate**

Toutes les analyses *in vitro* ont été réalisées à partir de cellules isolées de rates de souris BALB/c naïves, et cultivées par la suite dans du milieu RPMI 1640 complet [10% de sérum de veau fœtal (SVF), 10U/mL de pénicilline/streptomycine, et 0,5µM β-mercaptoéthanol].

À partir d'une suspension de splénocytes à  $4 \times 10^6$  cellules/ml, 0,5mL ont été mis en culture pendant 48h, avec 20µg/mL ou 40µg/mL d'hème dans des plaques de cultures pré-incubées avec 2,5µg/mL d'anticorps anti-CD3 (BioLegend). Des cellules contrôles ont été cultivées dans les mêmes conditions, mais sans hème. La production en cytokine a été mesurée tel que décrit dans l'Article 1. Par la suite, l'expression de CD69 par les cellules T CD4 a été analysée par cytométrie en flux.

#### **2.3.1. Elimination des lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont les CPA majoritaires dans la rate. Ainsi, pour confirmer l'importance des CPA dans l'activation des lymphocytes T CD4 médiée par l'hème, les lymphocytes B ont été déplétés de la suspension de splénocytes. Cette déplétion a été réalisée en utilisant le kit de sélection positive EasySep® Mouse CD19<sup>+</sup> Positive Selection Kit (StemCell Technologies). Une analyse par cytométrie en flux des résultats de purification indiquait, en moyenne, une efficacité de purification de 17%, soit 11% des cellules restantes étaient CD19<sup>+</sup>. Ces cellules ont par la suite été mises en culture avec 20mg/mL d'hème.

### **2.3.2. Traitement des cellules avec l'anticorps anti-IA/IE**

Sutherland et al. ont proposé que l'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème nécessite la reconnaissance du CMH de classe II, présenté par les CPA, *via* le TCR. Pour vérifier cette hypothèse, des splénocytes ont été traités pendant 30min avec 10µg/mL d'anticorps anti-CMH de classe II IA/IE (BioLegend), puis stimulés avec l'hème. Après 48h de culture, l'expression de CD69 par les cellules T CD4 a été analysée par cytométrie en flux.

### **2.3.3. Traitement des cellules avec les antioxydants**

Plusieurs antioxydants ont été testés sur les cellules traitées avec hème. Ainsi, les splénocytes ont été prétraités avec 10mM de N-acétyl-L-cystéine (NAC ; Sigma), 5000U/mL de catalase (Sigma) ou 100µM d'acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique (Trolox ; Sigma) dilués dans du PBS. Les cellules ont ensuite été traitées avec l'hème, et maintenues en culture pendant 48 h. L'activation et le statut redox des cellules ont été analysés par cytométrie en flux.

## **2.4. Marquages par cytométrie en flux**

### **2.4.1. Statut redox des cellules**

Le statut redox des cellules après traitement avec hème et/ou des antioxydants a été analysé par cytométrie en flux. Après 30 min de culture avec ou sans hème, les cellules ont été lavées dans une solution de PBS-10% SVF et resuspendues dans 10µM de 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H<sub>2</sub>DCFDA ; Life Technologies) pendant 30 min, à 37°C et à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été lavées dans du PBS-10% SVF, et l'intensité de

---

fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. Des cellules traitées avec du peroxyde d'hydrogène ont été ajoutées comme contrôles positives, et des cellules non marquées avec H<sub>2</sub>DCFDA comme contrôles négatives.

#### **2.4.2. Phénotypes des cellules**

L'activation des cellules T CD4 a été analysée suite à un marquage des splénocytes avec les anticorps anti-CD4-PerCP (eBioscience), anti-CD69-FITC (eBioscience). Le marquage des mastocytes et des polynucléaires basophiles a été réalisé avec des anticorps anti-ckit-PE (eBioscience) et anti-FcεRIα-FITC (eBioscience). La fluorescence des cellules a été analysée par cytométrie en flux (cytomètre FACScan ; BD Biosciences).

#### **2.5. Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 5.0). Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.



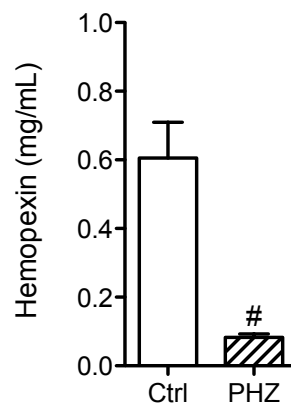


Figure I.1. Diminution de l'hémopexine par la phénylhydrazine.

L'hémopexine a été dosée dans le plasma de souris naïves (Ctrl) et de souris ayant reçu la phénylhydrazine (PHZ) (n = 4-6). #p < 0,05 d'après une analyse par Mann-Whitney.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Hémolysse et immunomodulation**

Nous avons analysé l'effet de l'hémolysse sur la balance des réponses de type 1 et 2 en injectant du phénylhydrazine aux souris, deux jours de suite. La phénylhydrazine est utilisée depuis de nombreuses années pour l'étude des modèles animaux d'anémies hémolytiques. Bien que encore incertains, ses mécanismes d'actions semblent notamment faire intervenir la production d'ERO responsables d'altérations des protéines érythrocytaires [176].

Dans le but d'avoir un aperçu quant à la libération d'hème suite aux traitements à la phénylhydrazine, nous avons analysé les niveaux d'hémopexine plasmatique. En effet, la diminution d'hémopexine circulante est proportionnelle à l'augmentation en hème libre [18]. Comme prévu, l'injection de phénylhydrazine est associée à une diminution importante de la concentration plasmatique en hémopexine, et donc vraisemblablement à la libération d'hème libre (Figure I.1).

##### **3.1.1. Activation des lymphocytes T CD4 et induction d'une réponse Th2 par la phénylhydrazine**

Sept jours après la première injection de phénylhydrazine, le phénotype des lymphocytes T CD4 spléniques a été analysé par cytométrie en flux. Nos résultats indiquent que malgré une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD4 dans la rate des souris recevant une injection de phénylhydrazine (Figure I.2A), le nombre absolu augmente significativement en comparaison aux souris naïves (Figure I.2C). De plus, nous montrons une activation des lymphocytes T CD4 dans la rate de souris traitées avec la phénylhydrazine, qui

---

est suggéré par l'augmentation du pourcentage et du nombre absolu de cellules CD4<sup>+</sup> exprimant le marqueur d'activation précoce, CD69 (Figures I.2B, 2D).

La production en IFN- $\gamma$  et IL-4 par les lymphocytes T a été quantifiée par ELISA après stimulation *ex vivo* des splénocytes avec un anticorps anti-CD3. D'après nos résultats, les cellules provenant des rates de souris traitées avec la phénylhydrazine produisent deux fois moins d'IFN- $\gamma$  que les témoins (Figure I.3A). Bien que le nombre absolu de lymphocytes T CD4 augmente dans la rate des souris traitées avec l'hème, leur fréquence d'apparition diminue (Figure I.2). Ainsi, la diminution de la production d'IFN- $\gamma$  pourrait être liée à la diminution de la proportion en lymphocytes T CD4 dans la rate. Cependant, pour avoir une meilleure idée quant à la réponse des lymphocytes T CD4, nous avons purifiés ces cellules à partir des rates de souris naïves et des souris traitées avec la phénylhydrazine, que nous avons cultivé dans les conditions de polarisation Th1. Nos résultats indiquent une diminution de moitié de la production en IFN- $\gamma$  pour les cellules provenant des souris traitées en comparaison aux naïves (Figure I.3C). Cependant, la production en IL-4 est inchangée entre les deux conditions, que ce soit pour les splénocytes restimulés *ex vivo*, ou pour les lymphocytes T CD4 cultivés dans les conditions de polarisation Th2 (Figures I.3B, 3D).

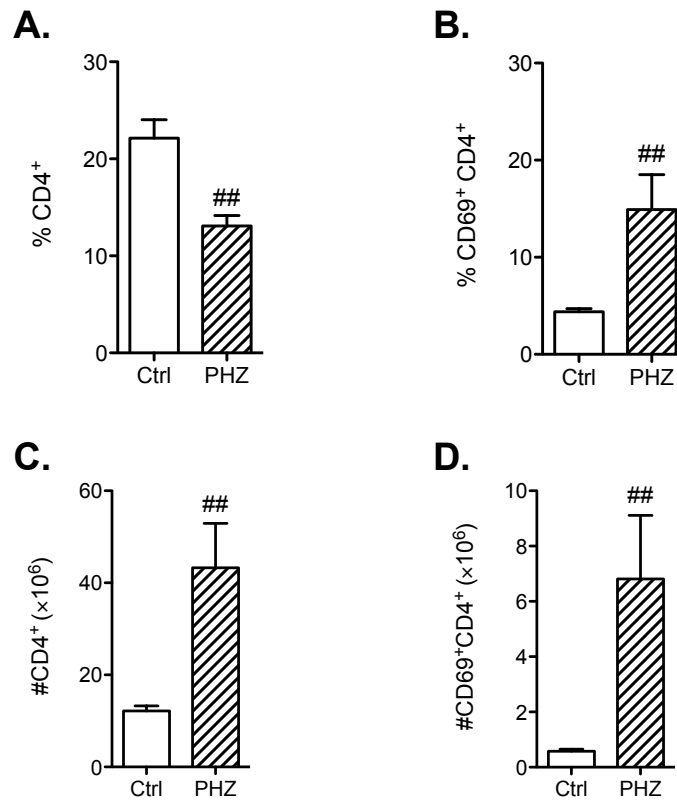


Figure I.2. L'injection de phénylhydrazine active les lymphocytes T CD4.

(A) Pourcentage de lymphocytes T CD4 totaux et (B) activés (CD69<sup>+</sup>) dans la rate de souris naïves (Ctrl) et de souris ayant reçu 2 injections de phénylhydrazine (PHZ). (C) Nombre de lymphocytes T CD4 totaux et (D) activés dans les rates des souris (n = 4-10). ##p < 0,01 d'après une analyse par Mann-Whitney.

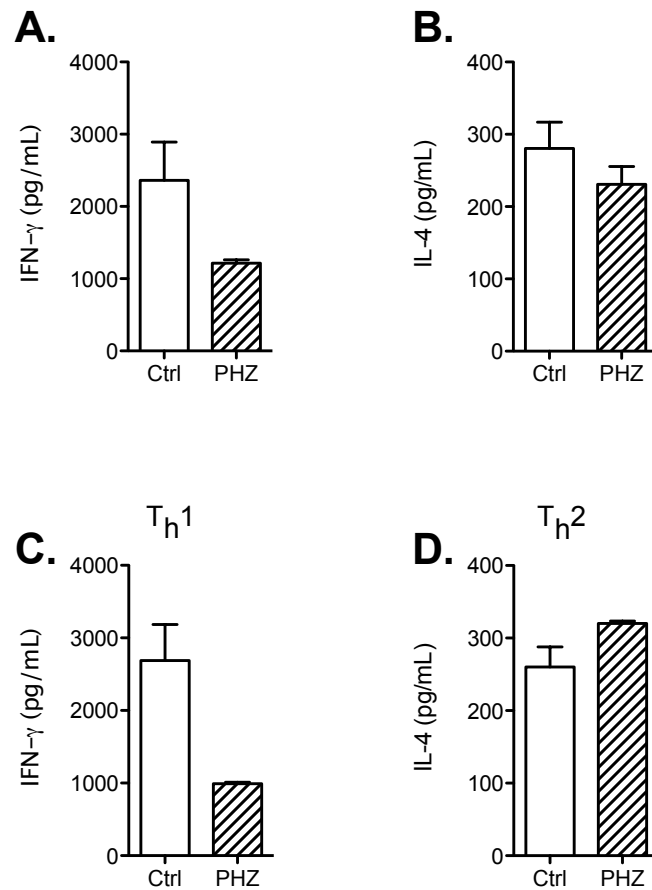


Figure I.3. Le traitement avec la phénylhydrazine diminue la réponse Th1.

(A-B) Les splénocytes de souris naïves (Ctrl) et injectées avec la phénylhydrazine (PHZ) ont été stimulés *ex vivo* avec de l'anti-CD3 pendant 48 h (n=3-6). Les lymphocytes T CD4 ont été cultivés dans les conditions de polarisation (E) Th1 et (F) Th2 (n=2-6). Les cytokines ont été mesurées par ELISA dans les surnageants de culture.

---

### **3.1.2. Expansions des cellules promotrices de la réponse Th2**

D'après plusieurs études, les mastocytes et les polynucléaires basophiles sont importants dans la régulation de la réponse Th2, de par leur production précoce de l'IL-4 [173, 177]. Par ailleurs, ces cellules expriment un CMH de classe II et pourraient ainsi promouvoir la polarisation des lymphocytes T en Th2 en tant que CPA, et avec une meilleure efficacité que les cellules dendritiques en ce qui concerne les polynucléaires basophiles [177, 178].

Dans les conditions normales, les mastocytes et les polynucléaires basophiles sont faibles en nombre. Cependant, suite à une stimulation antigénique, leurs précurseurs migrent de la moelle osseuse vers les tissus périphériques et se différencient en cellules matures. Pour avoir un aperçu quant à la participation de ces cellules dans l'orientation de la réponse immune, nous avons quantifié le nombre de mastocytes et de polynucléaires basophiles dans la rate des souris naïves et des souris ayant reçu la phénylhydrazine. De façon intéressante, leur nombre augmente de plus de dix fois chez les souris injectées avec la phénylhydrazine en comparaison aux souris naïves (Figure I.4)

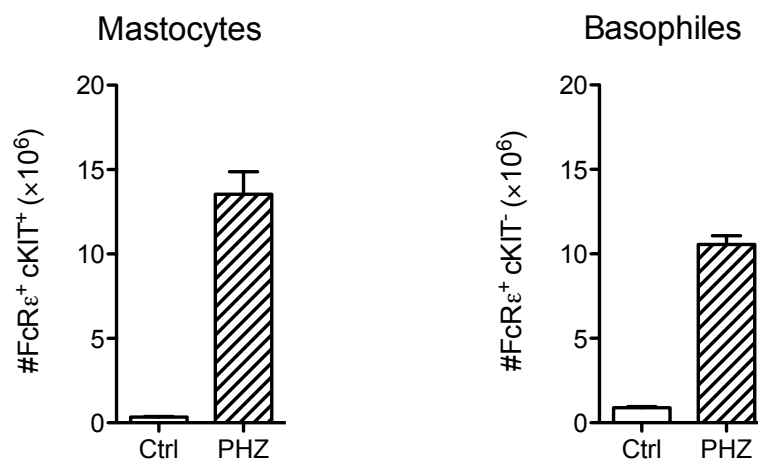


Figure I.4. Augmentation du nombre de mastocytes et de polynucléaires basophiles après injection de phénylhydrazine.

Le nombre absolu de mastocytes et de polynucléaires basophiles a été déterminé dans la rate de souris naïves (Ctrl) et de souris traitées avec la phénylhydrazine (PHZ) (n = 2-13).

## **3.2. Immunomodulation des lymphocytes T CD4 l'hème**

### **3.2.1. Activation des lymphocytes T CD4 par l'hème**

Compte tenu des résultats obtenus suite à l'injection de phénylhydrazine, nous avons analysé l'impact de l'hème sur la réponse des lymphocytes T CD4. Après traitement *in vitro* des splénocytes pendant 48h avec des concentrations croissantes en hème, et nous observons une augmentation du pourcentage de lymphocytes T CD4 qui expriment CD69, un marqueur précoce d'activation (Figure I.5A). Après 24h, l'hème (40µg/mL) induit également une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes T CD4 exprimant CD69, en comparaison au groupe non traité, suggérant l'activation rapide de ces cellules par l'hème (Figure I.5B). Les composés industriels peuvent être contaminés par des endotoxines, responsables par la suite de résultats et d'interprétations biaisés. Dans ce contexte, nous avons comparé l'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème préalablement décontaminée par la résine ToxinEraser™ (GenScript), avec celle obtenue avec l'hème non décontaminée. Aucune différence n'est notable entre les 2 groupes, ce qui suggère que la capacité activatrice de l'hème n'est pas associée à la présence d'endotoxines résiduelles (Figure I.5B).

### **3.2.2. Rôle des cellules présentatrices d'antigènes**

Dans un premier temps, pour confirmer dans notre modèle l'implication des CPA et du CMH de classe II dans l'activation des lymphocytes T induite par l'hème, les splénocytes ont été éliminés en lymphocytes B qui sont les CPA les plus représentées dans la rate ( $\approx 40\%$  des cellules totales de la rate d'une souris BALB/c saine, âgée de 6 semaines). D'après la Figure I.6A, leur élimination



---

prévient l'activation des lymphocytes T CD4 en réponse à l'hème. Dans un deuxième temps, le CMH de classe II des CPA a été encombré avec un anticorps spécifique. Similairement à la déplétion des splénocytes en lymphocytes B, l'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème est prévenue (Figure I.6B).

### 3.2.3. Rôle des espèces réactives de l'oxygène

L'activité immunomodulatrice de l'hème est fortement liée à son caractère pro-oxydant [38]. Le traitement des splénocytes avec du NAC, de la catalase ou du Trolox diminue l'intensité de fluorescence du marquage au H<sub>2</sub>DCFDA, un indicateur de la présence d'ERO intracellulaires (Figure I.7A, I.7B), indiquant que ces molécules agissent efficacement contre le statut « oxydé » des cellules induit par l'hème. De plus, nous observons une réponse homogène du statut redox de l'ensemble des splénocytes vis à vis de l'hème et des antioxydants, tel que suggéré par un pic unique sur les histogrammes de cellules de la rate marquées au H<sub>2</sub>DCFDA (Figure I.7A). Cependant, seul la NAC diminue le pourcentage de lymphocytes T CD4 activés (Figure I.8C), évoquant un mécanisme non médié par la production des ERO pour l'activation des lymphocytes T CD4.

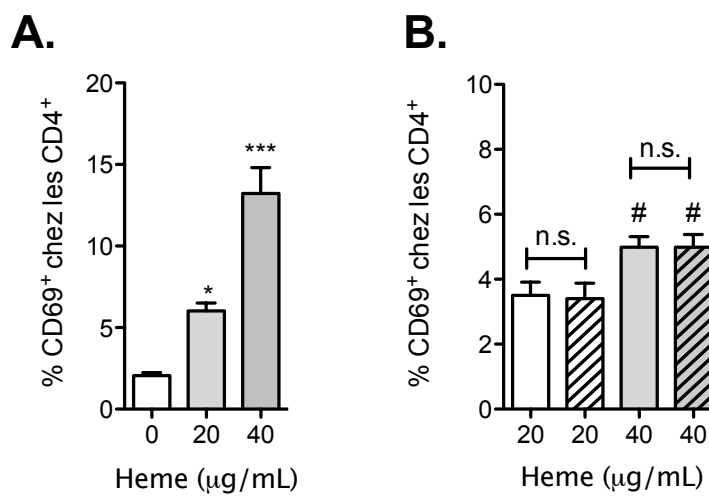


Figure I.5. Activation *in vitro* des lymphocytes T CD4 par l'hème.

(A) Les splénocytes ont été mis en culture en présence de concentrations croissantes en hème pendant 48h (n = 8-9), ou avec (B) de l'hème décontaminé ou non en endotoxine pendant 24 h (n = 4). \*\*p < 0,01 et \*\*\*p < 0,001 avec le groupe contrôle, ou entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. #p < 0,05 avec le groupe contrôle, d'après une analyse par Mann-Whitney

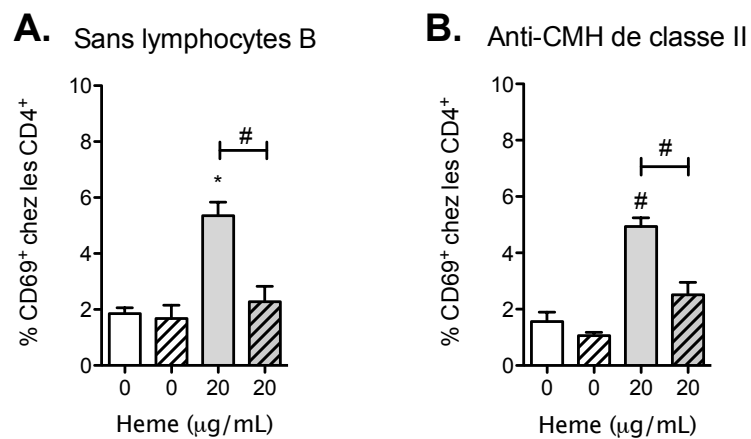


Figure I.6. L'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème nécessite les CPA.

Les barres hachurées représentent les conditions pour lesquelles les splénocytes ont (A) été déplétés en lymphocytes B ( $n = 4-6$ ), ou (B) traités avec un anticorps anti-CMH de classe II ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  avec l'échantillon contrôle d'après une analyse par Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. # $p < 0,05$  avec l'échantillon contrôle, ou entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par Mann-Whitney.

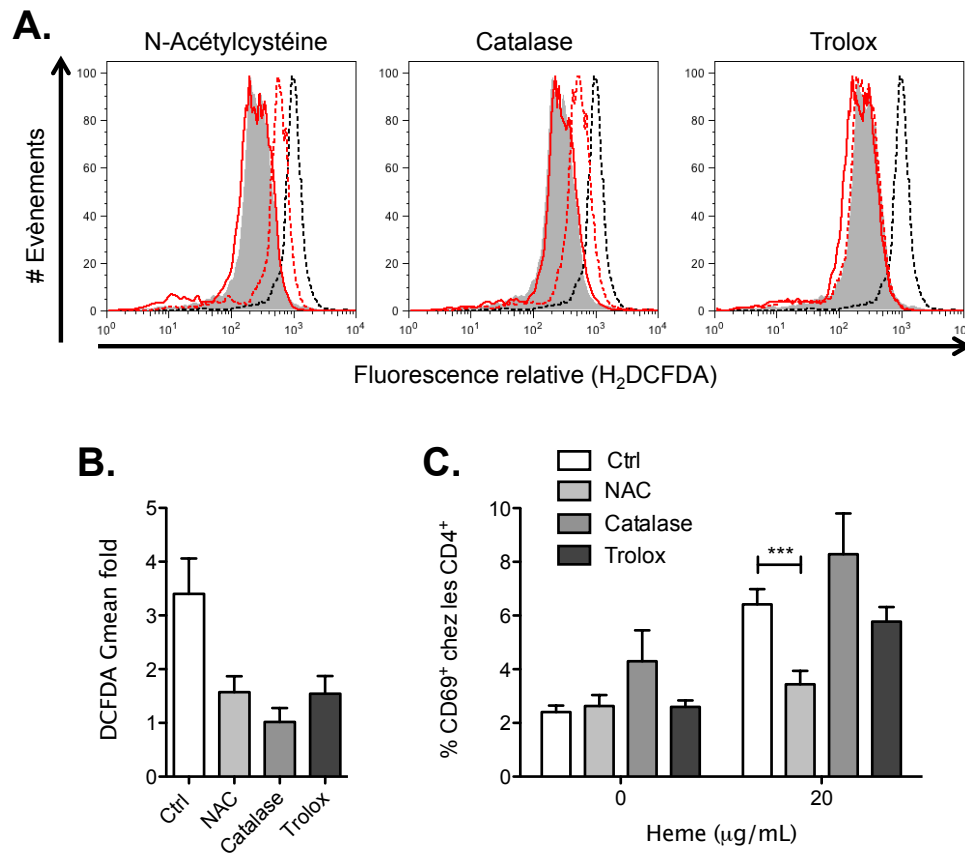


Figure I.7. L'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème n'est pas associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

(A) Les histogrammes pleins représentent les cellules non traitées, les histogrammes rouges les cellules traitées avec les antioxydants [10mM NAC, 5000U/mL catalase, 100µM Trolox], et les traits en pointillés les cellules traitées avec 20µg/mL d'hème. (B) Rapports des intensités de fluorescence entre les cellules traitées avec 20µg/mL d'hème et non traitées (n = 4-5). (C) Pourcentage de lymphocytes T CD4 activés (n = 4-8). \*\*\*p < 0,001 entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par ANOVA suivi d'un post-test de Bonferroni.

### 3.3. Modulation de la réponse des lymphocytes T CD4

Nous avons précédemment montré que l'hème induit l'activation des lymphocytes T CD4 *in vitro*, et pour cette raison nous avons par la suite analysé son impact sur la production cytokinique. *In vitro*, l'hème n'affecte pas la production en IFN- $\gamma$  et IL-4 par les splénocytes stimulés avec un anticorps anti-CD3 immobilisé (Figure I.8A, 8B). Cependant, l'hème diminue la production en IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4 purifiés, et cultivés dans les conditions de polarisation de type Th1 (Figure I.8C). Par contre, nous n'observons pas de variations quant à la production en IL-4 par les cellules Th2 traitées avec de l'hème (Figure I.8D). Nous suggérons que l'hème inhibe la réponse Th1 des lymphocytes T CD4, au profit d'une réponse Th2 majoritaire. CD3 est spécifiquement exprimé par les lymphocytes T, et la stimulation de ce récepteur induit l'activation des lymphocytes T indépendamment du TCR. Nous n'observons pas de variations dans les proportions en CD4<sup>+</sup> ( $\approx$ 25% des splénocytes) et en CD8<sup>+</sup> ( $\approx$ 10% des splénocytes) entre les splénocytes cultivés avec différentes concentrations en hème. Ainsi, l'absence de variations de production d'IFN- $\gamma$  chez les splénocytes totaux traités avec l'hème et l'anti-CD3 pourrait être le résultat de l'activation des lymphocytes T CD8.

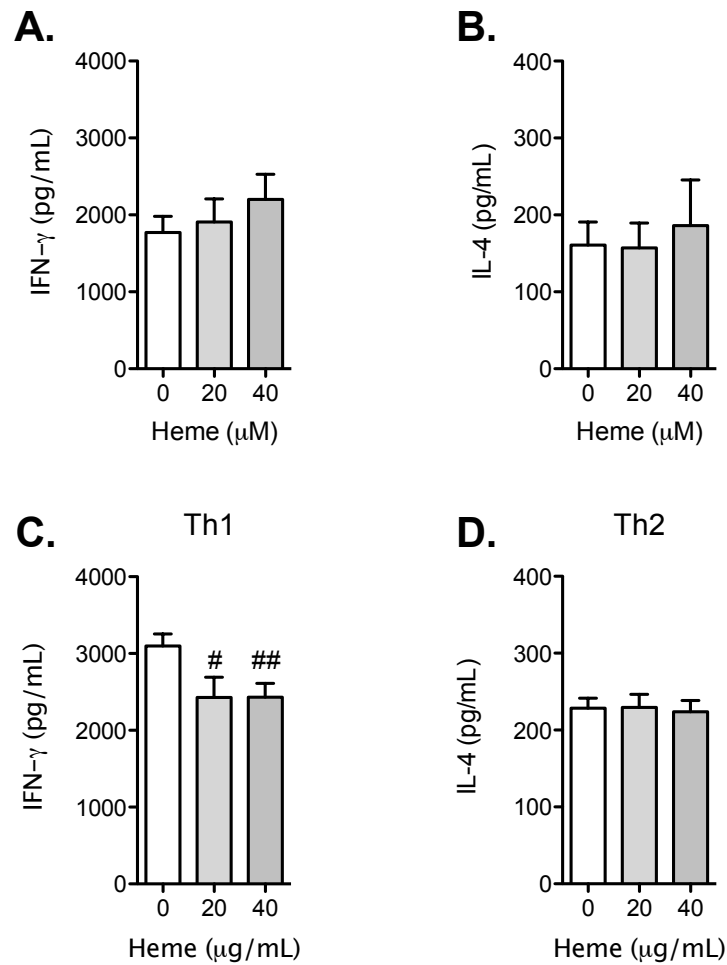


Figure I.8. L'hème inhibe la réponse Th1.

Production (A) d'IFN- $\gamma$  et (B) d'IL-4 par des splénocytes stimulés *in vitro* avec un anticorps anti-CD3 et de l'hème pendant 48h (n = 4-10). Les lymphocytes T CD4 ont été cultivés dans les conditions de polarisation (C) Th1 et (D) Th2 (n = 6-14). Les cytokines ont été mesurées dans les surnageants de culture. #p < 0,05 et ##p < 0,01 avec l'échantillon contrôle d'après une analyse par Mann-Whitney.

### **3.4. Analyse *in vivo* : impact de l'hème sur la clairance du parasite**

#### **3.4.1. Modulation de la réponse lymphocytaire, et impact sur l'érythropoïèse (Article 1)**

Lors de l'infection par *Plasmodium*, la production d'IFN- $\gamma$  est essentielle à l'élimination du parasite. Alors que nos résultats montrent une inhibition de la réponse Th1 par l'hème, nous avons étudié l'impact du pré-conditionnement des souris BALB/c avec l'hème sur la clairance du parasite *P. c. adami* DK. Les souris BALB/c infectées par *P. c. adami* DK éliminent spontanément le parasite après 12 jours d'infection, mais développent une anémie. Comme la réponse Th2 est associée à une diminution de l'érythropoïèse, nous avons également étudié l'impact du traitement des souris avec l'hème sur la différenciation érythrocytaire. Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans le journal PLoS ONE, en 2013.

Ma contribution pour la réalisation de cet article a été la mise au point, et la réalisation des expériences, l'analyse des résultats, et la rédaction du manuscrit.

# Preconditioning with Hemin Decreases *Plasmodium chabaudi adami* Parasitemia and Inhibits Erythropoiesis in BALB/c Mice

Esther Dalko<sup>1,2</sup>, Véronique Gaudreault<sup>2</sup>, Jaime Sanchez Dardon<sup>2</sup>, Robert Moreau<sup>2</sup>, Tatiana Scorza<sup>2\*</sup>

**1** Basic and Clinical Immunology of Parasitic Diseases Group, Centre for Infection and Immunity of Lille and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U547, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, **2** Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

## Abstract

Increased susceptibility to bacterial and viral infections and dysfunctional erythropoiesis are characteristic of malaria and other hemolytic hemoglobinopathies. High concentrations of free heme are common in these conditions but little is known about the effect of heme on adaptive immunity and erythropoiesis. Herein, we investigated the impact of heme (hemin) administration on immune parameters and steady state erythropoiesis in BALB/c mice, and on parasitemia and anemia during *Plasmodium chabaudi adami* infection. Intra-peritoneal injection of hemin (5 mg/Kg body weight) over three consecutive days decreased the numbers of splenic and bone marrow macrophages, IFN- $\gamma$  responses to CD3 stimulation and T<sub>H</sub>1 differentiation. Our results show that the numbers of erythroid progenitors decreased in the bone marrow and spleen of mice treated with hemin, which correlated with reduced numbers of circulating reticulocytes, without affecting hemoglobin concentrations. Although blunted IFN- $\gamma$  responses were measured in hemin-preconditioned mice, the mice developed lower parasitemia following *P.c.adami* infection. Importantly, anemia was exacerbated in hemin-preconditioned mice with malaria despite the reduced parasitemia. Altogether, our data indicate that free heme has dual effects on malaria pathology.

**Citation:** Dalko E, Gaudreault V, Sanchez Dardon J, Moreau R, Scorza T (2013) Preconditioning with Hemin Decreases *Plasmodium chabaudi adami* Parasitemia and Inhibits Erythropoiesis in BALB/c Mice. PLoS ONE 8(1): e54744. doi:10.1371/journal.pone.0054744

**Editor:** Denise L. Doolan, Queensland Institute of Medical Research, Australia

**Received:** October 5, 2012; **Accepted:** December 14, 2012; **Published:** January 24, 2013

**Copyright:** © 2013 Dalko et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was partially funded by a Discovery Grant (Natural Sciences and Engineering Research Council) and a Bone Catalyst Grant (Canadian Institutes of Health Research). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: scorza.tatiana@uqam.ca

## Introduction

Malaria and other hemolytic disorders are characterized by enhanced susceptibility to bacterial and viral infections, and increased levels of IL-4, IL-6 and IL-10 [1,2], [3]. These reports suggest a T helper (T<sub>H</sub>) 2 bias in chronic and acute hemolytic conditions that may contribute to altered cellular immunity. IFN- $\gamma$ , a key cytokine for induction and maintenance of T<sub>H</sub>1 responses, is required for the clearance of intracellular bacteria and viruses, and for the elimination of *Plasmodium* parasites. In experimental murine malaria models, the sequential induction of an early T<sub>H</sub>1 response followed by a T<sub>H</sub>2 response is pivotal for the control of parasitemia and complete clearance of parasitized red blood cells (pRBCs) [4,5]. The fact that concomitant infections with helminths enhance malaria morbidity by driving the differentiation of T<sub>H</sub>2 cells and the prevalence of the type 2 cytokines such as IL-4, and IL-13 [6], and that a potent IFN- $\gamma$  response at the early phase of infection correlates with protection, suggest a protective role for T<sub>H</sub>1 responses in human malaria [4,7]. CD4 T<sub>H</sub>1 cells are an important source of IFN- $\gamma$ , a cytokine that activates monocytes and macrophages and promotes elimination of pRBCs by these phagocytes. Through IFN- $\gamma$ , T<sub>H</sub>1 cells stimulate immunoglobulin class commutation and secretion of opsonizing antibodies by B cells, which reinforce parasite clearance by facilitating phagocytosis and antibody dependent cellular inhibition [8]. In contrast, exacerbated T<sub>H</sub>2 responses may be detrimental in malaria because

IL-4, secreted by T<sub>H</sub>2 cells, suppresses T<sub>H</sub>1 differentiation and macrophage activation and drives the synthesis of non-opsonizing antibodies including IgE [9].

When hemolysis occurs, hemoglobin is released into the blood stream. During their development inside red blood cells (RBCs), *Plasmodium* parasites degrade up to 80% of the hemoglobin, the remaining of which is released during the rupture of pRBCs [10]. Free hemoglobin is rapidly oxidized to methemoglobin and releases its heme groups. It has been estimated that 10 healthy RBCs are eliminated for each pRBC, and that premature removal of RBCs is concurrent to the oxidation of membrane lipids caused by free heme, that render these cells fragile and senescent [11,12,13]. In addition, scavenger macrophages, or the deposition of autoimmune complexes mediated against RBCs are also involved in this process [13]. Increased methemoglobin levels are reported in human malaria, and murine *Plasmodium* infections also generate elevated levels of free heme [14,15,16,17]. Various studies have reported mitogenic effects of heme on mouse and human CD4 T cells [18]. Heme also modulates the function of neutrophils, granulocytes, and macrophages [19,20], and in this context, we reported that heme decreases the production of IL-12p70 by LPS-activated macrophages through an IL-10-dependent mechanism production, hampering also the stimulatory effects of IFN- $\gamma$  on the IL-12p70 response [21].



Interestingly, various hemolytic conditions including malaria are characterized by dysfunctional erythropoiesis in the bone marrow. Severe malarial anemia (SMA) is of complex etiology and is concurrent to the lysis of pRBCs and non-parasitized RBCs, splenic sequestration of RBCs and bone marrow dysfunction [13,22,23]. SMA is often associated to reticulocytopenia, erythroid hyperplasia and increased levels of erythropoietin (EPO), suggesting a functional disruption of RBCs precursors [13,23]. Impaired IL-12 responses and a systemic inflammatory response seem to be involved in this process [24,25]. Accumulation of hemozoin in bone marrow macrophages has been linked to abnormal erythroid development, and patients with SMA have higher levels of hemozoin containing macrophages and lower levels of hemoglobin [13,26]. In  $\beta$ -thalassemia, excess of  $\alpha$ -globin chains and the associated heme induce reactive oxygen species (ROS) that contribute to the damage of mature and immature RBCs [27]. We have recently reported impaired growth of erythroid-burst forming unit (BFU-E) from bone marrow precursors from *Plasmodium chabaudi adami*-infected and phenylhydrazine-treated mice, which are accompanied by elevated ROS levels and high concentrations of circulating heme [28].

Considering that blunted  $T_H1$  immunity and dysfunctional erythropoiesis contribute to the pathogenesis of *Plasmodium* infection, and that heme seems to be a key modulator of these responses, we investigated the effects of pre-sensitization with hemin on CD4 T cells responses and erythroid parameters in naive BALB/c mice and in mice infected with *P. c. adami* DK parasites.

## Materials and Methods

### Mice, Treatment and Infection

Four- to 6-weeks old female BALB/c mice (Charles River Laboratories, Montreal, QC, Canada) were used in all experiments. To evaluate the effect of hemin *in vivo*, mice were injected intraperitoneally with 5 mg/Kg hemin for three days and control mice were treated with PBS. Hemin (porcine; Sigma Aldrich, Canada) was prepared by dissolving a stock solution of 25 mg/mL hemin (in 0.1 M NaOH) in PBS. Mice were euthanized 24 h after the last injection. Naive and hemin-treated mice were infected with  $10^5$  *Plasmodium chabaudi adami* DK-parasitized RBCs by the intravenous route. Parasitemia was estimated daily from tail blood smears stained with 10% Giemsa solution. All the manipulations in mice were conducted according to relevant national and international guidelines. All procedures in mice were approved by the Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (protocol 0511-720-0512).

### Assessment of Cell Populations in the Spleen, and Bone Marrow

Cells were recovered from the spleen and the bone marrow and stained with anti-TER119 and anti-CD71 antibodies (BioLegend) to evaluate erythroid populations. After lysing RBCs with the RBC lysing buffer Hybri-Max<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, Canada), single-cell suspensions of splenocytes were treated with anti CD4-FITC and anti-F4/80-PE antibody (BioLegend) to respectively assess the number of CD4 T cells and macrophages. Cells were further kept for 30 min at 4°C and fluorescence was analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Data provided by 10,000 events were analyzed using the FlowJo software.

### Cell Culture and Purification

Spleen cells from naive and hemin-treated mice were recovered, RBCs were lysed with the RBC lysing buffer

Hybri-Max<sup>®</sup>, and splenocytes were cultured in complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 10 U/mL streptomycin and penicillin and  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol) at  $4 \times 10^6$  splenocytes/mL. CD4 T cells were purified using the EasySep mouse CD4 T cell Enrichment Kit (StemCell Technologies, Canada). Purity levels were  $\geq 85\%$  as assessed by flow cytometry.

### Quantification of Activated CD4 T Cells and Secretion of IFN- $\gamma$ /IL-4

To assess the cytokine response,  $4 \times 10^6$  splenocytes/mL spleen cells were cultured in 48-well plates coated overnight with anti-CD3 (2.5  $\mu$ g/mL) monoclonal antibody (eBioscience). After 48 h of stimulation, IFN- $\gamma$  and IL-4 concentrations were measured in culture supernatants with specific ELISA MAX<sup>™</sup> Deluxe Sets (BioLegend). The same protocol was used with  $2 \times 10^6$  purified CD4 T cells/mL stimulated with 2.5  $\mu$ g/mL coated anti-CD3 and 1.5  $\mu$ g/mL soluble anti-CD28 monoclonal antibodies (eBioscience).

### In Vitro $T_H$ Cell Differentiation

Purified CD4 T cells from naive and hemin-treated mice were cultured at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL in 24-well plates pre-coated with anti-CD3 (0.2  $\mu$ g/mL) and soluble anti-CD28 (1.5  $\mu$ g/mL) monoclonal antibodies. For  $T_H1$  differentiation, CD4 T cells were stimulated in the presence of recombinant IL-12 (30 ng/mL; BioLegend) and anti-IL4 antibody (10 ng/mL; BioLegend). For  $T_H2$  differentiation, the cells were stimulated in the presence of recombinant IL-4 (40 ng/mL; BioLegend), anti-IL-12 (10  $\mu$ g/mL; BioLegend) and anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/mL; BioLegend) antibodies. After three days of stimulation, recombinant IL-2 (10 ng/mL; BioLegend) was added to the medium and cells were cultured for 3 additional days. The cells were then recovered, washed once in RPMI 1640 and further incubated with anti-CD3 monoclonal antibody (0.3  $\mu$ g/mL) for 24 h, after which IFN- $\gamma$  and IL-4 levels were assessed by ELISA (ELISA MAX<sup>™</sup> Deluxe Sets; BioLegend) in the supernatant.

### Determination of Haemoglobin and Reticulocyte Levels in Plasma

Hemoglobin concentrations were measured by diluting 2  $\mu$ l tail-vein blood in 500  $\mu$ l Drabkin's solution. Two hundred microliters were split in 96-well plates in duplicate and the absorbance was measured at 540 nm with a microplate reader. Values were converted to g/dL using a standard curve of pure hemoglobin dissolved in Drabkin's solution. In order to assess the percentage of reticulocytes in the blood, 2  $\mu$ l of blood from tail-tip were collected in 500  $\mu$ l of PBS. The blood cell suspensions were centrifuged and resuspended in 250  $\mu$ l of a 0.025% glutaraldehyde solution overnight. The cell suspensions were then stained with anti-CD71-FITC antibody (BioLegend), incubated at 4°C for 30 min and fluorescence was measured on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Data were analyzed using the FlowJo software.

### Determination of Heme, Hemopexin and Erythropoietin Concentrations in Plasma

Plasma was recovered from euthanized mice in a heparinized eppendorf. Total heme levels were measured in the plasma using its elicited luminescence. Briefly, 5  $\mu$ l of plasma was diluted in 25  $\mu$ l PBS and was added to an opaque 96-well plate. A luminescence reader (MLX microtiter plate luminometer with the software Revelation MLX, Version 4.27, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) was set to dispense

simultaneously 100  $\mu$ L of a 1  $\mu$ g/mL luminol solution (dissolved in 0.1 M NaOH and 3 mM EDTA; Sigma Aldrich, Canada) and 100  $\mu$ L of a 7.26 mM t-butylhydroperoxide solution (dissolved in 0.1 M NaOH and 3 mM EDTA; Sigma Aldrich, Canada). Luminescence output was measured immediately with a 2 s interval. A standard curve was made with the stock solution of heme to express results in  $\mu$ M. To assess hemopexin concentrations in the plasma the Mouse Hemopexin ELISA kit (Kamiya Biomedical Company) was used; the Mouse EPO ELISA kit (Kamiya Biomedical Company) was used for EPO level measurement in the plasma.

### Colony-forming Unit Assays

Single-cell suspensions were prepared from the spleen and bone marrow and RBCs from the spleen were lysed in RBC Lysing buffer Hybri-Max<sup>®</sup>. Two million cells/mL were prepared in RPMI 1640 and 0.3 mL were added to 3 mL of MethoCult<sup>®</sup> 03334 medium for duplicate cultures, as described by the manufacturer. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air and  $\geq$ 95% humidity for 8 days for optimal quantification of erythroid-blast forming units (BFU-E) (Figure S1).

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using a nonparametric Student *t* test for comparison of activation and cytokine responses between naive and hemin-treated cells using the Prism software;  $p < 0.05$  was considered as significant.

## Results

### Impact of Hemin Administration on Spleen Cells and Cytokine Responses

High concentrations of free heme are characteristic of hemolytic disorders, which are pathologies associated with altered immunity. Considering the importance of activated macrophages and IFN- $\gamma$  for the control of blood stage malaria, the *in vivo* effects of hemin on mouse macrophages and CD4 T cells were investigated. Hemopexin is the most important scavenger of free heme, and its levels decrease in hemolytic pathologies including malaria [29,30]. At a dose of 5 mg/Kg body weight, three consecutive injections of hemin decreased the plasmatic levels of hemopexin in mice, confirming partial saturation of this scavenging system (Fig. 1A). Total numbers of spleen cells were comparable in control and hemin-treated mice (Fig. 1B). The numbers of macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) significantly dropped in the spleen of mice injected with hemin compared to control mice (Fig. 1C), whereas the numbers of splenic CD4 T cells were not affected (Fig. 1D).

Splenocytes from naive and hemin-treated mice were stimulated *ex-vivo* with anti-CD3 antibody in order to investigate the effects of hemin conditioning on T cells responses. Total spleen cells from hemin-treated mice produced significantly less IFN- $\gamma$  compared to naive cells (Fig. 1E), whereas IL-4 levels remained comparable in hemin-treated and control mice (Fig. 1F). A similar trend was observed in purified CD4 T cells cultured under T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 polarizing conditions, as the production of IFN- $\gamma$  was significantly decreased in T<sub>h</sub>1 cells from hemin-treated mice (Fig. 1G) but the IL-4 response was not affected in T<sub>h</sub>2 polarized CD4 T cells (Fig. 1H).

### Bone Marrow and Spleen Erythropoiesis

In addition to immune parameters, the impact of hemin on erythroid cells was investigated by staining cells with anti-CD71-FITC and anti-TER119-PE antibodies. Decreased numbers of erythroid cells expressing the transferrin receptor

(CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup>) were measured in the bone marrow of hemin-conditioned mice, whereas the numbers of mature erythroid cells (CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup> cells) were not affected (Fig. 2A). Fewer erythroid cells were found in the spleen of hemin-treated mice in respect to the control group (Fig. 2B), suggesting effects in splenic erythropoietic niches in steady state conditions. The percentages of circulating reticulocytes were significantly reduced in mice treated with hemin although hemoglobin levels were not affected (Fig. 2C and 2D).

Considering that macrophages play important roles in erythropoiesis [31], we evaluated the impact of hemin on the population of resident macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) in the bone marrow, and no significant effect was revealed with the dose of hemin tested (Fig. 2E). Interestingly, the levels of EPO in plasma increased more than 3-fold in hemin-treated mice compared to naive mice (Fig. 2F).

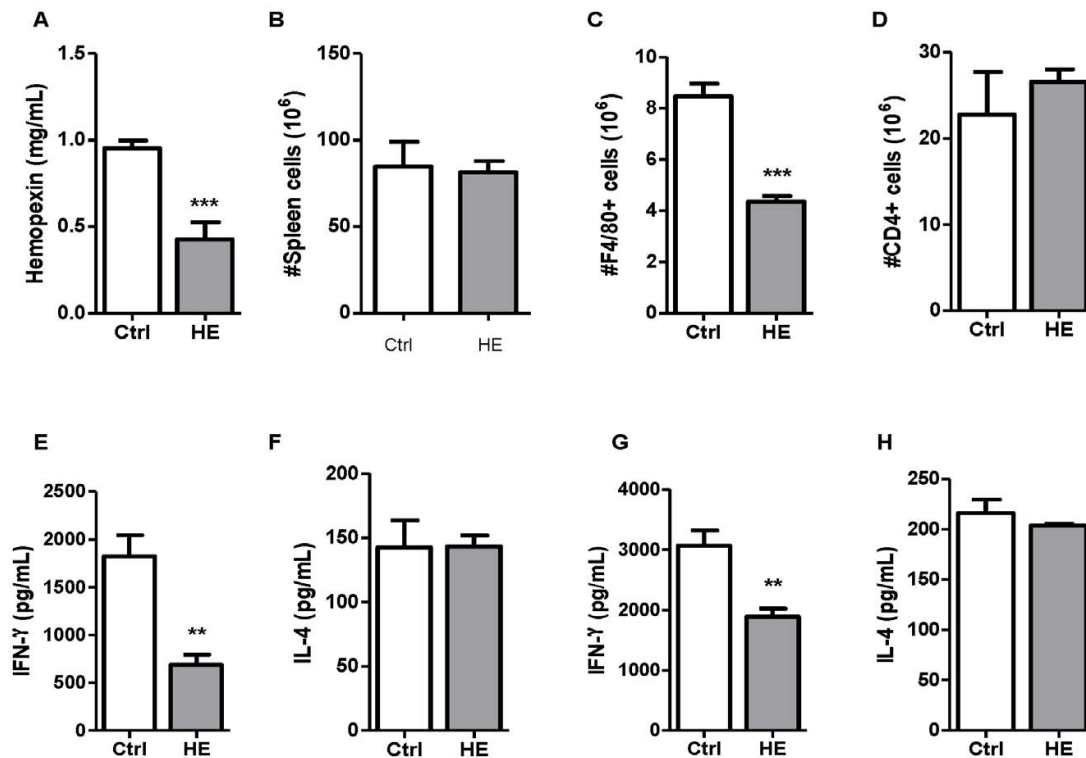
### Impact of Hemin Treatment on Plasmodium Adami Infection

Based on the decreased ability of CD4 T cells to secrete IFN- $\gamma$  and to differentiate into T<sub>h</sub>1 cells and the reduced numbers of splenic macrophages found in hemin-conditioned mice, we hypothesized that administration of hemin would exacerbate *P. c. adami* infection. Following injection of PBS or hemin over three days, mice were infected with *P. c. adami* DK parasites and parasitemia was followed daily. Unexpectedly, a significant decrease in parasitemia was measured in hemin-treated mice in two independent experiments, which are represented as compiled results in figure 3A. Cumulative parasitemia, estimated as the sum of daily parasitemia throughout the period of patent infection, was significantly lower at early infection (days 5–6) and throughout patent infection (days 5–10) in hemin-treated mice (Fig. 3B), and peak parasitemia was also significantly decreased (Fig. 3C).

### Splenic Response and Erythroid Precursors in Hemin-conditioned Mice with Malaria

Considering the blunted IFN- $\gamma$  responses measured in hemin-conditioned mice, a comparable analysis of the populations and cytokine responses was done with splenic cells from control and hemin-treated mice at day 10 post-infection. At this time point, parasitemia is significantly decreased and erythropoiesis is readily enhanced. Macrophage numbers were comparable in control and hemin-treated mice at day 10 post-infection (Fig. 4A) and no significant differences were measured in respect to CD4 T cell numbers (Fig. 4B) or cytokine responses of total splenic (Fig. 4C, D) and purified CD4 T cells (Fig. 4 E, F).

Despite the drop in parasitemia measured in hemin-conditioned mice, significant lower numbers of bone marrow CD71<sup>+</sup> and CD71<sup>+</sup> erythroid cells were found in these mice (Fig. 5A). In contrast, no major differences were observed in the splenic erythroid populations (Fig. 5B). Although comparable levels of hemoglobin were measured at day 10 post-infection in control and hemin-conditioned mice, hemoglobin levels were lower in hemin-preconditioned mice at day 6 post-infection when compared to controls (Fig. 5C). The percentages of circulating reticulocytes were low in hemin-conditioned mice the day of infection, but thereafter became comparable to controls, reaching their highest values at day 10 post-infection (Fig. 5D). These results show that despite developing lower parasitemia, anemia is relatively exacerbated in mice pre-conditioned with hemin at early infection. Comparable EPO levels were found in the plasma of control and hemin-preconditioned mice at day 10 post-infection (Fig. 5E).



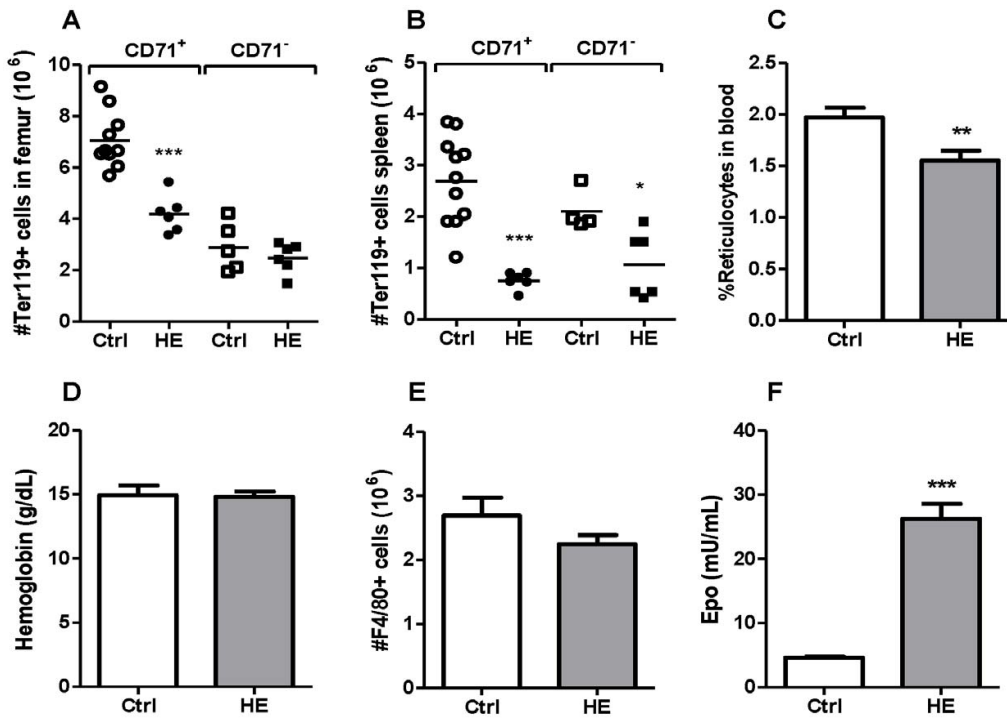
**Figure 1. Hemin-mediated immunomodulation.** Hemin (HE; 5 mg/kg) was injected consecutively during three days whereas control (Ctrl) mice received PBS. Hemopexin levels were assessed in the plasma by ELISA (A). Splens were recovered and total numbers of cells (B) were determined. The numbers of macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) (C) and CD4 T cells (D) were estimated following staining with specific antibodies and analysis by flow cytometry. Total spleen cells from control and HE-treated mice were stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody for 48 h to assess production of IFN-γ (E) and IL-4 (F) by ELISA. In parallel, purified CD4 T cells were cultured in T<sub>H</sub>1 (G) and T<sub>H</sub>2 (H) polarizing conditions as described in the *Material and Methods* section. Data in A and G are mean ± SEM from one experiment (n = 3–9 mice per group); results from B to F are mean ± SEM from two independent experiments (n = 6–10). Values were compared using a non-parametric Student t test. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0054744.g001

## Discussion

The inflammatory response and systemic oxidative stress generated in hemolytic pathologies is accompanied by important alterations in immunity and dysfunctional erythropoiesis. The levels of the T<sub>H</sub>2 type cytokines IL-4, IL-10 and IL-13 are relatively enhanced whereas IFN-γ responses are compromised in thalassemia, sickle cell disease (SCD) and autoimmune hemolytic anemia [1,2,3]. Malaria is a hemolytic disease also characterized by high levels of free heme in circulation, oxidative stress and inflammation [16,32], and *Plasmodium*-infected hosts are particularly susceptible to bacterial and viral infections, as are people with genetic hemolytic disorders [33,34,35,36]. Impaired IFN-γ responses and high IgE levels are found in people with severe malaria [37,38], whereas mild malaria correlates with higher IFN-γ and high levels of opsonizing antibodies [39,40], indicating that a predominant T<sub>H</sub>2 bias is detrimental and that T<sub>H</sub>1 immune responses are protective. In disorders characterized by chronic hemolysis, free hemoglobin from damaged RBC is rapidly oxidized into methemoglobin and releases its heme groups [16]. In circulation, free heme binds easily to cell membranes due to its lipophilic nature and is also rapidly complexed to serum albumin [41]. Accumulation of heme is concurrent to overwhelmed

hemopexin scavenging, the main mechanism sequestering heme and recycling its iron [29]. Herein, hemin was injected in mice at concentrations that reduced 50% the plasmatic levels of hemopexin, indicating saturation of this scavenger, as found in patients with SMA [30] and other hemolytic conditions [29]. Indeed, low levels of hemopexin are found in SCD and thalassemia [29], whereas levels of heme are high in the plasma of *Plasmodium*-infected mice [15,42]. Administration of hemin dampened IFN-γ responses and decreased the numbers of splenic macrophages. However, lower parasitemia was measured in hemin-preconditioned mice following infection with *P. c. adami* DK parasites, which was accompanied by exacerbated anemia at early infection. Despite the impaired IFN-γ responses and dyserythropoiesis concurrent to hemin pre-treatment, administration of hemin seems detrimental for the development of blood stage parasites.

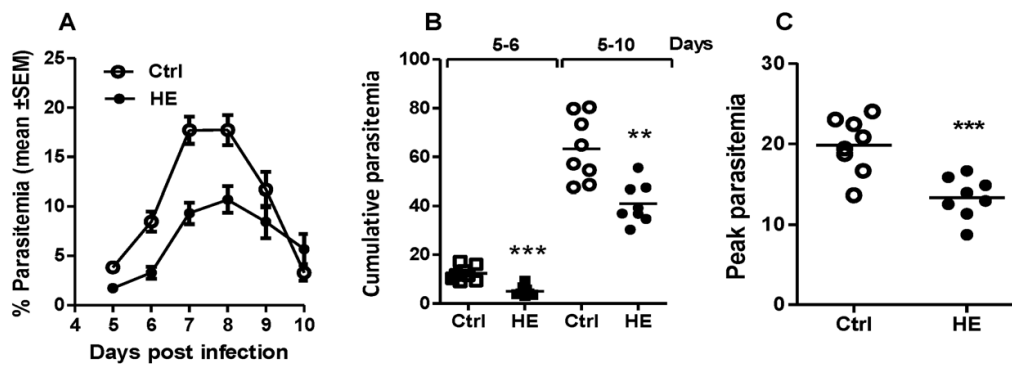
Various factors can contribute to the altered IFN-γ responses found in hemin-conditioned mice. The redox status of cells involved in innate and adaptive immune responses may significantly influence cytokine responses in macrophages and T cells. Macrophages treated with hemin secrete less IL-12p70 and more IL-10, which are effects associated with high intracellular levels of ROS and decreased concentrations of reduced glutathione



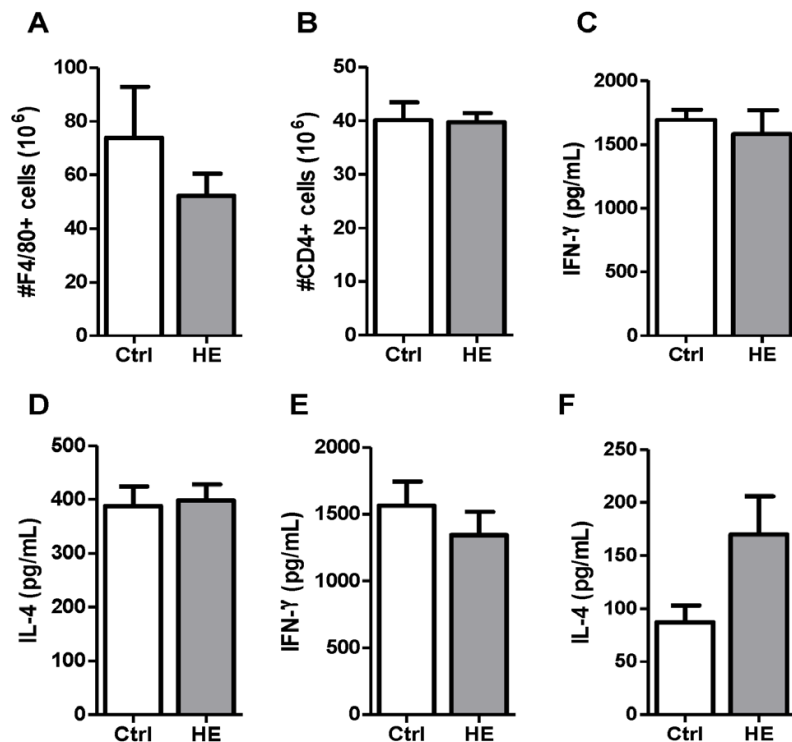
**Figure 2. Bone marrow and spleen erythroid parameters.** Control (Ctrl) and hemin (HE)-treated mice were euthanized 24 h after the last injection with PBS or HE. Populations of erythroid cells were analyzed in the bone marrow (A) and in the spleen (B) by staining cells with anti-CD71-FITC and anti-Ter119-PE antibodies. The percentage of reticulocytes (CD71<sup>+</sup> cells) (C) and hemoglobin levels were measured in the blood (D). Macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) were quantified in femoral bone marrow cell suspensions (E) by staining with anti-F4/80-PE antibody. Erythropoietin (EPO) was measured in the plasma by ELISA (F). Data are mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (n=4–11 mice per group) and values were compared using a non-parametric Student *t* test. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0054744.g002

[21,43]. In this context, it has been reported that the reduced/oxidized glutathione ratio of antigen presenting cells influences the polarization of CD4 T cells into T<sub>H</sub>1 or T<sub>H</sub>2 subsets [44]. Accordingly, our data reveal that administration of hemin

dampens the production of IFN- $\gamma$  by spleen cells as well as by CD4 T cells cultured under stringent conditions for T<sub>H</sub>1-polarization.



**Figure 3. Impact of heme on the clearance of *Plasmodium* infection.** *P. chabaudi adami* DK (10<sup>5</sup> parasitized RBCs) were inoculated by the intravenous route in PBS (Ctrl)- and hemin (HE)-preconditioned mice (5 mg/kg, for 3 consecutive days) 24 h after the last injection. Parasitemia was followed daily from tail-tip blood smears for estimation of the kinetics of infection (A) and cumulative (B) and peak parasitemia (C). Values represent the mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (n=8) and were compared using a non-parametric Student *t* test. \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0054744.g003

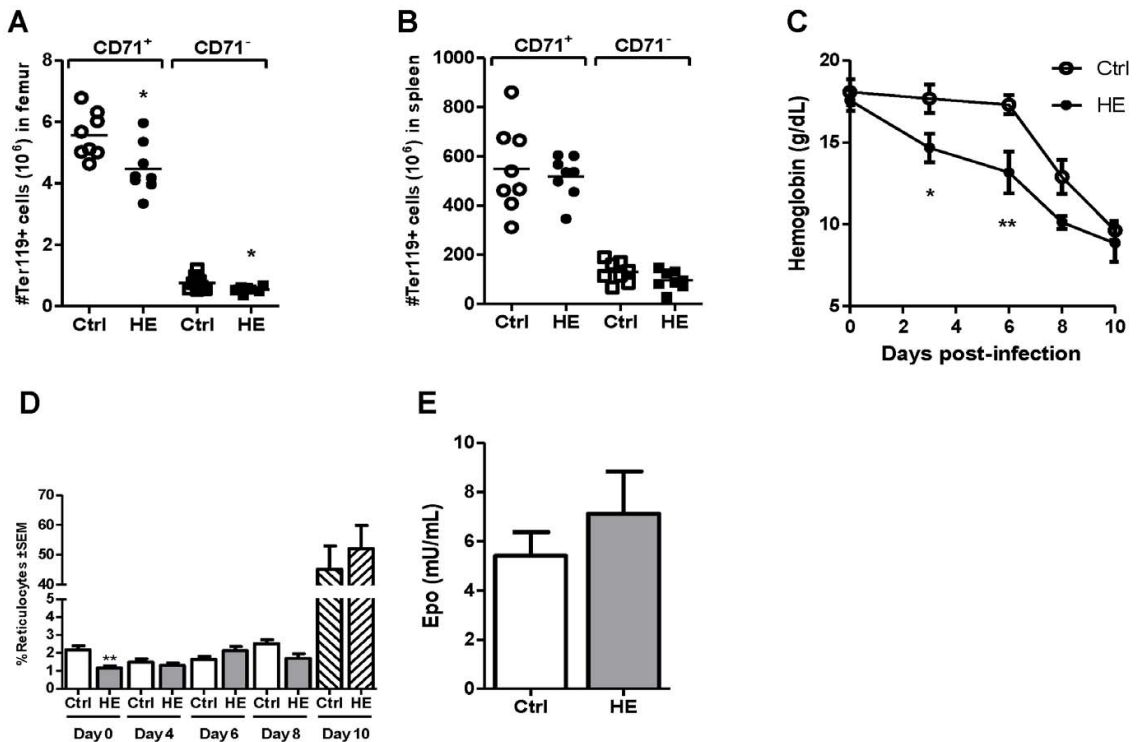


**Figure 4. Immune parameters in control and heme-preconditioned BALB/c mice 10 days after *P. c. adami* infection.** PBS (Ctrl) and hemin (HE)-treated mice were euthanized and spleen was recovered to assess the number of macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) (A) and CD4 T cells (B). Spleen cells were stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody for 48 h to assess IFN- $\gamma$  (C) and IL-4 (D) production by ELISA. Purified CD4 T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to estimate the production of IFN- $\gamma$  (E) and IL-4 (F). Data represent the mean  $\pm$  SEM from two independent experiments ( $n=7-12$ ) and values were compared using a non-parametric Student *t* test. doi:10.1371/journal.pone.0054744.g004

Early secretion of IFN- $\gamma$  by CD4 T cells is of particular importance for clearance of *P. chabaudi adami* DK parasites [4,5,7]. Although having compromised production of IFN- $\gamma$  prior to infection, hemin-conditioned mice developed milder infection than control mice. These results are in agreement with the protective effect of hemolytic disorders on high rates of parasitemia. Indeed, SCD and glucose-6-phosphate deficiency are traits associated with low malaria parasitemia, but the mechanisms involved are not yet fully understood. Considering that the inhibitory effects on parasitemia measured in hemin-preconditioned mice were apparent at early infection, it seems plausible that hemin renders RBCs less prompt to infection by merozoites or less apt in generating high numbers of merozoites during the first waves of parasite replication. By affecting the rigidity of RBC membranes heme may interfere with parasite penetration in the RBC [45], since it intercalates in the membrane bi-layer and oxidizes membrane phospholipids. The negative impact for hemin on *P. c. adami* DK parasitemia greatly contrasts with the absence of effect of hemin reported by Ferreira et al. on *P. berghei* parasitemia [42]. Unlike *P. c. adami*, *P. berghei* invades reticulocytes and mature RBCs, and it should be expected that the lower proportions of reticulocytes measured in hemin-preconditioned mice are detrimental for *P. berghei* development [46]. However, reticulocytes are more equipped to cope with oxidative damage than mature RBCs, as they possess higher concentrations of anti-oxidants [47], and hemin may affect more drastically mature RBCs. In this context,

our analysis revealed lower numbers of macrophages in hemin-treated mice, an effect that may be concurrent to enhanced elimination of prematurely senescent/damaged RBCs and concomitant apoptosis of macrophages, or to direct toxic effects of hemin on macrophages, as described for RBCs and astrocytes [48,49]. Indeed, hemin promotes exposure of phosphatidylserine in the outer surface of the RBC [48], which favors clearance of RBCs by macrophages and which in turn may contribute to their apoptosis [50].

In mice, homeostatic erythropoiesis occurs in the bone marrow, whereas stress erythropoiesis is primarily assured by the spleen [13]. During *P. c. adami* infection, splenic erythropoiesis resulted in more than 200 fold increase in immature erythroid progenitors in the spleen, both in control and hemin-treated mice, and although the percentages of reticulocytes were lower in hemin-preconditioned mice prior to infection, reticulocytopenia was efficiently restored. As significantly lower numbers of immature and mature erythroid cells were found in the bone marrow of hemin-preconditioned mice prior to and 10 days after infection, we speculate that the relatively exacerbated anemia measured in hemin-conditioned mice at early infection is concurrent to an impaired ability of the bone marrow in responding to erythropoietic stress. We speculate that as anemia accentuates throughout infection, the spleen becomes engaged in generating new RBCs to compensate for the limited capacity of bone marrow erythropoietic niches to expand.



**Figure 5. Bone marrow and spleen erythroid parameters in control and heme pre-conditioned mice infected with *P. c. adami*.** Control (Ctrl) and heme (HE)-preconditioned mice were infected with *P. chabaudi adami* ( $10^5$  parasitized RBCs) and euthanized at day 10 post-infection. The number of erythroid precursors was estimated in the bone marrow (A) and spleen (B) with anti-CD71-FITC and anti-Ter119-PE antibodies. Hemoglobin levels (C) and percentages of reticulocytes (D) were determined in blood daily, and plasmatic concentrations of EPO were quantified at day 10 post infection (E). Values in A-D are the mean  $\pm$  SEM from two independent experiments ( $n=8$ ). Data from (E) are the mean  $\pm$  SEM from one experiment ( $n=4$ ). Values were compared using a non-parametric Student *t* test. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ . doi:10.1371/journal.pone.0054744.g005

The importance of macrophages in erythropoiesis has been underscored by the fact that treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene biphosphonate depletes femoral macrophages and results in inefficient generation of blast forming erythroid units (BFU-E) *ex-vivo* [31]. Although administration of hemin during 3 consecutive days failed in altering the numbers of bone marrow macrophages, treatment with hemin for an additional week decreased significantly the numbers of macrophages in the femoral bone marrow (Figure S1). Prolonged administration of hemin also decreased hemoglobin levels and impaired the generation of bone marrow derived BFU-E *ex-vivo* (Figure S1). We suggest that the hemolysis induced by *P. c. adami* infection in conjunction with preconditioning with hemin exacerbated the detrimental effects of this oxidant on bone marrow macrophages and erythropoiesis.

The rise in EPO levels measured in mice treated with hemin for 3 consecutive days suggests alterations in EPO production by the kidney, which is normally stimulated by hypoxia [51]. Interestingly, renal and extra-renal production of EPO is enhanced in mice suffering from hemolytic anemia when compared to bled mice, suggesting that factors released by RBCs may influence EPO responses [52]. Accordingly, enhanced erythropoiesis has been reported in dogs and rats injected with hemolysates [53]. Heme induces the expression of heme oxygenase-1, which in turn, catalyzes its degradation into carbon monoxide and biliverdin. As carbon monoxide has a higher affinity with hemoglobin than

oxygen, it decreases the capacity of RBCs to carry  $O_2$ , and it is also possible that carbon monoxide resulting from heme degradation through heme oxygenase-1 may contribute to hypoxia, which in turn stimulates renal production of EPO [54].

In conclusion, our data indicate that hemin inhibits the production of IFN- $\gamma$  by spleen cells, and induces bone marrow dyserythropoiesis, which in mice may be efficiently compensated by the spleen. As preconditioning with hemin reduced parasitemia, our model also suggests that clearance of blood-stage *Plasmodium* infections is favored by hemolysis and that free hemin may have both detrimental and beneficial effects in blood stage malaria.

### Supporting Information

**Figure S1 Mice were injected with PBS (Ctrl) or hemin (HE; 5 mg/kg) 3 times a week for 2 weeks.** Hemoglobin concentrations in blood (A) and hemopexin concentrations in plasma (B) were determined 24 h after the last injection. Cells from femoral bone marrow (BM) and splenocytes (SPL) were recovered and stained with anti-F4/80-PE antibody to estimate the number of macrophages (C), and reticulocytes were determined in blood cells with anti-CD71-FITC antibody (D). BFU-E cells were quantified in BM (E) and spleen cell cultures (F), as described in the *Material and Methods* section. Data represent 6–13

mice per group, and were compared using a non-parametric Student *t* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . (TIFF)

## Acknowledgments

We thank Dr. Petra Rohrbach (Institute of Parasitology, McGill University) for kindly revising the manuscript.

## References

- Musa BOP, Onyemeluke GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH (2010) Pattern of Serum Cytokine Expression and T-Cell Subsets in Sickle Cell Disease Patients in Vaso-Occlusive Crisis. *Clin Vaccine Immunol* 17: 602–608.
- Toriani-Terenzi C, Fagiolo E (2005) IL-10 and the cytokine network in the pathogenesis of human autoimmune hemolytic anemia. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 29–44.
- Barcellini W, Clerici G, Montesano R, Taioli E, Morelatti F, et al. (2000) In vitro quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation. *Br J Haematol* 111: 452–460.
- De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH (1997) Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* 65: 1593–1598.
- Stevenson MM, Tam MF (1993) Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 92: 77–83.
- Roussilhon C, Brasseur P, Agnancy P, Perignon JL, Druilhe P (2010) Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS One* 5: e9309.
- Malu DT, Belanger B, Desautels F, Kelendji K, Dalko E, et al. (2011) Macrophage migration inhibitory factor: a downregulator of early T cell-dependent IFN-gamma responses in *Plasmodium chabaudi* adami (556 KA)-infected mice. *J Immunol* 186: 6271–6279.
- Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P (1990) Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 172: 1633–1641.
- Perlmann P, Perlmann H, Flyg BW, Hagstedt M, Elghazali G, et al. (1997) Immunoglobulin E, a pathogenic factor in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 65: 116–121.
- Francis SE, Sullivan DJ Jr, Goldberg DE (1997) Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 51: 97–123.
- Nuchsongsin F, Chotivanich K, Charunwathana P, Omodeo-Sale F, Taramelli D, et al. (2007) Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *Am J Trop Med Hyg* 77: 617–622.
- Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D (2005) Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol* 74: 324–332.
- Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, et al. (2007) Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110: 18–28.
- Anstey NM, Hassanali MY, Mlasi J, Manyanga D, Mwaikambo ED (1996) Elevated levels of methaemoglobin in Tanzanian children with severe and uncomplicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 147–151.
- Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, et al. (2007) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 13: 703–710.
- Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP (2008) A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)* 86: 1097–1111.
- Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, et al. (2009) Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15837–15842.
- Sutherland RM, Pan ZK, Caton AJ, Tang XX, Cerasoli DM, et al. (1995) T cells from unprimed mice respond to the self antigen heme, in a class II restricted manner, at a frequency similar to alloresponses. *Int Immunol* 7: 771–783.
- Cunnington AJ, de Souza JB, Walther M, Riley EM (2012) Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat Med* 18: 120–127.
- Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL (2002) Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99: 4160–4165.
- Cambos M, Bazinet S, Abed E, Sanchez-Dardon J, Bernard C, et al. (2010) The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages. *Int J Parasitol* 40: 1003–1012.
- Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, et al. (2011) The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* 117: 381–392.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, et al. (2011) Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* 7: 1427–1442.
- Chaisavaneeyakorn S, Othoro C, Shi YP, Otieno J, Chaiyaroj SC, et al. (2003) Relationship between plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 362–366.
- Mohan K, Stevenson MM (1998) Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient IL-12 production. *Br J Haematol* 103: 942–949.
- Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, Williams S, Lowe B, et al. (2006) Suppression of erythropoiesis in malarial anaemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* 108: 2569–2577.
- Rivella S (2012) The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Rev* 26 Suppl 1: S12–15.
- Moreau R, Malu DT, Dumais M, Dalko E, Gaudreault V, et al. (2012) Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and *Plasmodium*-infected mice. *PLoS One* 7: e46101.
- Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M (1968) Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* 32: 811–815.
- Fendel R, Brandts C, Rudat A, Kreidenweiss A, Steur C, et al. (2010) Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *PLoS One* 5: e10038.
- Giuliani AL, Wiener E, Lee MJ, Brown IN, Berti G, et al. (2001) Changes in murine bone marrow macrophages and erythroid burst-forming cells following the intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphate (Cl2MDP). *Eur J Haematol* 66: 221–229.
- Fibach E, Rachmilewitz E (2008) The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Curr Mol Med* 8: 609–619.
- Fagiolo E, Toriani-Terenzi C (2003) Mechanisms of immunological tolerance loss versus erythrocyte self-antigens and autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmunity* 36: 199–204.
- Gharagozloo M, Karimi M, Amirghofran Z (2009) Double-faced cell-mediated immunity in beta-thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity. *Ann Hematol* 88: 21–27.
- Perlmann P, Perlmann H, Berzins K, Troye-Blomberg M (1998) Selected problems of malaria blood stage immunity. *Tokai J Exp Clin Med* 23: 55–62.
- Wanachawanawin W, Phucharoen J, Pattanapanyasat K, Fuchareon S, Webster HK (1996) Lymphocytes in beta-thalassemia/HbE: subpopulations and mitogen responses. *Eur J Haematol* 56: 153–157.
- Bejon P, Mwacharo J, Kai O, Todryk S, Keating S, et al. (2007) The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by *Plasmodium falciparum*. *J Immunol* 179: 4193–4201.
- Elghazali G, Perlmann H, Rutta AS, Perlmann P, Troye-Blomberg M (1997) Elevated plasma levels of IgE in *Plasmodium falciparum*-primed individuals reflect an increased ratio of IL-4 to IFN-gamma-producing cells. *Clin Exp Immunol* 109: 84–89.
- McCall MB, Sauerwein RW (2010) INF-gamma—central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol* 88: 1131–1143.
- McCall MB, Hopman J, Daou M, Maiga B, Dara V, et al. (2010) Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* 201: 142–152.
- Kumar S, Bandyopadhyay U (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157: 175–188.
- Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, et al. (2011) Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* 145: 398–409.
- Yin XJ, Ma JY, Antonini JM, Castranova V, Ma JK (2004) Roles of reactive oxygen species and heme oxygenase-1 in modulation of alveolar macrophage-mediated pulmonary immune responses to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles. *Toxicol Sci* 82: 143–153.
- Murata Y, Shimamura T, Hamuro J (2002) The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14: 201–212.
- Destro Bisol G (1999) Genetic resistance to malaria, oxidative stress and hemoglobin oxidation. *Parassitologia* 41: 203–204.
- Gadsby N, Lawrence R, Carter R (2009) A study on pathogenicity and mosquito transmission success in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi adami*. *Int J Parasitol* 39: 347–354.
- Ghaffari S (2008) Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal* 10: 1923–1940.

## Free Heme in Malaria Resolution and Anemia

48. Gatidis S, Foller M, Lang F (2009) Hemin-induced suicidal erythrocyte death. *Ann Hematol* 88: 721–726.
49. Dang TN, Bishop GM, Dringen R, Robinson SR (2011) The metabolism and toxicity of hemin in astrocytes. *Glia* 59: 1540–1550.
50. Cambos M, Scorza T (2011) Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J Leukoc Biol* 89: 159–171.
51. Jelkmann W (2011) Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 589: 1251–1258.
52. Erslev AJ, Caro J, Kansu E, Silver R (1980) Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br J Haematol* 45: 65–72.
53. Sanchez-Medal L, Labardini J (1968) Hemolysis and erythropoiesis. 3. The effect of hemolysis and hemolysates on erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 149: 377–382.
54. Varon J, Marik PE, Fromm RE Jr, Gueler A (1999) Carbon monoxide poisoning: a review for clinicians. *J Emerg Med* 17: 87–93.



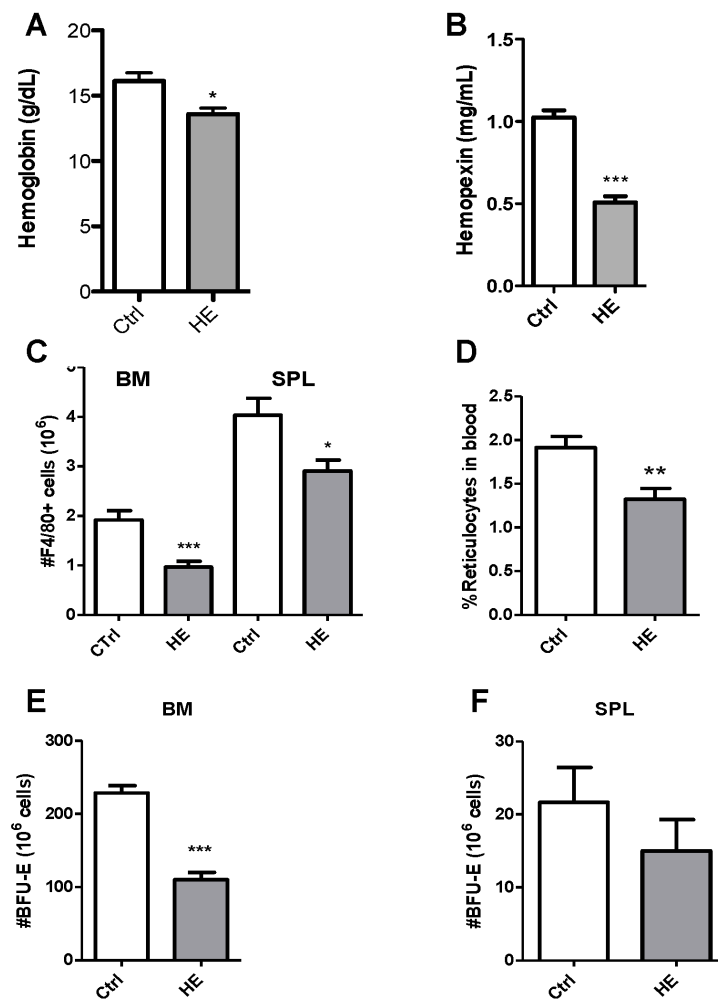


Figure S1. Souris ayant reçu une injection de PBS (Ctrl) ou d'hème (HE) toutes les 24 h, durant trois jours consécutifs par semaine, et pendant 2 semaines.

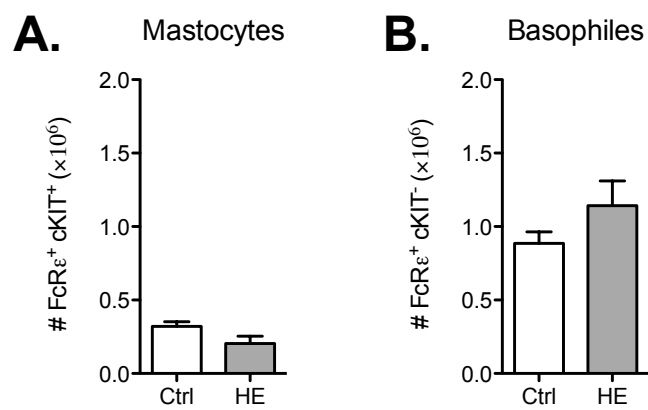


Figure I.9. L'injection d'hème n'affecte pas les cellules promotrices de la réponse Th2.

Nombre de (A) mastocytes et (B) polynucléaires basophiles dans la rate de souris naïves (Ctrl) et de souris ayant reçu 5mg/mL d'hème trois jours de suite (HE).

### **3.4.2. Absence de rôle des mastocytes et des polynucléaires basophiles dans l'induction de la réponse Th2.**

Parallèlement aux souris BALB/c ayant subi des injections de phénylhydrazine, nous avons quantifié le nombre de mastocytes et de polynucléaires basophiles chez les souris naïves et chez les souris ayant reçu 5mg/mL d'hème pendant trois jours. Ces cellules produisent de l'IL-4 et sont ainsi capables de promouvoir la polarisation des cellules T CD4 en Th2. D'après nos résultats le traitement avec l'hème ne modifie pas le nombre de mastocytes, ni de polynucléaires basophiles dans la rate de ces souris (Figures I.9).

## **4. Résumé et discussion des résultats du Chapitre 1**

Chez les patients atteints de drépanocytose ou d'anémie hémolytique auto-immune, les niveaux systémiques d'IL-4 et d'IL-10 sont augmentés, alors que les niveaux d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 sont diminués, ce qui caractérise la prédominance d'une réponse cellulaire de type 2 [167-171]. Par ailleurs, l'hémolyse qui accompagne ces maladies est responsable de la libération d'hémoglobine, qui après oxydation libère ses fragments d'hème (Figure 4) [18]. Comme l'hème diminue la production d'IL-12p70 par les macrophages, et favorise leur production en IL-10 [38], l'ensemble de ces observations suggère une participation de l'hème dans l'induction de la réponse de type 2 qui accompagne les maladies hémolytiques chroniques.

Alors que la production en cytokines par les CPA conditionne la réponse lymphocytaire, les macrophages pourraient favoriser la polarisation Th2 dans les conditions d'hémolyses. Nous avons ainsi évalué le rôle immunomodulateur

---

de l'hème sur la réponse des lymphocytes T CD4, chez des souris ayant subi une hémolyse par injections de phénylhydrazine. Dans notre étude nous montrons une diminution drastique des concentrations plasmatiques d'hémopexine, ce qui traduit une augmentation d'hème comme le démontre Moreau et al. (Annexe 1). En effet, l'hémopexine est la protéine ayant la plus forte affinité pour l'hème, et sa diminution est inversement corrélée à l'augmentation de l'hème [18].

L'injection de phénylhydrazine conduit également à l'activation des lymphocytes T CD4, comme le suggère l'augmentation du nombre de cellules T exprimant CD69, un marqueur précoce d'activation. Ce phénomène pourrait être lié à l'hème car nous observons des résultats similaires *in vivo* ou *in vitro* après le traitement des souris ou des lymphocytes T avec de l'hème. De façon intéressante, les lymphocytes T CD4 provenant de la rate des souris ayant eu une injection de phénylhydrazine produisent moins d'IFN- $\gamma$ , alors que leur production en IL-4 n'est pas altérée. Ainsi, l'hème libéré suite à l'hémolyse vasculaire activerait les lymphocytes T CD4 et inhiberait la production de cytokine apparentée à la réponse Th1, favorisant de cette façon la réponse de type 2.

Il a été suggéré que l'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème implique la reconnaissance du complexe CMH de classe II par le TCR, avec une restriction liée au CMH, et par un mécanisme alternatif aux peptides antigéniques et aux superantigènes [48, 49]. *In vitro*, l'hème active les fonctions de nombreuses cellules par la production d'ERO [34, 179], c'est à dire en diminuant le ratio GSH/glutathion oxydé [38], mais le traitement des cellules avec des antioxydants n'inhibe pas l'activation des lymphocytes T CD4 médié par l'hème. La NAC est un aminothiols précurseur de la L-cystéine capable de

---

rétablir les niveaux intracellulaires de GSH, mais qui interagit également avec d'autres voies biochimiques impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire, ou du cycle cellulaire [180]. Par exemple, l'inhibition du cycle cellulaire des cellules stellaires du foie par la NAC est associée à son interaction avec les résidus cystéines des protéines de la voie des MAPK [181]. De plus, la NAC affecte l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques en diminuant leur expression en signaux de co-stimulations, CD40, CD83 et CD86, nécessaires à l'activation CPA-dépendante des lymphocytes T [182]. Ainsi, la diminution de l'activation mesurée pour les cellules traitées avec la NAC serait plutôt liée aux effets alternatifs du NAC plutôt qu'à son rôle d'antioxydant.

Les polynucléaires basophiles, et les mastocytes expriment le CMH de classe II [177, 178]. Alors que les cellules dendritiques sont de mauvaises promotrices de la réponse Th2, les polynucléaires basophiles, et les mastocytes produisent rapidement de l'IL-4, et seraient ainsi des CPA importantes dans l'induction précoce de la réponse Th2 [173, 177]. Nous avons constaté une augmentation du nombre de mastocytes et de polynucléaires basophiles dans la rate de souris traitées par la phénylhydrazine en comparaison aux souris témoins, et ces cellules pourraient de cette façon contribuer à la promotion de la réponse de type 2 observée. Cependant, l'injection d'hème pendant trois jours n'est pas responsable de l'expansion de ces cellules, malgré l'orientation de la réponse des lymphocytes T vers un profil Th2. Nous spéculons que cette différence pourrait être attribuée à la réaction inflammatoire provoquée par la phénylhydrazine, car nous avons également observé une augmentation du nombre de polynucléaires basophiles ( $4,4 \times 10^6$  cellules dans la rate) et de mastocytes ( $7,5 \times 10^6$  cellules dans la rate) lorsque les souris C57BL/6 ont été uniquement infectées par *P. c. adami* DK. De plus, la diminution de

---

l'hémopexine est moins importante lorsque l'hème a été directement injecté, en comparaison aux souris traitées avec la phénylhydrazine, ce qui suggère un éventuel seuil d'accumulation d'hème à atteindre avant de pouvoir observer un recrutement des mastocytes et des polynucléaires basophiles. Ainsi, dans notre contexte d'étude les polynucléaires basophiles et les mastocytes ne semblent donc pas contribuer à l'orientation de la réponse Th2.

Malgré le fait que la réponse Th2 soit favorisée chez les souris traitées avec l'hème, ces souris développent une infection plus modérée que les souris naïves lors de leur infection par *P. c. adami*. Une fois dans la vacuole parasitophore et pour faire face à la libération d'hème associée à la dégradation de la fraction protéique de l'hémoglobine, le parasite induit la polymérisation de l'hème sous forme d'un biocristal relativement inerte, l'hémozoïne. En effet, l'hème est toxique pour le parasite, et pour cette raison de nombreux traitements anti-malariques ciblent l'inhibition de la formation de l'hémozoïne. Cependant, il est peu vraisemblable que l'hème inhibe la croissance des parasites car nous n'observons pas de différence quant à la vitesse de multiplication du parasite entre les deux groupes de souris infectées [données non publiées ; calculées à partir de la formule : Taux de multiplication = parasitémie  $J_{n+1}$  / parasitémie  $J_n$ ]. De même, la déplétion des niveaux intra-érythrocytaire de GSH par l'hème n'inhibe pas la croissance parasitaire *in vitro* [183]. En considérant ces faits, nous proposons que l'action bénéfique de l'hème sur le contrôle de la parasitémie intervienne de façon précoce pendant l'infection. Ainsi, l'augmentation de la rigidité de la membrane érythrocytaire suite à l'oxydation des phospholipides membranaire ou des protéines érythrocytaires pourrait prévenir l'invasion des cellules par les mérozoïtes. Simultanément, l'exposition de la phosphatidylsérine au niveau des feuillettes externes favoriserait

---

l'élimination des globules rouges parasités par les macrophages. Au cours de l'infection par *Plasmodium*, les réarrangements membranaires des érythrocytes sont également un mécanisme d'élimination des globules rouges sains par les macrophages tel que nous l'avons abordé précédemment [138]. Enfin, *P. c. adami* infecte préférentiellement les globules rouges matures [184], et la sélectivité des parasites pour certains érythrocytes associée à la diminution de cette population cellulaire pourrait contribuer à une parasitémie plus faible.

L'hème est essentiel à l'hématopoïèse car il est indispensable à la synthèse de l'hémoglobine. Dans cette étude, nous avons également analysé l'effet de l'hème sur la production des globules rouges, dans la rate et la moelle osseuse. Bien que les niveaux d'EPO mesurés dans le plasma soient plus élevés après trois jours de traitement avec l'hème, ces souris développent une anémie de manière précoce au cours de l'infection. Ces observations associées à la diminution du nombre de réticulocytes et de progéniteurs érythroïdes chez les souris traitées avec l'hème, suggèrent que l'hème est responsable d'une altération dans la réponse des progéniteurs érythroïde face à l'EPO produite. Ces données sont consistantes avec ce qui a été rapporté chez les modèles murins d'anémie sévère [158]. Ainsi, l'hème inhiberait la production de globules rouges, et pourrait induire une anémie par l'absence de renouvellement des globules sénescents éliminés. Cependant, les données disponibles à ce jour ne permettent pas d'expliquer la hausse d'EPO que nous observons chez les souris traitées avec l'hème.

Dans des conditions d'anémie aiguë ou de stress hypoxique, une érythropoïèse splénique se met en place [185]. Dans ce contexte, après dix jours d'infection, nous observons l'induction de l'érythropoïèse dans la rate, qui vraisemblablement permettrait la production efficace et plus rapide de globules

---

rouges, car la réticulocytose augmente malgré une diminution de l'érythropoïèse médullaire. Ces résultats sont consistants avec l'étude de Moreau et al. qui montre que la libération d'hème associée aux conditions hémolytiques inhibe l'érythropoïèse médullaire sans affecter l'érythropoïèse dans la rate (Annexe 1). Certaines cytokines peuvent également avoir un impact sur la maturation des progéniteurs érythroïdes. Le rôle de l'IL-10 au cours de l'érythropoïèse est ambigu chez l'Homme car l'augmentation des ses niveaux est associée à une protection vis à vis de l'anémie palustre sévère [162, 163], mais les études *in vitro* suggèrent un rôle délétère de IL-10 sur l'érythropoïèse suite à la modulation de la réponse des macrophages [165, 166]. Au contraire, l'injection d'IL-12 chez les souris C57BL/6 ou A/J favorise la prolifération des progéniteurs érythroïdes [186]. Ainsi, l'hème pourrait avoir un effet délétère sur l'érythropoïèse de l'hôte en favorisant la réponse immune de type Th2.

Pour conclure ce chapitre, nous avons montré un rôle à la fois délétère et bénéfique de l'hème ou cours de l'infection par *P. c. adami* DK. En effet, dans notre modèle d'étude, le prétraitement des souris avec de l'hème limite l'infection par *P. c. adami* DK, mais participe à l'induction d'une anémie par l'altération de l'érythropoïèse médullaire.



---

## CHAPITRE 2. PLACE DE L'HEME DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME GRAVE CHEZ L'HOMME

### 1. Contexte du travail

Pendant la phase érythrocytaire, pour sa différenciation et sa croissance, *Plasmodium* dégrade 60-80% de l'hémoglobine totale par des protéases, libérant de cette façon de l'hème libre dans sa vacuole digestive [187]. La libération d'hème est potentiellement délétère pour le parasite car elle entraîne la peroxydation lipidique des membranes ainsi que la production d'ERO [187]. La majeure partie de l'hème libre est polymérisée sous la forme d'un cristal relativement inerte, l'hémozoïne. Néanmoins, l'hème restant ( $\approx 5\%$ ) est libéré dans le système circulatoire lors de la lyse des globules rouges parasités, et semble contribuer à la lyse des globules rouges non parasités, par oxydation de leurs lipides membranaires et/ou des protéines du cytosquelette [28, 29]. Ainsi, suite à la lyse des globules rouges sains, l'hémoglobine libre est oxydée en méthémoglobine, une structure instable dont sont dissociés les groupements prosthétiques d'hème (Figure 4) [10]).

Plusieurs données suggèrent que l'hème est impliqué dans la physiopathologie du paludisme grave chez l'Homme. Premièrement, en Zambie, des urines positives pour l'hème ont été détectées chez 50% des enfants atteints de

---

neuropaludisme par rapport à, 3,5% et 8,3% des enfants respectivement atteints de paludisme simple ou d'anémie palustre sévère [188]. Deuxièmement, le taux de méthémoglobine circulant est plus élevé chez ces enfants en fonction de la sévérité du paludisme, la méthémoglobine étant un métabolite de l'hémoglobine et un « précurseur » de l'hème libre. Par ailleurs, 50% de mortalités ou d'apparitions de séquelles neurologiques ont été rapportées chez les enfants atteints de neuropaludisme et ayant un taux de méthémoglobine supérieure à 10% [189]. Troisièmement, le traitement des enfants avec de l'albumine ou des chélateurs du fer [deferoxamine, ou deferiprone] diminue la mortalité, les séquelles neurologiques ainsi que la durée du coma [190, 191].

Les niveaux d'hème total augmentent avec la sévérité du paludisme à *P. vivax* au Brésil, mais la relation entre les taux d'hème et la gravité des infections par *P. falciparum* n'a jusqu'à maintenant pas été rapportée dans la littérature [3, 192]. Ainsi, dans le but d'éclaircir le rôle de l'hème dans la physiopathologie du paludisme grave à *P. falciparum*, nous avons dosé l'hème total dans le plasma d'individus infectés vivant à Cuttack, une ville endémique pour le paludisme située dans l'état de l'Odisha, en Inde (Figure II.1). Ces patients présentent différentes formes cliniques du paludisme, catégorisées en fonction des critères de l'OMS. Nous avons corrélé ces niveaux avec la biomasse parasitaire, estimée par les concentrations plasmatiques de Protéine riche en histidine (HRP)-2 parasitaire, ainsi qu'avec les niveaux d'hémopexine, de cytokines, et de HO-1 mesurés dans le plasma. Différentes approches statistiques nous ont permis de mettre en évidence un réseau cytokinique associé à l'hème dans la physiopathologie du neuropaludisme et de l'insuffisance rénale palustre. Enfin, dans le but d'établir une relation entre

---

contrôle génétique de la réponse à l'hème et susceptibilité au paludisme grave, nous avons entrepris une analyse du polymorphisme de *HMOX1*, dont nous présenterons les résultats préliminaires.

## 2. Présentation du site d'étude

### 2.1. Endémicité du paludisme en Inde et dans l'Odisha

En 2008, l'Inde représentait 27% des cas de paludisme en dehors de l'Afrique, et 65% des cas de paludisme dans la région Asie du sud-est de l'OMS [193]. La même année, près de 82% de la population vivait en zone endémique pour le paludisme [193]. En 2009, plus de 1.560.000 cas de paludisme ont été déclarés par le *National Vector Borne Disease Control Programme* [Ministère de la Santé et du Bien-Être Familial en Inde]. Dans un pays de plus de 1,2 milliards d'habitants, où 22% de la population vit en zone de forte transmission palustre [4], il est vraisemblable que la morbidité soit largement sous-estimée.

La biodiversité de l'Inde, l'hétérogénéité géographique et climatique, et la génétique des populations contribuent à l'épidémiologie disparate du pays (Annexe 2) [108]. En effet, les régions centrales et à l'est sont les plus vulnérables ; 24% des cas de paludisme ont été recensés dans l'État de l'Odisha en 2009 [839.877 individus d'après le *National Vector Borne Disease Control Programme*, Ministère de la Santé et du Bien-Être Familial en Inde], dont 88% liés à *P. falciparum*. Ainsi, 40% des infections à *P. falciparum* ont été déclarées dans l'Odisha.

La transmission du paludisme dans l'Odisha est péri-annuelle, avec quelques fluctuations liées au climat. Ainsi, un pic de transmission a lieu pendant et juste

après la saison des pluies [de juin à octobre], puis diminue au cours de l'hiver [de novembre à février] [194, 195].



Figure II.1. Localisation de l'État d'Odisha (en orange) en Inde.

Les études de terrain ont été réalisées au SCB Medical College, à Cuttack



Figure II.2. Paysages et modes d'habitations en Odisha.

- (A) Temple de Bindu Sagar, Bhubaneswar.
- (B) Jardin botanique de Bhubaneswar.
- (C) Parc de Nandankanan.
- (D) Habitations à Bhubaneswar.
- (E) Affiches de la campagne d'implantation de sanitaires à Bhubaneswar.
- (F) Habitations proches de Chilika.
- (G) Temple de Muktesvara, Bhubaneswar.
- (H) Marché central de Bhubaneswar.

## 2.2. Cuttack



Figure II.3. Situation de Cuttack

La ville de Cuttack [coordonnées GPS, 20°31'31"N 85°47'17"E] est située à environ 25km au nord de Bhubaneswar, dans le district de Cuttack. Cette ville de plus de 606.000 habitants est un site actif de production d'alliages ferreux et d'acier. C'est également la deuxième ville productrice de textiles dans l'est de l'Inde. La croissance industrielle de la région a entraîné un exode rural massif et une augmentation de 12% de la population en 2001 [D'après Census 2011]. Cette expansion rapide de la ville est à l'origine du manque d'accès à l'eau potable et aux latrines d'une grande partie de la population.

La ville est localisée dans le delta de la rivière Mahandi (Figure II.3), dans laquelle sont régulièrement déversées les déjections des habitants. Elle est

---

également au centre de grandes réserves de forêts avec au sud la forêt de Chandaka, et au nord la forêt de Kalipash, dont la végétation dense est composée de sals, kinos et lauriers indiens et de bambous. De par sa proximité avec la côte du golfe du Bengale, cette région a été victime de plusieurs cyclones dévastateurs.

### **2.3. Santé des populations Odissi**

L'Odisha est l'un des États les plus pauvres de l'Inde. L'agriculture représente l'activité principale des habitants. Parmi les 37 millions d'habitants, seuls 15% vivent en zone urbaine. D'après le Département du Logement et du Développement Urbain (*Department of Housing and Urban Development*) du Gouvernement de l'Odisha, plus de 40% de la population n'a pas accès aux latrines à Bhubaneswar, la capitale de l'État. Les mauvaises conditions sanitaires pourraient favoriser les transmissions oro-fécales de bactéries ou d'helminthes, causant les infections intestinales endémiques dans la région [196], et justifieraient que plus de 40% de la population soit positive pour des antigènes de filaires lymphatiques [197, 198].

Outre les co-infections, les hémoglobinopathies et autres maladies hémolytiques chroniques contribuent à la variabilité de la réponse des individus aux infections par *Plasmodium*. Bien que peu de données soient disponibles à ce jour, il est de plus en plus clair que la prévalence des hémoglobinopathies est importante en Inde, mais avec un tableau clinique modéré pour ce qui est des cas de drépanocytoses. De cette façon, il est probable que les individus soient largement sous-diagnostiqués [199]. D'après Balgir et al., parmi les 1015 cas d'anémies hémolytiques analysés à Bhubaneswar, entre 1994 et 2003, 396 étaient atteints de drépanocytose et 272

de thalassémie [200]. De même, d'après une étude réalisée en 1995, sur 9 des 62 tribus endogames présentes en Odisha, 12% des individus étaient atteints de déficit en glucose-6 phosphate déshydrogénase, avec un variant propre à cette région (44 Ala→Gly) [201].

### 3. Participants

Tous les patients et sujets contrôles impliqués dans l'étude ont été recrutés suite à leur passage dans les services de consultations externes et de médecine interne du Sriram Chandra Bhanj Medical College & Hospital (SCB Medical College) entre 2008 et 2011.

L'infection par *Plasmodium* chez les patients présentant un syndrome fébrile a été dépistée par analyse microscopique de frottis sanguins et de gouttes épaisses, puis confirmée par une réaction en chaîne par polymérase (PCR) nichée réalisée à partir de sondes dérivés de l'ARN ribosomal parasitaire [202]. Après validation du diagnostic, tous les patients ont reçu un traitement antiparasitaire associé à un traitement symptomatique adapté à leur tableau clinique. Seuls les individus infectés par *P. falciparum* ont été inclus dans l'étude, soit au total 252 patients, âgés de plus 15 ans. Les patients ont été catégorisés en accès simple (n=60) ou en paludisme grave (n=192), en fonction des critères de gravité définis par l'OMS [203]. Les cas de paludisme grave étaient très hétérogènes, et comprenaient des atteintes cérébrales (neuropaludisme), rénales (insuffisance rénale), hépatiques, de chocs systoliques, jaunisses, acidoses métaboliques, anémies graves et des syndromes de chocs respiratoires. Sur l'ensemble de ces patients, 19 sont décédés. Le neuropaludisme a été diagnostiqué par un score de Glasgow < 11, et tous les



---

autres cas graves sans neuropaludisme, d'après les critères décrits dans les Articles 2 et 3.

Des sujets non infectés (contrôles endémiques, n = 37) ont également participé à l'étude. Ces individus étaient pour la plupart des membres de la famille des malades, avaient un frotti sanguin négatif et n'avaient pas rapporté d'infection par *Plasmodium* dans les 5 dernières années. Des individus atteints d'encéphalite virale (n = 9) et de sepsis sévère (n = 10) ont également été inclus dans certaines analyses en tant que témoins. Les critères de diagnostic des cas de sepsis sévères sont détaillés dans l'Article 2.

#### **4. Matériels et méthodes complémentaires aux Articles 2, 3**

##### **4.1. Considérations éthiques**

L'étude a été approuvée par les Comités d'Éthique *Institutional Human Ethics Committee* du SCB Medical College, *National Health Office Ethics Committee*, et par les Comités de Protection des Personnes des instituts partenaires : (1) *Institute of Life Sciences*, Bhubaneswar, Inde, (2) *Tata Institute of Fundamental Research*, Mumbai, Inde, (c) Institut Pasteur de Lille, Lille, France.

Tous les échantillons sanguins ont été prélevés après obtention d'un consentement écrit de la part des participants, ou des représentants légaux des malades en cas de coma.

##### **4.2. Analyse des paramètres biologiques**

Du sang périphérique a été prélevé (5mL) avant l'initiation des traitements. Les échantillons ont été centrifugés à 4500g pendant 15min, le plasma a été récupéré et conservé à -80°C.

---

La numération formule sanguine, et le dosage des paramètres biologiques rénaux (créatinine) et hépatiques (alcaline phosphatase, bilirubine totale, alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase) ont été réalisés. La glycémie, les électrolytes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et les niveaux d'acide lactique ont également été dosés pour chaque échantillon. Dans les cas de coagulation intravasculaire disséminée, un profil de l'hémostase était réalisé. Dans les cas de jaunisse, ou de troubles hépatiques, des marqueurs viraux étaient dosés. Dans les cas de syndrome de détresse respiratoire, une gazométrie artérielle était réalisée.

### 4.3. Quantification de la parasitémie

Les niveaux de HRP-2 plasmatiques ont été dosés par ELISA d'après ce qui a été décrit précédemment [204]. Une IgM anti-HRP-2 de *P. falciparum* (MPFM-55A; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a été utilisée comme anticorps de capture et une IgG1 anti-HRP-2 de *P. falciparum* a été utilisée comme anticorps de détection (MPFG-55; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Tous les anticorps ont été titrés avant leur utilisation.

Des plaques de microtitration de 96 demi-puits à fonds plats ont été sensibilisées toute une nuit à 4°C, avec 30µL de MPFM-55A à 0,2µg/mL dilué dans du PBS. Le lendemain les plaques ont été lavées 2 fois en PBS-0.05% Tween®20 (Sigma), et les puits saturés pendant 2h, à température ambiante, avec 60µL de PBS-10% SVF (Invitrogen).

Après une nouvelle étape de lavage, 30µL de sérums dilués 1/100 dans de l'eau pure (Invitrogen) ont été déposés en duplicata. Une courbe standard a été incluse à chaque plaque après réalisations de dilutions sériées aux  $\frac{1}{2}$  d'un échantillon d'une cohorte précédente pour lequel la parasitémie est connue

[90]. Deux puits sans échantillon, mais traités similairement, ont également été inclus comme contrôles négatifs. Après 1h, et une étape de lavage, 30µL d'une solution de MPFG-55 à 0,05µg/mL (dans du PBS-1% Tween®20-10% SVF) ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été incubées pendant 1h à température ambiante, puis lavées. À partir d'une solution d'anti-IgG1 monoclonal couplé à la HRP (pour peroxydase de raifort, SB77e; Abcam), diluée au 1/8000 dans du PBS-1% Tween®20-10% SVF, 30µL ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été lavées 5 fois après incubation des plaques pendant 1h à température ambiante.

La détection a été réalisée avec 30µL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma), et la réaction arrêtée après 10-20min avec 30µL d'acide sulfurique 1M (Sigma). La densité optique de chaque puits a été mesurée par un lecteur de plaques ELx808 (BioTek). La concentration en HRP-2 a été calculée et exprimée en unité arbitraire (UA) à partir des densités optiques mesurées pour les points de la courbe standard. Les échantillons dont les densités optiques étaient en dehors des seuils de détection ont été analysés de nouveau mais avec des dilutions plus ou moins importantes.

#### **4.4. Dosage de HO-1**

Les niveaux de HO-1 ont été dosés dans les plasmas en utilisant le kit ELISA ImmunoSet® HO-1 (human) ELISA development set (Enzo Life Sciences), et tel que préconisé par le fabricant.

#### **4.5. Analyse du polymorphisme de *HMOX1***

L'acide désoxyribonucléique (ADN) des individus a été purifié à partir de sang total (200µL) en utilisant le kit GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma).

Les éluats d'ADN extraits (3µL) ont été mélangés avec les réactifs du kit Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen), et le couple d'amorces spécifiques (Eurogentec) a été utilisé à la concentration finale de 200nM (Tableau II.1). La séquence d'intérêt a ensuite été amplifiée par PCR en utilisant un thermocycleur (Bio-Rad) réglé sur le programme suivant : 5min à 95°C, 28 cycles de [30sec à 95°C, 90sec à 60°C, 30sec à 72°C], et 30min à 60°C.

Tableau 3. Couple d'amorces pour l'amplification de la séquence d'intérêt dans le promoteur de *HMOX1*.

Amorce sens	AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA
Amorce anti-sens couplée à 6-FAM	ACAAAGTCTGGCCATAGGAC

La taille des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10%, avant analyse par électrophorèse capillaire avec le marqueur de poids moléculaire GeneScan™ 500LIZ™ (Life Technologies), et en utilisant l'analyseur génétique ABI 3500 (Applied Biosystems) couplé au logiciel GeneMarker® (SoftGenetics). Une taille de 127 +/- 15pb était attendue, avec 127pb pour un amplicon de 30 répétitions (GT). Les résultats ont été analysés avec le logiciel GeneMapper® (Life Technologies).

#### **4.6. Analyse de l'activité enzymatique de HO-1**

À 200µL de sang total ont été ajoutés 400µL de tampon de lyse (30mM Tris-HCl pH=7,5 ; 0,25M sucrose ; 0,15M NaCl) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules ont ensuite été soniquées deux fois, pendant 15sec, sur glace. Les homogénats ont été centrifugés pendant 15min, à 10.000g, à 4°C, et les surnageants ont été gardés pour l'analyse de l'activité enzymatique de HO-1 à partir de la quantité de bilirubine formée [205].

---

Pour la préparation du tampon d'essai, des protéines de cytosol ont été extraites à partir d'isolats de foies de souris C57BL/6 brièvement soniqués dans du tampon de lyse à 4°C, puis centrifugés 1h à 100.000g, et 4°C. Les surnageants ont été gardés, et leur concentration en protéines a été dosée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay kit (Pierce Technology, Inc). Le tampon d'essai de 0,8mM NADPH (Sigma), 2mM D-glucose-6-phosphate (Sigma), 0,2U/mL glucose-6-phosphate déshydrogénase (Sigma) 1mM MgCl<sub>2</sub>(Sigma), 100mM PBS, 20μM hémine (BioXtra porcine ; Sigma) et 2mg/mL de protéines extraites de cytosol de foie de souris a finalement été préparé.

Par la suite, 100μL d'homogénat de cellules de sang a été mélangé à 100μL de tampon d'essai, puis les solutions ont été incubées à 37°C, à l'abri de la lumière. Après 1h, 200μL de chloroforme ont été ajoutés, les solutions ont été vortexées pendant 15-20 min, puis centrifugées 5min, à 200 g, à 4°C. La densité optique des surnageants a ensuite été mesurée à 464nm et 530nm. La densité optique de tous les échantillons a également été mesurée aux temps t=0, à 464 et à 530 nm. La concentration de la bilirubine formée a été calculée à partir de la formule :  $C = [\Delta DO(t_{60}) - \Delta DO(t_0)] \times \epsilon$ , où  $\Delta DO(t_{60})$  et  $\Delta DO(t_0)$  sont respectivement les différences de densités optiques obtenues entre 464 nm et 530 nm à 60min et à 0min, et  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire. La quantité de HO-1 a été dosée par ELISA dans les homogénats, pour exprimer les résultats finaux en mol de bilirubine formé par ng de HO-1 par heure.

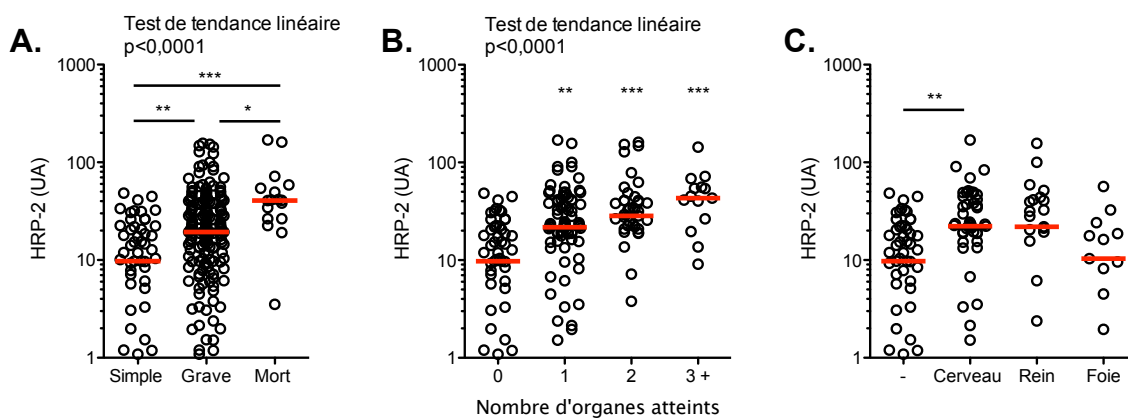


Figure II.4. HRP-2 augmente avec la sévérité du paludisme.

(A) Taux de HRP-2 plasmatiques chez les patients atteints d'un accès simple (Simple), d'un paludisme grave (Grave), ou décédés (Mort). (B) Concentrations en HRP-2 plasmatiques en fonction du nombre d'organes atteints, et (C) du type d'organe chez les individus ne présentant qu'une seule atteinte. Les médianes sont représentées en rouge. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  avec l'échantillon contrôle, ou entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn.

## 5. Résultats

### 5.1. Parasitémie et sévérité

Nous n'avions pas accès aux valeurs des parasitémies périphériques, comptés sur des frottis sanguins et gouttes épaisses. Pour cette raison, la biomasse parasitaire totale a été quantifiée par ELISA dans le plasma en dosant les niveaux de HRP-2 spécifiques de *P. falciparum* [206]. Nos résultats indiquent que la concentration plasmatique de HRP-2 est significativement plus élevée dans les cas de paludisme grave, en comparaison aux accès simples, et d'autant plus chez les patients décédés (Figure II.4A). La concentration d'HRP-2 augmente également avec le nombre d'organes atteints (Figure II.4B). Lorsque seuls les patients ayant une atteinte organique ont été comparés, les niveaux de HRP-2 sont significativement augmentés dans les cas d'atteintes cérébrales en comparaison aux accès simples (Figure II.4C). Ces résultats suggèrent fortement que la concentration plasmatique en HRP-2 augmente avec la sévérité de l'infection par *Plasmodium*, et plus particulièrement dans les cas de neuropaludisme. Néanmoins, d'après une analyse statistique de Mann-Whitney, les niveaux de HRP-2 sont également significativement plus élevés dans les plasmas de patients atteints d'insuffisance rénale palustre en comparaison aux accès simples ( $p=0,021$ ).

### 5.2. Rôle de l'hème dans la sévérité du paludisme

#### 5.2.1. Biomarqueurs d'hémolyse et de parasitémie

Nous avons dosé les niveaux d'hème total dans les plasmas des patients de notre cohorte (Article 2). Tel qu'illustré par la Figure II.5, les niveaux d'hème sont significativement corrélés avec les niveaux de HRP-2 plasmatiques ainsi

qu'avec la bilirubinémie totale ( $R=0,494$  ;  $p<0,001$  ; corrélation de Spearman), mais pas avec le taux d'hémoglobine ( $R=0,006$  ;  $p=0,927$  ; corrélation de Spearman). Ces résultats suggèrent que l'hème proviendrait majoritairement de la dégradation des globules rouges parasités plutôt que des globules rouges sains.

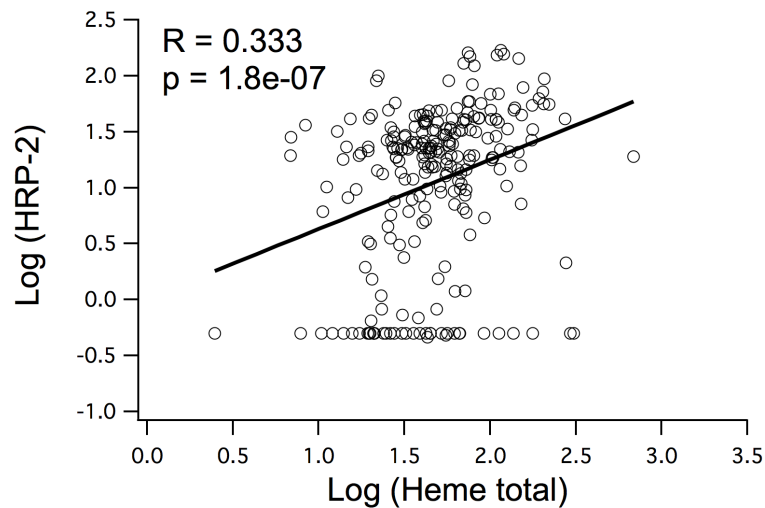


Figure II.5. Corrélation de HRP-2 avec l'hème plasmatique.

Analyse par corrélation de Spearman en considérant tous les groupes d'individus infectés.



---

### 5.2.2. Hème et manifestations cliniques (Article 2)

Par la suite nous avons analysé les niveaux d'hème total et d'hémopexine plasmatiques en fonction de la sévérité de l'infection à *P. falciparum*. De plus, nous avons corrélé les niveaux d'hème total et d'hémopexine avec les concentrations plasmatiques de 26 cytokines/chimiokines, et avec le phénotype des patients. Nos résultats montrent une augmentation de l'hème avec la sévérité de l'infection, notamment avec la mortalité et le nombre d'organes atteints. Nos données soumises à une analyse par régression multivariée suggèrent également deux réseaux cytokiniques différents, impliquant l'hème total, l'hémopexine, l'IL-10, TNF- $\alpha$ , IP-10 et MCP-1 dans la physiopathologie du neuropaludisme et de l'insuffisance rénale palustre. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis à publication au journal *Infection and Immunity*, en février 2015, et accepté en juillet 2015.

Ma contribution pour la réalisation de ce papier a été la vérification de la classification des patients, la réalisation de dosages (hème total, hémopexine, HRP-2), l'analyse des résultats, et enfin la rédaction de l'article.

Les références citées dans l'Article 2 ont été incluses à la fin du manuscrit.

---

**A multifaceted role of heme during severe *Plasmodium falciparum* infections in India**

Running title: Heme and severe *P. falciparum* malaria

Esther Dalko,<sup>1,2</sup> Bidyut Das,<sup>3</sup> Fabien Herbert,<sup>1</sup> Constantin Fesel,<sup>4</sup> Sulabha Pathak,<sup>5</sup> Rina Tripathy,<sup>3</sup> Pierre-André Cazenave,<sup>1, 6</sup> Balachandran Ravindran,<sup>7</sup> Shobhona Sharma,<sup>5</sup> Sylviane Pied<sup>1#</sup>

1. Centre for Infection and Immunity of Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

2. Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal Québec, Canada

3. SCB Medical College, Cuttack, Odisha, India

4. Instituto Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal

5. Department of Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India

6. Immunologie - Immunopathologie – Immunothérapie, UPMC/CNRS UMR 7211, Paris, France

7. Institute of Life Sciences, Bhubaneswar, Odisha, India

# Corresponding author: [sylviane.pied@pasteur-lille.fr](mailto:sylviane.pied@pasteur-lille.fr)

---

**ABSTRACT**

Several immunomodulatory factors are involved in malaria pathogenesis. Among them, it has been shown that heme plays a role in the pathophysiology of rodent severe malaria but its role is unclear during human severe malaria. Circulating levels of total heme and its main scavenger, hemopexin, along with cytokine/chemokine and biological parameters, including hemoglobin and creatinine levels as well as transaminases activities, were measured in the plasma of 237 *P. falciparum*-infected patients living in the malaria-endemic state of Odisha, India. All patients were categorized into the well-defined groups of mild malaria, cerebral malaria (CM) or severe non-cerebral malaria, which included acute renal failure (ARF) and hepatopathy. Our results show a significant increase in total heme plasma levels with malaria severity, especially for CM and malarial ARF. Spearman rank correlation and canonical correlation analyses have shown a correlation between total heme, hemopexin, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ -induced protein (IP)-10 and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 levels. In addition, canonical correlations revealed that heme along with IP-10 was associated to the CM pathophysiology whereas both IP-10 and MCP-1 concomitantly with heme discriminated ARF. Altogether, our data indicate that heme in association with cytokines and chemokines is involved in the pathophysiology of CM and ARF by different mechanisms, and support the deleterious role of heme during severe malaria reported with experimental models.

---

## INTRODUCTION

In 2008, India alone accounted for 27% of malaria cases outside Africa [193]. The central and eastern regions of India are the most vulnerable to malaria, with the state of Odisha alone accounting for 40% of all malaria cases, and 88% of *P. falciparum* infections recorded in India in 2009 [207]. Although cerebral complications are equally frequent among adults and children, adults are more susceptible to develop multiple malaria-related complications [208]. Indeed, a shift in the clinical profile has been observed in the last ten years, with more cases of multiple complications, including malarial acute renal failure (ARF) [208, 209]. Mechanisms underlying this shift are not clearly understood and need to be further investigated.

As a consequence of the massive destruction of red blood cells (RBCs) during infection, immunogenic molecules are released into the bloodstream, and they play a major role in determining the clinical outcome [58]. Although the malarial parasite uses 60–80% of hemoglobin for growth and converts most of the heme into hemozoin, there is also significant release of hemoglobin into blood from non-parasitized RBCs [210]. Cell-free hemoglobin is readily oxidized, releasing its heme prosthetic groups [10]. When bound to hemoproteins, heme is essential to life under aerobic conditions. However, free heme is involved in immune-mediated diseases by inducing the production of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines [7, 34]. Normally, extracellular free heme is neutralized rapidly by hemopexin, forming a heme–hemopexin complex. This complex is then scavenged by macrophages and hepatocytes and further catabolized by heme oxygenase-1 (HO-1) [10]. Although the liver is the main site for heme degradation, its detoxifying capacity might be overwhelmed by high levels of cell-free heme during hemolytic pathologies [17, 24].

---

In mice, injection of heme at later stages of malarial infection triggers cerebral malaria (CM) and was also involved in hepatopathy and dyserythropoiesis [10, 211, 212]. Interestingly, during *P. vivax* infections in Brazil, plasma heme levels increased with the severity of disease [192]. In addition, plasma levels of cell-free hemoglobin increased with severity during *P. falciparum* infection and could reflect increased systemic levels of heme [213], and more than 50% of *P. falciparum*-infected children developing CM in Zambia showed the presence of urinary heme compared to 3.5% of uncomplicated cases [188]. However, little is known about heme in the pathophysiology of *P. falciparum* malaria. In this study, we investigated its role in malarial outcomes of *P. falciparum*-infected patients from the malaria-endemic state of Odisha in India. We also examined the correlation of plasma levels of heme and hemopexin with circulating cytokine profiles and malaria pathology. Our analysis revealed that heme levels increased during CM and malarial ARF, while correlative studies with cytokines suggest that mechanisms involved in both pathologies are different.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics**

This study was conducted according to the guidelines set out in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Human Ethics Committee of SCB Medical College, Cuttack and the Institutional Review Board of all three collaborating institutes: (a) the Institute of Life Sciences, Bhubaneswar, India (b) the Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India and (c) Institut Pasteur de Lille, Lille, France. The National Health Office Ethics committee in India approved the study design. All blood samples were collected after obtaining written consent from participants or, in case of comatose patients, the accompanying relatives.

---

### Study Site and Participants

The study was conducted at SCB Medical College, Cuttack, Odisha in India between 2008-2011. Patients (n=237; age  $\geq$  15 years) with a history of fever and with evidence of altered sensorium, jaundice, oliguria, respiratory distress, shock and/or bleeding diathesis, were screened for *P. falciparum* infection by Giemsa-stained blood smears and immune chromatography test (SD Bio Standard Diagnostics India). Patients who were positive for ICT but negative by blood smears were subjected to nested PCR, as described earlier [202]. Those with evidence of sepsis were excluded. After diagnosis, all patients received appropriate treatment.

Clinical categorization was based on modified guidelines of the World Health Organization (WHO) [202, 203]. Mild malaria (MM) was defined as fever with evidence of *P. falciparum* infection. Severe malaria (SM) was defined as patients having at least one feature of SM reported by the WHO [203], and further categorized into four groups based on distinct clinical features: CM, SNCM (severe non-CM), MOD (multiple organ dysfunction), and CM-MOD (CM with MOD). CM was defined as patients with a Glasgow Coma Score (GCS)  $\leq$  10. SNCM patients had one of the severe manifestations without cerebral involvement, such as severe anemia (haemoglobin  $<$  5 g/dL), ARF (creatinine  $>$  3 mg/dL), jaundice (bilirubin  $>$  3 mg/dL), acute respiratory distress (ARDS; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>  $<$  200 mmHg), metabolic acidosis (plasma bicarbonate  $<$  15 mmol/L), and systolic shock (systolic blood pressure  $<$  80 mmHg). Hepatopathy was diagnosed either as ALT (alanine transaminase) and AST (aspartate transaminase)  $>$  3 times of normal or as ALT and AST  $>$  2 times of normal with bilirubin  $>$  6 mg/dL and alkaline phosphatase  $>$  100 IU/mL, in order to distinguish patients displaying liver dysfunctions from patients having solely jaundice. MOD patients had at least two

---

damaged organs, including ARF, hepatopathy, ARDS, and systolic shock. When more than a simple organ failure was associated with CM, patients were considered CM-MOD.

Endemic controls (EC) of identical ethnicity and coming from a similar geographical background were enrolled from among patients' relatives (n=37). Sepsis was defined as patients showing a systemic inflammatory response syndrome that had a proven or suspected microbial etiology. Sepsis (n=10) and encephalitis cases (n=9) were admitted to SCB Medical College. None of the control subjects had reported a history of clinical malaria in the five years preceding our study.

### **Blood Collection, Diagnosis, and Biological parameters**

Peripheral venous blood was collected on the day of recruitment prior to initiation of any treatment. Biological parameters such as complete blood count, renal (creatinine) and liver (alkaline phosphatase, bilirubin, ALT, AST) function tests, blood sugar, electrolytes and lactate levels were measured for all samples. Patients with bleeding diathesis were assessed for platelet count, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrin degradation product for evidence of disseminated intravascular coagulation. All the other patients had their platelets estimated. If there was evidence of thrombocytopenia ( $< 100,000/\text{mm}^3$ ), the above coagulation profile was carried out to establish subclinical disseminated intravascular coagulation. Viral markers for hepatitis A, E, B, and C were tested in patients with hepatopathy and jaundice, and arterial blood gas analysis was performed during ARDS.

### **Quantification of Histidine Rich protein-2 (HRP-2)**

---

HRP-2 levels were measured in plasma by using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as described previously [204]. An anti-*P. falciparum* HRP-2 IgM (MPFM-55A; Santa Cruz Biotechnology, France) was used as the capture antibody; an anti-*P. falciparum* HRP-2 IgG1 was used as a detection antibody (MPFG-55; Santa Cruz Biotechnology, France), and an HRP-coupled monoclonal anti-IgG1 antibody (SB77e; Abcam, France) was used as the secondary antibody for detection. A standard curve was added in duplicate to each plate, and it was obtained through serial dilutions of a serum sample from a previously described cohort with known parasitemia [90]. Samples out of the range of detection were more or less diluted. The lower limit of detection was 0.5 arbitrary units (AU).

#### **Determination of Plasma Levels of Total Heme and Hemopexin**

Total heme levels were measured in plasma using the QuantiChrom Heme Assay kit (BioAssay Systems, USA). Hemopexin levels were measured through ELISA using the Human Hemopexin ELISA kit (Abcam, France).

#### **Cytokine Measurements**

The concentrations of plasma cytokines for each sample were measured in duplicate using the MILLIPLEX MAP multiplex assay kit (Millipore, France). The Bio-Plex 200 system (Bio-Rad, France) was used for detection, and data were analyzed with the Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad, France).

#### **Statistical Analysis**

Statistical significance was determined by the non-parametric Mann-Whitney test for pairwise comparisons, or the Kruskal-Wallis test for multiple comparisons, using



---

GraphPad Prism Software (version 5, GraphPad Prism Software, USA). Spearman rank correlation analyses and canonical correlations were performed using IgorPro software (WaveMetrics, USA).  $p < 0.05$  was considered as significant.

## RESULTS

### Characteristics of Patient Groups

Among *P. falciparum*-infected patients recruited in the study, 180 (76%) individuals had SM (Table 1). Jaundice, severe anemia and metabolic acidosis, were not considered to be organ dysfunctions but were included in the SNCM, and they accounted for 21% of SM cases (Fig. S1A). Nearly half of the patients with SM (48%) had a single organ dysfunction (Fig. S1B), with CM the commonest complication (51%), followed by ARF (40%), hepatopathy (7%), and systolic shock (2%) (Fig. S1B); 23% and 8% had two and three damaged organs respectively, whereas only one patient had four dysfunctional organs (Fig. S1A). Among patients having two damaged organs, 83% had ARF, 66% had CM, and 46% had hepatopathy (Fig. S1C). Only two patients had ARDS that was associated with at least two other damaged organs. It is noteworthy that age was not a predictor of the severity of malaria (Table 1). A higher percentage of male was observed among all malaria groups, which is in agreement with studies previously reported in Odisha [214]. HRP-2 level has been shown to be a good indicator of total parasite biomass [206]. In this study, plasma levels of HRP-2 were higher in SM patients than in MM patients, while only CM and CM-MOD patients had significantly higher HRP-2 levels (Table 1).

### Heme and Hemopexin Levels in Severe Malaria

---

To have an insight about the impact of heme in the pathophysiology of severe *P. falciparum* malaria, we measured the plasma levels of heme, which includes both free and protein-bound forms, in *P. falciparum*-infected patients and correlated them with disease severity. Patients with systemic (sepsis; n=10) and brain (encephalitis; n=9) inflammatory disease were also included to assess whether any observed association was malaria specific. We found no change in heme levels in case of encephalitis and sepsis. However, heme levels increased with malarial disease severity, as well as with the number of damaged organs (Figure 1A-B). Mortality was only observed during CM (n=6) and CM-MOD (n=9) and CM/CM-MOD patients who did not survive had a twofold increase in heme levels compared to those who survived ( $p < 0.01$ ; Mann-Whitney test). Also, we noted an inverse correlation between heme and hemopexin levels ( $R=-0.416$ ;  $p < 0.0001$ ). There was a sixfold decrease in the plasma levels of hemopexin in SM patients compared to MM patients or ECs, and hemopexin levels decreased significantly with the number of damaged organs (Figure 1C-D).

### **Heme/Hemopexin Levels and Organ Injuries**

Systolic shock cases were excluded from analysis, due to the small number of patients (n=4). Similar total heme levels were obtained in patients with a single organ dysfunction and those with MM (Figure 1B, Figure 2A). However, hemopexin levels decreased significantly in patients having one damaged organ (Figure 1C), that was particularly observed when brain and kidney were involved but not liver (Figure 2B). We also compared total heme and hemopexin levels, according to the GCS. Considering a GCS of  $\leq 6$  indicating a poor prognosis [215], we grouped patients into three GCS categories:  $\leq 6$ , 7–10, and  $> 10$ . Levels of total heme significantly increased when the GCS  $\leq 6$  (Figure 2C), and were inversely correlated to plasma hemopexin levels (Figure

---

2D). Additionally, hemopexin levels were lower in patients with malarial ARF but not during hepatopathy (Figure 2B). According to a Spearman rank's correlation analysis, creatinine levels correlated negatively with hemopexin and positively with total heme, whereas ALT correlated with total heme levels only (Figures 2E-H).

### **Correlation of Heme and Hemopexin Levels with Cytokines in Severe Malaria.**

In order to assess whether plasma levels of total heme and hemopexin were related to cytokine profiles in malaria, we measured the plasma concentrations of the following cytokines: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor, interferon (IFN)- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- $\gamma$ -induced protein (IP)-10, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$ , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and TNF- $\beta$ . IL-10, IP-10, TNF- $\alpha$ , and MCP-1 correlated with both heme and hemopexin levels (Table S1).

To understand the networks involved among these different factors, we performed a canonical correlation analysis between cytokine levels and biological parameters by including all study patients. Canonical analysis is a multivariate analysis that distinguishes components of relationship between two sets of variables. It can further describe, by coefficients, how variables combined in one set explain a corresponding variable combination in a second set and in each component, also called canonical variate. The negative or positive coefficient assigned for each variable predicts the way of its contribution in the component. The two sets of variables used in our analysis were as follows: (X) IL-10, IP-10, MCP-1, and TNF- $\alpha$ , and (Y) creatinine, heme, and hemopexin (Table 2). Analysis revealed two separate significant canonical variates (First:  $p < 0.0001$ ; second:  $p = 0.0021$ ). Total heme and creatinine contributed

---

negatively to the first canonical variate, while all cytokines were positively related to it. Within each set of variables, IP-10 and hemopexin had the highest coefficients, suggesting their major contribution in this component of relationship (Table 2). IL-10 and IP-10 were positively associated to the second significant canonical variate, as well as heme, hemopexin and creatinine from the second set of variable. This suggests a positive association between these variables. Interestingly, within this second canonical variate MCP-1 and creatinine had the highest coefficients (Table 2). This analysis revealed the existence of complex networks, while overall only the plasma levels of MCP-1 were significantly higher during malarial ARF than MM (Figures 3A-D).

It is noteworthy that the plasma cytokine profile in CM patients was different from that observed in malarial ARF. IL-10, IP-10, MCP-1 and TNF- $\alpha$  levels were comparable between CM and MM patients (Figures 4A-D). Canonical correlations between (X) IL-10, IP-10, MCP-1 and TNF- $\alpha$ , and (Y) heme, hemopexin and the CM-specific GCS were therefore also calculated (Table 3). Only one significant canonical variate was found ( $p < 0.0001$ ), within which low heme levels were associated to an increased GCS, and to increased cytokine levels. This was characterized by the negative association of heme, and the positive association of all other factors to this component of relationship. In each set of variable, IP-10 and hemopexin had the highest coefficients, suggesting their major effect in the CM-related network.

## DISCUSSION

Hemolytic conditions are responsible for the release of heme into the circulation. Despite its critical role in many biological processes, free heme could be involved in the induction of pathogenic responses [7]. Therefore, to assess the role of heme in human malaria, we measured the plasma levels of total heme and hemopexin in *P. falciparum*-

---

infected patients. We found that the highest total heme levels were correlated inversely with hemopexin levels in both CM and ARF patients. Thus, our results provide evidence that the severity of *P. falciparum* malaria is associated with an increase in total heme levels in plasma. Accordingly, heme levels were particularly high in fatal cases with an increasing number of affected organs, but not in cases of hepatopathy. To our knowledge, this study is the first to emphasize the deleterious effects of heme in *P. falciparum* infection.

Hemopexin is the most important element of the heme-detoxifying system, because of its high binding affinity that allows it to ferry heme from the bloodstream to scavenger cells [17]. The degradation of the heme–hemopexin complex is likely to result in a decrease in hemopexin levels during hemolysis, thus contributing to the systemic accumulation of heme [18]. We have shown previously that intraperitoneal injections of heme in mice resulted in a decrease in hemopexin levels [211]. We therefore propose that hemopexin levels reflect free heme levels. Interestingly, here is a negative correlation between total heme and hemopexin levels, suggesting that during infection mainly unbound heme is found in plasma. Hemopexin is a positive acute phase protein, and previous studies have reported an increase in the circulating levels of hemopexin and its precursor during sepsis or in MM [23, 216]. However, decreased levels of hemopexin during severe sepsis were also associated with a low survival prognosis, highlighting its importance in the scavenging of free heme [53, 216]. Our observation that heme and hemopexin levels remained unchanged in the severe sepsis and encephalitis groups strongly supports the association of systemic accumulation of heme in malarial infection with the lysis of infected RBCs, but not with inflammatory conditions. This assumption is reinforced by the significant correlation of heme with HRP-2 ( $R = 0.475$ ;  $p < 0.001$ ), as HRP-2 levels are a good indicator of the total body

---

parasite biomass [206]. Even though total heme levels were not correlated to hemoglobin levels ( $R = 0.015$ ;  $p = 0.839$ ), we cannot exclude the contribution of healthy RBCs in the systemic release of heme.

Our findings reveal a role of heme in the pathophysiology of human CM, which was confirmed previously by elegant studies done in mice [10]. In India, CM is often associated with MOD, including malarial ARF [217]. In this study, 31% of SM patients had more than two damaged organs, and ARF was the second commonest cause of SM (Fig. S1). Despite the increasing incidence of malarial ARF in India, little is known about its pathophysiology [209]. ARF is a frequent complication in disorders associated with high levels of heme [24, 53, 218]. To our knowledge, we are the first to report increased heme levels during malarial ARF, pointing to a possible toxic effect of heme on the kidneys during *P. falciparum* infections. During CM and malarial ARF, it is likely that the heme-mediated pathophysiology involves mechanical, as well as immunological, processes [24, 27, 29]. Moreover, as a catalyzer of ROS generation, heme decreases the intracellular levels of reduced glutathione, which is associated with the modulation of the immune response, through the polarization of T-lymphocytes and macrophages towards T-helper 2 and M2 profiles [38, 211].

Cumulating evidence in our study strongly indicates an immunological network, involving heme with cytokines, such as IL-10, IP-10, MCP-1, and TNF- $\alpha$ , in the pathophysiology of CM and malarial ARF. As suggested previously, IP-10 levels seemed to be regulated by hemopexin [219], but cytokine levels were not associated with the outcome of CM [108, 109]. In fact, we have shown that IP-10 alone was not a predictor of CM in the Odishi population (F. Herbert, N. Tchitchek, D. Bansal, J. Jacques, S. Pathak, C. Bécavin, C. Fesel, E. Dalko, P.-A. Cazenave, C. Preda, B.

---

Ravindran, S. Sharma, B. Das and S. Pied, submitted for publication). In this context and as suggested by canonical correlation analyses, IP-10 might be a major component of the complex immune network involving heme and hemopexin in the pathophysiology of CM. Despite an immune network involving a positive correlation between heme and creatinine levels, malarial ARF was associated with increased levels of MCP-1, indicating different immune-mediated mechanisms in the pathophysiology of these two malaria-driven complications. Heme- and hemoglobin-induced renal damage is further associated with the production of high levels of ROS, and hence with an overexpression of HO-1, which inhibits MCP-1 expression through a negative loop [218, 220]. In our canonical analysis, this may correspond to the second canonical variate where low levels for MCP-1 and TNF- $\alpha$  were related to high levels of heme. In addition, increased levels of IL-10 were associated with increased levels of creatinine, which is in agreement with the protective effect of IL-10 during ARF in mice models [221]. In contrast with this observation, the first canonical variate related overall high cytokine/chemokine levels rather with high hemopexin, low heme, and low creatinine levels highlighting the complexity of the networks involved in the pathophysiology of ARF.

Although the pathophysiology of CM and malarial ARF could, in part, be driven by genetic and environmental factors, our results suggest that IL-10, IP-10, MCP-1 and TNF- $\alpha$  may, along with heme and hemopexin, contribute to the development of these conditions via different regulatory mechanisms. We also suggest that plasma heme and hemopexin levels are good indicators for differentiating severe outcomes of *P. falciparum* malaria. This way, our study supports the deleterious role of heme during severe malaria. To gain a better insight into the complex mechanisms underlying these regulations, we will investigate, in further studies, the polymorphism in the promoter of

---

the HO-1 gene, *HMOX1*, that influences its expression and circulating levels of heme [222, 223].

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research, the Associated International Laboratory Systems (LIA; CNRS) Immunology and Genetics of Infectious Diseases (SIGID), the Department of Biotechnology from the Ministry of Science and Technology of India (DBT), and intramural funds from Tata Institute of Fundamental Research (TIFR). The project was supported by the Raman–Charpak award from IFCPAR and by the AAP n10 award from the College Doctoral Lille Nord de France.

We thank Dr. Devendra Bansal for his help in assaying cytokine levels.



**Table 1. Baseline characteristics.**

	No.	Male (%)	Age (y) <sup>†</sup>	Hb (g/dL) <sup>†</sup>	HRP-2 (AU) <sup>†</sup>
MM	57	78.9	29 (22-39)	10.8 (9.6-12.6)	9.8 (1.1-20.6)
Severe malaria	180	82.2	29 (22-45)	10.0 (8.0-11.4)	22.8 (8.0-40.8) <sup>***</sup>
CM <sup>a</sup>	48	81.3	28 (20-40)	10.2 (8.7-11.9)	22.5 (4.3-40.7) <sup>#</sup>
ARF <sup>b</sup>	23	91.3	30 (25-45)	9.6 (8.0-10.2)	28.1 (10.9-42.6)
Hepatopathy <sup>c</sup>	12	75.0	29 (26-40)	10.3 (9.2-11.0)	13.3 (1.6-25.0)
Systolic shock <sup>d</sup>	4	50.0	40 (40-46)	12.7 (7.4-13.6)	23.7 (20.2-37.4)
Other SNCM <sup>‡</sup>	37	73.0	28 (22-40)	9.5 (6.4-12.0)	14.5 (5.1-29.3)
MOD	14	85.7	27 (22-53)	10.2 (8.7-11.6)	20.7 (3.0-34.6)
CM-MOD	42	90.5	35 (23-47)	9.6 (8.0-11.4)	34.1 (20.9-54.2) <sup>###</sup>
Total	237	76.6	29 (22-41)	10.0 (8.3-12.0)	20.5 (5.6-34.5)

<sup>\*\*\*</sup> Mild malaria (MM) and severe malaria cases were compared using the Mann-Whitney test.  $p \leq 0.001$ .

<sup>#</sup> and <sup>###</sup> Mild malaria cases were compared to patients affected with cerebral malaria (CM), acute renal failure (ARF), hepatopathy, systolic shock, other severe non-cerebral malaria case (SNCM), multiple organ dysfunction (MOD), CM with MOD (CM-MOD) using the Kruskal–Wallis test with a Dunn’s post-test. <sup>#</sup> $p \leq 0.05$ ; <sup>###</sup> $p \leq 0.001$ .

<sup>†</sup> Median (interquartile range)

<sup>‡</sup> Jaundice, severe anemia, acidosis, DIC

<sup>a</sup> CM was diagnosed as a GCS  $\leq 10$

<sup>b</sup> ARF was diagnosed as plasma creatinine levels  $> 3$  mg/dL

<sup>c</sup> Hepatopathy was diagnosed as ALT and AST  $> 3$  times normal, or as AST  $> 2$  times normal and bilirubin levels  $> 6$  mg/dL

<sup>d</sup> Systolic shock was diagnosed as systolic blood pressure  $< 80$  mmHg

	Creat (mg/dL) <sup>†</sup>	ALT (IU/L) <sup>†</sup>	GCS <sup>†</sup>
MM	1.3 (1.0-1.5)	39.0 (28.7-51.0)	15
Severe malaria	2.2 (1.2-5.4) <sup>***</sup>	58.0 (39.0-85.0) <sup>***</sup>	11 <sup>***</sup>
CM	1.3 (1.1-1.7)	46.0 (33.3-60.8)	9 <sup>###</sup>
ARF	7.0 (5.8-9.1) <sup>###</sup>	41.0 (33.3-55.5)	15
Hepatopathy	1.0 (0.8-1.2)	131.5 (99.8-189.0) <sup>###</sup>	15
Systolic shock	2.3 (1.3-2.7)	60.5 (44.3-70.8)	15
Other SNCM <sup>‡</sup>	1.2 (0.9-1.6)	53.0 (33.0-72.0)	15
MOD	4.3 (3.0-8.6) <sup>###</sup>	136.0 (93.3-160.0) <sup>###</sup>	15
CM-MOD	5.4 (3.8-8.1) <sup>###</sup>	68.0 (50.5-104.5) <sup>###</sup>	9 <sup>###</sup>
Total	1.6 (1.1-4.2)	52.0 (36.0-79.5)	15

**Table 2. Canonical correlation scores of cytokines, total heme, hemopexin, and creatinine levels obtained by a canonical correlation analysis.**

		Canonical variates		
			1	2
Sets of variable	X	IL-10	0.0308	0.0814
		TNF- $\alpha$	0.0071	-0.0103
		IP-10	0.0751	0.0576
		MCP-1	0.0605	-0.1582
Y		Heme	-0.0524	0.0419
		Hemopexin	0.1207	0.1016
		Creatinine	-0.0376	0.2166

Canonical correlation analysis was calculated between two sets of variables: (X) IL-10, IP-10, MCP-1, and TNF- $\alpha$ , and (Y) creatinine, total heme, and hemopexin. Columns 1 and 2 describe the two total canonical variates, with the respective coefficients for the variables in each set.

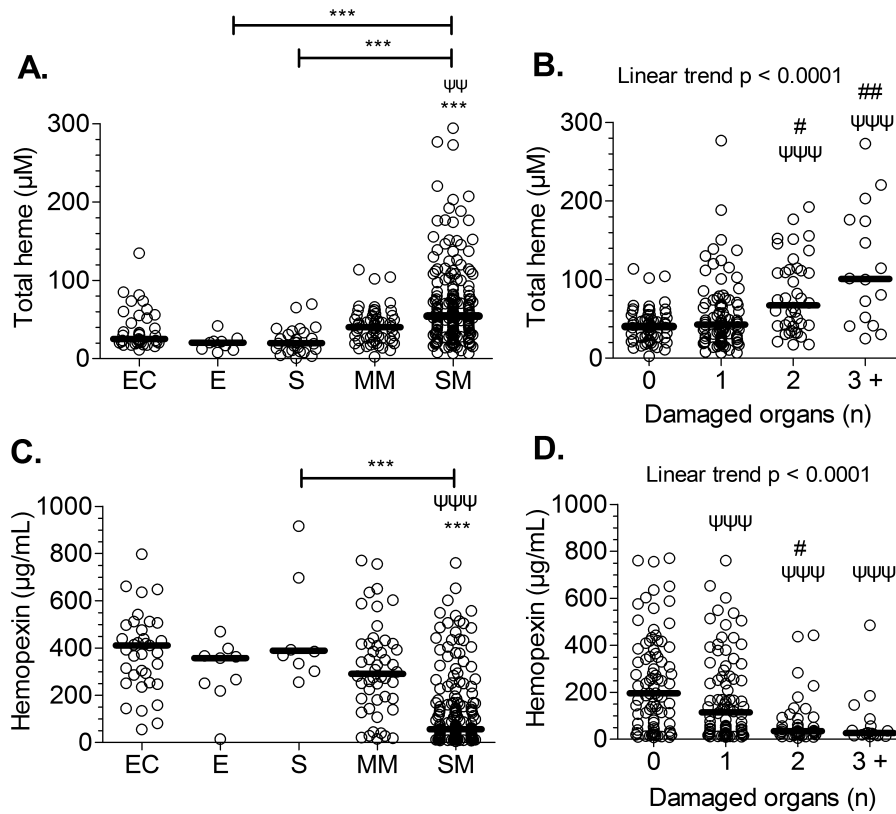
**Table 3. Canonical correlation scores of cytokines, total heme, and hemopexin levels, and the Glasgow coma score obtained by a canonical correlation analysis.**

Sets of variable		Canonical variates	
		1	
X	IL-10	0.0420	
	TNF- $\alpha$	0.0009	
	IP-10	0.0753	
	MCP-1	0.0457	
Y	Heme	-0.0616	
	Hemopexin	0.1225	
	GCS	0.0578	

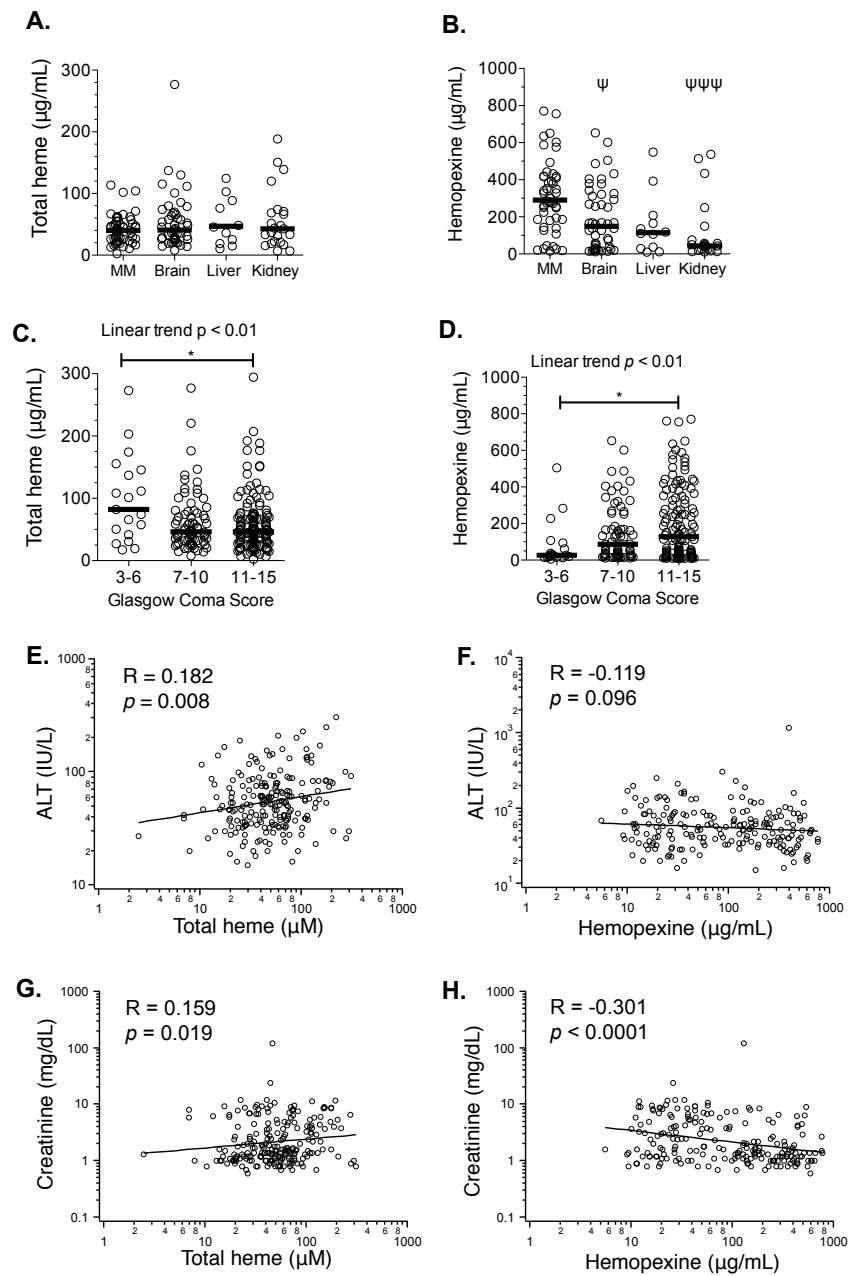
Canonical correlation analysis was calculated between two sets of variables: (X) IL-10, IP-10, MCP-1, and TNF- $\alpha$ , and (Y) the Glasgow coma score (GCS), total heme, and hemopexin. Only one canonical correlation was found significant, with the respective coefficients for the variables as for Table 2.

**Table S1. Correlation between cytokine, heme and hemopexin levels measured in the plasma.**

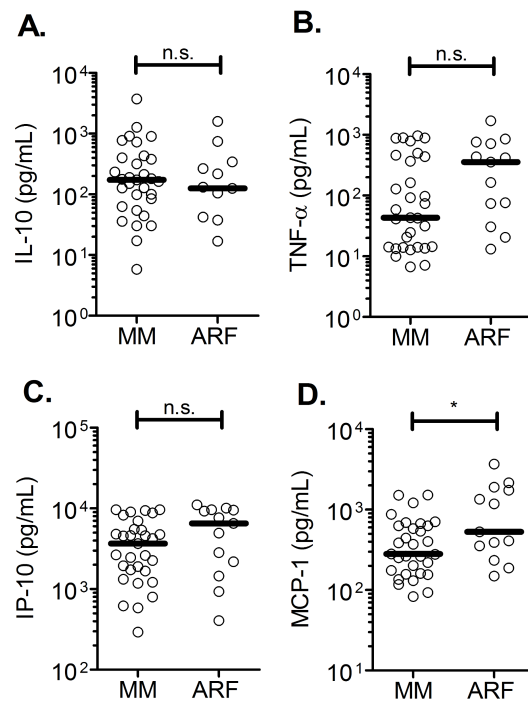
Cytokine	Total heme		Hemopexin	
	R	<i>p</i>	R	<i>p</i>
IL-10	0.3188	< 0.0001	-0.3937	< 0.0001
IL-12p40	0.1481	0.0627	-0.2007	0.0114
IL-12p70	0.1234	0.1210	-0.1557	0.0497
IL-1 $\alpha$	0.1045	0.1889	-0.1903	0.0160
IL-6	0.1539	0.0531	-0.2754	< 0.0001
IFN- $\gamma$	0.1177	0.1392	-0.2054	0.0096
TNF- $\alpha$	0.1868	0.0188	-0.2095	0.0083
IL-7	0.1457	0.0673	-0.1813	0.0220
IP-10	0.3377	< 0.0001	-0.4035	< 0.0001
MCP-1	0.3296	< 0.0001	-0.3425	< 0.0001



**Figure 1. Total heme levels and malaria severity.** Total heme and hemopexin levels were measured in the plasma of *P. falciparum*-infected patients and were compared according to (A, C) the different clinical outcomes – endemic controls (EC), encephalitis (E), severe sepsis (S), mild malaria (MM), severe malarial (SM) patients, – and (B, D) the number of damaged organ during malaria. The dark lines indicate the median. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test with a Dunn’s post-test, or with a linear trend analysis in B.  $\psi$  indicates differences with the MM or with the group of patients having 0 damaged organ, # indicates differences with the group of patients having 1 damaged organ, and \* indicates differences between selected groups. \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$

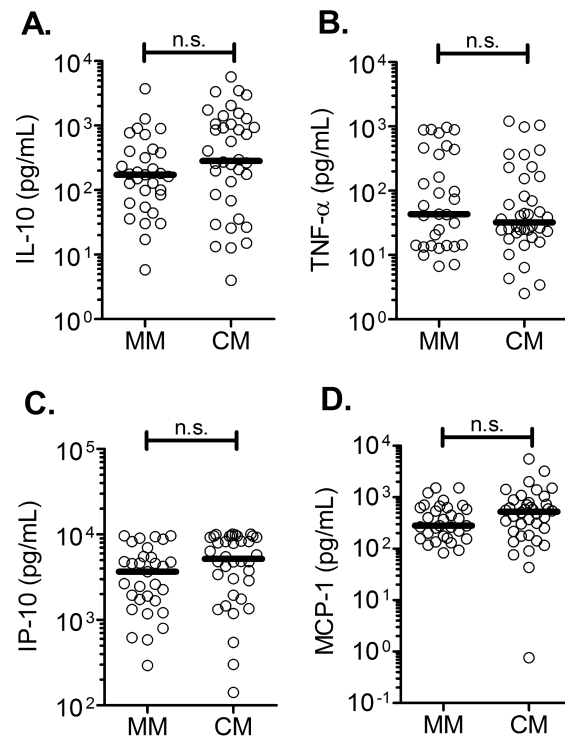


**Figure 2. Correlation between clinical features and biological parameters with total heme and hemopexin levels.** (A-B) Total heme and hemopexin levels that were measured in the plasma of *P. falciparum* patients were compared between mild malaria (MM) cases and individuals having only a single complication: cerebral malarial (Brain), hepatopathy (Liver) and malarial acute renal failure (Kidney). (C-D) Total heme levels and hemopexin levels were compared according to the Glasgow Coma Score, and were also correlated using a Spearman rank's correlation test to (E-F) alanine transaminase levels (ALT) and (G-H) creatinine levels of *P. falciparum*-infected patients. The dark lines indicate the median. A-D were analyzed using the Kruskal-Wallis test with a Dunn's post-test. In B  $\psi$  indicates differences with the MM, and in A-D \* indicates differences between selected groups.  $*p \leq 0.05$ ;  $***p \leq 0.001$

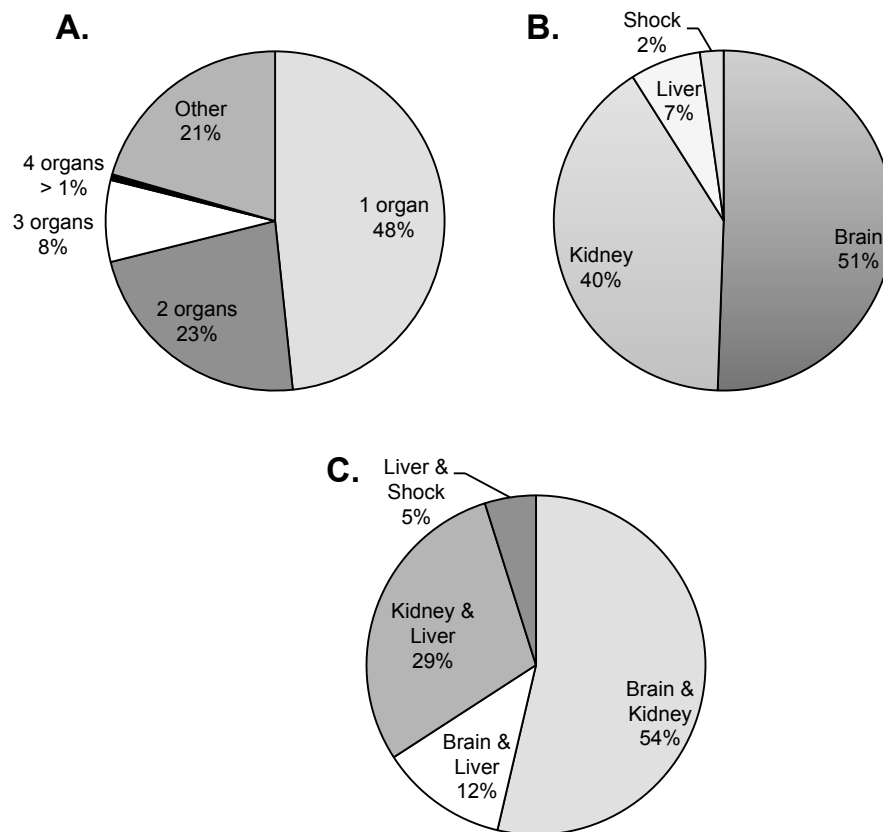


**Figure 3. Cytokine levels during MM and ARF.** (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IP-10 and (D) MCP-1 levels were measured in the plasma of *P. falciparum*-infected patients having mild malaria (MM) or only malarial acute renal failure (ARF). The dark lines indicate the median. Data were analyzed using the Mann-Whitney test. \* $p \leq 0.05$ ; n.s., non significant difference.





**Figure 4. Cytokine levels during MM and CM.** (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IP-10 and (D) MCP-1 levels were measured in the plasma of mild malaria (MM) and cerebral malaria (CM) patients. The dark lines indicate the median. Data were analyzed using the Mann-Whitney test.  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$ ; *n.s.*, non significant difference.



**Figure S1. Distribution of severe malaria cases.** (A) Percentage of individuals according to the number of affected organs within all severe malaria cases. Other cases refer to patients having severe malaria without the involvement of at least one organ, such as severe anemia, jaundice and metabolic acidosis. (B) Distribution of the type of damaged organ, within the group of patients having only one damaged organ, and (C) having two damaged organs.

### 5.2.3. Concentration en activité de HO-1

HO-1 est l'enzyme responsable de la dégradation de l'hème [10]. Malgré le fait que HO-1 possède une localisation strictement intracellulaire, plusieurs études ont rapporté une augmentation des niveaux plasmatiques de HO-1 au cours des infections par *Plasmodium*, et suggèrent une augmentation des niveaux circulants associés à la sévérité du tableau clinique [3, 223]. Ainsi, nous avons dosés les niveaux de HO-1 dans les plasmas de contrôles endémiques, et d'individus atteints de sepsis sévère, d'encéphalite virale ou infectés par *P. falciparum*. D'après nos résultats, la concentration plasmatique en HO-1 augmente plus de 10 fois lors d'une infection par *P. falciparum* et de sepsis sévère, en comparaison aux contrôles endémiques. Cependant, aucune différence n'est notable entre les cas d'encéphalites virales et les contrôles endémiques. Ainsi, nous suggérons que la libération systémique de HO-1 provienne de l'inflammation systémique qui est associée à l'infection par *Plasmodium* et au sepsis sévère (Figure II.6A). Cependant, il est à noter que les niveaux de HO-1 sont significativement plus élevés chez les individus décédés ou atteints de neuropaludisme, en comparaison aux accès simples, ou aux autres cas de paludisme grave (Figures II.6B, 6C). Les cas de paludisme grave présentant un neuropaludisme associés ou non à plusieurs organes, ont été séparés des autres cas de paludisme grave, appelés non neuropaludisme. De cette façon, nous cherchons à comprendre des mécanismes physiopathologiques qui seraient propres au neuropaludisme.

D'après nos résultats présentés dans l'Article 2, la concentration d'hémopexine plasmatique est négativement corrélée avec les niveaux d'hème total, et nous suggérons que la mesure de ces deux facteurs biologiques permette d'apprécier les niveaux d'hème libre circulants. Tel que nous l'avons décrit précédemment,

l'HO-1 est l'enzyme responsable du catabolisme de l'hème, et dont l'expression est également induite par l'hème. Afin de mieux comprendre les réseaux impliquant ces 3 facteurs biologiques, nous avons évalué les corrélations possibles entre les concentrations plasmatiques de HO-1 avec les niveaux d'hème total et d'hémopexine. D'après le Tableau II.3, les concentrations plasmatiques d'hème et d'hémopexine étaient significativement corrélées aux niveaux de HO-1 au cours du paludisme, ainsi que pour les patients atteints de neuropaludisme. Cependant, alors que les niveaux d'hème total étaient positivement corrélés aux niveaux d'HO-1, les niveaux d'hémopexine étaient négativement corrélés aux niveaux de HO-1.

De façon intéressante, ces paramètres biologiques n'étaient pas corrélés entre eux dans les cas d'accès simple. Nous proposons que les niveaux d'hème systémiques soient trop faibles pour induire une augmentation de l'expression de *HMOX1* dans les cas d'accès simple, et/ou, qu'une cytolyse importante soit associée au neuropaludisme et contribue à la libération systémique de HO-1.

Table 4. Corrélations entre les niveaux plasmatiques de HO-1, d'hème total et d'hémopexine en fonction du tableau clinique de l'infection.

	Hème total		Hémopexine	
	R	p	R	p
Accès simples	0.260	0.052	-0.131	0.356
Neuropaludisme	0.204	0.049	-0.406	< 0.001
Non-Neuropaludisme	0.067	0.523	-0.302	0.005
Tous	0.159	0.012	-0.306	< 0.001

R : coefficient de corrélation.

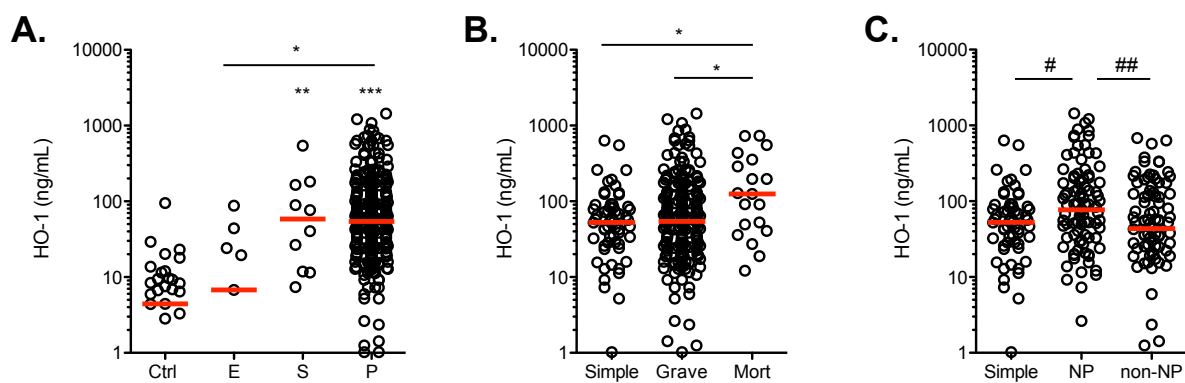


Figure II.6. Les niveaux plasmatiques de HO-1 augmentent dans les cas de neuropaludisme.

Concentrations de HO-1 mesurées dans les plasmas de contrôles endémiques (Ctrl), d'individus atteints d'encéphalite (E), de sepsis sévères (S) ou infectés par *P. falciparum* (P) et développant un accès simple (Simple), un paludisme grave (Grave), ou décédés (Mort). Les cas de paludisme grave ont été répartis en neuropaludisme (NP) et non-neuropaludisme (non-NP). Les médianes sont représentées en rouge. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  avec l'échantillon contrôle (Ctrl) d'après une analyse par Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. # $p < 0,05$  et ## $p < 0,01$  entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par Mann-Whitney.

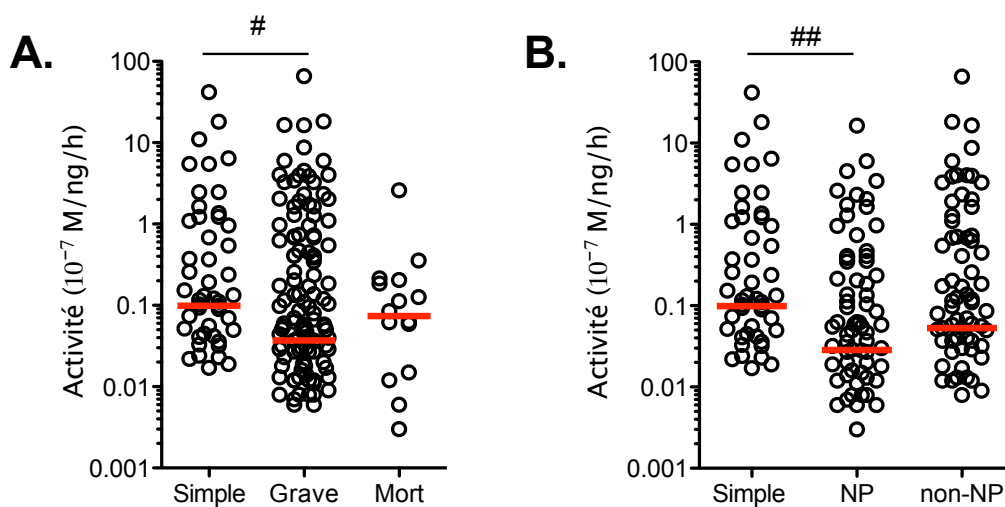


Figure II.7. L'activité enzymatique de HO-1 est plus faible dans les cas de neuropaludisme.

(A) Activité enzymatique de HO-1 mesurée à partir de sonicats de cellules de sang périphérique de patients infectés par *P. falciparum* et développant un accès simple (Simple), un paludisme grave (Grave), ou décédés (Mort). (B) Les cas de paludisme grave ont été répartis en neuropaludisme (NP) et non-neuropaludisme (non-NP). Les médianes sont représentées en rouge. # $p < 0,05$  et ## $p < 0,01$  entre les échantillons sélectionnés, d'après une analyse par Mann-Whitney.

---

L'activité enzymatique de HO-1 a été calculée à partir de la quantité de bilirubine formée par un sonicat de cellules de sang périphérique, en fonction de la quantité de HO-1 disponible et par unité de temps. D'après nos résultats, l'activité enzymatique de HO-1 est plus faible chez les patients atteints de paludisme grave en comparaison aux accès simples, et parmi les cas graves, uniquement chez les patients atteints de neuropaludisme (Figures II.7A, 7B).

#### 5.2.4. Polymorphisme de *HMOX1*

La relation entre polymorphisme de microsatellites du promoteur de *HMOX1* et phénotype de la maladie suite à une infection par *Plasmodium* a été étudiée au Brésil, en Gambie et au Myanmar [3, 222, 223]. Ainsi, dans le but d'évaluer la susceptibilité génétique associée au développement du paludisme grave, nous avons analysé le nombre de répétitions (GT) présentes dans le promoteur de *HMOX1* chez 85 patients de notre cohorte, dont 20 atteints d'accès simple, et 65 atteints de paludisme grave, toutes gravités confondues.

Nous avons analysé la distribution du nombre de répétitions (GT), et d'après nos résultats, le nombre de répétitions (GT) est compris entre 16 et 38 pour nos patients. Similairement à ce qui a été rapporté dans la population du Myanmar, nous constatons 3 pics de fréquences à 23 (28,2%), 30 (31,2%) et 36 (5,3%) répétitions (GT) (Figure II.8A) [222]. Les longueurs des fragments ont par la suite été classées en deux allèles, court (C ;  $n < 27$ ) et long (L ;  $n \geq 27$ ). Chez les patients atteints d'accès simple, 20,0% des allèles sont de 23 répétitions (GT), et 20% de 30 répétitions (GT) au niveau du promoteur de *HMOX1*, contre 36,6% et 30,8% chez les patients faisant un accès simple (Figures II.8B, II.8C). Bien qu'il n'y ait pas de différence dans les fréquences de répartition des allèles C et L entre les 2 groupes de patients, le génotype C/C est significativement

---

plus représenté parmi les patients développant un accès simple, que ceux développant un paludisme grave (Odd ratio = 1,91 ; intervalle de confiance à 95% = 1,02-3,57 ; test  $X^2$ ) (Figures II.9A, II.9B). Enfin, il n'y a pas de différence quant aux niveaux d'hème plasmatique en fonction du génotype des patients ( $p = 0,86$  ; ANOVA) (Figure II.10A). Cependant, pour les génotypes C/C, les niveaux d'hème total sont significativement plus faibles chez les patients atteints d'accès simple, en comparaison aux cas de paludisme grave ( $p = 0,019$  ; ANOVA) (Figure II.10B). Ces résultats suggèrent que le génotype C/C pourrait contribuer aux faibles niveaux d'hème mesurés dans le plasma des individus atteints d'accès simple, mais qu'il ne constitue pas à lui seul une protection vis à vis des formes graves de paludisme.



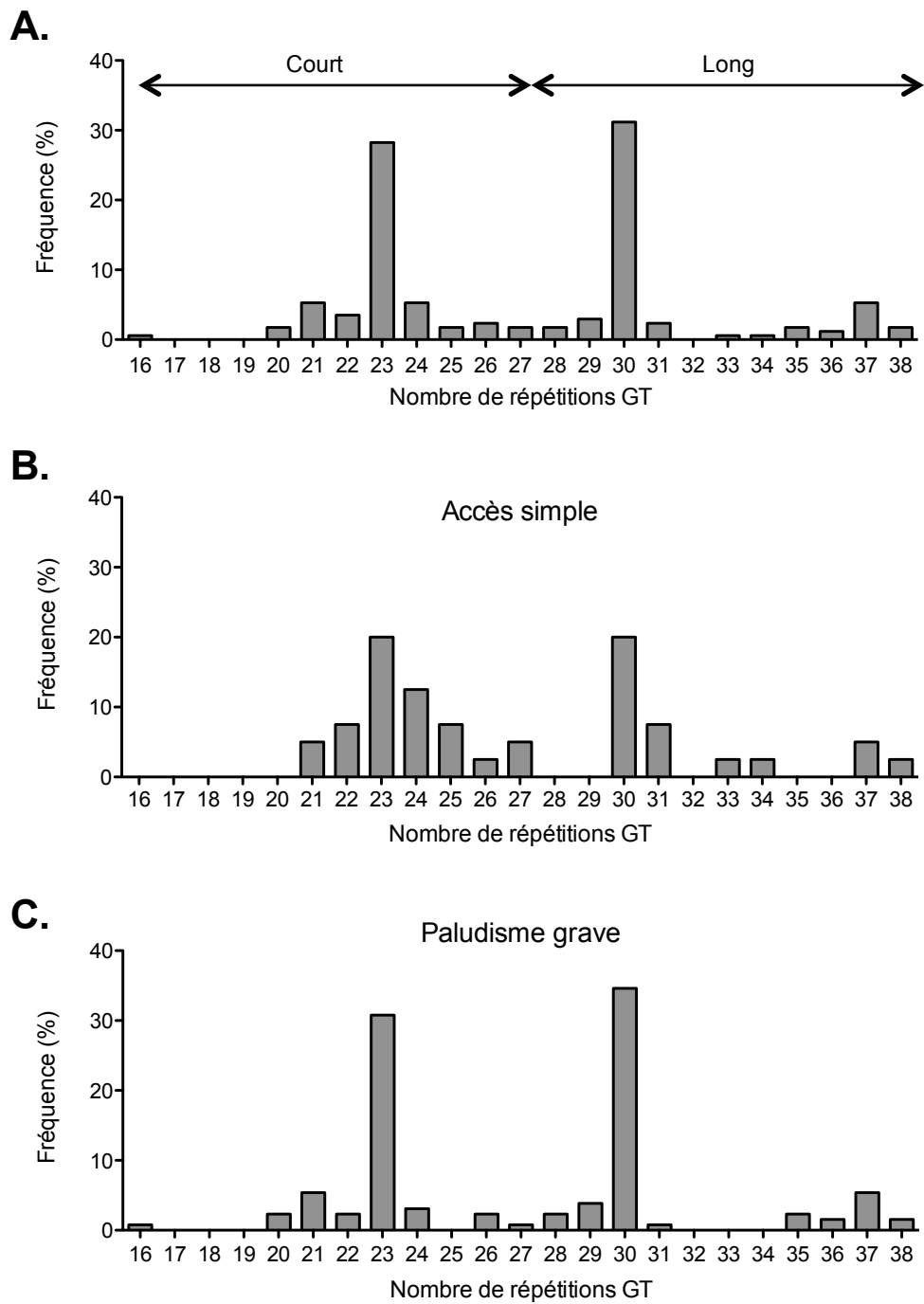


Figure II.8. Fréquences du nombre de répétitions (GT) dans le promoteur de *HMOX1*.

Parmi (A) l'ensemble des individus infectés par *P. falciparum*, les individus atteints (B) d'accès simple et (C) de paludisme grave.

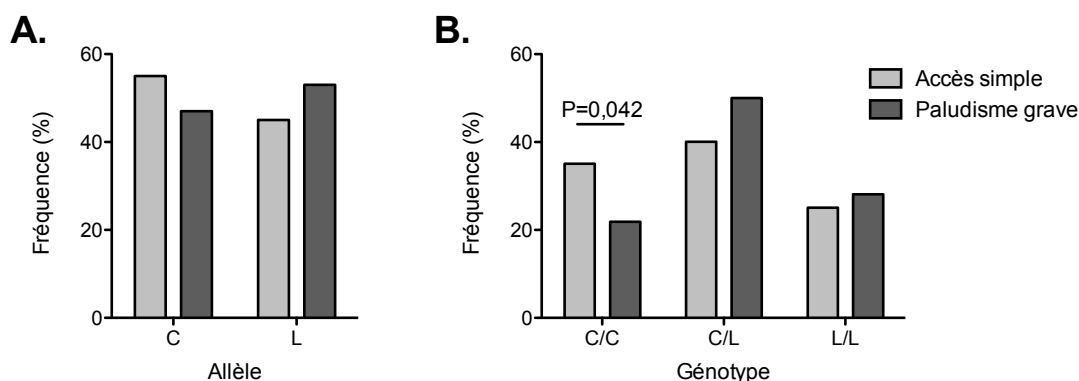


Figure II.9. Profils génétiques en fonction de la sévérité du paludisme.

(A) Fréquence de distribution des allèles C (court,  $n < 27$ ) et L (long,  $n \geq 27$ ) de *HMOX1* chez les patients développant un accès simple, ou atteints de paludisme grave.  
 (B) Distribution des génotypes.

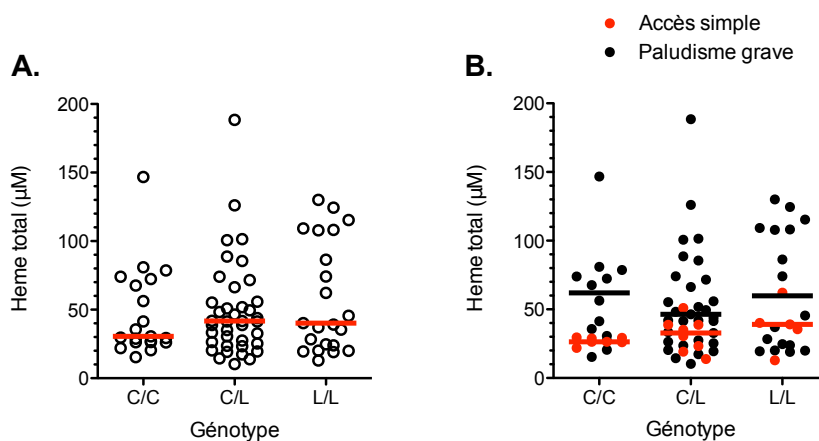


Figure II.10. Niveaux d'hème en fonction du génotype de *HMOX1*.

Les concentrations en hème plasmatique ont été comparées en fonction du génotype des patients, (A) tous les cas confondus, ou (B) en fonction de la gravité de l'atteinte (accès simple, et paludisme grave). Les médianes sont représentées en rouge pour (A) l'ensemble des patients, ou pour (B) les patients atteints d'accès simple, et en noir pour les cas de paludisme grave.

---

### 5.3. EPO et sévérité du paludisme (Article 3)

Alors qu'un rôle bénéfique de l'EPO a été proposé dans le traitement des maladies neurodégénératives, plusieurs équipes se sont intéressées à corrélérer les niveaux systémiques d'EPO avec la sévérité du paludisme. Néanmoins, les études réalisées en Afrique suggèrent des effets contradictoires quant au rôle bénéfique, ou délétère de l'EPO dans la physiopathologie du neuropaludisme [224-226]. Pour cette raison, nous avons dosé les niveaux d'EPO dans le plasma des patients des cohortes étudiées pour les corrélérer avec le phénotype du paludisme en Inde. Nous montrons une association entre les niveaux élevés en EPO et les atteintes cérébrales. Ces résultats suggèrent donc un rôle délétère de l'EPO au cours de l'infection par *Plasmodium* en Inde. Enfin, nous avons corrélé les niveaux d'EPO avec la concentration plasmatique en hème total dans le but de déterminer une association entre ces deux paramètres biologiques.

Ma contribution pour la réalisation de ce papier a été la vérification de la classification des patients, la réalisation de dosages (EPO, hème total, hémopexine, HRP-2), l'analyse des résultats, et la rédaction de l'article.

Les références citées dans l'Article 3 ont été incluses à la fin du manuscrit.

---

**Erythropoietin levels increase during cerebral malaria and correlate with heme, IL-10 and TNF-alpha in India**

Running title: Erythropoietin and cerebral malaria in India

Esther Dalko,<sup>1,2</sup> Bidyut Das,<sup>3</sup> Pierre-André Cazenave,<sup>4</sup> Balachandran Ravindran,<sup>5</sup> Shobhona Sharma,<sup>6</sup> Sylviane Pied<sup>1</sup>

1. Centre for Infection and Immunity of Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille 59019, France

2. Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal (QC) H2X 1Y4, Canada

3. SCB Medical College, Cuttack, Odisha 753007, India

4. Immunologie - Immunopathologie – Immunothérapie, UPMC/CNRS UMR 7211, Paris 75651, France

5. Institute of Life Sciences, Bhubaneswar, Odisha, India

6. Department of Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, Maharashtra 400005, India

Corresponding author: Dr Sylviane Pied, CIIL, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex. [sylviane.pied@pasteur-lille.fr](mailto:sylviane.pied@pasteur-lille.fr)

---

**ABSTRACT**

Cerebral malaria (CM) caused by *Plasmodium falciparum* parasites often leads to the death of infected patients or to persisting neurological sequelae despite anti-parasitic treatments. Erythropoietin (EPO) was recently suggested as a potential adjunctive treatment for CM as it was shown to have neuroprotective and anti-inflammatory properties in rodent CM. However results from patients from Sub-Saharan countries and infected with *P. falciparum* show diverging results. We measured EPO levels in the plasma of mild malaria (MM), CM, and severe non-CM (NCM) patients from the state of Odisha, India, infected with *P. falciparum*. EPO levels were also correlated by a Spearman rank's correlation analysis with biological parameters, including parasite biomass, heme, interleukin (IL)-10 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  plasma concentrations. We found a significant increase in EPO levels within the CM group, but not in patients with MM or NCM. In addition, during CM, EPO correlated positively with levels of total heme, TNF- $\alpha$  and IL-10, suggesting it to be associated with pro-inflammatory effects during CM. In India, EPO levels increased with the severity, and correlated with pro-inflammatory responses. The differences in EPO levels reported for patients from India when compared to African patients underscore a distinct malaria-associated pathogenesis and the need for optimization of adjunctive treatments according to the population considered.

---

## INTRODUCTION

Malaria eradication is a worldwide public health priority. Despite tremendous efforts, children and adults still die from this plague every year due to severe disease manifestations. Cerebral malaria (CM) is the deadliest complication, and as reported by the World Health Organization (WHO) it is most of the time caused by *Plasmodium falciparum* infections [66]. The pathophysiology of CM is complex and far from being completely understood. However, it involves brain inflammation triggered by the sequestration of parasitized erythrocytes, cell death and infiltrating immune cells in the central nervous system, as well as systemic production of pro-inflammatory cytokines [77]. In 18% of the cases, patients die despite heaving anti-parasitic treatment, and surviving patients often suffer from neurological sequelae [77, 227]. Thus, there is an important need in finding appropriate adjunctive treatments against CM.

In this perspective, administration of erythropoietin (EPO) has recently raised interest in the treatment of neurodegenerative diseases, including CM. EPO, first described as a hematopoietic hormone, is principally produced by peritubular capillary endothelial cells of the kidney in response to hypoxia. Upon binding to its homodimeric receptor, EPO-R, EPO stimulates the expression of transcription factors such as Bcl-X<sub>L</sub> that further stimulates the maturation of erythroid progenitors [152]. However, other cells, including neurons, glial and endothelial cells also constitutively produce low levels of EPO, which also increase in response to acute hypoxia [228]. Remarkably, brain cells express EPO-R, suggesting a plausible localized impact of this hormone on the central nervous system [229]. EPO may exert extra-hematopoietic functions in the brain, diminishing the production of pro-inflammatory cytokines and preventing neuronal cell death, which appear to limit brain damage and neurological sequelae [230-232].

---

Several studies have suggested that EPO plays a pivotal role in CM by exerting protective effects within the central nervous system. Elevated EPO levels were found in plasma of children with severe *P. falciparum* malaria in Mozambique, including severe malarial anemia and mixed severe malaria, but not within the CM group [225]. Furthermore, high levels of endogenous plasma EPO were associated with reduced risk of developing acute neurological sequelae after CM in Kenya [224]. EPO was also shown to efficiently prevent rodent CM during *P. berghei* ANKA infection of C57BL/6 and CBA/J mice [233-235]. It was likely that the beneficial impact of recombinant human EPO (rhEPO) on CM was concurrent to decreased production of the pro-inflammatory cytokines interferon- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and decreased recruitment of T lymphocytes in the brain [233-235]. These results were the basis for conducting a safety clinical trial in Mali, using 1,500 IU/kg rhEPO as adjunctive treatment during three days after admission of the patients, and combined to quinine for CM [236]. However, a very recent study published by Shabani et al., reported elevated plasma EPO levels in CM cases in children with prolonged coma and increased mortality [226]. The median age was higher in this study, and increased age has been associated with enhanced endogenous EPO levels in response to unaffected hemoglobin levels. In addition, considerable uncertainty still remains regarding the use of rhEPO as a neuroprotective strategy for the treatment of other neurodegenerative disease such as acute stroke. In fact, rhEPO given at the admission of the patients was first associated with smaller lesion size and a better functional recovery of the patients compared to the placebo [237], but a later clinical trial with a higher number of patients has reported deleterious outcomes for the survival of acute stroke patients [238].

In light of these discrepancies and the absence of studies concerning populations with different age and environmental factors, we have investigated EPO levels in groups *P.*

---

*falciparum*-infected patients with mild malaria (MM), severe non-cerebral malaria (NCM), or CM from the state of Odisha, India. In 2010, approximately 85% of the Indian population lived in malaria-endemic areas, representing 27% of malaria cases outside Africa [193]. Unlike Sub-Saharan Africa, mainly adults develop severe malaria in India, with very heterogeneous clinical pictures that are usually not associated with anemia (E. Dalko, B. Das, F. Herbert, C. Fesel, S. Pathak, R. Tripathy, P.-A. Cazenave, B. Ravindran, S. Sharma and S. Pied, submitted for publication). We addressed the relationship between EPO and the clinical severity of malaria by evaluating possible associations between plasmatic concentrations of EPO and *P. falciparum* histidine-rich protein-2 (PfHRP-2) and mortality in *P. falciparum* in infected adults. In addition, we examined the association of EPO levels with the pro- and anti-inflammatory cytokine networks involved in CM pathophysiology.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study site and participants**

The study was conducted at the SCB Medical College, Cuttack, Odisha in India, between 2008 and 2011. Following confirmation of *P. falciparum* infection by nested PCR, patients were categorized into distinct clinical groups; MM patients only developed fever, and severe malaria (SM) patients were defined as those having at least one laboratory or clinical feature of SM reported by the WHO [239]. Further categorization of SM patients into two groups, CM and NCM, was based on distinct clinical features. CM were defined as patients with a Glasgow Come Score (GCS)  $\leq 10$ , and NCM patients were SM patients without cerebral involvement. All severe anemia cases (hemoglobin levels  $< 6\text{g/dL}$ ) were excluded from the study. After diagnosis, all patients received adequate treatment. Endemic controls (EC) of identical ethnicity and



---

coming from a similar geographical background were enrolled from among patients' relatives (n=25), and did not report a history of clinical malaria in the five years preceding our study.

All blood samples were collected after obtaining written consent from participants or, in case of comatose patients, the accompanying relatives. This study was conducted according to the guidelines set out in the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Human Ethics Committee of SCB Medical College, Cuttack and the Institutional Review Board of all three collaborating institutes: (a) the Institute of Life Sciences, Bhubaneswar, India (b) the Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India and (c) Institut Pasteur de Lille, Lille, France. The National Health Office Ethics committee in India approved the study design.

#### **Quantification of plasmatic levels of *P. falciparum* histidine rich protein-2**

PfHRP-2 levels were measured in plasma by ELISA, and as described previously [204]. Briefly, an anti-*P. falciparum* HRP-2 IgM (MPFM-55A; Santa Cruz Biotechnology) was used as the capture antibody; an anti-*P. falciparum* HRP-2 IgG1 was used as a detection antibody (MPFG-55; Santa Cruz Biotechnology), and an HRP-coupled monoclonal anti-IgG1 antibody (SB77e; Abcam) was used as the secondary antibody for detection. A standard curve was added in duplicate to each plate, and it was obtained through serial dilutions of a serum sample from a previously described cohort with known parasitemia [90]. Samples out of the range of detection were more or less diluted. The lower limit of detection was 0.5 arbitrary units (AU).

#### **Determination of EPO, total heme and hemopexin levels in plasma**

---

The concentrations of plasmatic EPO and hemopexin were measured by ELISA using respectively the Human EPO Platinum ELISA (eBioscience) and the Human Hemopexin ELISA kit (Abcam), and according to the manufacturer's instructions. Total heme levels were measured in plasma using the QuantiChrom Heme Assay kit (BioAssay Systems). The colorimetric reaction was measured at 405 nm.

### **Assay of cytokines**

TNF- $\alpha$  and IL-10 levels were measured in plasma using the MILLIPLEX MAP multiplex assay kit (Milipore), as described previously (E. Dalko, B. Das, F. Herbert, C. Fesl, S. Pathak, R. Tripathy, P.-A. Cazenave, B. Ravindran, S. Sharma and S. Pied, submitted for publication).

### **Statistical analysis**

Statistical significance was determined by the non-parametric Kruskal–Wallis test for pairwise comparisons, or the Mann–Whitney test for multiple comparisons, and by using GraphPad Prism Software (version 5). Spearman rank correlation analyses and canonical correlations were performed using IgorPro software (WaveMetrics). A  $p < 0.05$  was considered as significant.

## **RESULTS**

### **Baseline characteristics**

A total of 148 patients were included in this study. The strong male bias is in agreement with studies previously reported in India [108, 214]. There were no differences in hemoglobin levels between MM, NCM and CM groups (Table 1). HRP-2 levels were

---

significantly increased in the plasma of CM patients, but not NCM, compared to MM patients (Table 1).

### **EPO levels increase during CM**

To investigate if EPO levels were associated with a “protective phenotype” against CM in Odisha, EPO levels were determined in the plasma of *P. falciparum*-infected patients and EC. To eliminate a possible bias resulting from low hemoglobin levels, patients with severe anemia were excluded from the study. Surprisingly, we found that EPO levels were higher in the plasma of SM patients and more specifically during CM (Figure 1A, 1B). In our groups of patients, only those developing neurological outcomes died. Figure 1C shows that the group of CM patients who died ( $n = 14$ ) had a four-fold increase in their plasma levels of EPO compared to CM survivors ( $n = 53$ ).

### **EPO levels correlated with biological parameters**

During blood stage malaria, EPO production by the kidney increases to counteract the loss of red blood cell. Considering that in our malaria groups, hemoglobin levels correlated significantly and negatively with PfHRP-2 plasma levels ( $R = -0.242$ ;  $p < 0.01$ ), we investigated correlations between EPO and hemoglobin, PfHRP-2, total heme and hemopexin plasma levels to further characterize the conditions leading to enhanced EPO levels. When considering all *P. falciparum*-infected patients, EPO correlated significantly with hemoglobin and PfHRP-2 plasma levels, with a negative and a positive factor, respectively. However, EPO plasma levels correlated with hemoglobin in CM patients, and correlation with PfHRP-2 levels was found for the NCM group (Table 2). We have previously reported that total heme and hemopexin levels are good indicators for free heme levels (E. Dalko, B. Das, F. Herbert, C. Fesel, S. Pathak, R.

---

Tripathy, P.-A. Cazenave, B. Ravindran, S. Sharma and S. Pied, submitted for publication). In our cohort of *P. falciparum*-infected and CM patients, hemopexin and total heme correlated inversely with EPO levels (Table 2).

Given our findings on the heme/hemopexin balance that influences cytokine profiles during severe malaria (E. Dalko, B. Das, F. Herbert, C. Fesel, S. Pathak, R. Tripathy, P.-A. Cazenave, B. Ravindran, S. Sharma and S. Pied, submitted for publication), we investigated a possible correlation between EPO, TNF- $\alpha$  and IL-10 plasma levels. These two cytokines have been shown to majorly contribute to the pathophysiology of human CM in India (F. Herbert, N. Tchitchek, D. Bansal, J. Jacques, S. Pathak, C. Bécavin, C. Fesel, E. Dalko, P.-A. Cazenave, C. Preda, B. Ravindran, S. Sharma, B. Das and S. Pied, submitted for publication) [108]. TNF- $\alpha$  and IL-10 were shown to positively correlate to EPO levels during malaria, and specifically in CM cases. However, TNF- $\alpha$  was the only parameter correlating with EPO levels in plasma of NCM patients (Table 1).

## DISCUSSION

Several studies conducted in Africa reported lower EPO levels in patients with CM, while high EPO levels have been linked to a blunted risk of developing neurological sequelae [224, 225]. Due to these findings and its known neuroprotective effects, EPO has been proposed as an adjunctive treatment for neurological disorders [231, 232, 237, 240]. EPO inhibits apoptosis and inflammation in the central nervous system and favors angiogenesis, neurogenesis as well as maturation and proliferation of glial cells [230, 232]. Consequently, the use of EPO as a complement to anti-parasitic treatment during CM has been proposed. Studies conducted in mice are promising and suggest a beneficial impact of EPO injections on the survival of *P. berghei* ANKA-infected mice

---

[233-235]. In the light of divergences reported in the literature on increased or decrease plasma EPO concentrations in human CM, we investigated EPO levels in a population of patients with distinct malaria epidemiology, environmental parameters and genetic background than those described earlier [224-226].

In contrast to what was reported in Kenya and Mozambique [224, 225], we show that plasma EPO concentrations increased with the severity of *P. falciparum* malaria in Odisha, and more specifically in cases of fatal CM. Interestingly, a negative correlation of EPO levels with prolonged coma was recently reported in Uganda [226]. However, it is noteworthy that when analysis was performed with respect to hemoglobin levels, EPO levels were associated with CM mortality and prolonged coma duration only in the group of patients having hemoglobin < 8 g/dL, but not when hemoglobin was  $\geq$  8g/dL [226]. In this context, increased EPO levels can be attributable to anemia and might not be directly related to the pathophysiology of CM. The discrepancies observed between the Sub-Saharan and Indian populations may be inherent to distinct human genetic background, in particular hematological parameters, as well as to environmental differences. Expectedly, our results show a correlation between EPO levels and hemoglobin levels in malaria. In fact, red blood cell destruction and the inhibition of erythropoiesis trigger the production of EPO in response to hypoxia [153]. A fundamental aspect of our study is that most of our patients did not suffer from anemia, and we excluded severe anemia cases to avoid a bias in the analysis. It has become apparent that additional factors released during the blood stage of *Plasmodium*, such as heme, may contribute to increased EPO levels in malaria [211]. Remarkably, we found increased heme levels during CM in the same cohort of infected patients (E. Dalko, B. Das, F. Herbert, C. Fesel, S. Pathak, R. Tripathy, P.-A. Cazenave, B. Ravindran, S.

---

Sharma and S. Pied, submitted for publication). Given our findings, we speculate that the release of these endogenous molecules may upregulate EPO levels.

Exogenous EPO decreased pro-inflammatory responses in the brain of C57BL/6 and CBA/J mice infected with *P. berghei* ANKA [233, 234]. However, in our study the correlation analysis of cytokine levels with EPO did not reveal a clear anti-inflammatory response associated with high EPO levels. In fact, EPO correlated positively with TNF- $\alpha$  and IL-10, which are cytokines that were previously reported to increase during CM (F. Herbert, N. Tchitchek, D. Bansal, J. Jacques, S. Pathak, C. Bécavin, C. Fesel, E. Dalko, P.-A. Cazenave, C. Preda, B. Ravindran, S. Sharma, B. Das and S. Pied, submitted for publication) [108]. While IL-10 is likely to be protective against CM, TNF- $\alpha$  was shown to be an important mediator in the induction of rodent CM [241-243]. Rodent models are essential for understanding the pathophysiology of malaria but they are insufficient as proof of principle for the development of human therapeutic targets. Our analysis demonstrates that, in contrast to what has been reported for Africa, EPO levels increased in CM cases from Odisha. EPO is likely to distinctly affect the pathogenesis of CM in patients from Odisha compared to Sub-Saharan populations. As suggested earlier, age may also influence the pathophysiology of CM, and consequently the role of EPO in the outcome of the disease [226]. These observations underscore important differences in malaria-associated pathogenesis between Sub-Saharan African and South Asian populations and the need to better evaluate malaria parameters in different geographical and epidemiological contexts for the optimization of treatments.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

---

This work was supported by the Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research (IFCPAR), the Associated International Laboratory Systems Immunology and Genetics of Infectious Diseases (SIGID), the Department of Biotechnology from the Ministry of Science and Technology of India (DBT), and intramural funds from Tata Institute of Fundamental Research. The project was supported by the Raman–Charpak award from the IFCPAR and by the AAP n10 award from the College Doctoral Lille Nord de France.

We thank Dr. Tatiana Scorza (Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal) for kindly reviewing the manuscript.

**Table 1. Baseline characteristics**

	MM	NCM	CM	All
No.	27	52	69	148
Age (year)	30 (24-35)	33 (23-44)	30 (20-45)	30 (22-41)
% Male	78.3	61.3	70.9	67.5
Hb (g/dL)	10.6 (10.0-12.4)	10.0 (8.0-12.0)	10.0 (8.0-11.0)	10.0 (8.0-11.40)
HRP-2 (AU)	11.9 (1.1-22.5)	22.4 (7.9-38.8)	32.6 (20.9-48.3) <sup>a</sup>	23.6 (9.4-41.0)

<sup>a</sup> MM vs. CM  $p < 0.001$

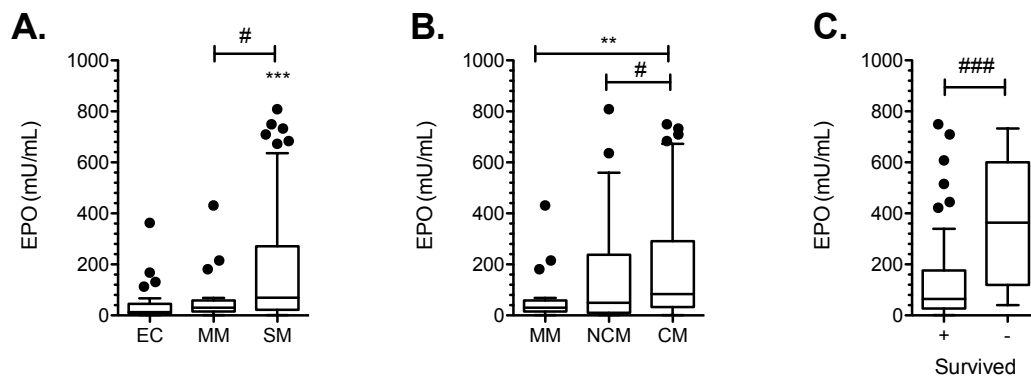
AU: Arbitrary unit



**Table 2. Correlation of erythropoietin plasma levels, with biological parameters and cytokine levels.**

		NCM	CM	All
Hemoglobin	R	-0.24	-0.36	-0.32
	<i>p</i>	0.09	< 0.01	< 0.001
HRP-2	R	0.45	0.21	0.40
	<i>p</i>	< 0.01	0.08	< 0.001
Hemopexin	R	-0.43	-0.38	-0.44
	<i>p</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.001
Total heme	R	0.04	0.31	0.18
	<i>p</i>	0.79	< 0.01	< 0.05
TNF- $\alpha$	R	-0.00	0.39	0.22
	<i>p</i>	0.99	< 0.05	< 0.01
IL-10	R	0.58	0.42	0.48
	<i>p</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

R: correlation coefficient



**Figure 1. Erythropoietin levels increase during cerebral malaria with severity of the infection.** (A) Erythropoietin (EPO) levels were measured in the plasma of endemic controls (EC), mild malaria (MM) and a total of all severe malaria (SM) patients, and (B) in the SM sub-groups of non-cerebral malaria (NCM) and cerebral malaria (CM). (C) EPO levels were compared between CM patients who survived and those who did not. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test with a Dunn's post-test with (\*) indicating differences with the EC group or between selected groups, or using the Mann-Whitney test with (#) indicating differences between selected groups. \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ . # $p \leq 0.05$ ; ## $p \leq 0.01$ ; ### $p \leq 0.001$ .

## 6. Résumé et discussion des résultats du Chapitre 2

L'hème est une protoporphyrine ferrique qui confère l'activité biologique aux hémoprotéines. L'hème total représente l'association de l'hème libre et de l'hème lié aux protéines, mais seul l'hème libre est délétère pour l'hôte. De ce fait, sa dégradation est essentielle. L'hémopexine se lie à l'hème libre avec la plus forte affinité connue, et le complexe hème-hémopexine est par la suite internalisé par les cellules phagocytaires (Figure 4). Ces cellules expriment HO-1, l'enzyme responsable de la dégradation finale de l'hème libre. Alors que l'hémopexine plasmatique diminue lorsque l'hème total augmente, il est vraisemblable que l'hémopexine soit dégradée conjointement avec l'hème, mais par un processus qui reste à être élucidé [18, 136]. Nous suggérons également que les niveaux plasmatiques d'hème total et d'hémopexine analysés ensemble permettent d'apprécier les niveaux d'hème libre.

Dans l'Article 2 nous montrons que les concentrations plasmatiques d'hème total augmentent dans le plasma de patients infectés par *P. falciparum*, mais pas dans les cas de sepsis sévères ou d'encéphalites virales. De ce fait, l'hème proviendrait de la cytolysse liée à l'infection. HRP-2 est une protéine strictement plasmodiale dont la concentration plasmatique est associée à la biomasse parasitaire [206]. D'après nos résultats, la concentration plasmatique en hème total corrèle avec les niveaux de HRP-2, mais pas avec le taux d'hémoglobine, suggérant que l'accumulation de l'hème provienne principalement de la dégradation des globules rouges parasités, plutôt que des globules rouges sains. L'augmentation de la bilirubinémie totale peut être induite par une hémolyse, ou par des anomalies dans les fonctions hépatiques. L'hémopexine étant principalement produite par le foie, une atteinte hépatique associée à l'hémolyse pourrait contribuer à l'accumulation de l'hème. Ceci permettrait

---

d'expliquer la corrélation que nous observons entre les niveaux d'hème total plasmatique avec la bilirubinémie chez nos patients.

Tandis que les concentrations plasmatiques d'hème augmentent avec la sévérité du tableau clinique du paludisme, elles augmentent principalement dans les cas d'atteintes cérébrales et rénales. Cependant, tel que nous l'avons également présenté dans l'étude de Herbert et al. (Annexe 2), ces atteintes sont régies par une physiopathologie différente bien qu'elles semblent impliquer dans les 2 cas l'hème, l'hémopexine et 4 cytokines : IP-10, IL-10, TNF- $\alpha$  et MCP-1. *In vitro*, et/ou *in vivo*, l'hème induit la production de IP-10, IL-10, TNF- $\alpha$  et MCP-1 par les macrophages, les microglies, les cellules épithéliales et les astrocytes [15, 33, 35, 39, 244]. Par ailleurs, dans le chapitre précédent nous montrons l'influence de l'hème sur l'augmentation de la réponse de type 2, associée à la production d'IL-4 et d'IL-10. IP-10 et MCP-1 sont des chimiokines, qui, dans ce contexte, pourraient participer au recrutement des cellules impliquées dans la physiopathologie du neuropaludisme et des atteintes rénales [245, 246]. Enfin, par un mécanisme impliquant la production de TNF- $\alpha$ , l'hème induit une apoptose des cellules [40], et la corrélation positive des niveaux d'hème avec TNF- $\alpha$  pourrait refléter une souffrance cellulaire.

Quels facteurs sont impliqués dans la variabilité de la libération ou de l'élimination de l'hème entre les individus ? Plusieurs facteurs provenant du parasite ou de l'hôte pourraient participer à l'accumulation de l'hème en circulation chez l'hôte, parmi lesquels la vitesse de multiplication du parasite, ou le niveau d'expression et d'activité de HO-1 par l'hôte. Premièrement, la vitesse de multiplication des parasites pourrait contribuer à la libération d'hème plus ou moins rapidement au cours du cycle érythrocytaire. En effet, les parasites *P. falciparum* prélevés chez des patients atteints de paludisme grave se

---

multiplient plus vite *in vitro* que ceux prélevés chez des patients atteints d'infection asymptomatique [247]. Deuxièmement, le polymorphisme dans le promoteur de *HMOX1* de l'hôte est associé au niveau d'expression de ce gène, mais aussi à la sévérité du paludisme [192, 222, 223]. Dans notre étude, l'activité enzymatique de HO-1 est plus faible chez les patients atteints de neuropaludisme, et pourrait ainsi contribuer aux niveaux élevés d'hème observés chez ces patients.

À Cuttack, les niveaux plasmatiques de HO-1 augmentent chez les patients atteints de paludisme ou de sepsis sévères. Bien que à Cuttack ces deux situations infectieuses soient associées à une réponse inflammatoire différente (Annexe 2), elles peuvent aboutir à des atteintes multi-organiques. En accord avec les données de Walther et al., nos résultats indiquent des concentrations plasmatiques de HO-1 plus élevés chez les patients décédés, en comparaison aux autres cas graves de paludisme, ou aux accès simples, mais aussi dans les cas de neuropaludisme en comparaison aux cas graves sans atteintes cérébrales (« non neuropaludisme ») [223]. L'expression de l'HO-1 est augmentée par l'hème mais également par des stimuli pro-inflammatoires et pro-oxydants [8, 12, 16, 223]. Ainsi, comme l'HO-1 est une enzyme cytosolique, il est envisageable que sa libération provienne d'une cytolyse (ou apoptose induite par TNF- $\alpha$ ), subséquentement à l'augmentation de son expression.

Dans le sang périphérique, *HMOX1* est exprimé par l'ensemble des populations leucocytaires [223]. Par ailleurs, il existe un polymorphisme de nombre de répétitions (GT) dans le promoteur de *HMOX1* qui est associé à la sévérité du paludisme et d'autres maladies inflammatoires et auto-immunes [3, 222, 223, 248, 249]. D'après une analyse par  $X^2$  de nos résultats préliminaires, le génotype C/C est associé à une protection vis à vis du paludisme grave. Ces

---

résultats sont en accord avec une étude réalisée au Brésil, où la fréquence des patients possédant un allèle C est plus élevée chez les individus développant un paludisme asymptomatique que chez les individus atteints de paludisme symptomatique à *P. vivax* [3]. Les courtes répétitions (GT) dans le promoteur de *HMOX1* sont associées à une transcription plus importante du gène, et pourrait ainsi contribuer à une élimination plus efficace de l'hème libre circulant [248]. Ceci pourrait également expliquer les niveaux élevés de HO-1 que nous avons mesuré dans les plasmas de patients atteints de paludisme graves. Cependant, bien que la distribution des fréquences des répétitions (GT) soit similaire à celle décrite dans la population du Myanmar, les résultats montrent un effet inverse, car, dans cette autre étude le génotype C/C est associé à une susceptibilité accrue à développer un paludisme grave [222]. Dans notre étude nous avons uniquement analysé le polymorphisme de *HMOX1*, mais d'autres gènes, tel que les gènes codant des cytokines, seraient également impliqués (données en cours d'analyse). Par ailleurs, l'étude de la génétique des populations ne permettrait pas de déterminer à elle seule les facteurs impliqués dans la physiopathologie du paludisme grave, mais donne une indication quant à la complexité des mécanismes impliqués et soulignent également les variabilités génétiques des populations d'un site à un autre.

Nous avons également montré que les concentrations plasmatiques d'EPO augmentent avec la sévérité du paludisme, particulièrement dans les cas de neuropaludisme. Encore une fois, nos résultats sont contradictoires avec ceux rapportés en Mozambique et au Kenya, où les niveaux systémiques d'EPO diminuent au cours du neuropaludisme. De même, le traitement de souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA avec de l'EPO humaine recombinante prévient le développement du neuropaludisme [233, 234], suggérant son rôle

---

neuroprotecteur. Dans notre étude réalisée à Cuttack, les niveaux d'EPO sont positivement corrélés à l'hème total, mais pas au taux d'hémoglobine. Alors que, dans l'Article 1 nous montrons que le traitement des souris avec l'hème induit une augmentation de la concentration plasmatique en EPO, il est envisageable que l'augmentation d'EPO que nous observons chez nos patients soit la conséquence d'une augmentation des niveaux d'hème circulants. Cependant les analyses rétrospectives réalisées chez l'Homme ne permettent pas de vérifier cette hypothèse.

Alors que se sont principalement les enfants de moins de 5 ans qui sont atteints de paludisme grave en Afrique, il y a une forte prévalence des infections symptomatiques par *Plasmodium* chez les adultes en Inde. De même les tableaux cliniques sont différents ; en Inde, les atteintes sont très hétérogènes, avec des altérations de plusieurs organes en même temps. Ainsi, l'âge, le sexe, l'ethnicité, les infections chroniques ou concomitantes, et le polymorphisme génétique sont des facteurs de susceptibilité qui contribuent à la gravité de l'infection par *Plasmodium*. A notre connaissance, nous présentons pour la première fois une association entre des niveaux élevés d'hème plasmatiques et la sévérité du paludisme à *P. falciparum* chez l'Homme. Nous proposons que l'hème soit impliqué dans la physiopathologie du paludisme grave, et notamment du neuropaludisme, en contribuant à l'altération de la balance cytokinique rapportée (Annexe 2).





## **CHAPITRE 3.      REPONSES DES CELLULES GLIALES A L'HEME ET SES CONSEQUENCES SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DU NEUROPALUDISME**

### **1.      Contexte du travail**

Tel que nous l'avons abordé dans la partie État de l'Art, les mécanismes impliqués dans la physiopathologie du neuropaludisme sont complexes, et sont initiés bien avant l'apparition des signes cliniques. Le neuropaludisme serait la conséquence d'une réponse inflammatoire exacerbée dans le cerveau, qui est associée à l'activation des cellules du parenchyme cérébral et au recrutement de lymphocytes T [78, 88]. Les cellules du parenchyme cérébral associées au système immunitaire sont principalement les astrocytes et les microglies.

Au cours de l'infection, les signes cliniques apparaissent pendant la phase érythrocytaire du cycle parasitaire [78, 88]. En effet, de nombreuses molécules immunogéniques sont libérées lors de la lyse des globules rouges, parmi lesquelles l'hème. Chez le modèle murin, les niveaux d'hème sont significativement plus élevés chez les souris sensibles au neuropaludisme en comparaison aux souris résistantes [10]. De plus, l'injection d'hème au sixième jour de l'infection par *P. berghei* ANKA chez des souris résistantes, conduit au développement du neuropaludisme [10]. D'après nos résultats présentés dans le

chapitre précédent, les niveaux d'hème plasmatiques sont plus élevés chez des patients atteints de neuropaludisme comparativement aux individus non infectés ou développant un accès simple (Article 2). D'une manière similaire en Zambie, 55% des enfants atteints de neuropaludisme ont de l'hème dans leurs urines, contre 8,3% des enfants atteints d'anémie palustre sévère [188].

Les effets de l'hème semblent être associés à sa cinétique de libération. En effet, dans le modèle expérimental de la souris C57BL/6 infectée par *P. berghei* ANKA, l'injection d'hème avant l'infection protège les souris du neuropaludisme par un mécanisme qui fait intervenir l'expression de HO-1 [250]. De la même manière, les souris qui expriment une forme mutée de l'hémoglobine [Hb<sup>SAD</sup>, 3 mutations dans la chaîne  $\beta$ :  $\beta^6\text{Glu}>\text{Val}$  (HbS),  $\beta^{23}\text{Ala}>\text{Ile}$  (Antilles<sup>23I</sup>) et  $\beta^{121}\text{Asp}>\text{Gln}$  (D-Punjab<sup>121Q</sup>)] sont résistantes au neuropaludisme [250], et les individus atteints d'hémoglobinopathies ont un risque plus faible à développer un neuropaludisme [251]. Il semblerait que l'hémolyse qui accompagne ces déficits contribue à la libération permanente de faibles niveaux d'hème, qui par la suite conduirait à l'augmentation de l'expression de *HMOX1* notamment par les cellules mononuclées du sang périphérique [252]. D'après Ferreira et al., la protection des souris Hb<sup>SAD</sup> n'est pas associée à une diminution de la charge parasitaire, mais à l'expression de HO-1 qui est conjointe à une chute de l'expression des chimiokines et cytokines *IP10*, *TNFA* et *IL10* dans le cerveau, et du recrutement de lymphocytes T CD8 [250, 253].

A notre connaissance, les effets immunomodulateurs de l'hème avant l'apparition des signes cliniques n'ont pas encore été évalués chez les individus non-atteints d'hémoglobinopathies. Pour cette raison nous avons émis

---

l'hypothèse que la libération importante d'hème durant les premiers jours, à la suite de l'infection par *Plasmodium* exercerait un effet protecteur. D'après les résultats présentés dans le Chapitre 1, l'hème diminue la réponse immunitaire cellulaire de type 1, qui est également impliquée dans les mécanismes inflammatoires associés au neuropaludisme. De plus, comme il l'a été décrit pour les macrophages, l'hème pourrait favoriser un profil cellulaire protecteur/réparateur de type 2 au niveau du parenchyme cérébral [38, 105]. Les microglies dérivent de progéniteurs myéloïdes du sac vitellin qui ont migré au cours de l'embryogenèse dans le système nerveux central, et pour cette raison les microglies sont apparentées aux macrophages.

Les études réalisées chez l'Homme sont rétrospectives, de ce fait et aussi pour des raisons éthiques, il est impossible de réaliser une étude qui permettrait d'associer l'augmentation précoce d'hème avec le phénotype clinique du paludisme. Afin de valider notre hypothèse, nous avons infecté des souris C57BL/6, sensibles au neuropaludisme, avec *P. berghei* ANKA. Nous les avons ensuite traitées avec de l'hème à partir du troisième jour de l'infection. En parallèle, la réponse de cultures primaires mixtes d'astrocytes et de microglies a été analysée après leur traitement avec de l'hème et/ou des globules rouges parasités. Nos résultats montrent que malgré l'activation et l'induction d'une réponse de type 2 des microglies et des astrocytes, et la diminution du recrutement des lymphocytes dans le cerveau, l'hème exerce un effet protecteur modeste sur le développement du neuropaludisme.

## 2. Matériels et méthodes complémentaires à l'Article 4

### 2.1. Analyse de l'expression de HO-1 par cytométrie en flux

Des cultures primaires d'astrocytes et de microglies ont été obtenues à partir de cerveaux de souris de moins de 1 jour tel que décrit dans l'Article 4, et ont été maintenues dans du milieu DMEM complet [10% SVF, 1g/L D-glucose (Sigma), et 0,1% pénicilline/streptomycine]. Pour analyser l'effet de l'hème sur l'expression de HO-1,  $2 \times 10^6$  cellules gliales mises en culture dans les plaques de 6 puits, ont été traitées avec des concentrations croissantes en hème (20 à 80µg/mL). Après 24h et 48h, les cellules ont été récupérées par trypsination (Trypsine-EDTA ; Gibco), et ont ensuite été perméabilisées en utilisant le kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) et marquées avec un anticorps anti-HO-1-FITC (Enzo Life Sciences).

### 2.2. Analyse de l'expression de *CD16* et *CD32*

L'extraction d'ARN, la synthèse d'ADN complémentaire, et les PCR quantitatives ont été réalisées d'après les protocoles décrits dans l'Article 4. Les séquences des couples d'amorces utilisés pour amplifier les séquences spécifiques de *CD16* et *CD32* sont indiquées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Couple d'amorces pour amplification des séquences d'intérêt.

	Amorce sens	Amorce anti-sens
CD16	TGTCACCATCACTGTCCAAGA	ACTAGGGAGAAAGCAGTGTGGTA
CD32	CATCTGGACTGGAGCCAAC	CCTCAGTTTTGGCAGCTTCT

---

### **2.3. Analyse de l'expression génique des cellule du cerveau**

Des souris C57BL/6 de huit à dix semaines ont reçu des injections de 30mg/kg d'hème par voie intrapéritonéale, deux fois par jour et pendant trois jours. Douze heures après la dernière injection, les souris ont été euthanasiées pour analyser l'expression des gènes codant HO-1, TNF- $\alpha$ , IL-10 et IP-10 par les cellules du cerveau par PCR quantitatives, et tel que décrit dans l'Article 4.

## **3. Résultats**

### **3.1. Réponse des astrocytes et des microglies à l'hème**

L'hème induit l'expression de HO-1 chez les cellules. Dans notre étude nous avons analysé l'expression de HO-1 par cytométrie en flux après 12h et 48h de traitement avec l'hème. D'après la Figure III.1, l'expression de HO-1 ne change pas après 12h, mais elle augmente de façon concentration dépendante après 48h de traitement *in vitro* avec l'hème ( $p < 0,001$  ; Test de tendance linéaire).

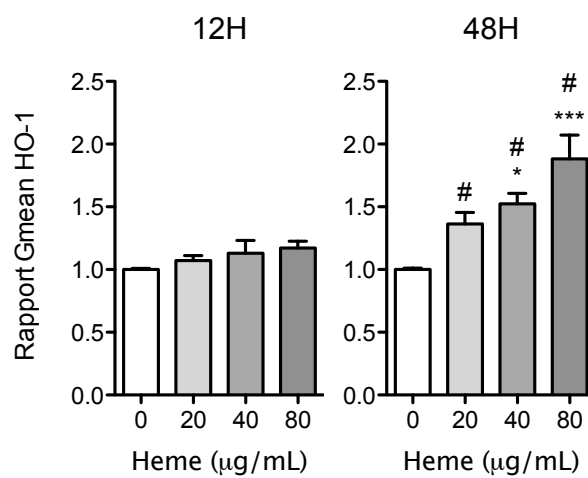


Figure III.1. Augmentation de l'expression de HO-1.

L'expression de HO-1 par les astrocytes et microglies a été analysée par cytométrie en flux après 24 et 48h de traitement avec des concentrations croissantes en hème (n = 4-6). \* $p < 0,05$  et \*\*\* $p < 0,001$  avec l'échantillon contrôle d'après le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn. # $p < 0,05$  entre 12h et 48h pour une même concentration d'hème, d'après le test de Mann-Whitney.

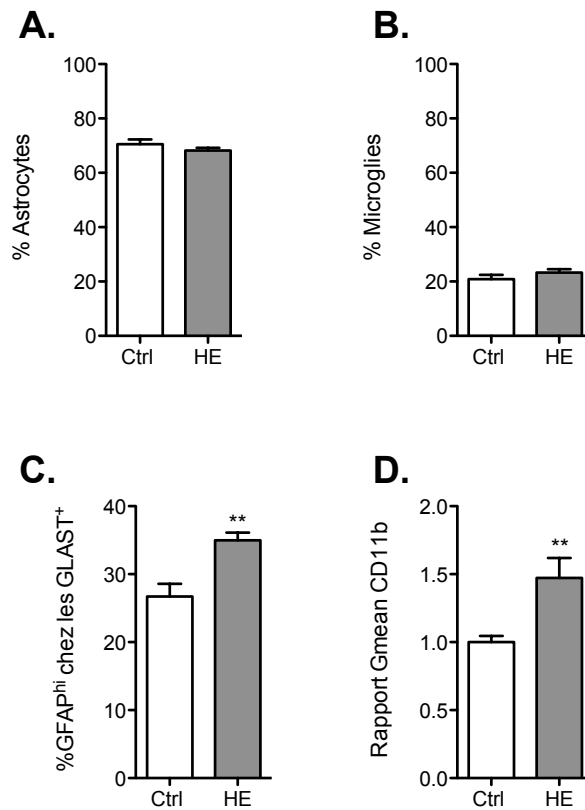


Figure III.2. Activation des astrocytes et microglies par l'hème.

Proportions en (A) cellules GFAP<sup>+</sup>GLAST<sup>+</sup> (astrocyte), et en (B) cellules CD11b<sup>+</sup> (microglie) après 48h de culture sans traitement (Ctrl) ou avec 80µg/mL d'hème (HE). (C) Pourcentage d'astrocytes activés (GFAP<sup>hi</sup>) parmi l'ensemble des astrocytes. (D) Rapport d'expression de CD11b par rapport aux contrôles et parmi les microglies (n = 10-11). \*\*p < 0,01 d'après le test de Mann-Whitney.

### 3.1.1. Phénotype des cellules

Alors que le traitement des astrocytes et des microglies avec 80µg/mL d'hème induit une augmentation significative de l'expression de HO-1 après 48h, nous avons maintenu ces conditions expérimentales pour la suite des analyses.

Le traitement des cellules avec l'hème n'affecte pas les proportions en astrocytes et microglies. En effet, les astrocytes représentent  $70,6 \pm 5,5\%$  et  $68,2 \pm 3,5\%$  des cellules non traitées ou traitées avec l'hème, respectivement (Figure III.2A). Les microglies représentent  $20,9 \pm 4,9\%$  et  $23,3 \pm 4,0\%$  des cellules non traitées ou traitées avec l'hème, respectivement (Figure III.2B). Par ailleurs, nous constatons une activation de ces deux sous-types cellulaires par l'augmentation du nombre d'astrocytes GLAST<sup>hi</sup> et de l'expression de CD11b par les microglies (Figures III.2C, 2D).

Il a été rapporté que l'hème favorise la différenciation des macrophages dérivés de la moelle osseuse en type M2 [38]. Dans le but de déterminer l'impact de l'hème sur la réponse des microglies, l'expression des marqueurs cellulaires a été analysée par cytométrie en flux. Chez les microglies, nous avons considéré les mêmes marqueurs de polarisation que ceux décrits pour les macrophages activés par la voie classique [M1 : CD16 et CD32 (CD16/32)] ou par la voie alternative [M2 : CD206] [254]. Après 48h de traitement, l'hème induit une augmentation de l'expression de CD206 par les microglies de trois fois alors que l'expression de CD16/32 est inchangée (Figure III.3A, III.3B). Cependant, l'expression des gènes qui codent CD16 et CD32 diminue significativement chez les cellules traitées avec l'hème (Figures III.3C, 3D). Comme notre analyse par cytométrie en flux indique que les astrocytes (contrôles ou traités avec l'hème) n'expriment pas CD16/32 (Figure III.3E), les variations d'expressions géniques



---

de *CD16* et *CD32* mesurées sur l'ensemble de la population cellulaire reflètent probablement la réponse des microglies.

### **3.1.2. Production de cytokines *in vitro***

Simultanément, les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-10 et IP-10 ont été dosées dans les surnageants des cultures. Nos résultats montrent une stimulation de la production en TNF- $\alpha$  par les astrocytes et les microglies conditionnés avec de l'hème (Figure III.4D), alors que les niveaux d'IL-10 et d'IP-10 sont comparables aux contrôles (Figures III.4E, III.4F).

### **3.1.3. Expression de *HMOX1* et de cytokines par les cellules du cerveau**

Afin d'analyser l'impact de l'hème sur la réponse des cellules du cerveau, de l'hème a été injecté aux souris C57BL/6, deux fois par jour, et pendant trois jours consécutifs. Les cerveaux ont été prélevés pour analyser l'expression de *HMOX1* et des cytokines par PCR quantitative. Comme le montre la Figure III.6A-D, il n'y a pas de différence quant à l'expression de ces gènes entre les cerveaux de souris contrôles et de souris traitées avec de l'hème.

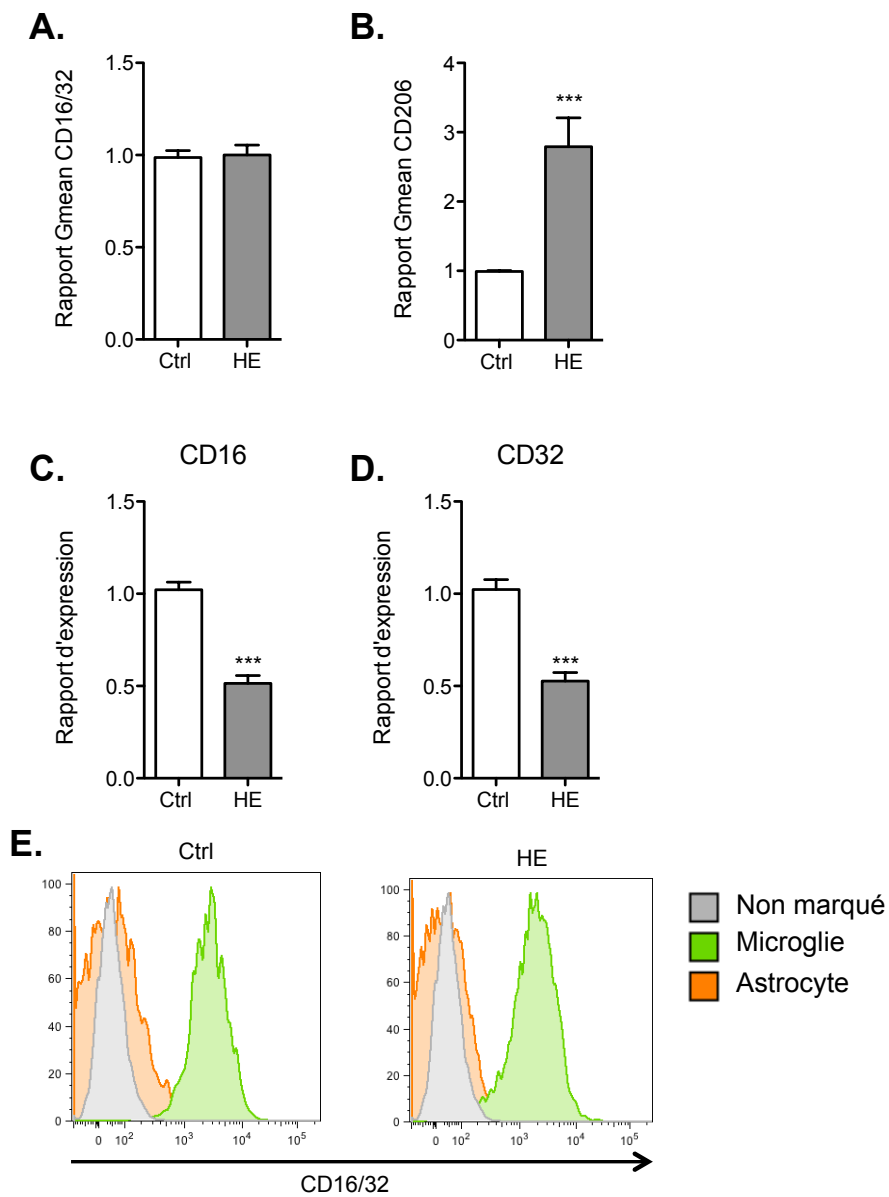


Figure III.3. L'hème favorise le profil M2 des microglies.

Rapport d'expression de (A) CD206 et de (B) CD16/32 chez les cellules gliales non traitées (Ctrl) et traitées avec 80µg/mL d'hème (HE), par rapport aux cellules Ctrl et parmi les cellules CD11b<sup>+</sup> (n=10-11). Expression génique de (C) *CD16* et de (D) *CD32* par les cellules primaires mixtes d'astrocytes et de microglies (n=8-10). (E) Intensité de fluorescence de CD16/32-APC Cy7 chez les astrocytes (GFAP<sup>+</sup>GLAST<sup>+</sup>) et les microglies (CD11b<sup>+</sup>). \*\*\*p < 0,001 avec le groupe contrôles, d'après le test de Mann-Whitney.

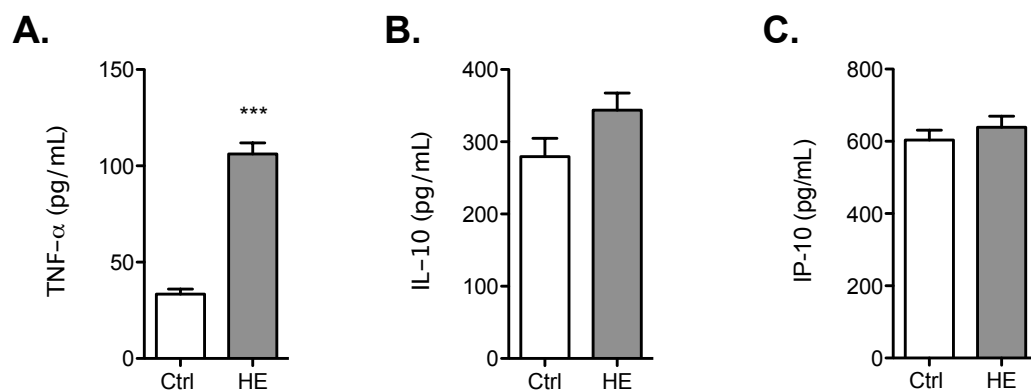


Figure III.4. Modulation de la production des cytokines.

Production de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10 et (C) IP-10 mesurées dans les surnageants des cultures cellulaires après 48h de traitement (n=8-10). \*\*\*p<0,001 d'après le test de Mann-Whitney

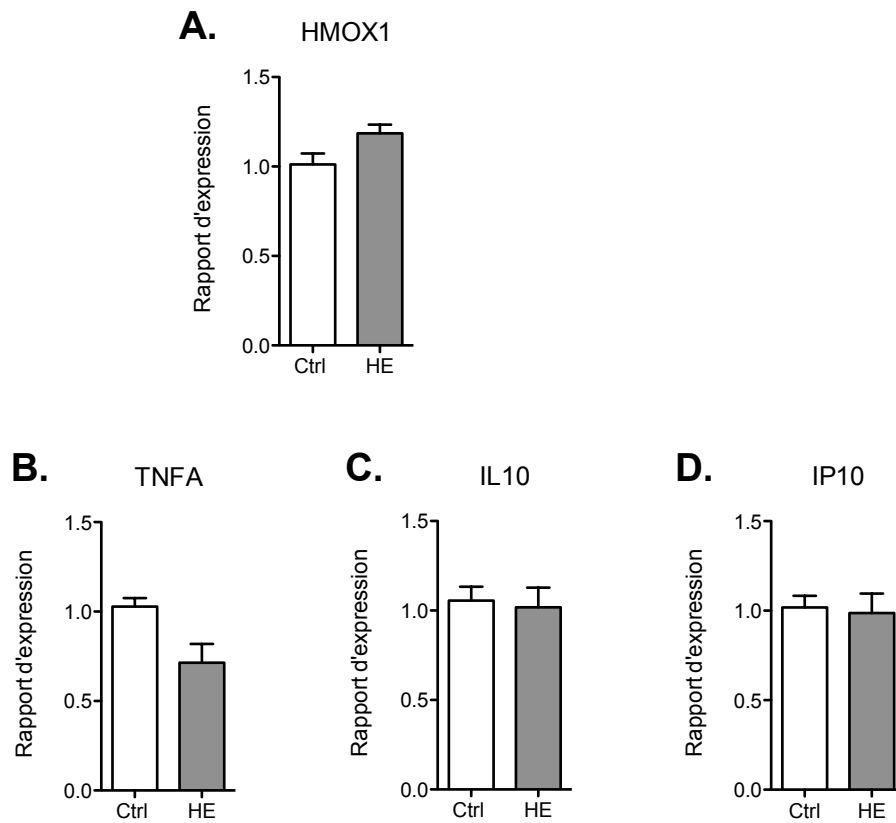


Figure III.6. Expression génique par les cellules du cerveau

Des souris C57BL/6 ont été injectées avec 30mg/kg d'hème 2 fois par jour, pendant 3 jours, et 12h après la dernière injection les cerveaux ont été prélevés pour analyser l'expression de (A) *HMOX1*, (B) *TNFA*, (C) *IL10* et (D) *IP10* par PCR quantitative.

## 3.2. Impact sur le neuropaludisme

### 3.2.1. Effet de l'hème sur la survie des souris infectées

Dans le but de déterminer l'impact de l'hème sur la survie des souris, de l'hème a été injecté à des souris C57BL/6, à différentes concentrations, deux fois par jour à partir du troisième jour d'infection par *P. berghei* ANKA. Entre le sixième et le huitième jour de l'infection, toutes les souris infectées par *P. berghei* ANKA ont présenté des signes caractéristiques du neuropaludisme murin (convulsion, ataxie, coma) qui ont précédé leur mort. L'injection de 5mg/kg d'hème n'influence pas la survie des souris et est associée à 100% de mortalité au huitième jour (Figure III.6). Cependant, les injections de 10mg/kg et de 30mg/kg d'hème conduisent respectivement à la survie de 18,2% et de 30% des souris, au huitième jour de l'infection, suggérant un effet bénéfique de l'hème qui serait dépendant de la concentration de la solution d'hème injectée. Par ailleurs, la parasitémie mesurée au sixième jour de l'infection n'est pas affectée par le traitement avec l'hème, ce qui suppose que la multiplication intra-érythrocytaire des parasites n'est pas altérée suite au traitement par l'hème (Figure III.7). Néanmoins, l'injection de 60mg/kg d'hème a entraîné la mort de toutes les souris 1,5 jours après le début du traitement, lui associant un effet toxique quand utilisé à des concentrations élevées.

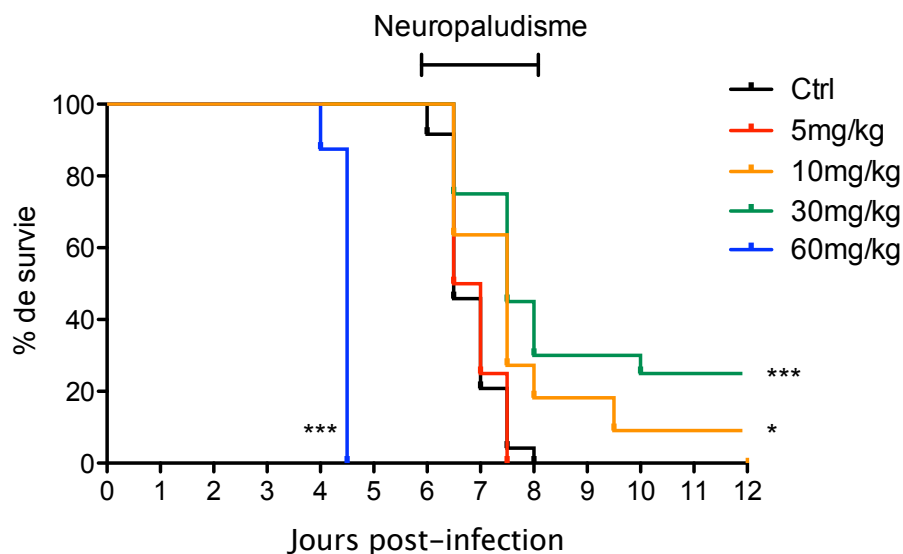


Figure III.7. Les effets protecteurs de l'hème vis à vis du neuropaludisme dépendent de sa concentration.

Des souris C57BL/6 ont été infectées par *P. berghei* ANKA et injectées avec 5mg/kg (n = 4), 10mg/kg (n = 11), 30mg/kg (n = 20) ou 60mg/kg (n = 8) d'hème à partir de J3 post-infection, 2 fois par jour, jusqu'à J7 post-infection. Des souris infectées n'ayant pas reçu d'hème ont été maintenues dans les mêmes conditions d'hébergement (n = 24). \*p < 0,05 et \*\*\*p < 0,001 en comparaison avec les souris n'ayant pas reçu d'hème, et d'après le test de Mantel-Cox.

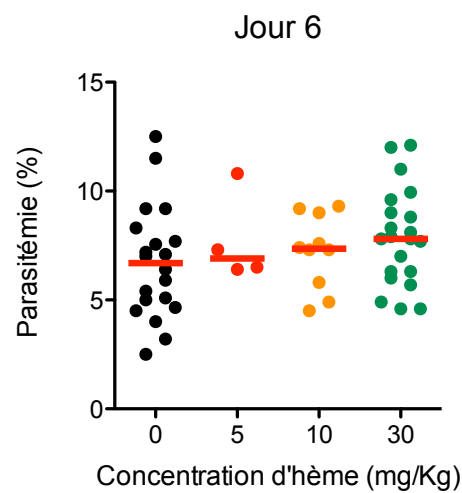


Figure III.8. Le traitement des souris avec l'hème n'affecte pas la parasitémie.

La parasitémie a été calculée à partir de frottis sanguins chez des souris C57BL/6 au sixième jour d'infection par *P. berghei* ANKA et injectées avec différentes concentrations d'hème, 2 fois par jour et à partir du troisième jour d'infection.

---

### **3.2.2. Modulation de la réponse des microglies et des astrocytes par l'hème au cours de l'infection (Article 4)**

Suite à ces résultats, nous avons analysé l'impact de l'injection d'hème sur le développement des atteintes cérébrales. De plus, afin de comprendre les effets de l'hème *in vivo* sur la réponse immunitaire, le phénotype des microglies et des astrocytes, le recrutement des lymphocytes et l'expression des cytokines ont été analysés chez des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA. Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vivo* ont été corrélés à des analyses *in vitro* réalisées à partir de cultures primaires d'astrocytes et de microglies. Ainsi nous montrons un rôle bénéfique de l'hème qui est associé à une diminution de la réponse de type M1 des microglies et du recrutement des lymphocytes dans le cerveau. Cependant, nous observons une mobilisation de monocytes au cours du neuropaludisme murin qui n'est pas affectée par l'hème. Ce travail a fait l'objet d'un article prêt à être soumis à publication.

Ma contribution pour la réalisation de cet article a été la mise au point et la réalisation des expériences, l'analyse des résultats, et la rédaction de l'article.

Les références citées dans l'Article 4 ont été incluses à la fin du manuscrit.



---

**Heme Alters the Development of Experimental Cerebral Malaria by Impairing T Lymphocytes Recruitment within the Brain through the Modulation of Astrocyte and Microglia Responses**

Esther Dalko<sup>1,2</sup>, Delphine Genete<sup>1</sup>, Florent Auger<sup>3,4</sup>, Fabien Herbert<sup>1</sup>, Claire Dovergne<sup>1</sup>, Pierre-André Cazenave<sup>1</sup>, Jacques Roland<sup>1</sup>, and Sylviane Pied<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Center for Infection and Immunity of Lille, CNRS UMR 8204, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>2</sup> Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada

<sup>3</sup> Imaging Platform, Research Pole, Lille University Hospital, Lille, France

<sup>4</sup> Université de Lille, UDSL, EA 1046, Lille, France

\* Corresponding author e-mail: [sylviane.pied@pasteur-lille.fr](mailto:sylviane.pied@pasteur-lille.fr) (SP)

**Running title: Effect of Heme on Microglia Responses and Cerebral Malaria**

---

**ABSTRACT**

Cerebral malaria (CM) is the deadliest complication of *Plasmodium falciparum* infection. CM pathophysiology involves a strong pro-inflammatory response associated with activation of glial cells and recruitment of T lymphocytes to the brain. However, the phenotype of glial cells during CM still remains unknown. Heme is an immunomodulatory molecule released during the infection that plays a controversial role in the pathophysiology of severe malaria. With respect to the deleterious role of heme shown in experimental models of CM we have recently reported increased circulating heme levels during CM. However, heme was also shown to protect mouse models of sickle cell disease against experimental CM (ECM). Given the anti-inflammatory effect of heme reported on T lymphocytes and macrophages, we investigated here its impact on microglia, astrocyte, and T lymphocyte responses during ECM. We found that microglia acquire an M1-like pro-inflammatory CD16/32<sup>hi</sup> phenotype that is associated with the increased expression of *IP10*, *TNFA*, *MCP1* and *IL10* in brain of *P. berghei* ANKA-infected C57BL/6 mice developing ECM. Administration of heme twice a day from day 3 of infection protected mice from ECM by preventing the neuroinflammation and the ensuing brain damage. Our *in vivo* and *in vitro* studies further confirmed the effect of heme in reducing the M1-like phenotype of microglia, and in preventing astrocyte activation. In addition, heme decreased IP-10 production by glial cells that would further contribute to the altered migration of pathogenic CD4 and CD8 T lymphocytes within the brain, but without affecting the concomitant disruption of the blood brain barrier. Herein we highlighted a role for heme in the complex pathophysiology of CM, which may also be related to increased *HMOX1*

---

expression. Our study reveals the immunomodulatory role of heme and its significance as an interesting target for developing new treatments against CM.

---

**AUTHOR SUMMARY**

Cerebral malaria is the deadliest clinical syndrome associated with *Plasmodium* infections. Its complex pathophysiology involves a detrimental immune response characterized by an exacerbated neuroinflammation, which is not fully understood. Herein we show a significant role of M1-like pro-inflammatory microglia and activated astrocytes in the pathophysiology of experimental cerebral malaria. Together, these cells may promote the recruitment of pathogenic T lymphocytes within the brain by cytokines and chemokine production such as TNF- $\alpha$  and IP-10. We also found that the early treatment of mice during infection with heme alters the development of experimental cerebral malaria by modulating glial cell responses and increasing *HMOX1* expression, therefore inhibiting brain inflammation. In addition, the recruitment of T lymphocytes was prevented in line with the decreased M1-like response of microglia. Our observation highlights the importance of heme in modulating the immune response during malaria infection and reveals possible therapeutic targets for the prevention and treatment of cerebral malaria.

---

## INTRODUCTION

Cerebral malaria (CM) is the deadliest complication of *Plasmodium* infection. Untreated *P. falciparum* patients who progress to CM have an almost exclusively fatal outcome [77]. Despite tremendous efforts to better understand the complex pathophysiology of CM, many gray zones still persist. Owing to ethical and practical considerations, detailed analyses of the events leading to CM in humans are limited. Therefore, the murine experimental model of CM (ECM) induced by *P. berghei* ANKA (PbA) infection in C57BL/6 mice have been extensively used to understand the complex neuropathophysiology of CM. ECM is a neurological syndrome that reproduces many features of the human CM characterized by ataxia, seizure, coma before death, and low peripheral parasitemia [77]. Fatal ECM involves the activation of brain glial cells from day 3 of infection, the production of chemokine such as IP-10, and the recruitment of CD8 T and CD4 Th1 lymphocytes to the brain that in turn promote an exacerbated inflammation at the onset of the disease [58, 88, 255, 256]. Altogether, these responses promote brain edema, axonal damage, and myelin loss [88, 127].

Heme is an immunomodulatory molecule released following the lysis of infected and healthy red blood cells (RBCs) during malaria blood stage [10]. Bound to hemoproteins, heme participates in many biological processes, such as dioxygen transportation and catalase activity [7]. During normal conditions, circulating cell-free heme is rapidly scavenged by hemopexin and then internalized by phagocytic cells that express heme oxygenase-1, the rate-limiting enzyme that degrades heme [7]. However, saturation of heme detoxification mechanisms may precipitate this accumulation, which is toxic to both the parasite and the host. In this context we have recently shown that high levels of circulating heme are associated with CM in the *P. falciparum*-endemic region of

---

Odisha, India [257], and mouse susceptible to ECM were reported to have higher levels of free heme compared to resistant ones [10]. However, the late injection of heme in ECM-resistant mice promotes the development of neurological outcomes, whereas injection prior to infection protects susceptible mice from ECM though early expression of the heme oxygenase-1 gene (*HMOX1*) [250, 253]. These observations suggest that the protective effect of heme may dependent both on its circulating levels and its release kinetic pattern. Accordingly, patients with sickle cell disease seem to be protected from cerebral malaria due to a continuous low expression level of *HMOX1* [251, 252].

The M1-like phenotype of microglia was associated to the development of neurodegenerative disorders [258], but to our knowledge their phenotype was not yet assessed during ECM. Based on the fact that heme decreases the Th1 response of T lymphocytes and the analogous M1 response of macrophages [38, 211], we hypothesize that early increase of circulating heme levels may prevent development of ECM by modulating the immune response, and more specifically the glial cells. To address this issue, *C57BL/6* mice were treated with heme after the third day of PbA infection and the immune response was studied in the spleen and brain at the onset of ECM. Our results clearly indicate that 1) the acquisition of an M1-like pro-inflammatory phenotype by microglia is a necessary step in ECM as they produce IP-10, a chemokine involved in the recruitment of pathogenic T lymphocytes to the brain and 2) the early treatment with heme during PbA infection reduces brain damage and decreases cerebral inflammation by preventing the pro-inflammatory phenotype of astrocytes and microglia.

## RESULTS

---

**Heme prevented ECM in PbA-infected C57BL/6 mice**

In order to estimate if increased levels of heme during early blood stage infection conferred protection against ECM, PbA-infected C57BL/6 mice were treated with 30 mg/kg heme by the intraperitoneal route twice daily from day 3 to day 6 of the infection based on previously reported studies [250]. Treatment with heme resulted in a 30% survival of PbA-infected mice, and did not affect parasitemia nor hemoglobin levels (Fig. 1A-C). Expression of *HMOX1* increased significantly in spleen cells of PbA-infected mice treated with heme compared to untreated PbA-infected or control mice (Fig. 1D).

Alterations in brain were monitored by MRI between day 6 and 7 of the infection, when untreated PbA-infected mice were showing symptoms of ECM. Axial and sagittal T2-weighted (T2W) images from PbA-infected mice showed tissue damage characterized by hyperintense lesions in the corpus callosum (11/20 mice, 55%), and hypointense sections in the olfactory bulb (14/20 mice, 70%) (Fig. 2A). A Fisher's test confirmed the reduction in lesions in heme injected PbA mice (Fig. 2B). As shown by Figure 3A-D, PbA infection induced brain edema characterized by decreased apparent diffusion coefficients (ADC) in the cortex, and increased brain width. These modifications were absent in heme-treated mice, although heme treatment did not prevent the blood-brain barrier (BBB) disruption observed during ECM, as shown by the two-fold accumulation of Evans blue in the brain of infected mice (Fig. 3E).

Proton magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS) was used to quantify brain metabolites. Heme treatment of PbA-infected mice was associated with significant decreases in taurine and glutamine levels as well as in the glutamine to glutamate ratio

---

compared to untreated infected mice (Fig. S1). N-acetyl-aspartate, choline, and myo-inositol levels remained comparable in all the experimental groups (Fig. S1).

### **Heme reduced the PbA-mediated pro-inflammatory phenotype of astrocytes and microglia**

We then analyzed the response of astrocytes [glial fibrillary acidic protein positive (GFAP<sup>+</sup>), glutamate aspartate transporter positive (GLAST<sup>+</sup>) cells] and microglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>lo</sup> cells) during ECM induced by PbA infection, and after heme treatment (Fig. 4A-H). The number of microglia remained comparable in all experimental groups (Fig. 4B), but certain modifications in the phenotype of these cells were observed (Fig. 4A-E). During PbA infection, microglia exhibited an activated phenotype as shown by a significant increase in CD11b expression, which further increased with heme treatment (Fig. 4C). To gain insight into the response of these cells we analyzed the expression of CD16 and CD32, markers for M1-like responses, and CD206, a marker for M2-like responses [254]. During ECM, CD16/32 expression by microglia increased significantly compared to control cells (Fig. 4D), and this was concomitant with a two-fold drop in CD206 expression (Fig. 4E). Microglia from PbA-infected mice treated with heme showed decreased expression of CD16/32 in comparison to untreated mice (Fig. 4D), suggesting that heme reduces the M1-like phenotype of these cells. Of note, *TNFA* expression decreased in the spleen during infection whether mice were treated with heme or not (Fig. S2A), while *IL10* expression increased significantly during ECM, and even more when mice received heme from day 3 to day 6 of the infection (Fig. S2B). As with microglia, the number of astrocytes did not change during infection (Fig. 4G). With respect to the increased number of reactive astrocytes expressing GFAP during ECM, fewer GFAP<sup>+</sup> astrocytes were observed in PbA-infected mice treated with heme



than in untreated infected mice (Fig. 4H). These results show that ECM is associated with an M1-like pro-inflammatory phenotype of glial cells and that heme mitigates the effects on microglia and astrocytes.

*In vitro* experiments were further conducted. Stimulation of primary glial cells with infected RBCs did not induce GFAP expression in astrocytes (Fig. 5A, B), nor did it significantly affect the expression of CD11b, CD16/32, or CD206 by microglia (Fig. 5C-F). In contrast, pretreatment with heme enhanced GFAP expression in astrocytes (Fig. 5B), and increased expression of CD11b by microglia when compared to control and cells stimulated with PbA-infected RBCs (Fig. 5D), suggesting activation of both astrocytes and microglia. In addition, heme inhibited M1-like polarization of microglia as suggested by a significant two-fold drop in the expression of CD16/32 in heme-treated cells. However, expression of CD206 in heme-treated cells stimulated with PbA-infected RBCs was not significantly different compared to control ( $p = 0.087$ ) and cells stimulated with PbA-infected RBCs ( $p = 0.063$ ) (Fig. 5E, F).

### **Heme modulated the expression of cytokines by brain cells during PbA infection**

Given that increased expression of *HMOX1* prior to infection protects mice from ECM, and that heme is a potent inducer of *HMOX1* expression (8), we used real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to analyze *HMOX1* expression in the brain of mice. Expectedly, we observed an increase in the levels of expression of *HMOX1* in the brain of PbA-infected mice, treated with heme or untreated, when compared to controls (Fig. 6A). *HMOX1* expression levels doubled in the brain of heme-treated infected mice compared to infected control mice. Despite increased expression of *HMOX1* in the spleen of uninfected mice treated with heme, its expression remained unaffected in the

---

brain when compared to control mice (Fig. S3A-B). Interestingly, heme treatment did not affect the integrity of the blood brain barrier of uninfected mice (Fig. S3C).

Expression of *TNFA*, *IL10*, *IP10*, and *MCPI* in whole brain extracts was also assessed by RT-PCR (Fig. 6B-E). Although there were no significant differences in respect to brain *TNFA* and *MCPI* expression between heme-treated and untreated infected mice (Fig. 6B, E), the expression of *IL10* and *IP10* was significantly lower in infected treated mice (Fig. 6C, D). Astrocytes and microglia produce high levels of IL-10, IP-10, and TNF- $\alpha$  [107, 259], and to better understand the impact of heme on glial cells and during stimulation with PbA-infected RBCs, we quantified the expression at the mRNA and protein levels of these cytokines *in vitro*. Heme pre-treatment significantly decreased PbA-induced gene expression of these factors (Fig. 7A-C). However, while the production of IL-10 and TNF- $\alpha$  remained unchanged between cells stimulated with PbA-infected RBCs in the absence or presence of heme, the concentration of IP-10 significantly decreased in the supernatants of cell cultures treated with heme (Fig. 7D-G). These results confirm the anti-inflammatory effect of heme on glial cells during PbA infection, and may explain its protective effect against CM. Finally, we measured enhanced expression of *HMOXI* in astrocytes and microglia after stimulation with PbA-infected RBCs *in vitro*, and in contrast to the *in vivo* data this effect was further accentuated by heme (Fig. 7G).

### **Recruitment of T lymphocytes to the brain was reduced by heme treatment**

Recruitment of CD4 and CD8 T lymphocytes is essential for the pathophysiology of ECM and is dependent on IP-10 production by brain cells [116, 117, 255]. Therefore, we used flow cytometry to quantify the numbers of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in brains of

---

control and infected mice that were treated or not with heme. Interestingly, the numbers of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were two-fold lower in brain of heme-treated infected mice compared to untreated mice (Fig. 8A, B). Because mice treated with heme died 1 day later than untreated mice, we also looked at the number of T lymphocytes and the expression of *IP10* at day 7 of the infection, and did not report any increase (Fig. S4A-C).

Cells recruited to the brain are first activated in the periphery, such as in the spleen [260]. Compared to untreated PbA-infected mice that harbored less splenic CD8 T lymphocytes, this cell population did not change in PbA-infected mice treated with heme compared to uninfected mouse. In respect to CD4 T cells, their numbers remained unchanged and comparable in the two groups of infected mice (Fig. 7A, B). Interestingly, the numbers of activated CD8 and CD4 T lymphocytes were also comparable between the two groups of infected mice (Fig. 7C, D). Strikingly, heme treatment increased the number of CD8 and CD4 T cells expressing CXCR3, the receptor for IP-10 (Fig. 7E, F), but these effects were not associated with modifications in *IP10* in spleen cells (Fig. 7G). These results strongly suggest that heme treatment from day 3 of infection may inhibit the migration of pathogenic T lymphocytes to the brain.

### **Heme did not affect the recruitment of monocytes to the brain**

Considering that monocytes also contribute to the pathophysiology of ECM by producing pro-inflammatory cytokines after migrating to the brain [119], we studied the CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup> cell population in brains by flow cytometry. The number of monocytes increased in the brain of PbA-infected mice during ECM, but heme did not prevent this

---

recruitment (Fig. 8A, B). These observations highlight that CM involves a complex physiopathology, and the low (30%) mouse survival rate may be attributed to the lack of impact of heme on all inflammatory mechanisms involved.

## **DISCUSSION**

It is now well accepted that ECM induced by PbA infection in susceptible mouse strains, such as the C57BL/6 mouse strain, is associated with the induction of a deleterious immune response. Glial cells become activated early during the infection [88], producing cytokines such as IP-10, that promote the recruitment of pathogenic T lymphocytes to the brain [88, 259]. Taking into account the complex heterogeneity of glial cell subpopulations as well as their pro- or anti-inflammatory properties, their immunomodulatory function during ECM needs to be further defined.

Astrocytes and microglia are important immune cells of the brain parenchyma., and are involved in the pathophysiology of neurodegenerative diseases with distinct but complementary mechanisms [103, 105]. In ECM, we found increased activation of astrocytes that associated with an impaired glutamine to glutamate balance, and increased taurine levels (Fig. S1). One of the key functions of astrocytes is the maintenance of glutamate homeostasis via glutamate–glutamine shuttles [261]; increased release of glutamate is associated with dysfunctions in the central nervous system, and ablation of the glutamate transporter in astrocytes results in neuron loss and death [262]. Hence, an impaired glutamine to glutamate balance may be indicative of the astrocyte damage characteristic of human and rodent CM [130, 263]. In addition, increased levels of taurine in the brain could be concurrent to astrocyte swelling that may further contribute to the release of neurotoxins, such as quinolinic acid [264]. To

---

our knowledge, phenotypic analysis of microglia during PbA infection has not yet been reported in the literature. Here, we show that microglia are activated at the onset of ECM and display a strong M1-like phenotype, characterized by increased CD16/32 expression. According to our results and considering that the Th1 response intervenes in ECM, we suggest a strong systemic type-1 pro-inflammatory response is a hallmark of ECM.

During the erythrocytic stage of *Plasmodium* infection, immunoreactive molecules such as heme are released, causing both protective and deleterious effects. In fact, heme has been previously shown to induce cell death [7], but also promotes an anti-inflammatory M2 and Th2 phenotypes in macrophages and T lymphocytes, respectively [38, 211]. Increased expression of *IL10* and in the spleen of heme-treated infected mice is also suggestive of a systemic type 2 immune response, which may involve T lymphocytes in addition to other immune cells (Fig. S2). In this context, we suggest that heme exerts protection against ECM through modulation of deleterious pro-inflammatory responses, and we show that early treatment of mice with 30 mg/kg heme partially protects from death caused by ECM, without affecting circulating parasitemia. In addition, at day 6 of the infection, heme prevents damage in the olfactory bulb and the corpus callosum, and brain edema, previously shown as important features of ECM [89, 128]. However, heme does not prevent BBB disruption, which may be essential in the modulation of the immune response of brain parenchymal cells (Fig. S3). In addition, heme treatment during the infection prevented taurine and glutamine imbalances in the brain, and halted the activation of astrocytes during PbA infection, which are indicative of a protective effect of heme on astrocytes (Fig. S1).

---

Remarkably, during PbA infection of C57BL/6 mice, heme enhanced microglia activation and decreased their M1-like response. In agreement with the biased Th2 response we have previously reported in heme-treated mice [211], heme also favored the M2-like response of glial cells stimulated *in vitro* with PbA-infected RBCs. M2 macrophage-like cells can handle more efficiently high levels of iron and heme compared to M1 cells, and express higher levels of *HMOX1* [265], which may contribute to the increased expression of *HMOX1* in the brain and the spleen of heme-treated infected mice. Interestingly, early expression of *HMOX1* confers protection against ECM, by decreasing inflammatory processes as well as the expression of chemokines in the brain [250].

In this study, increased *HMOX1* expression was consistent with decreased expression of *IP10* in the brain of heme-treated PbA-infected mice. Heme also efficiently decreased the production and expression of *IP10* by glial cells simulated *in vitro* with PbA-infected RBCs. The chemokine IP-10 plays a key role in the pathophysiology of ECM [116, 117, 246, 250]; it mobilizes pathogenic CD4 and CD8 T lymphocytes to the brain, which play an important role in the neuro-inflammatory process [116, 117, 246]. In this context, early treatment of infected mice with heme decreased the number of both CD4 and CD8 T lymphocytes in the brain. Because the number of activated CD8 and CD4 T lymphocytes in the spleen remained comparable in both groups of infected mice, the spleen being necessary for the occurrence of ECM [260], we speculate that heme treatment did not alter the function of T lymphocytes. In addition, heme treatment during the infection was associated with increased numbers of lymphocytes expressing CXCR3 compared to untreated mice, suggesting a lack of their mobilization. However, T cell recruitment was still hampered at day 7 of infection in mice treated with heme

---

and developing ECM (Fig. S4), and may therefore be associated with the complementary pathological process.

Interestingly, *MCPI* expression and the number of monocytes recruited to the brain were unaffected by heme treatment during the infection. During intracerebral hemorrhage, TNF- $\alpha$ -producing inflammatory monocytes are recruited to the brain, and contribute to subsequent motor deficiencies [266]. These monocytes are characterized by the expression of CCR2, the receptor of MCP-1, and the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  [266-268]. However, the role of inflammatory monocytes in the pathophysiology of CM is still unclear [119, 269]. In fact, the reported ECM-resistance in monocyte/macrophage-depleted mice could be the result of decreased activation of lymphocytes in the periphery [119], and MCP-1 knockout mice are not protected from ECM despite decreased recruitment of monocytes to the brain, probably because of the unaffected migration of CD8 T cells [269]. Together, this information suggests that both T lymphocytes and monocytes contribute in concert to the pathophysiology of CM.

This study shows that an early increase in heme levels during PbA infection prevents ECM (30%) in susceptible mice, by modulating the response of glial cells and decreasing recruitment of T lymphocytes (Fig. 9). However, the remaining 70% mortality of heme-treated mice could be the result of an inefficient control of complementary deleterious mechanisms such as monocyte mobility to the brain. Interestingly, mice with sickle cell disease are protected from ECM by the continuous release of low levels of heme that induce early expression of *HMOXI* [250]. In contrast, injection of heme at day 6 of the infection in resistant mice leads to the development of ECM [250, 253], suggesting a dual effect of heme according to the time of its increase

---

or injection. In a similar fashion, hemoglobinopathies are associated with protection from CM [251], and we have previously reported increased plasma levels of heme during human CM [257]. To conclude, in patients without hemoglobinopathies, genetic polymorphisms associated with the control in systemic heme levels might contribute this way to resistance in human CM [223].

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Infection of C57BL/6 mice with PbA-parasitized RBCs**

Eight- to ten-week-old C57BL/6 JRj mice (Janvier, France) were infected by the intraperitoneal route with  $10^6$  PbA-parasitized RBCs. Uninfected mice of the same age were used as controls. Mice were monitored twice daily, and parasitemia was assessed every 24 h by Giemsa-stained blood smears from the tail vein. All mice were euthanized when they started developing neurological symptoms characteristic of ECM [84]. Animals were housed in the Institut Pasteur de Lille animal facility accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice, in line with the French (Decree 87-848 issued on 19/10/1987) and European (Directive 86/609/CEE) regulations on care and protection of Laboratory Animals. Protocols were approved by the Ethical Committee of the Institut Pasteur de Lille and the French Ministry of Agriculture (permit number A 75-15-28) and performed in compliance with the NIH Animal Welfare Assurance #A5476-01 issued on 02/07/2007. All efforts were made to minimize animal suffering.

### ***In vivo* treatment of C57BL/6 mice with hemin**



---

Hemin (BioXtra, from porcine; Sigma, France) was freshly prepared for each experiment by dissolving a stock solution of 25 mg/mL (in NaOH 0.1 M) in phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, France). The solution was neutralized to pH 7.4 and then filtered before injection. Mice received 30 mg/kg hemin intraperitoneally twice daily, from day 3 to day 6 of the infection.

### **Quantification of hemoglobin levels**

Hemoglobin levels were measured by diluting 1  $\mu$ L mouse tail vein blood in 250  $\mu$ L Drabkin's solution (Sigma) and as described elsewhere [211].

### **Purification of *P. berghei* ANKA-infected red blood cells**

Parasitized RBCs were purified from total blood from PbA-infected severe combined immune deficiency (SCID) mice (Institut Pasteur de Lille, France). Briefly, after day 16 to 18 of infection, total blood was recovered in 50  $\mu$ L heparin (Sanofi-Synthelabo, France), then washed twice in 10 mL PBS and centrifuged at 1600 rpm for 5 min, at room temperature. Parasitized RBCs were separated from other blood cells with a 40% Percoll gradient (Sigma), and centrifuged at 2500 rpm for 30 min. Purified parasitized RBCs were washed twice in PBS and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco). Purity was assessed by Giemsa-stained thin blood smears, and was equal to 100% of infected RBCs among total RBCs.

### **Preparation and maintenance of primary glial cell cultures**

Primary glial cell cultures were established from brains of newborn (0–1 days) C57BL/6 mice. Brains were extracted under sterile conditions, after which meninges

---

were removed and only the cerebrum kept for isolation of the cells. Brain tissues were gently cut in small pieces in dissection medium (PBS, 45% glucose, 2% penicillin/streptomycin). After gentle pipetting, cells were carefully layered twice over 1 mL of FCS, and centrifuged for 10 min at 900 rpm in DMEM. Astrocytes and microglia were resuspended in culture medium (DMEM supplemented with 10% FCS, 1 g/L D-glucose, and 0.1% penicillin/streptomycin), and  $2.5 \times 10^6$  cells were plated in poly-L-ornithine hydrobromide (Sigma) pre-coated culture plates. Cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. After 7 days, the medium was replaced, and cells were incubated for another 7 days before use in further experiments.

Astrocyte/microglial cells at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells were cultured and pre-treated with 80 µg/mL hemin for 1 h, after which parasitized RBCs were added to the cells at a ratio of 5:1 (PbA-infected RBCs to astrocytes/microglia). Control cells remained unstimulated or were only treated with parasitized RBCs. After 48 h, the supernatant was recovered and frozen until the analysis of cytokine levels. Cells were washed twice and removed with a solution of Trypsin-EDTA (Gibco) for further analysis.

---

## CHAPITRE 4. ISOLATION AND PREPARATION OF BRAIN AND SPLENIC CELLS

Brain cell phenotypes were assessed by flow cytometry. Brain cells were isolated using the trypsin-based neural tissue dissociation kit (Milteny Biotec, France) and were purified using a 30% Percoll solution as described previously [270]. Splenocytes were recovered mechanically after crushing spleens. RBCs were removed from brain and spleen cell suspensions with a solution of ammonium-chloride-potassium lysis buffer, and then washed in PBS with 10% FCS before further staining.

### **Brain and spleen cell analysis by cytofluorometry**

Cells recovered from the brain or from *in vitro* cultures were stained with anti-GLAST-phycoerythrin (PE; Milteny Biotec), and anti-CD11b-allophycocyanin (APC), anti-CD16/32-APC Cy7, and anti-CD45-PE Cy7 (all BioLegend, France) antibodies for the detection of astrocytes and microglia. Intracellular staining with anti-GFAP-fluorescein isothiocyanate (FITC; BioLegend) and anti-CD206-peridinin chlorophyll protein (PerCP; BioLegend) antibodies was performed using the Cytotfix/Cytoperm intracellular staining kit (BD Biosciences, France). Single cell suspensions isolated from the brain and the spleen were stained with anti-CD3-APC, anti-NK1.1-FITC, anti-CD4-PerCP, and anti-CD69-PE Cy7 (all BioLegend), and anti-CD8-eFluo 450 and anti-CXCR3-PE (both eBioscience, France) for the detection of CD8 and CD4 T lymphocytes.

### **Assessment of blood–brain barrier permeability**

---

BBB permeability was assessed by Evans blue quantification as described previously [253]. When PbA-infected mice displayed symptoms of ECM, all groups of mice were injected simultaneously with 0.1 mL 2% Evans blue (Sigma). Mice were euthanized 1 h later, and brains were dissected, weighed, and incubated in 2 mL formamide (Sigma) for 48 h at 37°C. Absorbance of extracted dye was measured by spectrophotometry at 620 nm. Evans blue concentration was calculated using a standard curve, and data were expressed as micrograms of Evans blue per gram of brain tissue.

## **CHAPITRE 5. CYTOKINE QUANTIFICATION IN GLIAL CELL CULTURE SUPERNATANTS**

IL-10, TNF- $\alpha$ , and IP-10 levels were measured in cell culture supernatants with the IL-10 and the TNF- $\alpha$  mouse ELISA MAX standard kits (BioLegend) and the IP-10 Quantikine ELISA kit (R&D Systems, France).

### **RNA extraction and quantification by RT-PCR**

Before RNA isolation, organs were disrupted in RLT Buffer lysis solution (Qiagen, France) with a Polytron Homogenizer. RNA was further extracted from organ supernatant homogenates or from primary cell cultures with the RNeasy Mini kit (Qiagen).

---

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng RNA using the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen, France) in a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, France) programmed as follows: 10 min at 25°C, 60 min at 42°C, and 5 min at 85°C. After that, RT-PCR could be performed. Briefly, 5 ng cDNA was mixed with primers (Table S1; Eurogentec, France) and Power SYBR Master Mix (Life Technologies, France). All RT-PCRs were performed in a 7300 RealTime PCR system (Applied Biosystems, France) with a program of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 6 °C. Data were analyzed with the 7300 System software and relative gene expression data were quantified using the  $\Delta\Delta C_t$  method and according to *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* gene (*HPRT1*) expression in control samples.

### **Magnetic resonance imaging**

All MRI experiments were performed on a Biospec 7.0 T / 20 cm machine with a horizontal magnet (Bruker, Ettlingen, Germany). Three MRI sequences were performed, including T2W, diffusion-weighted images (DWI) and MRS.

Animals were first anesthetized with isoflurane and then placed in a dual-coil small animal restrainer containing a volume coil for transmission and a surface quadratic coil for reception of signals. Coil-to-coil electromagnetic interaction was actively decoupled. The respiration rates and waveforms were continuously monitored via a force transducer. The rectal temperature was maintained at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  via a feedback-regulated circulating water pad.

#### *T2-weighted images sequence*

---

Anatomic T2W images were acquired in axial and sagittal planes using the fast spin-echo rapid acquisition relaxation-enhanced (TurboRARE) pulse sequence with the following parameters: repetition time, 5000 ms; echo time, 77 ms; matrix size,  $256 \times 256$  pixels; field of view,  $20 \times 20$  mm; and number of excitation, 4. Acquisition time was 10 min for each T2W sequence. For axial and sagittal images, non-overlapping 0.5-mm-thick slices were acquired.

#### *Diffusion-weighted images sequence*

DWI was performed on a unique axial slice positioned on the cortical and subcortical regions (defined on coronal T2W images). The DWI sequence was performed in three directions [1, 0, 0], [0, 1, 0], [0, 0, 1] for which 6 b values were used to characterize signal decay. The b values were defined as follows: 100, 200, 400, 600, 800, and 1000  $\text{s}/\text{mm}^2$ . The sequence parameters were as follows: field of view,  $20 \times 20$  mm; matrix size,  $128 \times 128$ ; slice thickness, 1 mm; repetition time, 3000 ms; echo time, 33 ms; acquisition time, 8 min. ADCs of tissue were obtained by applying a mono-exponential model fit on the data set. This post process was performed with the Paravision 5.1 (Bruker, Ettlingen, Germany) software.

#### *Magnetic resonance spectroscopy sequence*

T2W axial and sagittal images of brain obtained were used for the positioning of the  $^1\text{H}$ -MRS voxel. Single voxel ( $4.0 \times 0.8 \times 3.8 \text{ mm}^3$ ) volume localized  $^1\text{H}$ -MRS was carried out in the cerebral cortex using the point-resolved spatial selection (PRESS) protocol in conjunction with outer volume suppression and the following parameters: echo time, 20 ms; repetition time, 2.5 s; spectral width, 4000 Hz; number of average, 512; acquisition time, 20 min.

---

The Totally Automatic Robust Quantitation in Nuclear magnetic resonance (TARQUIN) method was used to quantify  $^1\text{H}$ -MRS metabolites, *in vivo* [271, 272]. The TARQUIN algorithm consisted of (i) preprocessing (removal of post-acquisition residual water by Hankel singular value decomposition, automatic phasing); (ii) basis set simulation (quantum mechanical simulation of  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance signals from small molecules); and (iii) solution of a nonlinear least-squares fitting problem (modeling of the experimental data as a linear combination of modified basis signals and, following the adjustment of all segments, re-stimulation of the basis set and synthesis at the new frequencies) [271, 272].

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (version 5; GraphPad Prism Software, USA) and using the non-parametric Mann–Whitney test for pairwise comparisons, or the Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s post-test for multiple comparisons. Fisher’s test was used for determining the impact of heme treatment on preventing cerebral damages during PbA infection.  $p < 0.05$  was considered as significant.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Tatiana Scorza (Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal) for kindly reviewing the manuscript; Dr. Emeric Deruy for helping to optimize the flow cytometry experiments; Marion Draheim for her contribution to the *in vivo* experiments; Nicolas Durieux for the MRI experiments; the staff of the IPL animal facility for animal care; and Lurdes Fernandes for administrative support.

This work was supported by CNRS as well as ARCir “Dynamique” Région Nord-Pas de Calais and the LabEx PARAFRAP: ANR-11-LABX-0024. ED was supported by a doctoral contract with Université Lille 1, the Raman–Charpak award from IFCPAR, the AAP n10 award from the College Doctoral Lille Nord de France and respective awards from the Fondation des Treilles, and the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors have declared that no competing financial interests exist.

**Supplementary Table 1. Sequences of primers used.**

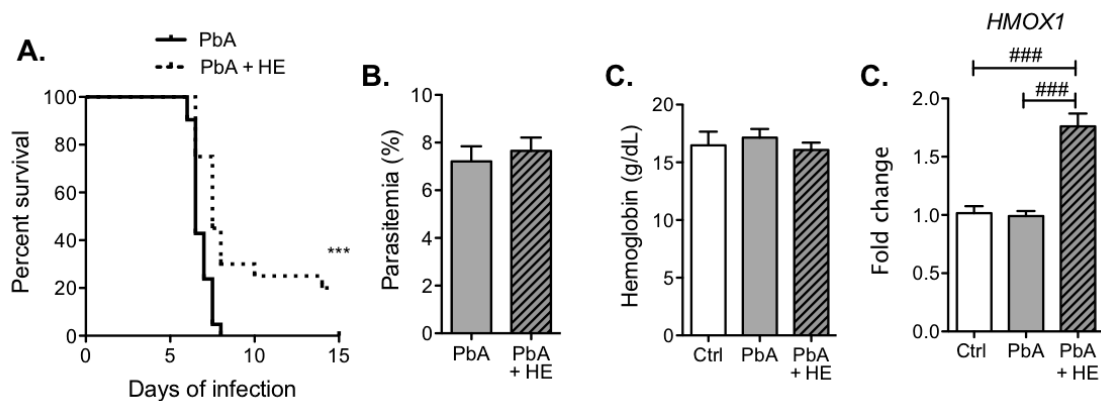
Gene		Sequence
HPRT1	Sense	CCTCCTCAGACCGCTTTTT
	Antisense	AACCTGGTTCATCATCGCTAA
HMOX1	Sense	AGGCTAAGACCGCCTTCCT
	Antisense	TGTGTTCCCTCTGTCAGCATCA
TNFA	Sense	CTGTAGCCCACGTCGTAGC
	Antisense	TTGAGATCCATGCCGTTG
IL10	Sense	CAGAGCCACATGCTCCTAGA
	Antisense	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT



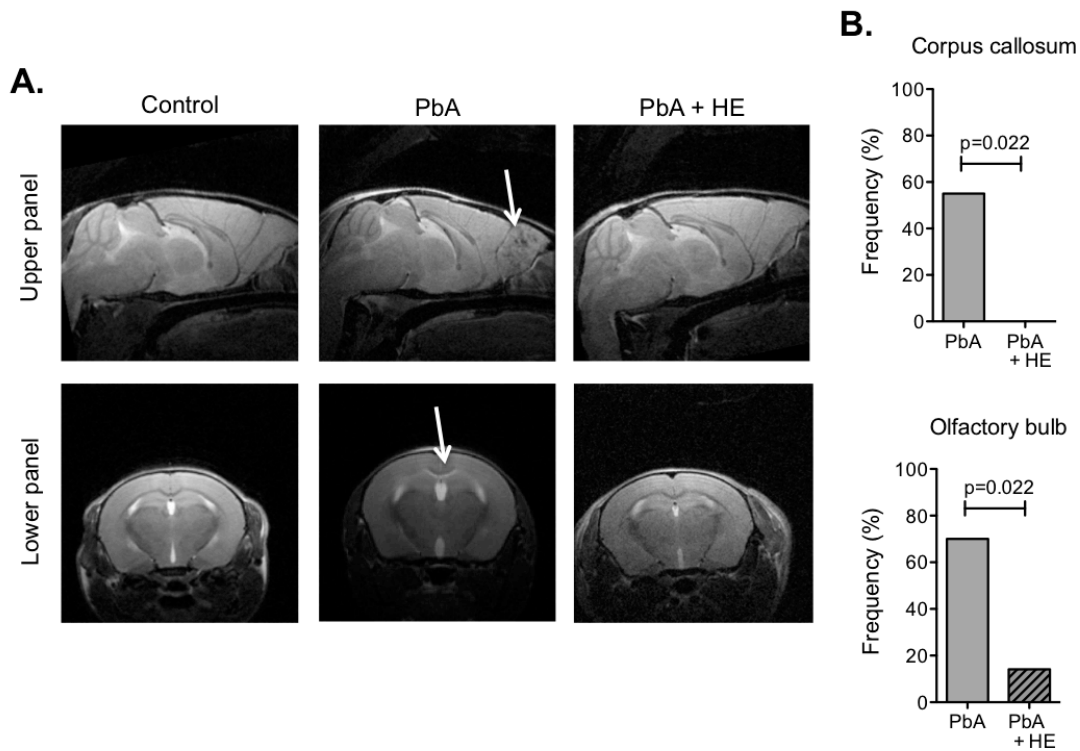
---

IP10	Sense	GCTGCCGTCATTTTCTGC
	Antisense	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT

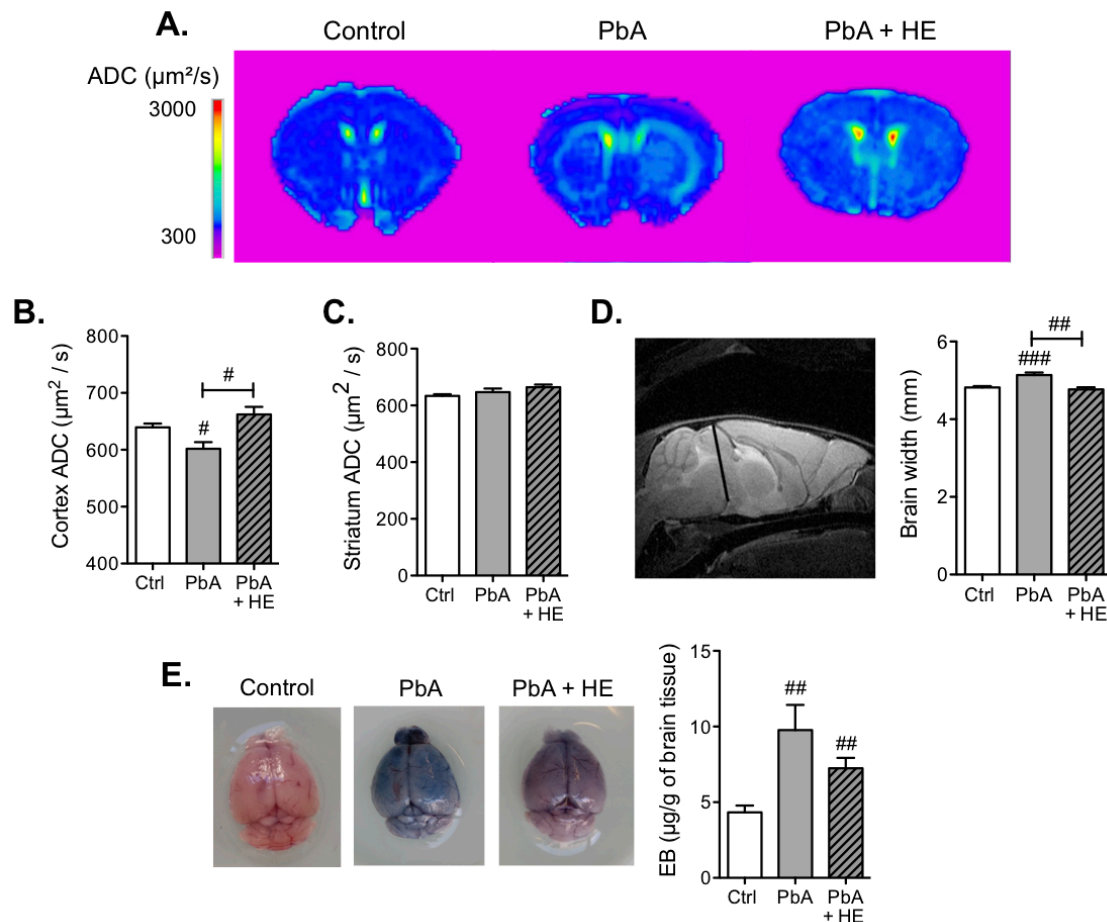
---



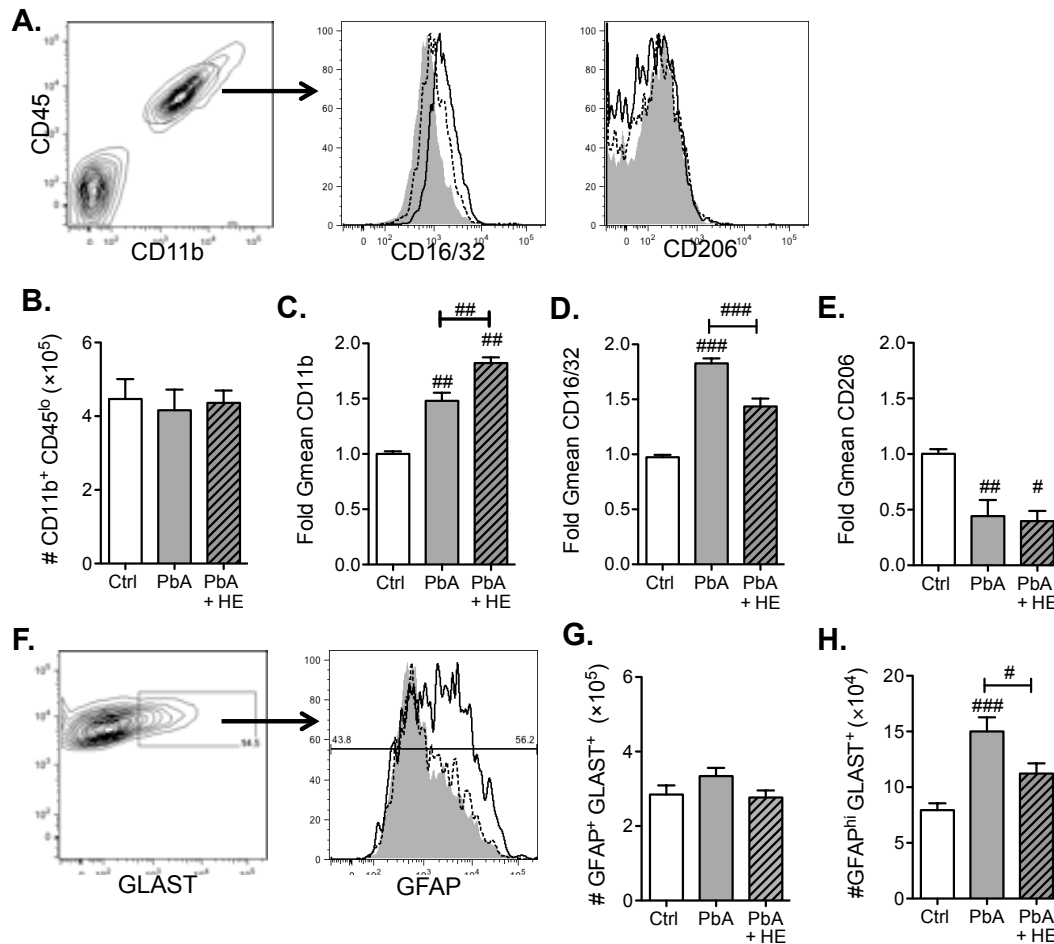
**Figure 1. Heme prevented ECM.** (A) Survival of mice infected with *P. berghei* ANKA (PbA) or with *P. berghei* ANKA and treated with heme (PbA + HE). (B) Parasitemia and (C) hemoglobin levels at day 6 post-infection of control (Ctrl), PbA, and PbA + HE mice. (D) Expression of *HMOX1* was quantified by RT-PCR in spleen cells, at day 6 post-infection. Data in A-C are results from  $n = 20$  and  $21$  mice that were compared using a Mantel-Cox test (A) or a Mann-Whitney test (B, C). Values in D are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments ( $n = 9$  per group) that were compared using a Mann-Whitney test. ###  $p < 0.001$ .



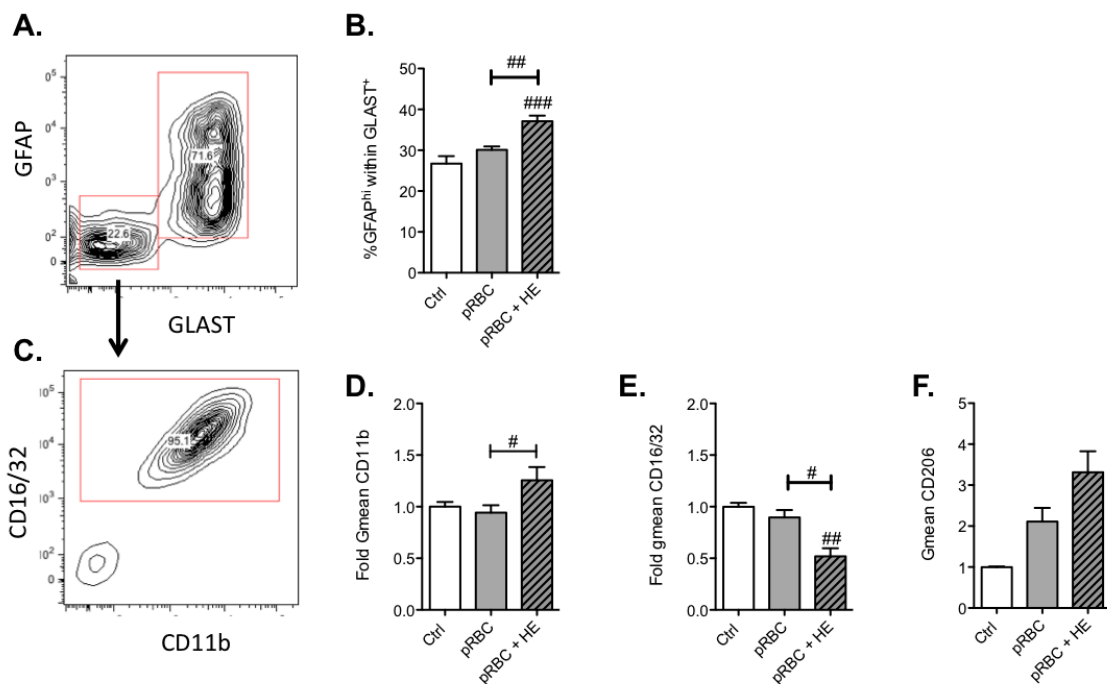
**Figure 2. Heme prevented damage in the olfactory bulb and the corpus callosum.** (A) Sagittal (upper panels) and coronal (lower panel) sections of T2-weighted MRI images from the same control, *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected (PbA + HE) mice, at day 6 post-infection. The white arrow in the upper panel shows hypointense sections in the olfactory bulb, and the white arrow in the lower panel shows hyperintense sections in the corpus callosum. (B) Association of heme treatment with prevention of olfactory bulb and corpus callosum damage calculated by a Fisher's test ( $n = 7-20$ )



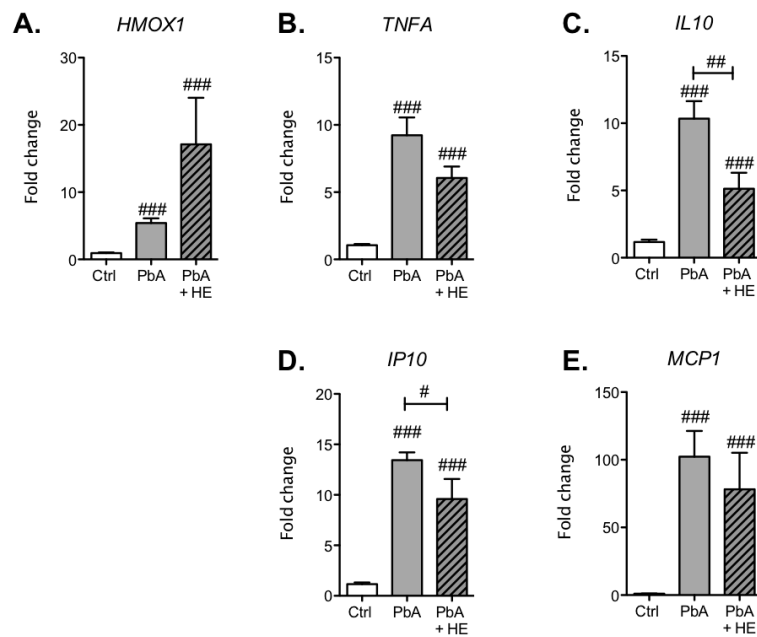
**Figure 3. Heme prevented brain edema but not blood–brain barrier disruption.** (A) Representative apparent diffusion coefficients (ADC) maps from control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected (PbA + HE) mice, at day 6 post-infection. (B) ADC values from the cortex and (C) the striatum. (D) Width of the brain from mid-sagittal T2-weighted MRI images of mice. (E) Evans blue quantification from brains. Results from B–E are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments ( $n > 7$ ). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .



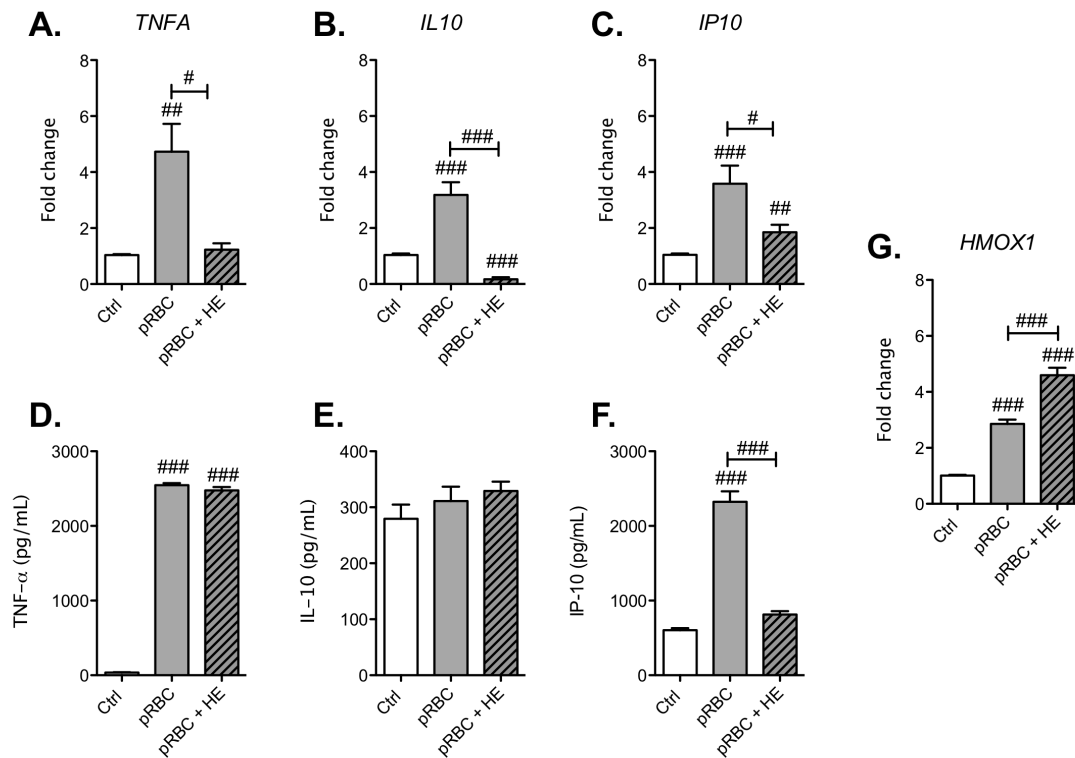
**Figure 4. Treatment of *P. berghei*-infected mice with heme induced a change in the phenotype of glial cells.** (A) Gating strategy for the analysis of microglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>lo</sup>), and (B) total number of microglia in the brain of control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected (PbA + HE), at day 6 post-infection. Fold Geometrical mean (Gmean) expression of (C) CD11b, (D) CD16/32, and (E) CD206 by microglia with respect to Ctrl conditions. (F) Gating strategy for the analysis of astrocytes (GLAST<sup>+</sup>). (G) Total number, and (H) number of activated astrocytes (GFAP<sup>hi</sup>GLAST<sup>+</sup>) in the brain. In A and F, gray histograms represents Ctrl condition, black lines PbA condition, and dotted lines PbA + HE condition. Data are mean ± SEM from three independent experiments (n = 6–14). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. # *p* < 0.05; ## *p* < 0.01; ### *p* < 0.001.



**Figure 5. Heme activated glial cells *in vitro*.** (A) Gating strategy for astrocytes (GFAP<sup>+</sup>GLAST<sup>+</sup>), and (B) the percentage of activated astrocytes (GFAP<sup>hi</sup>) within the GFAP<sup>+</sup>GLAST<sup>+</sup> population. (C) Gating strategy for microglia (CD11b<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>). Relative Gmean expression of (D) CD11b, (E) CD16/32 and (F) CD206 by microglia, with respect to the control (Ctrl) condition. Cells were stimulated with *P. berghei* ANKA-infected red blood cells (pRBC), or were treated with heme (80  $\mu$ g/mL) in addition to pRBC stimulation (pRBC+HE) for 48h. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (n = 9–11). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann-Whitney test. #p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001.

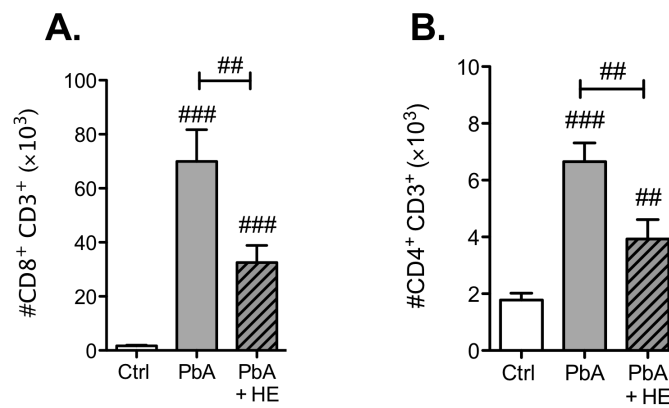


**Figure 6. Infection and heme-treatment modulated the expression of *HMOX1* and cytokines by brain cells.** Expression of (A) *HMOX1*, (B) *TNFA*, (C) *IL10*, (D) *IP10*, and (E) *MCP1* was quantified by RT-PCR in whole-brain cell extracts of control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected mice (PbA + HE), at day 6 post-infection. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments ( $n = 9$ ). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .

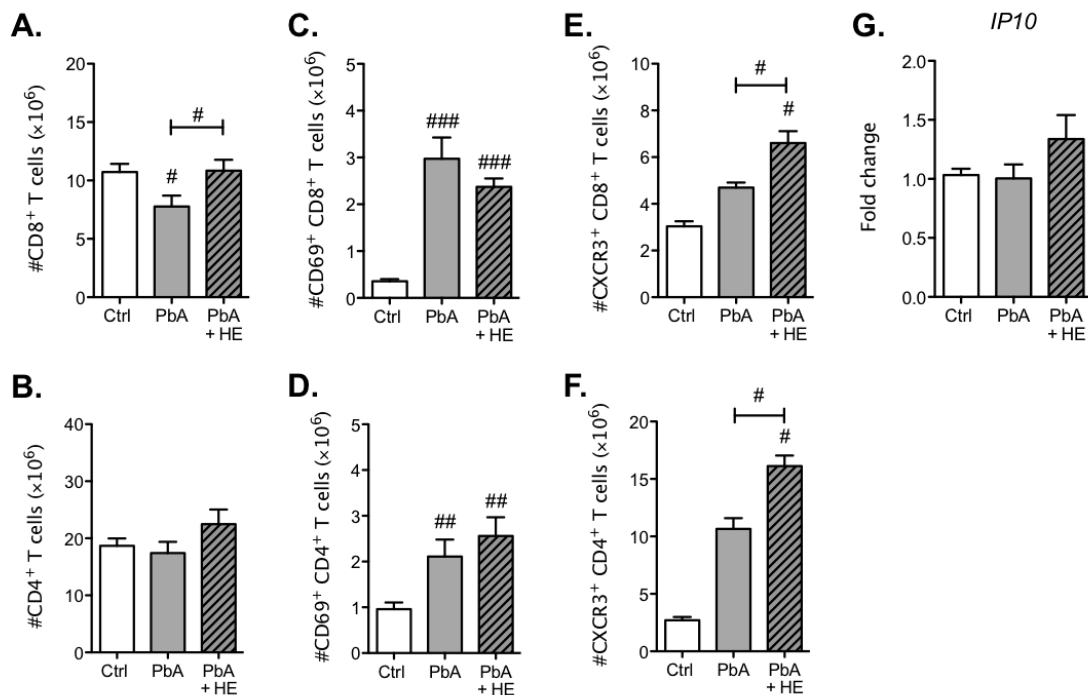


**Figure 7. Heme decreased the production of chemokine by *P. berghei* ANKA-stimulated glial cells *in vitro*.** Expression of (A) *TNFA*, (B) *IL10* and (C) *IP10* by mixed cultures of astrocytes and microglia was quantified by RT-PCR. Production of (D) *TNF-α*, (E) *IL-10* and (F) *IP-10* was measured in cell culture supernatants. Cells were maintained in control conditions (Ctrl), were stimulated with *P. berghei* ANKA-infected red blood cells (pRBC), or were treated with heme (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in addition to pRBC stimulation (pRBC+HE) for 48h. (G) Expression of *HMOX1* was also assessed in cells by RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SEM from at least two independent experiments (n = 4–9). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann-Whitney test. # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001.

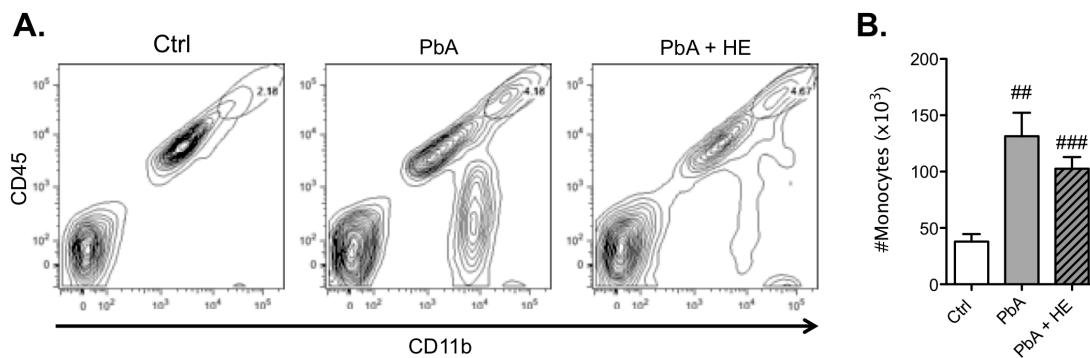




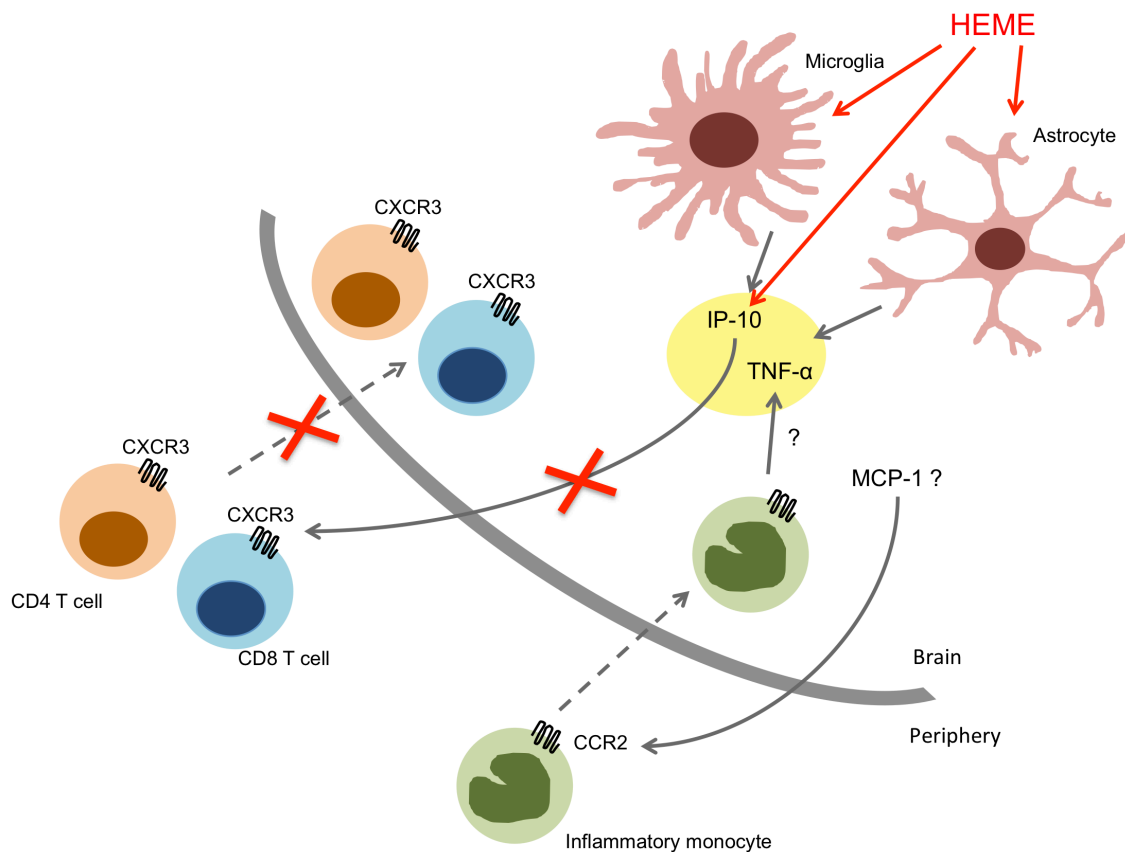
**Figure 8. Heme prevented the recruitment of lymphocytes to the brain.** (A) Number of CD8 T lymphocytes (CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>) and (B) CD4 T lymphocytes (CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) recruited to the brain of control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected mice (PbA + HE), at day 6 post-infection. Data are mean ± SEM from three independent experiments (n = 9–15). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .



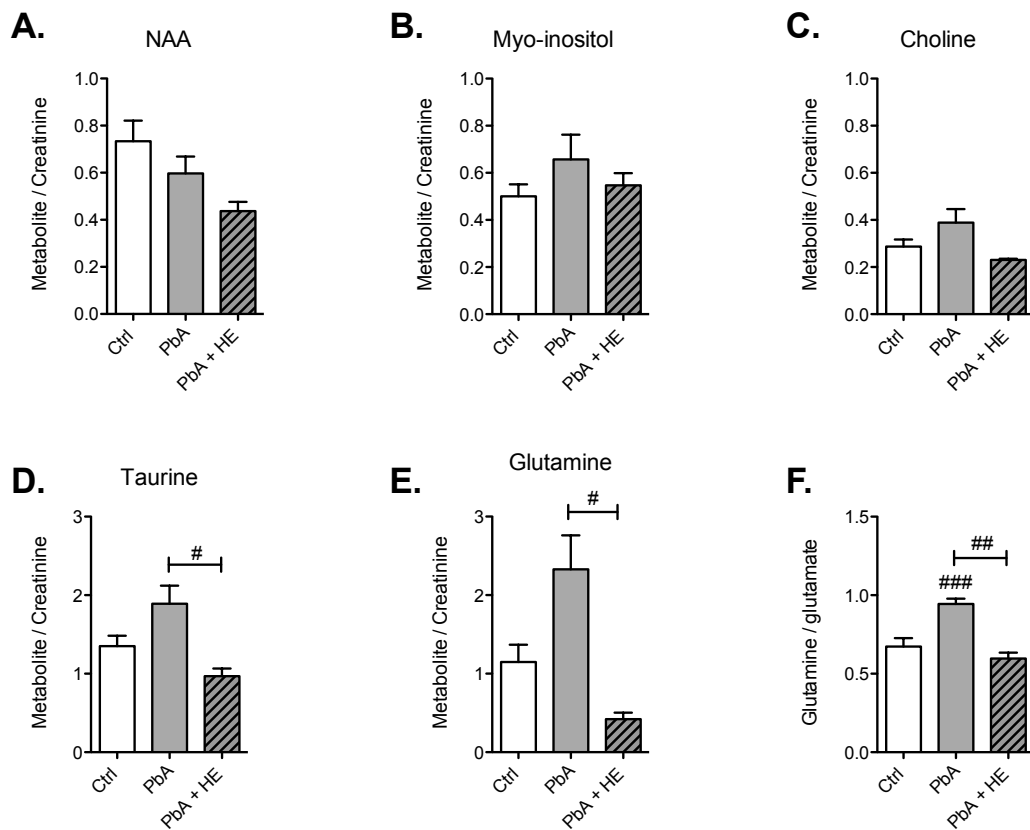
**Figure 9. Heme did not alter the function of T lymphocytes.** Number of total (A) CD8 and (B) CD4 T cells, activated (C) CD8 and (D) CD4 T cells (CD69<sup>+</sup>) and CXCR3-expressing (E) CD8 and (F) CD4 T cells in the spleen of control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA) and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected mice (PbA + HE), at day 6 post-infection. (G) Expression *IP10* was quantified in the spleen of mice at day 6 of the infection by RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (n = 9–15). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .



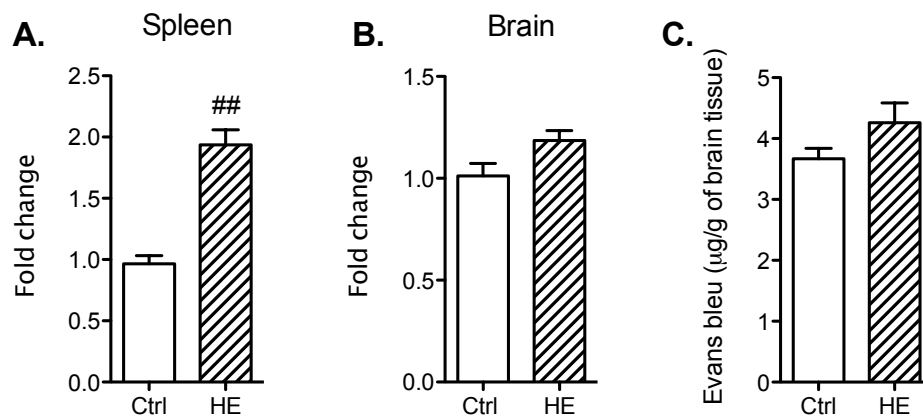
**Figure 10. Heme treatment did not prevent the recruitment of monocytes to the brain of infected mice.** (A) Gating strategies for selecting monocytes (CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>), and (B) number of monocytes in the brain of control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected (PbA + HE), at day 6 post-infection. Data are mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (n = 6–10). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann–Whitney test. ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .



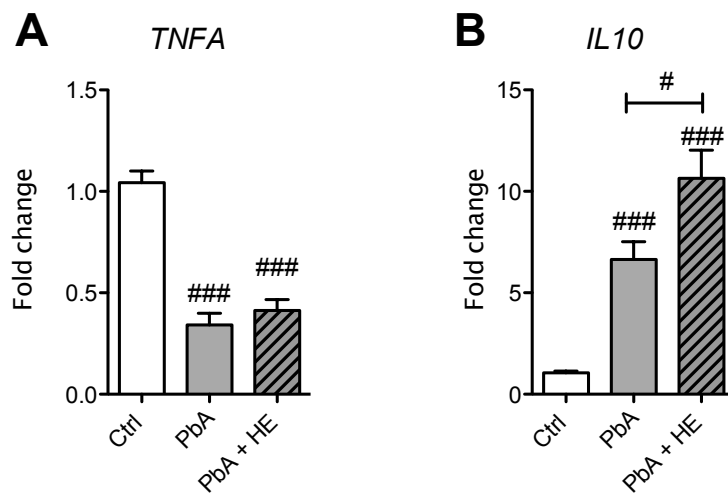
**Figure 11. Heme decreased the recruitment of T cells, but not of monocytes, through the modulation of the response of brain parenchymal cells.** Cerebral malaria is associated with the activation of astrocytes and microglia, and the induction of an M1-like response of microglia. Both these cells produce IP-10, which is involved in the recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressing CXCR3, the receptor of IP-10. In addition, monocytes are also recruited because of the production of MCP-1, and could contribute to the high expression of *TNFA* in the brain. Heme modulates the response of astrocytes and microglia, and dampened their pro-inflammatory phenotype, as well as their production of IP-10. This was consistent with a decreased recruitment of pathogenic T cells to the brain, despite unaltered function of these lymphocytes. However, the response of monocytes was unaffected by heme treatment.



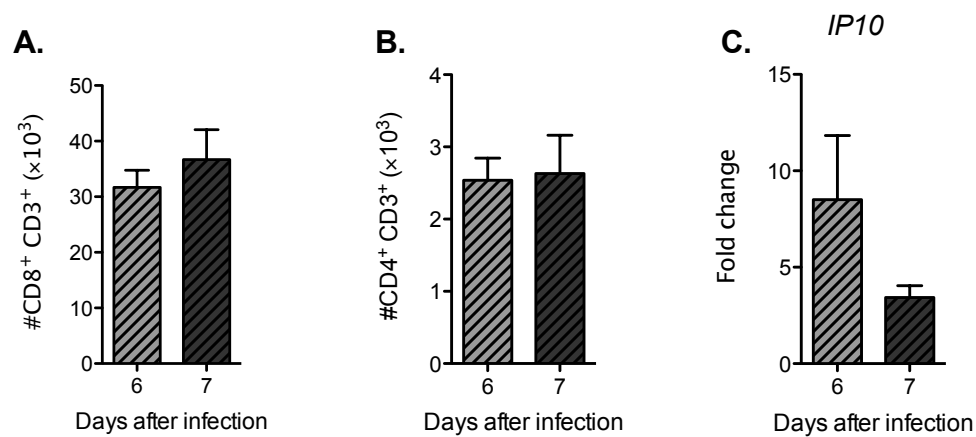
**Figure S1. Brain metabolites quantified by  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy in the cortex.** (A) N-acetylaspartate, (B) myo-inositol, (C) choline, (D) taurine, and (E) glutamine levels were quantified by brain  $^1\text{H}$ -MRS, and were expressed as the relative area of each metabolite compared to the area of creatine. (F) represents the relative levels of glutamine compared to glutamate in control (Ctrl;  $n = 12$ ), *P. berghei* ANKA-Infected (PbA;  $n = 10$ ), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected mice (PbA + HE;  $n = 3$ ), at day 6 of infection. Data are mean  $\pm$  SEM. Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann-Whitney test. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .



**Figure S2. Heme treatment does not affect *HMOX1* expression in the brain of uninfected mice.** Mice received 30 mg/kg hemin intraperitoneally twice daily, for four days, and expression of *HMOX1* was quantified by RT-PCR in (A) spleen and (B) brain of control (Ctrl) and mice treated with heme twice daily for four days (HE). Data are mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (n = 5–6). (C) Evans blue was quantified from brains of Ctrl and HE-treated mice. Data are mean  $\pm$  SEM from obtained from three mice per group. Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann-Whitney test. ##p < 0.01.



**Figure S3. Heme induced and anti-inflammatory response in the spleen.** Expression of (A) *TNFA* and (B) *IL10* was quantified in spleen cells from control (Ctrl), *P. berghei* ANKA-infected (PbA), and heme-treated *P. berghei* ANKA-infected mice (PbA + HE), at day 6 post-infection, by RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (n = 9). Values were compared to the control group or between selected groups using a Mann-Whitney test. # p < 0.05; ### p < 0.001.



**Figure S4. Heme treatment inhibited T cell recruitment to the brain of *P. berghei* ANKA-infected mice at day 7.** Number of total (A) CD8 T lymphocytes, and (B) CD4 T lymphocytes recruited to the brain of *P. berghei* ANKA-infected mice treated with 30mg/kg heme at day 6 and 7 post-infection. (C) Expression of *IP10* was quantified in total brain cells by RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SEM from one experiment (n = 3–5). Values were compared using a Mann-Whitney test.



## 1. Résumé et discussion des résultats du chapitre 3

La physiopathologie du neuropaludisme est complexe et implique l'activation des cellules gliales du parenchyme cérébral, ainsi que l'induction d'une réponse pro-inflammatoire. En analysant des coupes de cerveaux de souris CBA infectées par *P. berghei* ANKA, Medana et al. montrent que les astrocytes et les microglies adoptent un phénotype d'activation, caractérisé par une astrogliose et par une forme amiboïde des microglies [88]. Cependant, à notre connaissance, le phénotype des microglies et des astrocytes au cours du neuropaludisme n'a pas encore été décrit dans la littérature. Nos résultats indiquent que, en plus d'être activées, les microglies adoptent un phénotype de type M1 au jour du développement du neuropaludisme.

Les signes cliniques associés à l'infection apparaissent au cours du cycle érythrocytaire du parasite, et suite à la libération systémique de molécules immunogéniques, telles que l'hème. L'injection d'hème au sixième jour d'infection par *P. berghei* ANKA chez les souris BALB/c résistantes au neuropaludisme est responsable de l'apparition d'un syndrome neurologique [10]. Cependant, l'augmentation de l'expression de *HMOX1*, préalable à l'infection par *P. berghei* ANKA chez les souris C57BL/6, contribue à la résistance de ces souris vis à vis du neuropaludisme [250], et nous montrons que le traitement des cellules gliales avec l'hème induit l'expression de *HMOX1*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'impact de l'hème sur la physiopathologie du neuropaludisme murin varie selon sa cinétique de d'injection et donc vraisemblablement de libération.

---

L'administration d'hème avant l'infection des souris est comparable d'une certaine manière aux conditions rencontrées lors des hémoglobinopathies, des maladies chroniques qui confèrent une protection vis à vis des formes graves de paludisme chez l'Homme [250]. Ici, nous avons injecté différentes concentrations d'hème à des souris C57BL/6 à partir du troisième jour d'infection pour déterminer si la cinétique de libération d'hème chez les individus non atteints d'hémoglobinopathies influence le développement des formes graves de paludisme. L'injection de quantités élevées d'hème (60mg/kg) semble toxique, ce qui est en accord avec l'augmentation importante des niveaux élevés mesurés dans le sérum de souris au moment du neuropaludisme [10]. Cependant, aux plus faibles concentrations (jusqu'à 30mg/kg), nos résultats montrent une protection de l'hème contre le développement du neuropaludisme qui est dépendante de la dose injectée aux souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA. Dans notre étude l'ensemble des souris infectées par *P. berghei* ANKA meurent de neuropaludisme, et nous envisageons que l'effet protecteur de l'hème pourrait être plus prononcé chez des souris moins sensibles au neuropaludisme. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

De même que Cambos et al. qui montrent l'induction d'une réponse à l'hème de type 2 chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse [38], nos résultats suggèrent que le traitement *in vitro* des cellules gliales avec l'hème favorise une réponse M2 chez les microglies. En effet, nous montrons une augmentation de l'expression du marqueur CD206, et une diminution de l'expression des molécules *CD16* et *CD32* par les microglies traitées avec de l'hème [254]. Notons que l'effet de l'hème *in vivo* et *in vitro* sur les microglies stimulées ou non par des globules rouges parasités est également associée à la diminution de

---

la réponse de type M1. L'ensemble de ces résultats indique un impact important de l'hème dans l'induction d'une réponse de type 2 chez les microglies, qui est par ailleurs associée à une réponse réparatrice dans les cas de maladies neurodégénératives [105, 254]. En accord avec les résultats publiés par Wagener et al. [273], l'injection d'hème chez des souris C57BL/6 non infectées n'altère pas l'expression des gènes codant des cytokines par les cellules du cerveau. Ceci suggère donc qu'une rupture préalable de la BHE soit nécessaire afin que l'hème puisse exercer son effet immunomodulateur sur les cellules gliales *in vivo*.

Nous avons également mis en évidence que l'hème augmente la production de TNF- $\alpha$  par les cellules gliales *in vitro*. Cependant, nous n'observons pas de différence quant à la production de cette cytokine lorsque les cellules ont été simulées avec des globules rouges parasités, et traitées ou non avec de l'hème. De même, l'injection d'hème chez les souris infectées par *P. berghei* ANKA, en comparaison aux souris infectées non traitées, ne modifie pas l'expression de *TNFA* par les cellules du cerveau. Néanmoins, le rôle de TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives reste ambigu, car au cours de ces maladies, le TNF- $\alpha$  est à la fois associé aux mécanismes de démyélinisation et de remyélinisation [114, 254]. Par ailleurs, on note aussi que les souris déficientes en TNF- $\alpha$  ne sont pas résistantes au neuropaludisme au contraire des souris déficientes en IP-10, qui le sont [116, 117].

L'IP-10 est impliqué dans la pathogenèse du neuropaludisme en contribuant au recrutement des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans le cerveau [116, 117]. Au cours de l'infection par *P. berghei* ANKA, l'expression de *IP10* augmente au moment de l'apparition des signes cliniques (données non publiées), ce qui

---

expliquerait la migration tardive des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans le cerveau. Ainsi, dans notre étude, la diminution du nombre de lymphocytes T CD4 et T CD8 constatée chez les souris infectées et traitées avec l'hème est vraisemblablement liée à la diminution de l'expression de *IP10* par les cellules du cerveau, et non pas à une anomalie de la réponse des lymphocytes T CD4 et T CD8, comme le suggère les niveaux d'activation similaires entre les deux groupes de souris infectées. Pour éliminer la possibilité d'un délai dans l'induction de la migration des lymphocytes, nous avons également analysé les cerveaux des souris traitées au septième jour de l'infection, sans constater de recrutement lymphocytaire ni de différences quant à l'expression de *IP10* par les cellules du cerveau (données non publiées).

Outres les lymphocytes, les monocytes jouent également un rôle important dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives chez l'Homme et chez la souris [105, 254, 268]. Dans notre étude, le nombre de monocytes recrutés dans le cerveau reste inchangé lorsque les souris infectées ont été traitées avec de l'hème, en comparaison aux souris infectées non traitées. D'après Pai et al., la déplétion des souris C57BL/6 en monocytes avant leur infection par *P. berghei* ANKA les protège du neuropaludisme par un mécanisme associé à la diminution du recrutement des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans le cerveau [119]. Cependant, dans nos expériences, alors que le traitement par l'hème empêche le recrutement des lymphocytes T CD4 et T CD8 dans le cerveau, 70% des souris développent un neuropaludisme. Ces résultats supposent donc que ces monocytes pourraient être responsables des atteintes neurologiques, notamment par la production de TNF- $\alpha$ . En effet, au cours des maladies neurodégénératives, les monocytes inflammatoires sont recrutés au niveau du cerveau de par leur capacité à répondre à une stimulation par le

---

MCP-1, produisent du TNF- $\alpha$  et participent à la réponse inflammatoire importante dans le cerveau [105, 254, 268]. Néanmoins, nous ne pouvons non plus pas exclure la participation d'autres cellules, comme les polynucléaires neutrophiles qui sont également recrutés dans le cerveau des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA et produisent du TNF- $\alpha$  [274].

Tel que son nom l'indique, le MCP-1 est responsable du recrutement des monocytes. Nos résultats indiquent une augmentation très importante de l'expression de *MCP1* dans les cerveaux qui est cohérente avec les niveaux élevés mesurés dans les sérums de souris atteintes de neuropaludisme [275]. A ce jour peu d'études se sont concentrées sur l'impact de cette chimiokine dans la physiopathologie du neuropaludisme. Les souris déficientes en CCR2, le récepteur de MCP-1, ne sont pas résistantes au neuropaludisme, mais ceci est vraisemblablement lié au fait que chez ces souris la migration des cellules T CD8 dans le cerveau n'est pas affectée [269]. Chez les modèles murins de sclérose en plaque, l'expression de *MCP1* par les astrocytes augmente au moment du développement des atteintes neurologiques, et est concomitante avec le recrutement cérébral des monocytes et avec la formation de plaques de démyélinisation [276]. De même, les souris déficientes en CCR2 sont résistantes à l'encéphalomyélite auto-immune, ce qui souligne l'importance du rôle de MCP-1 et de son récepteur dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives [276].

Ainsi, l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montre un rôle immunomodulateur de l'hème sur la réponse des cellules gliales. L'hème diminue notamment la réponse de type M1 des microglies dans le contexte d'une infection par *P. berghei* ANKA, et inhibe l'expression de *IP10* par les

---

cellules du cerveau ainsi que le recrutement lymphocytaire. Malgré la diminution de ces réponses, 70% des souris traitées avec l'hème développent un neuropaludisme. Comme le traitement par l'hème des souris infectées n'affecte pas la migration des monocytes, nous suggérons que ces cellules contribuent de manière importante à la physiopathologie du neuropaludisme murin. Pour conclure, nous soulignons la complexité des mécanismes immunologiques impliqués au cours du neuropaludisme murin, et montrons que l'augmentation précoce d'hème au cours de l'infection contribue en partie, à une protection des souris vis à vis de cette complication du paludisme.

**PARTIE III. DISCUSSION GENERALE  
ET CONCLUSION**

---





---

## DISCUSSION GENERALE

### 1. Origine de l'hème libre

#### 1.1. Cycle érythrocytaire du parasite

Pendant sa phase érythrocytaire, *Plasmodium* dégrade 60-80% de l'hémoglobine en fragments protéiques et en hème libre par un mécanisme impliquant des protéases [187]. La capacité de formation *de novo* des acides aminés par le parasite étant limitée, la dégradation de l'hémoglobine est essentielle à sa maturation [187]. Cependant, la libération d'hème sous forme libre conduit à l'oxydation du fer présent au centre de la protoporphyrine, et induit la production d'ERO par la réaction de Fenton. Le parasite et les globules rouges sont équipés d'antioxydants [superoxyde dismutase et catalase] qui leurs permettent de faire face à ce stress oxydatif [277]. En parallèle, l'hème est détoxifié à 95% par polymérisation dans la vacuole digestive sous la forme d'un cristal relativement inerte, l'hémozoïne [187, 277]. Lors de la lyse des globules rouges parasités, les 5% d'hème libre restant sont déversés dans le système circulatoire.

#### 1.2. Élimination des globules rouges sains

D'après des études réalisées *in vitro*, l'hème fragilise les érythrocytes sains et diminue leur déformabilité par oxydation des lipides membranaires et des

---

protéines du cytosquelette [28, 29]. La structure planaire et hydrophobe de l'hème lui permettraient également de s'insérer entre les doubles feuillets phospholipidiques des érythrocytes, et de cette façon, de contribuer à l'augmentation de la rigidité membranaire de ces cellules [29]. Ainsi, l'hème participerait à la lyse importante des globules rouges sains, et à la libération d'hémoglobine dans le compartiment sanguin.

L'hémoglobine extracellulaire se lie à l'haptoglobine, une protéine positive de l'inflammation, c'est à dire dont la production augmente au pendant des situations inflammatoires. Le complexe hémoglobine-haptoglobine est par la suite pris en charge par les cellules phagocytaires. Cependant, l'haptoglobine est dégradée conjointement avec l'hémoglobine, et de cette façon l'hémolyse est associée à une diminution importante, voire à une disparition (anhaptoglobinémie) des niveaux systémiques d'haptoglobine [18, 23, 278]. Dans ce contexte, l'hémoglobine libre est accumulée en circulation et est rapidement oxydée en méthémoglobine, et l'hème ayant une plus faible affinité pour la méthémoglobine, il se dissocie de la structure protéique [277]. L'hème libre pourrait également avoir pour origine la libération extracellulaire d'autres hémoprotéines, comme la myoglobine. En effet, en étudiant des marqueurs de sévérité du paludisme à *P. falciparum*, Bachmann et al. ont observé la signature d'une destruction musculaire chez les enfants atteints de neuropaludisme caractérisée par l'augmentation des niveaux plasmatiques de myoglobine, de créatine kinase et d'anhydrase carbonique III [279]. Le stress oxydatif lié à l'infection, en coopération avec les altérations hémorhéologiques induites par la séquestration des parasites, conduirait aux atteintes des muscles lisses vasculaires et striés [279, 280]. De même, nous montrons une corrélation positive entre les niveaux plasmatiques d'hème et d'HO-1 (Chapitre 2) ; l'HO-1

étant strictement intracellulaire, ces résultats pourraient traduire le déversement simultané d'hème et d'HO-1 en circulation suite à une cytolyse.

### 1.3. Rôle de l'hémopexine

L'hème confère aux hémoprotéines leur activité physiologique de par la capacité du fer présent au centre de la protoporphyrine à changer son état redox de façon réversible [5]. Par exemple, l'hème exerce l'activité catalase et permet le transport de l'oxygène par l'hémoglobine [6, 11]. Cependant, à l'état libre l'hème est délétère car il stimule la production d'ERO par la réaction de Fenton, il module l'expression de gènes, et induit également la mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose [6, 11].

L'hème libre est principalement pris en charge par l'hémopexine ; le complexe hème-hémopexine est internalisé par les cellules phagocytaires, et l'hème est ensuite dégradé par l'HO-1. Comme l'haptoglobine, l'hémopexine est également une protéine positive de l'inflammation [22]. Ainsi, chez la souris son expression hépatique augmente dans les cas d'encéphalite auto-immune [19], de même que un à trois jours après une hémolyse induite par une simple dose de phénylhydrazine [278]. Enfin, les concentrations plasmatiques d'hémopexine sont également plus élevées au treizième jour d'une infection par *P. yoelii* 17XNL en comparaison aux souris naïves [21]. Similairement, la concentration sérique du précurseur de l'hémopexine est plus élevée dans les cas d'accès simples à *P. falciparum* en Inde [23].

Bien que le foie soit le principal organe qui assure la production systémique d'hémopexine, d'autres cellules la produisent également comme par exemple les neurones et les astrocytes [20], ce qui permettrait une dégradation de l'hème

---

dans le cerveau. L'injection d'hème chez les souris déficientes en hémopexine est associée à une diminution de la perméabilité vasculaire et à une peroxydation lipidique dans le foie [24]. Ceci souligne le rôle primordial de l'hémopexine dans le processus de détoxification de l'hème.

## **2. Facteurs influençant l'accumulation d'hème**

L'hème est libéré lors de situations de cytolyses, comme lors d'une infection par *Plasmodium*, pendant les hémoglobinopathies, les accidents vasculaires cérébraux, ou les rhabdomyolyses (Figure 5). D'après notre analyse réalisée à Cuttack, nous constatons une corrélation des niveaux plasmatiques d'hème avec la biomasse parasitaire, appréciée par le dosage de HRP-2 dans les plasmas. Alors que les niveaux d'hème ne corrélaient pas avec le taux d'hémoglobine, ces observations suggèrent que les taux d'hème augmentés proviendraient majoritairement de la lyse des globules rouges parasités, avec une plus faible contribution de la lyse des globules rouges sains (Article 2). Cependant, l'accumulation d'hème libre pourrait également être liée à la saturation des mécanismes de détoxification.

### **2.1. Diminution des niveaux d'hémopexine : dégradation ou altération de sa production ?**

Comme il l'a été décrit dans les cas d'hémoglobinopathies [18], les niveaux d'hème plasmatiques sont négativement corrélés aux concentrations plasmatiques en hémopexine lors des infections par *P. falciparum* en Inde (Article 2). De plus, chez les modèles expérimentaux murins, l'hémolyse causée par la phénylhydrazine (Chapitre 1), ainsi que l'injection d'hème, diminuent au moins de moitié la concentration d'hémopexine plasmatique, en comparaison

---

aux souris naïves (Article 1). Contrairement à ce qui a été décrit antérieurement, nous montrons une diminution des niveaux d'hémopexine dans le plasma suite à l'injection de phénylhydrazine [278]. Cette différence pourrait être liée au fait que : (i) nous avons injecté deux fois plus de phénylhydrazine, (ii) deux jours de suite, (iii) et que nous analysons les niveaux d'hémopexine six jours après la dernière injection. Néanmoins, ces résultats suggèrent que bien que la production d'hémopexine augmente dans les situations inflammatoires, les quantités ainsi produites pourraient être insuffisantes pour endiguer l'augmentation importante d'hème en circulation. Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que l'hémopexine est dégradée en même temps que l'hème suite à la phagocytose du complexe hème-hémopexine. Bien que séduisante, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer, que contrairement à l'haptoglobine, la disparition quasi-totale de l'hémopexine plasmatique n'a pas pour le moment pas été décrite dans la littérature, ni observée dans notre étude à Cuttack (Article 2). Aussi, nous proposons que la synthèse hépatique de l'hémopexine soit insuffisante pour compenser la dégradation de cette protéine après phagocytose du complexe hème-hémopexine.

D'après plusieurs observations, l'hème seul n'est pas responsable d'atteintes hépatiques. En effet, l'injection d'hème chez des souris naïves n'est pas associée à une rupture de la perméabilité vasculaire, ni à la peroxydation des lipides hépatiques, ni à une augmentation de l'activité d'aspartate aminotransférase mesurée dans les sérums [24, 53]. Cependant, l'accumulation d'hème dans le foie de souris BALB/c infectées par *P. yoelii* induit une nécrose des tissus hépatiques qui est prévenue par la deferoxamine, un chélateur du fer [212]. Ces résultats suggèrent fortement un rôle hépatotoxique de l'hème au cours

d'une infection par *Plasmodium* chez la souris. Par ailleurs, l'injection d'hème 2 à 24h après l'induction d'un sepsis sévère chez la souris BALB/c est également associée à une augmentation des niveaux sériques d'aspartate aminotransférase [53]. Alors que cette transaminase n'est pas spécifique du foie, et que dans cette étude de Larsen et al. son augmentation est associée à des niveaux sériques élevés de créatine kinase, ces paramètres pourraient également traduire des atteintes musculaires [53]. Néanmoins, pour compléter leur hypothèse sur l'activité hépatotoxique de l'hème, l'équipe de Soares a montré que le traitement de cultures primaires d'hépatocytes de souris avec de l'hème, suivi par une stimulation des cellules avec du peroxyde d'hydrogène, du peroxyde d'azote ou du TNF- $\alpha$ , induit l'apoptose de ces cellules, contrairement au traitement des hépatocytes avec de l'hème seul, ou avec l'un des trois autres composés cités [53, 281]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'hème est responsable d'une cytolyse hépatique lorsque sa libération est associée à un contexte inflammatoire.

Chez l'Homme, l'activité de l'alanine aminotransférase corrèle avec les niveaux plasmatiques d'hème total chez les patients à Cuttack. Nous rapportons également une tendance à la hausse des niveaux d'hème total dans les cas d'hépatopathies, et nous envisageons que l'absence de significativité observée soit reliée au faible nombre de patients étudiés (Article 2). Néanmoins, ces résultats peuvent aussi bien traduire une conséquence et/ou la cause des niveaux élevés d'hème durant les hépatopathies. En effet, l'hème étant cytolytique, son accumulation pourrait aussi bien induire, qu'être le résultat d'une cytolyse hépatique. Ceci traduirait donc l'existence d'un réseau qui se mettrait en place et contribuerait à l'accumulation systémique d'hème (Figure 10). Les hépatopathies associées au paludisme par *P. falciparum* sont fréquentes

en Inde, et font généralement parties d'un tableau clinique associant plusieurs défaillances organiques [282]. À Cuttack, sur les 46 patients infectés par *P. falciparum* et présentant une hépatopathie, 34 avaient au moins un autre organe atteint (Article 2). Enfin, chez l'Homme comme chez la souris, l'hémopexine étant principalement produite au niveau du foie, nous proposons que les atteintes hépatiques induites par l'hème au cours de l'infection par *Plasmodium* affectent la production d'hémopexine, et contribuent de cette façon à l'accumulation systémique d'hème libre.

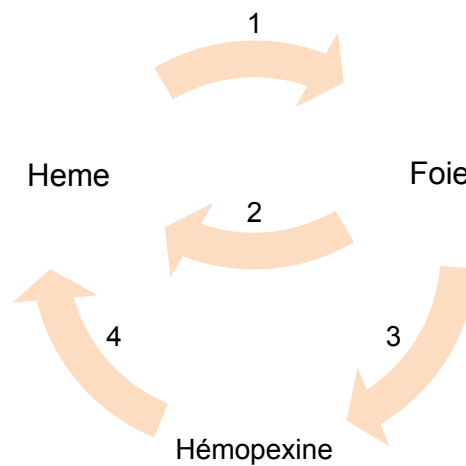


Figure 10. Hème et hépatopathies.

(1) L'accumulation d'hème libre est responsable d'hépatopathies, et (2) la destruction des cellules du foie participe à l'accumulation d'hème par la libération d'hémoprotéines en circulation. (3) L'hémopexine étant produite par le foie, les atteintes hépatiques contribueraient à une diminution des niveaux d'hémopexine plasmatiques, et de cette façon (4) à une accumulation d'hème.

## 2.2. Polymorphisme de *HMOX1*

Chez le modèle murin, l'expression précoce de HO-1 est un facteur déterminant dans la résistance de formes graves du paludisme (neuropaludisme, atteintes

hépatiques) [250, 281]. Chez l'Homme, un polymorphisme de microsatellite (GT)<sub>n</sub> a été décrit au niveau du promoteur de *HMOX1*, qui est associé à des variabilités dans les niveaux de transcription de *HMOX1*. En effet, les fragments de n = 22 répétitions de (GT) sont associés à une transcription plus importante du gène que le sont les fragments de n = 30 répétitions chez des patients chinois [248]. Walther et al. ont rapporté des résultats inverse en Gambie : le niveau d'expression de *HMOX1* augmente chez les patients possédant un nombre de répétitions (GT) > 32 [223]. Cependant, outre les différences de structures génétiques des deux populations (chinoise et gambienne), l'approche expérimentale suivie par les deux équipes était également différente. Ainsi, Chen et al. ont transfecté des fragments géniques humains de différentes longueurs dans des cellules musculaires aortiques de rats pour analyser la transcription des gènes [248], alors que dans l'étude de Walther et al. l'analyse transcriptionnelle a été réalisée à partir de sang total de patients [223]. La composition en populations lymphocytaires varie avec la sévérité du paludisme, et l'expression de *HMOX1* est plus ou moins importante en fonction de la population cellulaire considérée. Ainsi, dans le sang périphérique, *HMOX1* est principalement exprimé par les polynucléaires neutrophiles, suivi par les monocytes et les lymphocytes [223]. D'après nos résultats préliminaires, le génotype C/C est associé à une protection vis à vis des formes graves de paludisme à Cuttack, ce qui coïncide avec l'activité transcriptionnelle élevée décrite pour l'allèle C. Néanmoins, les niveaux d'hème total mesurés dans le plasma sont similaires en fonction du génotype, ce qui suggère que le polymorphisme de *HMOX1* ne serait pas le seul facteur permettant d'expliquer la susceptibilité au paludisme grave dans notre population étudiée (Chapitre 2).



L'hème induit l'expression intracellulaire de HO-1 [223]. Néanmoins, nous suggérons que la corrélation positive entre les niveaux plasmatiques de HO-1 et d'hème total que nous observons chez les patients atteints de paludisme et de sepsis sévère est le résultat d'une cytolyse plutôt que d'une augmentation de la transcription de *HMOX1* (Chapitre 2). Malgré la différence de la réponse immunitaire observée chez les patients atteints de sepsis sévère à Cuttack (Annexe 2), cette pathologie est associée à une destruction multi-organique similaire aux formes graves de paludisme [53]. Enfin, l'activité de HO-1, mesurée à partir de protéines extraites du sang périphérique, diminue dans les cas de neuropaludisme en comparaison aux accès simple, et pourrait de cette façon contribuer à l'accumulation d'hème en circulation (Chapitre 2).

### 3. Hème et paludisme grave

Plusieurs études suggèrent un rôle délétère de l'hème libre en circulation. L'hème est impliqué dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires [283], et participe à la gravité du sepsis sévère [53]. De même, le pourcentage d'enfants ayant de l'hème urinaire augmente avec la sévérité de l'infection à *P. falciparum* en Zambie [188], ainsi que le taux de méthémoglobine circulant [189]. Les niveaux d'hème plasmatique sont plus élevés dans les cas de paludisme symptomatique à *P. vivax*, en comparaison aux patients asymptomatiques au Brésil [3], ce qui indique que l'effet délétère de l'hème ne semble pas spécifique de l'espèce de *Plasmodium*.

De façon comparable, plusieurs données suggèrent un rôle de l'hème dans la physiopathologie du paludisme grave chez la souris, en participant au développement d'atteintes hépatiques tel que cité plus haut, mais aussi au neuropaludisme [10, 212].

### 3.1. Anémie sévère

L'injection d'hème pendant trois jours n'altère pas le taux d'hémoglobine chez les souris C57BL/6 ou chez les souris BALB/c (Articles 1 et 4). Cependant, lorsque les souris BALB/c sont prétraitées avec de l'hème avant d'être infectées par *P. c. adami* DK, l'anémie est aggravée dès le deuxième jour de l'infection, et ceci malgré une augmentation des niveaux d'EPO mesurés dans les plasmas (Article 1). En sus de la capacité de l'hème à fragiliser les globules rouges sains par un mécanisme impliquant les ERO [28, 29], nous montrons que l'érythropoïèse est altérée, tel que proposé par la diminution du nombre de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse et la rate (Article 1).

Au cours de l'érythropoïèse médullaire et splénique, les érythroblastes s'organisent autour d'un macrophage central qui assure le maintien d'un environnement adéquat à la maturation des cellules érythroïdes [284]. L'orientation de la réponse immunitaire de type 2 induite par l'hème pourrait contribuer à une réponse inadaptée de ces macrophages [38]. En effet, l'IL-10 inhibe la formation de BFU-E à partir de cellules mononuclées du sang périphérique, en diminuant la production de GM-CSF par les macrophages [166], alors que la déplétion en IL-12 inhibe la prolifération des progéniteurs érythroïdes CFU-E et BFU-E de la rate et de la moelle osseuse [186]. De plus, l'hème ainsi que la phagocytose des érythrocytes oxydés par l'hème entraînent l'apoptose des macrophages [39], ce qui est en accord avec la diminution du nombre de macrophages que nous rapportons dans la rate de souris traitées avec l'hème (Article 1). Dans les cas de stress hémolytique chez la souris, la rate est le siège de l'érythropoïèse, et les macrophages spléniques sont indispensables pour recouvrir d'une anémie [185, 285].

### 3.2. Insuffisance rénale palustre et neuropaludisme

Par le biais d'une étude de terrain réalisée à Cuttack, nous avons montré que les niveaux d'hème plasmatique corrèlent positivement avec les niveaux d'EPO plasmatique (Article 3), et avec la sévérité du paludisme à *P. falciparum* (Articles 2 et 3). Cependant, dans notre cohorte l'anémie palustre sévère est rare (n = 9).

Sur les 237 patients infectés par *P. falciparum*, plus de 75% étaient atteints de formes graves de paludisme, et présentaient différents tableaux cliniques, avec des défaillances de un à quatre organes. Les atteintes multi-organiques, où cerveau, foie, et reins sont affectés, sont de plus en plus courantes en Inde [209]. À Cuttack, les atteintes cérébrales sont les plus fréquentes (chez 38% des infections), suivies par les insuffisances rénales palustres (Article 2). Nous montrons pour la première fois que les concentrations d'hème plasmatique augmentent avec la sévérité du paludisme, et plus particulièrement au cours du neuropaludisme et de l'insuffisance rénale (Article 2).

Le rein semble être l'organe le plus vulnérable à l'hème [218]. En effet, l'hémolyse induite par l'injection de phénylhydrazine, ainsi que l'injection d'hème chez les souris, induisent dans les deux cas des atteintes au niveau des tissus rénaux [24, 53, 278]. De même, les maladies hémolytiques chroniques et aiguës engendrent des insuffisances rénales chez l'Homme [277, 286], et la rhabdomyolyse qui accompagne les infections sévères à *P. falciparum* pourraient également contribuer à l'apparition de ces atteintes [280, 287, 288]. En effet, Davis et al. montrent une corrélation positive entre les niveaux de myoglobines et de créatinine mesurés dans le sérum de patients infectés par *P. falciparum* [280].

L'hémolyse qui accompagne les hémoglobinopathies n'est pas vectrice de syndromes neurologiques, contrairement aux situations hémolytiques associées à un contexte infectieux, comme le syndrome hémolytique et urémique. D'une manière similaire, l'injection d'hème chez des souris BALB/c ou C57BL/6 naïves n'induit pas de syndrome neurologique (Article 1, Chapitre 3), ou de rupture de la BHE [273]. Au regard de ces observations, Lin et al. ont injecté près de 9mg/Kg d'hème chez des souris C57BL/6 par voie intrastriatale et montrent la formation d'un œdème cérébral et l'apparition de déficits neurologiques, qui sont absents chez les souris ayant reçu la solution tampon [37]. Ainsi, nous suggérons que l'effet délétère de l'hème libre au niveau du système nerveux central nécessite un contexte infectieux ou inflammatoire, pendant lequel des ERO et des cytokines pro-inflammatoires sont produites et participeraient à la rupture de la BHE. Cette hypothèse est renforcée par les observations de Pamplona et al. qui montrent une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales bovines bMVEC-B lorsqu'elles sont traitées avec du peroxyde d'hydrogène en plus de l'hème, en comparaison à un traitement avec l'hème seul [253].

Les effets de l'hème sur la physiopathologie du neuropaludisme impliquent vraisemblablement un ensemble de mécanismes conduisant à une inflammation importante, et à l'induction d'une réponse immunitaire non adaptée. Ainsi, l'injection d'hème au sixième jour de l'infection par *P. berghei* ANKA chez les souris BALB/c normalement résistantes au neuropaludisme, induit la mort des souris au septième jour, soit en même temps que les souris C57BL/6 sensibles infectées par *P. berghei* ANKA [10, 253]. L'utilisation de ces modèles murins a permis d'élucider des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du neuropaludisme, comme la rupture de la BHE [99, 119], et l'activation précoce

---

des astrocytes et des microglies [88]. Par ailleurs, nous montrons que la réponse des microglies est orientée vers un profil de type M1 chez les souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA (Article 4). De plus la séquestration des lymphocytes dans le cerveau est également un facteur déterminant dans le développement du neuropaludisme [116-118, 255].

#### 4. Rôle immunomodulateur de l'hème

Le traitement *in vitro* de cellules endothéliales humaines HUVEC avec de l'hème augmente l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 [289]. L'injection d'hème chez les souris induit également l'expression de ICAM-1 chez les cellules endothéliales et les cellules du foie [24, 273], et contribue de cette façon au recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires, principalement des granulocytes et des macrophages [273]. Chez l'Homme, l'expression de ICAM-1 par les cellules endothéliales est associée à la séquestration des globules rouges parasités [93, 98], un mécanisme également impliqué dans la physiopathologie du neuropaludisme auquel pourrait contribuer l'hème. De plus, la liaison de ICAM-1 à son ligand entraîne l'apoptose des cellules endothéliales [290], qui conjointement à leur apoptose médié par l'hème [42], pourrait contribuer à la rupture de la BHE au cours du neuropaludisme [104].

Outre son caractère pro-oxydant par sa capacité à induire la production d'ERO, l'hème est également responsable de la modulation de la réponse immunitaire, en augmentant la mobilité, en activant, et en modulant la réponse des cellules. Ainsi, l'injection d'hème dans la cavité intrapéritonéale des souris augmente le chimiotaxisme des polynucléaires neutrophiles humains, induit leur recrutement au site d'injection, et active également leur expression du gène codant l'IL-8 [34]. Par des analyses de corrélations de Spearman, suivies par

---

des analyses de régressions multivariées nous montrons que les niveaux plasmatiques d'hème sont associés aux concentrations plasmatiques de quatre cytokines, IP-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  et IL-10, dans les cas de neuropaludisme et d'insuffisance rénale palustre en Inde (Article 2).

#### **4.1. Modulation de la production des cytokines par l'hème**

##### **4.1.1. IP-10 et MCP-1**

Le traitement des cellules de la lignée endothéliale de souris (CRL2581) avec de l'hème induit rapidement leur expression en *IP10* [15], et l'hème potentialise également la production de IP-10 par les macrophages péritonéaux stimulés avec du LPS [36]. Cependant, dans notre contexte d'étude, le traitement *in vitro* de cultures mixtes d'astrocytes et de microglies avec de l'hème n'augmente pas leur production en IP-10, en comparaison aux cellules non traitées (Chapitre 4). De façon intéressante, l'hème induit très rapidement l'expression de *MCP1* par les cellules de tubule proximal de rat [244]. Comme l'inhibition de la synthèse de HO-1 par le NAC, ou de l'activité catalytique de HO-1 par la protoporphyrine zinc, est associée à une absence d'expression de *MCP1* suite à un traitement de ces cellules par l'hème, ces résultats suggèrent que l'expression de MCP1 par les cellules de tubule proximal implique HO-1 [244].

Au cours du neuropaludisme murin, l'expression de *IP10* et *MCP1* augmente dans le cerveau, en comparaison aux souris naïves (Article 4). Chez l'Homme, les niveaux d'IP-10 mesurés dans le sérum, le plasma ou le LCR augmentent également au cours du neuropaludisme en comparaison aux individus non infectés, et aux autres cas de paludisme [109, 112]. Néanmoins, ces études ne

montrent pas de différences quant aux niveaux de MCP-1 entre les différents groupes de patients infectés par *P. falciparum* [109, 111, 112], bien que plusieurs études l'incriminent dans les maladies neurodégénératives, comme la sclérose en plaque [276]. De façon intéressante, MCP-1 est également impliqué dans la physiopathologie de l'insuffisance rénale [291].

IP-10 et MCP-1 sont des chimiokines qui contribuent au recrutement de leucocytes, principalement et respectivement des lymphocytes et des monocytes [116, 117, 276]. Présentes dans le cerveau, ou le rein, ces cellules participeraient à l'emballage de la réponse inflammatoire associée au neuropaludisme, ou à l'insuffisance rénale.

#### 4.1.2. TNF- $\alpha$

En accord avec les études qui rapportent que l'hème induit l'expression de *TNFA* par les astrocytes de souris CD-1 [33], et stimule la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 [35], nous observons une augmentation de la production en TNF- $\alpha$  par les cultures mixtes d'astrocytes et de microglies (Chapitre 4). De même, parallèlement à ce qui a été rapporté chez le modèle murin de neuropaludisme, nous montrons une augmentation de l'expression de *TNFA* par les cellules du cerveau de souris développant un neuropaludisme, en comparaison aux souris naïves (Article 4). Cependant, alors que la déplétion en TNF- $\alpha$  au quatrième jour de l'infection par *P. berghei* ANKA protège les souris CBA du neuropaludisme [242], les souris C57BL/6 génétiquement déficientes en TNF- $\alpha$  et infectées par *P. berghei* ANKA meurent en même temps que les souris sauvages [113], ce qui démontre bien le rôle controversé du TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie du neuropaludisme. De même, chez l'Homme, les niveaux circulants de TNF- $\alpha$  ne sont pas toujours associés à

la sévérité du paludisme à *P. falciparum* [108-110] (Article 2, Annexe 2), et son rôle bénéfique ou délétère est à ce jour encore incertain [114, 254].

Tel que nous l'avons abordé précédemment, le TNF- $\alpha$  potentialise l'effet pro-apoptotique de l'hème sur les hépatocyte [53, 281], mais aussi sur les cellules du parenchyme cérébral et les cellules endothéliales [292]. Ainsi, la corrélation positive des niveaux d'hème et de TNF- $\alpha$  que nous observons chez les patients infectés par *P. falciparum* à Cuttack pourrait également témoigner d'une cytolysse importante associée au paludisme grave (Article 2).

#### 4.1.3. IL-10

En fonction du contexte immunologique, l'IL-10 peut être associée à une réponse inflammatoire, ou anti-inflammatoire. Parmi les souris C57BL/6 déficientes en IL-10, 40% meurent suite à une infection par *P. c. chabaudi* AS. La production de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes augmente pour les cellules issues de souris déficientes en IL-10 en comparaison aux souris sauvages, ce qui lui vaut un rôle anti-inflammatoire dans le cadre de l'infection par *Plasmodium* chez la souris [293]. Chez l'Homme, les niveaux d'IL-10 augmentent souvent dans les cas de paludisme grave, mais conjointement avec les niveaux circulants de TNF- $\alpha$  [108, 162]. Pour cette raison, l'analyse du ratio IL-10/TNF- $\alpha$  permet d'apprécier les altérations de la réponse immune : un ratio IL-10/TNF- $\alpha$  diminué est associé à la sévérité du tableau clinique du paludisme, alors que son augmentation est apparenté à une hyperparasitémie [162, 164]. Ainsi, la prolifération des parasites pourrait être favorisée par la prédominance d'une réponse anti-inflammatoire associée à une augmentation de la production d'IL-10, au dépend d'une production plus faible de cytokines pro-inflammatoires. Néanmoins, la parasitémie des souris C57BL/6 déficientes



---

en IL-10 et infectées par *P. c. chabaudi* AS est comparable à celle des souris sauvages infectées [293].

Chez la souris, la production précoce d'IFN- $\gamma$  est essentielle à la clairance des parasites [174, 175]. Or, le prétraitement des souris BALB/c infectées par *P. c. adami* DK avec de l'hème induit simultanément une diminution de la parasitémie et de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4, en comparaison aux souris infectées, non traitées avec de l'hème (Article 1). Alors que dans cette situation la réponse immunitaire ne semble pas impliquée dans la clairance parasitaire, nous suggérons que l'hème module la fluidité des membranes érythrocytaires ou augmente le statut pro-oxydant des globules rouges, limitant ainsi leur infection par les parasites. Contrairement à *P. c. adami* DK, l'injection d'hème chez les souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA n'affecte pas la parasitémie (Articles 1, 4) [250]. Ces différences pourraient être liées à la sélectivité d'infection de *P. c. adami* DK pour certains globules rouges, et notamment des globules rouges matures [184, 294], vraisemblablement moins apparente chez *P. berghei* ANKA.

Dans notre analyse à Cuttack nous observons une corrélation positive entre les niveaux d'hème et d'HRP-2 plasmatiques, et nous suggérons que dans ce contexte les niveaux d'hème n'influencent pas la parasitémie. Au contraire, la multiplication des parasites pourrait contribuer aux niveaux augmentés d'hème que nous mesurons. Dans ce contexte, Chotivanich et al. montrent que les clones de *P. falciparum* prélevés chez les patients atteints de paludisme grave se multiplient plus vite *in vitro*, et ont un indice de sélectivité plus faible que les parasites prélevés de patients faisant un accès simple [247]. Ainsi, la

---

multiplication plus rapide des parasites pourrait induire l'accumulation plus efficace de l'hème, et ainsi contribuer à la sévérité de l'infection.

#### **4.2. Impact de l'hème sur la polarisation et l'activation des lymphocytes T CD4**

Les patients atteints d'anémie hémolytique auto-immune et de drépanocytose ont des niveaux circulants d'IL-10 et d'IL-4 élevés comparativement aux individus sains, ce qui suggère une réponse systémique de type 2 dans des conditions hémolytiques [167-171]. Outre la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th2, *in vitro* (Chapitre 1) et *in vivo* (Article 1), les macrophages produisent également plus d'IL-10 et moins d'IL-12 lorsqu'ils sont stimulés avec du LPS en présence d'hème [38]. De même, les microglies adoptent un phénotype de type M2 en présence d'hème *in vitro*, tel que le suggère la diminution de l'expression génique de *CD16* et *CD32*, et l'augmentation de l'expression de *CD206* (Chapitre 3). Ces observations sont en accord avec le fait que la réponse des lymphocytes oriente l'activation des macrophages par une voie classique (dépendante de l'IFN- $\gamma$ ) ou par une voie alternative (dépendant de l'IL-10). Par ailleurs, suite à la reconnaissance du TCR par le complexe CMH-peptide antigénique, les CPA induisent la polarisation des lymphocytes Th0 CD4 vers un profil de type Th1 ou Th2 en fonction des cytokines produites. En accord avec l'étude de Sutherland et al. [49], nous montrons que l'activation des lymphocytes T CD4 par l'hème nécessite la reconnaissance du CMH de classe II présenté par les CPA, mais qu'elle est indépendante du caractère pro-oxydant de l'hème (Chapitre 1).

Les macrophages, et les cellules dendritiques étant de mauvais producteurs d'IL-4, ces cellules ne seraient que secondairement impliquées dans l'induction

de la réponse de type 2 [177, 295]. Les polynucléaires basophiles et les mastocytes ont quant à eux, non seulement la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4, mais aussi de produire de hauts niveaux d'IL-4, et ainsi de participer activement au processus de polarisation des lymphocytes Th0 en Th2 [177, 296]. De façon intéressante, l'hémolyse associée à l'injection de phénylhydrazine chez les souris BALB/c induit l'expansion des polynucléaires basophiles et des mastocytes, qui est absente chez les souris traitées avec 5mg/kg d'hème (Chapitre 1). Pour cette raison nous supposons que (i) la quantité d'hème systémique obtenue à la suite de l'injection de 5mg/kg d'hème est faible au regard des niveaux obtenus à la suite de l'injection de phénylhydrazine, et/ou que (ii) la génération d'ERO par la phénylhydrazine est plus importante que par l'hème, et/ou que (iii) la lyse érythrocytaire induite par la phénylhydrazine entraîne la libération de molécules responsables de l'activation des polynucléaires basophiles et des mastocytes. Néanmoins, ces résultats suggèrent que l'induction de la réponse de type 2 médiée par l'hème chez les souris BALB/c est indépendante de l'activation des polynucléaires basophiles et des mastocytes (Chapitre 1).

Curieusement, alors que la réponse de type 2 est associée aux phénomènes de réparations tissulaires pendant les maladies neurodégénératives [105], l'hème aurait un rôle également bénéfique dans la résistance au neuropaludisme que nous détaillons dans le paragraphe suivant.

## **5. Rôle protecteur de l'hème au cours du neuropaludisme**

Grâce aux modèles murins, il a été démontré que l'injection d'hème préalablement à l'infection protège les souris du neuropaludisme par un mécanisme impliquant l'expression et la production de l'HO-1 [250]. Chez

l'Homme, l'expression de *HMOX1* augmente constitutivement dans les cas d'hémoglobinopathies [252], des maladies hémolytiques chroniques qui sont associées à une protection vis à vis du neuropaludisme [251]. De façon intéressante, les co-infections à *Ascaris lombricoides*, *Trichus trichiura*, et *Strongyloides stercoralis* protègent également des formes graves de paludisme, et, en analogie avec les maladies hémolytiques chroniques, les helminthiases sont associées à une réponse majoritaire de type 2 [297, 298]. Ainsi, l'induction précoce d'une réponse de type 2 en association avec l'augmentation de l'expression de l'HO-1 par l'hème pourrait contribuer à la protection de ces individus vis à vis des formes graves de paludisme. Dans ce cadre de figure, les niveaux d'hème augmenteraient précocement au cours de l'infection palustre.

Nous avons constaté 30% de protection contre le neuropaludisme chez des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA et traitées avec 30mg/kg d'hème toutes les 24h dès le troisième jour de l'infection (Article 4). D'après une analyse des structures du cerveau par la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM), nous montrons également que le traitement des souris avec l'hème prévient l'apparition des atteintes cérébrales, au niveau du bulbe olfactif, et du corps calleux, ainsi que la formation d'un œdème cérébral (Article 4). L'ensemble de ces atteintes apparaissent lors de l'étape finale de la maladie, c'est-à-dire au moment où les souris développent un syndrome cérébral [89, 128]. Comme le traitement des souris avec l'hème retarde l'apparition des premiers signes neurologique d'environ 24h, il est possible que l'effet bénéfique que nous observons par IRM puisse être lié à ce délai dans le développement de la maladie. Toutefois, la hausse de l'expression de *HMOX1* constatée dans le cerveau et la rate des souris traitées avec l'hème pourrait diminuer l'inflammation liée à l'infection.

### 5.1. Impact sur les cellules du parenchyme cérébral

Ainsi, l'hème favorise la polarisation des lymphocytes [211], des macrophages [38], et des microglies vers une réponse de type 2 (Chapitre 3). De manière intéressante, le traitement avec de l'hème (*i*) de cellules gliales stimulées avec des globules rouges parasités, et (*ii*) de souris infectées par *P. berghei* ANKA, biaise le profil de type M1 des microglies, tel que l'indique la diminution de l'expression des récepteurs CD16 et CD32 (Article 4). De plus, l'hème majore l'activation des microglies chez les souris infectées, et les cellules traitées avec des globules rouges parasités (Article 4). Cependant, l'activation des microglies est aussi bien associée à un effet protecteur, ou délétère sur les cellules du système nerveux central [254, 299]. Récemment, Chen et al. ont montré un rôle neuroprotecteur de l'activation TLR-4-dépendante des microglies par l'injection intrapéritonéale de faibles doses de LPS pendant plusieurs jours consécutifs. En effet, les souris prétraitées avec le LPS présentent des lésions cérébrales plus faibles, comparativement aux souris naïves, ainsi qu'une diminution du nombre de cellules apoptotiques après l'induction d'une blessure chirurgicale (cryogénique) au niveau du cortex pariétal [300]. Il est également à noter que le prétraitement des souris avec le LPS à faible dose oriente la réponse des microglies vers un profil de type M2 [300]. De façon intéressante, les cultures primaires de microglies traitées avec de l'hème augmente l'expression de TLR-4 par ces cellules, et induit leur production en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 par un mécanisme dépendant du TLR-4 [37]. Néanmoins, le rôle de l'hème dans l'induction d'une réponse de type M2 protectrice médié par le TLR-4 reste encore à être déterminée dans le cadre de l'infection par *Plasmodium*.

Nos résultats indiquent également que l'injection d'hème dans le contexte infectieux diminue l'activation des astrocytes, ce qui pourrait être le résultat d'une réponse inflammatoire mitigée comparativement à celle des souris infectées non traitées (Article 4). Cette observation est corroborée à la diminution des taux en taurine et de glutamine mesurés dans le cortex par spectroscopie par résonance magnétique (Article 4). En effet, l'efflux de taurine et de glutamine par les astrocyte caractérise un œdème cellulaire, qui pourrait par la suite également contribuer à la libération de neurotoxines par les astrocytes, comme l'acide quinoléique [264], dont la concentration dans le LCR augmente avec la sévérité du neuropaludisme chez l'Homme [132].

## **5.2. Impact de l'hème sur le recrutement des lymphocytes et les monocytes**

En accord avec nos résultats obtenus chez les souris BALB/c traitées avec de l'hème, l'injection d'hème chez les souris C57BL/6 infectées par *P. berghei* ANKA augmente l'expression de *IL10* dans la rate en comparaison aux souris infectées non traitées (Article 4). Cependant, l'hème diminue l'expression et la production de IP-10 par les astrocytes et les microglies *in vitro*. De cette façon, la diminution de *IP10* notée dans les cerveaux des souris C57BL/6 traitées avec de l'hème pourrait être le résultat d'une production affaiblie (Article 4). Cette hypothèse est renforcée par la diminution concomitante du nombre de lymphocytes T CD8 et T CD4 observée dans le cerveau des souris infectées et traitées avec de l'hème, ce qui est par ailleurs en accord avec les observations rapportées avec les souris déficientes en CXCR3 et infectées par *P. berghei* ANKA [116, 117]. Le recrutement de cellules T CD8 et CD4 est une composante essentielle dans la physiopathologie du neuropaludisme murin. Ainsi, la

---

diminution de l'expression d'*IP10* contribuerait à la marginalisation des cellules exprimant CXCR3 au niveau de la rate (Article 4). Bien que l'hème active les lymphocytes T CD4 *in vitro* et *in vivo* (Chapitre 1), il ne semble pas moduler l'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8 lors de l'infection par *Plasmodium* (Article 4). Cette observation renforce notre hypothèse sur l'action bénéfique directe de l'hème sur les cellules du parenchyme cérébral.

Néanmoins, l'hème ne modifie pas l'expression de *MCP1* par les cellules du cerveau, ni n'affecte le recrutement des monocytes dans le compartiment cérébral (Article 4). Les monocytes inflammatoires répondent au MCP-1 par l'expression de son récepteur, CCR2, et produisent du TNF- $\alpha$  [254]. Aussi, nous suggérons que la population que nous avons identifiée soit celle des monocytes inflammatoires. Ceci pourrait également expliquer l'absence de différence que nous observons quant à l'expression de *TNFA* dans le cerveau des souris infectées et traitées avec de l'hème malgré l'orientation de la réponse des microglies vers un profil de type M2, anti-inflammatoire. Néanmoins, à ce jour et tel que nous l'évoquons plus haut, le rôle de TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives est encore incertain car cette cytokine est autant associée à une réponse protectrice, qu'à une réponse délétère au niveau du système nerveux central.

En conclusion, le traitement précoce des souris avec de l'hème au cours de l'infection par *Plasmodium* prévient le neuropaludisme, vraisemblablement en modulant la réponse des microglies vers un profil anti-inflammatoire et en diminuant la production d'IP-10 par les cellules du parenchyme cérébral (astrocytes et microglies). Néanmoins, comme la production de MCP-1 ne

---

semble pas être affectée par l'hème, la protection vis à vis du neuropaludisme est partielle.



## CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons étudié l'impact de l'hème sur la modulation de la réponse des lymphocytes T et de cellules gliales, que sont les astrocytes et les microglies. De par son activité immunomodulatrice, l'hème influence la physiopathologie de l'anémie sévère et du neuropaludisme murin, ainsi que la clairance parasitaire. Par une étude de terrain réalisée en zone endémique pour *P. falciparum* en Inde, nous avons corroboré l'ensemble de ces résultats avec des données cliniques, où les niveaux d'hème ont été corrélés aux concentrations plasmatiques en cytokines, et aux tableaux cliniques.

Nous montrons que l'hème participe à la sévérité de l'anémie palustre chez la souris, mais aussi à la physiopathologie du neuropaludisme et de l'insuffisance rénale palustre chez l'Homme. Toutefois, l'impact délétère de l'hème au cours du paludisme semble dépendre de la cinétique de sa libération ainsi que de sa concentration. En effet, l'augmentation précoce d'hème, obtenue expérimentalement par l'injection de 30mg/kg à partir du troisième jour de l'infection, protège une partie des souris du neuropaludisme, alors que l'injection de quantités deux fois plus importantes induit rapidement la mort des souris.

L'hème stimule la production d'ERO qui pourrait être à l'origine de sa toxicité, et induit également la nécrose et l'apoptose de nombreux types cellulaires *in*

---

*vitro*, y compris des hépatocytes, des astrocytes et des cellules endothéliales. Cependant, de par son activité immunomodulatrice, l'induction d'une réponse précoce de type 2 des lymphocytes T CD4, des macrophages et des microglies, en réponse à une stimulation semble avoir un rôle protecteur vis à vis du neuropaludisme. Pour cela, des études complémentaires seraient nécessaires afin d'analyser les effets de l'hème à différents temps, mais aussi pour élucider l'importance du MCP-1 au cours du neuropaludisme dans le but de délimiter de nouvelles cibles thérapeutiques ou prophylactiques.

Le traitement avec de l'albumine ou des chélateurs du fer [deferoxamine, ou deferiprone] diminue la mortalité, les détériorations neurologiques, et la durée de rétablissement du coma chez des enfants atteints de neuropaludisme [190, 191]. Alors que nous avons montré que l'hème a un rôle à dual au cours du paludisme grave, la neutralisation de l'hème pourrait constituer une cible thérapeutique chez des individus déclarant un neuropaludisme. De même, l'administration de faibles doses d'hème ou d'analogues, pourrait être envisagée comme une approche prophylactique contre les complications liées au paludisme chez l'Homme.

## **PARTIE IV. ANNEXES**

---



## **ANNEXE 1**

Ma contribution à cet article a été le suivi des hémoglobinopathies et des infections par *P. chabaudi adami* DK, et le dosage par ELISA des marqueurs de remodelage osseux.

# Alterations in Bone and Erythropoiesis in Hemolytic Anemia: Comparative Study in Bled, Phenylhydrazine-Treated and *Plasmodium*-Infected Mice

Robert Moreau<sup>1</sup>, Diane Tshikudi Malu<sup>1</sup>, Mathieu Dumais<sup>1</sup>, Esther Dalko<sup>1</sup>, Véronique Gaudreault<sup>1</sup>, Hugo Roméro<sup>1</sup>, Corine Martineau<sup>1</sup>, Olha Kevorkova<sup>1</sup>, Jaime Sanchez Dardon<sup>1</sup>, Erin Lynn Dodd<sup>2</sup>, David Scott Bohle<sup>2</sup>, Tatiana Scorza<sup>1\*</sup>

**1** Department of Biological Sciences, Université du Québec à Montréal, Montréal, Quebec, Canada, **2** Department of Chemistry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

## Abstract

Sustained erythropoiesis and concurrent bone marrow hyperplasia are proposed to be responsible for low bone mass density (BMD) in chronic hemolytic pathologies. As impaired erythropoiesis is also frequent in these conditions, we hypothesized that free heme may alter marrow and bone physiology in these disorders. Bone status and bone marrow erythropoiesis were studied in mice with hemolytic anemia (HA) induced by phenylhydrazine (PHZ) or *Plasmodium* infection and in bled mice. All treatments resulted in lower hemoglobin concentrations, enhanced erythropoiesis in the spleen and reticulocytosis. The anemia was severe in mice with acute hemolysis, which also had elevated levels of free heme and ROS. No major changes in cellularity and erythroid cell numbers occurred in the bone marrow of bled mice, which generated higher numbers of erythroid blast forming units (BFU-E) in response to erythropoietin. In contrast, low numbers of bone marrow erythroid precursors and BFU-E and low concentrations of bone remodelling markers were measured in mice with HA, which also had blunted osteoclastogenesis, in opposition to its enhancement in bled mice. The alterations in bone metabolism were accompanied by reduced trabecular bone volume, enhanced trabecular spacing and lower trabecular numbers in mice with HA. Taken together our data suggests that hemolysis exerts distinct effects to bleeding in the marrow and bone and may contribute to osteoporosis through a mechanism independent of the erythropoietic stress.

**Citation:** Moreau R, Tshikudi Malu D, Dumais M, Dalko E, Gaudreault V, et al. (2012) Alterations in Bone and Erythropoiesis in Hemolytic Anemia: Comparative Study in Bled, Phenylhydrazine-Treated and *Plasmodium*-Infected Mice. PLoS ONE 7(9): e46101. doi:10.1371/journal.pone.0046101

**Editor:** Valery Combes, University of Sydney, Australia

**Received:** March 9, 2012; **Accepted:** August 28, 2012; **Published:** September 28, 2012

**Copyright:** © 2012 Moreau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was funded by a New Initiative grant from the Centre for Host Parasite Interactions (Fonds de Recherche Nature et Technologies, FORNT, Quebec, Canada). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: scorza.tatiana@uqam.ca

## Introduction

Low bone mass density (BMD) and fractures are frequent in patients suffering from hemolytic hemoglobinopathies but their etiology is unknown. It is hypothesized that overexertion of hematopoiesis provokes bone marrow hyperplasia and reduces the amount of bone generated [1], causing bone distortion/fragility and enhanced bone resorption [2]. This hypothesis is sustained by the fact that low BMD is found in mice bled chronically for 10 months or in total-body irradiated mice [3]. High-resolution 3D studies locate erythropoietic islands in the inter-trabecular spaces of the bone marrow [4] and modifications in the vascular structure, in the proportion of hematopoietic lineages and in the remodeling of the trabecular bone are expected to assure replenishment of erythrocytes in response to chronic erythropoietic stress. These hemolytic conditions are also characterized by dysfunctional bone marrow erythropoiesis [5,6,7] and extramedullary erythropoiesis [8,9,10].

The chronic hemolysis common to hemoglobinopathies as thalassemia and sickle cell disease is concurrent to increased oxidative insults in red blood cell (RBC), resulting from genetically defective hemoglobins [1,11,12,13]. Under homeostatic condi-

tions, hemoglobin released in hemolysis is rapidly scavenged by haptoglobin and internalized by macrophages, which degrade it through the heme oxygenase-1 (HO-1) system [14]. Extracellular hemoglobin rapidly oxidizes to methemoglobin and releases prosthetic heme groups that are toxic and pro-inflammatory [15] and plasma hemopexin and albumin greatly limit the deleterious effects of heme through their tight binding [16]. However, an excessive release of hemoglobin drastically decreases haptoglobin levels, resulting in accumulation of free heme and generation of reactive oxygen species (ROS), which through a positive feedback loop generate more methemoglobin and free heme. The fact that pathologies as  $\beta$ -thalassemia [17] and sickle cell disease [18] are characterized by high concentrations of heme confirm physiological exhaustion of hemoglobin and heme scavengers. Free heme is highly lipophilic, crossing cell membranes and various lipid structures and provoking oxidative stress through its redox activity [19].

The maintenance of adequate BMD relies on the balance between resorption and formation processes in bones (reviewed in [20]). Bone forming osteoblasts secrete matrix components such as collagen type I as well as non-collagenous protein (i.e. osteocalcin, OCN) and promote subsequent matrix mineralization. Following

a period of activity, osteoblasts enter apoptosis, terminally differentiate to osteocytes surrounded by bone matrix or remain on the bone surface as quiescent bone-lining cells. Osteoblasts also provide factors essential for the differentiation of osteoclasts, such as macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and the cell surface receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) which binds to its receptor RANK expressed on osteoclast progenitors, and thereby induces the fusion of mononuclear monocyte precursors into multinucleate osteoclasts and activated osteoclasts secrete tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b). Since osteoblasts also release osteoprotegerin (OPG) which acts as a decoy receptor for RANK and inhibits osteoclast differentiation, osteoblasts tightly regulate the levels of bone resorption through the OPG/RANKL ratio [21], playing a central role in bone formation and preserving the bone remodeling delicate balance [22].

Inflammation is also a known modulator of bone function [23,24,25] and heme-dependent induction of anti-inflammatory HO-1 has been reported to block the maturation and activity of osteoblasts in a study [26], whereas an opposite stimulatory effect has been revealed by an independent research group [27]. Since heme-dependent inhibition of osteoclastogenesis and osteoclast activity *in vitro* and *in vivo* has also been described [28], heme may contribute to dysfunctions of bone cells which account for low BMD in hemolytic conditions.

Herein, the *Plasmodium chabaudi adami* (DK) (rodent malaria) and the phenylhydrazine (PHZ) models were used to characterize the effect of short-term hemolysis on bone remodeling *in vivo*. Mice rendered anemic by bleeding were also included to determine the effects associated to a short-term non-hemolytic stress. *Plasmodium* parasites replicate in RBC and provoke a potent inflammatory response which contributes to oxidative damage of infected and non-infected RBC and hemolysis [29,30]. Albeit the anemia induced, generation of new RBC in the bone marrow is impaired in malaria due to bone marrow dysfunction [30,31,32] and as for  $\beta$ -hemoglobinopathies, high concentrations of cell-free hemoglobin are reported [33]. PHZ is used to experimentally induce anemia in animals, its mechanism of action relying on RBC lipid peroxidation (reviewed in [34]). As in malaria, robust hemolysis, high concentrations of free heme and oxidative damage are induced in PHZ-treated animals [35,36].

## Methods

### Ethics statement

The study was conducted in compliance with the regulations from the Animal Committee of the University of Quebec in Montreal (CIPA). All procedures in mice were approved by the CIPA (protocols 0210-677-0211 and 0211-R1-677-0212).

### Mice and in vivo treatments

Female BALB/c mice (Charles River) 4–6 weeks old were used in all the experiments as young growing mice are suitable in studies designed to investigate conditions which may affect peak bone mass [37]. For infection,  $10^5$  *P. c. adami* DK (556 KA) parasitized RBC were injected in mice by the peritoneal route, parasitemia was measured daily in methanol fixed tail blood smears stained with a 10% Giemsa solution in PBS and mice were sacrificed at day 8 of infection, corresponding to acute infection. PHZ (Sigma Aldrich, Canada) was administered by the peritoneal route at 40 mg/Kg body weight on day 0, and two additional injections were given at 9 am and 4 pm, on day 1, after which mice were sacrificed 6 days later. To induce non-hemolytic anemia, 100  $\mu$ L of blood were withdrawn from the saphenous vein every other day, three times, and mice were euthanized two days after

the last blood withdrawal. Immediately following each bleeding mice received an equal volume of physiologic saline solution by the intra-peritoneal route.

### Determination of hemoglobin in blood

Hemoglobin concentrations were measured in mice daily following treatment (infection, PHZ injection or bleeding) by diluting 2  $\mu$ L tail-vein blood in 500  $\mu$ L Drabkin's solution (Sigma Aldrich, Canada). Hemoglobin was assayed in 96-well microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) in a volume of 100  $\mu$ L by measuring the absorption at 540 nm in a microplate reader. Values were converted to g/dL using a standard curve of human hemoglobin (Sigma Aldrich, Canada) prepared in Drabkin's solution. All samples were assessed in duplicate.

### Determination of reticulocytes and parasitemia in blood

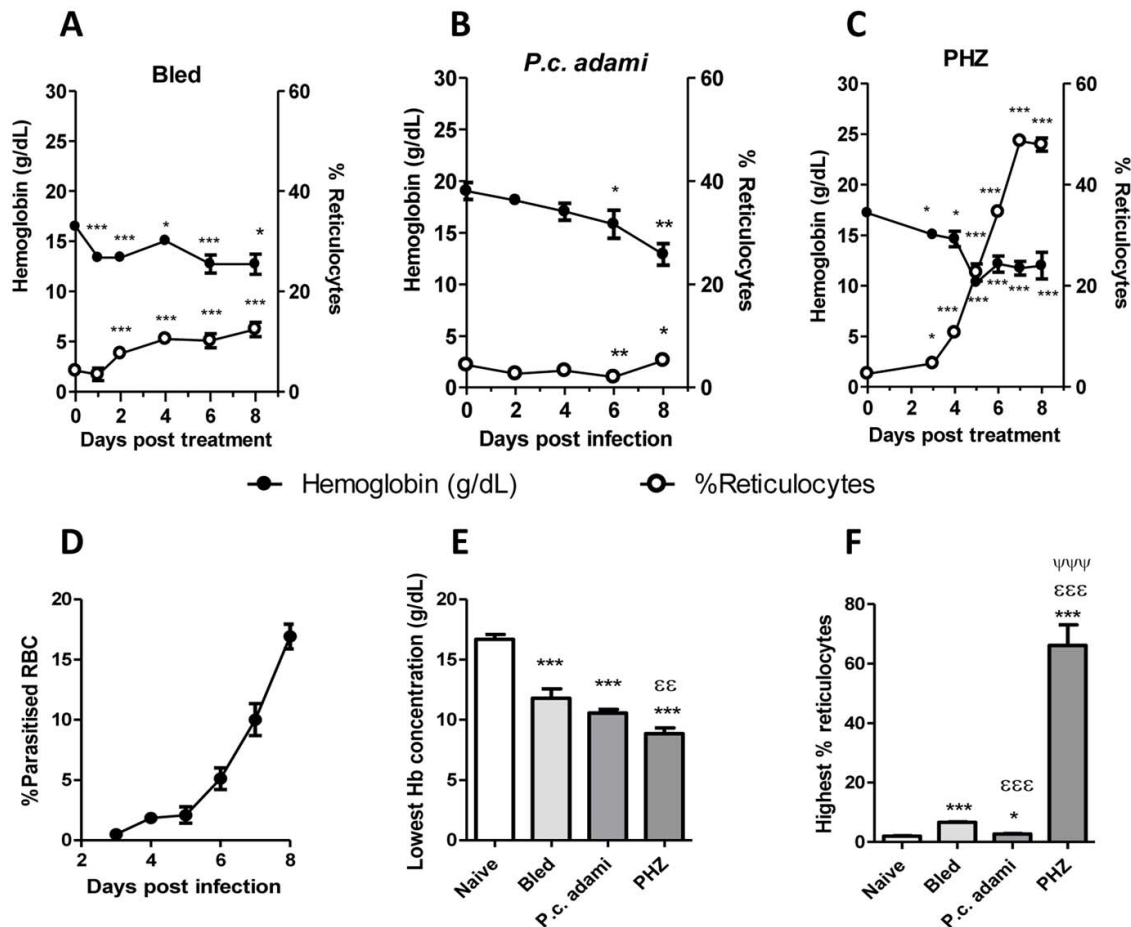
Two microliters of blood were collected from the tips of the tails in 0.5 mL of PBS the day before and every day following treatment (infection, PHZ injection or bleeding). The blood cell suspensions were centrifuged and resuspended in 250  $\mu$ L of a 0.025% glutaraldehyde solution for at least 18 h. Blood samples from *Plasmodium*-infected mice were further treated with 0.25% Triton X-100 for permeabilization, washed in PBS and resuspended in 50  $\mu$ L PBS with 100  $\mu$ g RNase (4 mg/ml stock) at 37°C for 30 min. The cell suspensions were then stained with anti-CD71-FITC antibody (Cedarlane, Canada) and samples from *Plasmodium*-infected mice were additionally treated with propidium iodide (PI) (1 mg/mL stock) to exclude parasitized RBC from the analysis. The cells were analyzed in a FACScan (Becton Dickinson, USA). Parasitemia was measured daily in methanol fixed blood smears stained with a 10% Giemsa solution in PBS.

### Determination of reactive oxygen species in bone marrow cell suspensions

The marrow of tibia was recovered by flushing with cold DMEM. The cells were washed and resuspended in 2 mL DMEM supplemented with 10% FBS, 1% HEPES, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Invitrogen). For ROS determination, bone marrow cell suspensions ( $10^6$  cells per tube) were prepared in PBS and stained with anti-F4/80-biotinylated antibody (Biolegend) and streptavidin-PERCP (BD Pharmingen) for 15 min prior to labeling with H<sub>2</sub>-DCFDA (Molecular Probe, Invitrogen, Canada) (100  $\mu$ M) for 30 min at 37°C; the mean cellular fluorescence was measured in a FACScan cytofluorometer and analysed in F4-80<sup>+</sup> and F4-80<sup>-</sup> cells.

### Osteoclast progenitors and TRAP staining

To determine osteoclast progenitors, tibial bone marrow cell suspensions were stained with anti-F4-80-PE antibody (Biolegend) and analyzed by flow cytometry. In parallel,  $2.9 \times 10^7$  bone marrow cells were plated in 8 mL of  $\alpha$ MEM medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL Streptomycin (Invitrogen, Canada) overnight. Non-adherent cells were recovered and plated at  $4 \times 10^5$  cells/mL in medium with 25 ng/mL M-CSF and 50 ng/mL recombinant mouse RANKL (eBioscience) for 3 days, after which the media was replaced and cells were cultured for 4 additional days. The TRAP staining kit (B-Bridge International Inc) was used to determine tartrate-resistant acid phosphatase positive cells. Briefly, cell supernatants were removed and cells were washed once in PBS after which fixative (10% Formalin in neutral buffer) was added into the wells for 5 min. Wells were then washed three times in dH<sub>2</sub>O and chromogenic substrate was added for 20–60 min. The wells



**Figure 1. Erythroid parameters.** (A–C) Blood was recovered from naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice prior to and every day following treatment for assessment of hemoglobin (Hb) and percentages of reticulocytes (CD71<sup>+</sup>). (D) Kinetics of parasitemia in *P. c. adami* BALB/c mice. (E) The lowest Hb concentrations (g/dL) and (F) highest reticulocytosis measured in mice are represented. Data are mean  $\pm$  SEM from 4–7 mice per group, compiled and compared using a one-way ANOVA and Tukey's multiple test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  are comparisons to naive; <sup>εε</sup> $P < 0.01$ , <sup>εεε</sup> $P < 0.001$  are comparisons to bled; <sup>ψ</sup> $P < 0.05$ , <sup>ψψψ</sup> $P < 0.001$  are comparisons between PHZ-treated and *Plasmodium*-infected mice.  
doi:10.1371/journal.pone.0046101.g001

were then washed in dH<sub>2</sub>O and stained with 10% Giemsa in PBS for coloration of nuclei. TRAP<sup>+</sup> cells with  $\geq 4$  nuclei were estimated in each sample by contrast microscopy.

#### Assessment of erythroid populations in the bone marrow

Freshly prepared bone marrow cell suspensions were treated with anti Ter119-PE and anti-CD71-FITC antibodies (Biolegend) for 30 min at 4°C and the cells were analyzed on a FACScan flow cytometer and the FloJo software. Ten thousand cells were acquired by flow cytometry and dead cells were excluded by staining with 7AAD (BD-Bioscience).

#### Colony-forming unit assays

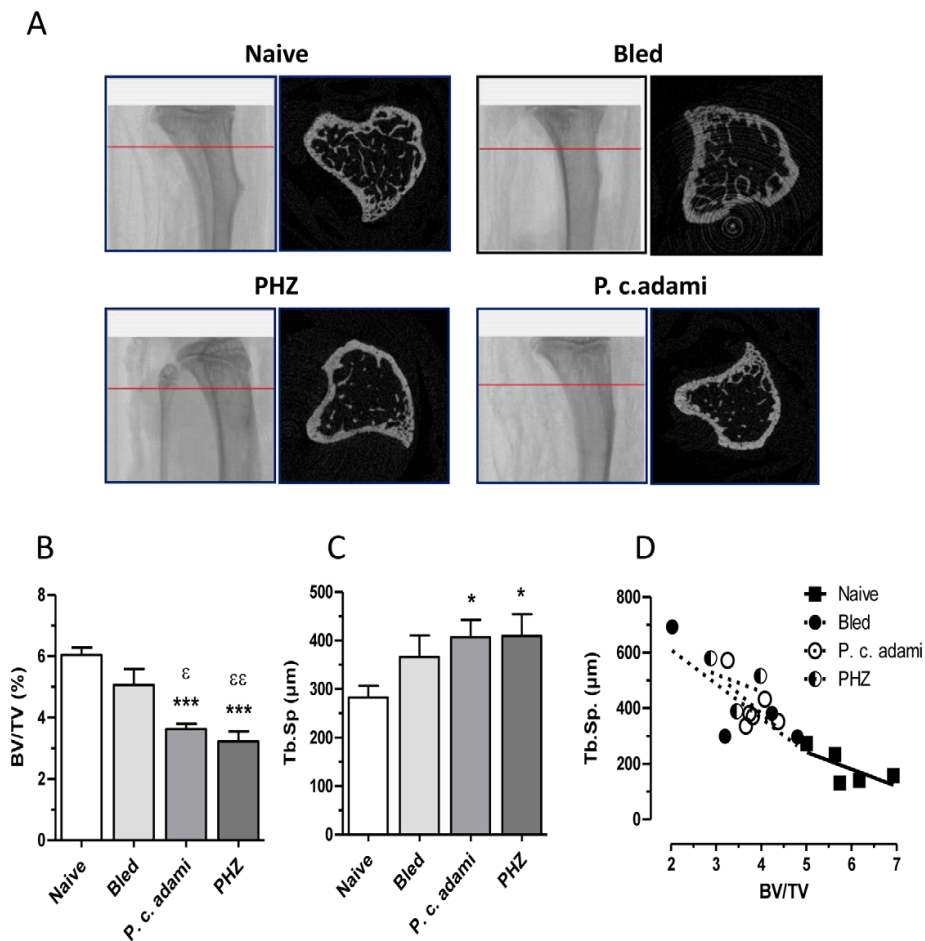
Bone marrow and spleen cell suspensions for colony forming assays were prepared in RPMI-1640 media supplemented with 10% FBS and antibiotics at 10 $\times$  concentrations. RBC from spleen cell suspensions

were lysed in Red blood cell Lysing buffer Hybri-Max<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, Canada) prior to plating. Mature burst-forming unit-erythroid (BFU-E) were quantified in bone marrow and spleen cell suspensions using MethoCult<sup>®</sup> 03434 media. Briefly, 1 $\times 10^5$  cells/mL or 2 $\times 10^5$  cells/mL for spleen and bone marrow, respectively were prepared in RPMI 1640 and 0.3 mL were added to 3 mL of MethoCult<sup>®</sup> medium for duplicate cultures. The mix was vortexed, allowed to stand for 5 min and dispensed into 35 mm culture dishes (StemCell Technologies) using a 16 gauge blunt-end needle and a 3 cc syringe, 1.1 mL per dish. The cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air and  $\geq 95\%$  humidity for 8 days after which BFU-E were identified and counted.

#### Estimation of erythropoietin and bone markers concentrations in serum

Serum concentrations of erythropoietin (EPO), tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRAP5b), N-terminal propeptide of type





**Figure 2. Bone architecture parameters.** Naive, bled, *P. c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized and the trabecular portions of tibia were scanned. (A) Representative scan from the trabecular portion of tibia. (B–D) Ratio of bone volume (BV) on total volume (TV), trabecular spacing (Tb.Sp) were compared between each groups and Tb.Sp were plotted against BV/TV. Results are mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (n = 5–6 mice per group) compiled and compared to control mice using a one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared to naive and <sup>ns</sup> $P < 0.05$ , <sup>ns</sup> $P < 0.01$  compared to bled. doi:10.1371/journal.pone.0046101.g002

I procollagen (PINP) and C-terminal crosslinks telopeptide of type I collagen (CTX) were measured by EIA assays (IDS Inc, Fountain Hills, AZ and the Quantikine mouse/rat EPO Immunoassay R&D Systems, Inc). Serum concentrations of osteocalcin (OCN) were measured using a mouse osteocalcin EIA kit (Biomedical Technologies, Stoughton, MA, USA).

#### Bone structure analysis

After euthanasia, bones were harvested and fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde-phosphate buffered saline (PBS) solution at 4°C. Bone were then rinsed and transferred into fresh PBS. Bones were wrapped in PBS-soaked gauze and analyzed by micro-computed tomography ( $\mu$ CT) using an 1172c Skyscan system (Soquelec, Montreal, Canada) with the following configuration: x-ray potential 70 kV, 0.5 mm Al filter, 180° rotation at a 0.5° rotation step, 5  $\mu$ m resolution with the small camera pixels. The raw data sets were reconstructed with the NRecon software (Skyscan, Aartselar, Belgium). The trabecular region of interest was manually drawn 2 mm from the

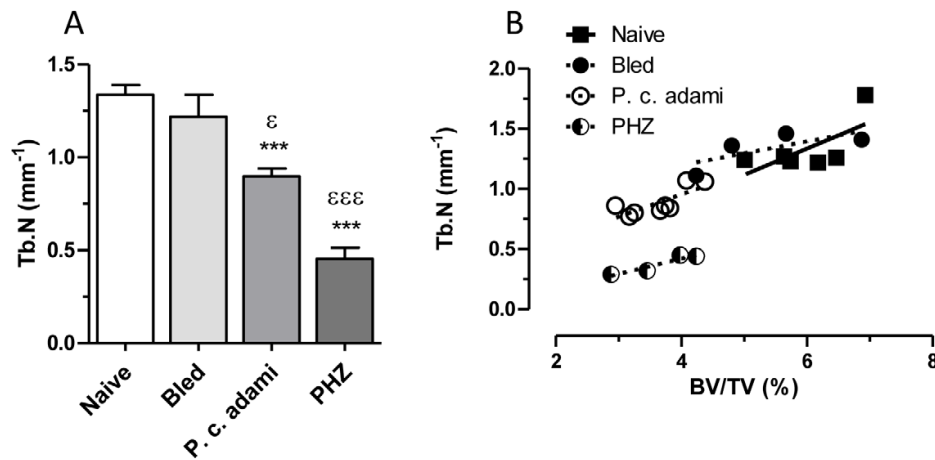
bottom of the growth plate for 4 mm and subsequently analyzed with the CTAn software (Skyscan, Aartselar, Belgium).

#### Bone histochemistry

The tibia were dissected free of soft tissue, fixed for 16 h in 4% paraformaldehyde (PF) at 4°C and rinsed in PBS. The femora were embedded in a mixture of polymethylmethacrylate (PMMA) as described by Erben [38]. Two  $\mu$ m sections were cut on a modified Leica RM 2155 rotary microtome (Leica Microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada) and stained with 5% silver nitrate for 30 min under UV light for 1 h to identify mineral (Von Kossa staining). Staining for TRAP activity was carried out at 37°C in a Coplin jar placed in a waterbath as described previously [39].

#### Determination of heme concentrations in serum

Concentrations of heme in serum were determined by the pyridine hemochrome method described by Falk [40]. Briefly, a



**Figure 3. Bone architecture parameters.** Naive, bled, *P. c. adami*-infected and PHZ-treated ( $n=5-6$ ) female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized and the trabecular portion of tibias were scanned. A) The trabecular number (Tb.N) was compared between each groups and plotted against the BV/TV. Results are mean  $\pm$  SEM from two independent experiments ( $n=5-6$  mice per group) compiled and compared to control mice using a one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. \*\*\* $P<0.001$  compared to naive and  $^{\epsilon}P<0.05$ ,  $^{\epsilon\epsilon\epsilon}P<0.001$  compared to bled. doi:10.1371/journal.pone.0046101.g003

stock solution of 50 mM NaOH and 20% (by volume) pyridine and 3  $\mu$ L of 0.1 M  $K_3Fe(CN)_6$  was placed in a cuvette and  $\frac{1}{4}$  volume of serum was added and thoroughly mixed. The oxidized spectrum was then recorded and sodium dithionite (2–5 mg) was added; the spectrum of the reduced pyridine heme was immediately recorded. Heme concentrations were determined from absorbance intensity at 556 nm based on a pyridine hemochrome calibration curve determined from hemin.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with a one-way ANOVA and Tukey's multiple tests, and Pearson correlation coefficients were obtained using the Prism 5 software (GraphPad, USA).  $P<0.05$  was considered significant.

#### Results

##### Bone marrow erythropoiesis in non-hemolytic and hemolytic mice

Hematologic parameters and erythropoiesis were compared in bled, *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice. Normal hemoglobin concentrations in female BALB/c mice are  $16.55 \pm 2.15$  and reticulocytes represent 1–3% of total RBC in circulation [41]. Low hemoglobin concentrations occurred in all the treated mice. In bled mice, the concentrations of hemoglobin dropped significantly a day after the first blood withdrawal, remaining relatively lower during the week of experimentation and being associated with progressive reticulocytosis (Fig. 1A). A slower decline in hemoglobin concentration was noticed in *Plasmodium*-infected mice (Fig. 1B), which only became significant at day 6 post-infection and achieved its maximal level at day 8, corresponding to the moment of peak parasitemia (Fig. 1D). In respect to the day of infection, the percentages of reticulocytes were significantly lower in mice with malaria at 6 post-infection, and reticulocytosis was modestly enhanced at day 8 post-infection (Fig. 1B). In mice injected with PHZ, drastic drops in hemoglobin levels were measured, which became maximal the third day after the third PHZ injection (Fig. 1C). The drops in hemoglobin levels

were accompanied by a rapid erythropoietic response, characterized by robust reticulocytosis, which was almost exponential and reached its highest levels at day 7 (Fig. 1C). No complete recovery in hemoglobin levels was noticed in PHZ-treated mice albeit the enhanced reticulocytosis measured. In summary, anemia was rapidly induced in bled and PHZ-treated, whereas in mice with malaria, significant drops in hemoglobin concentrations were only measured at day 6 post-infection, corresponding to the time when average parasitemia was  $\approx 5\%$  (Fig. 1D).

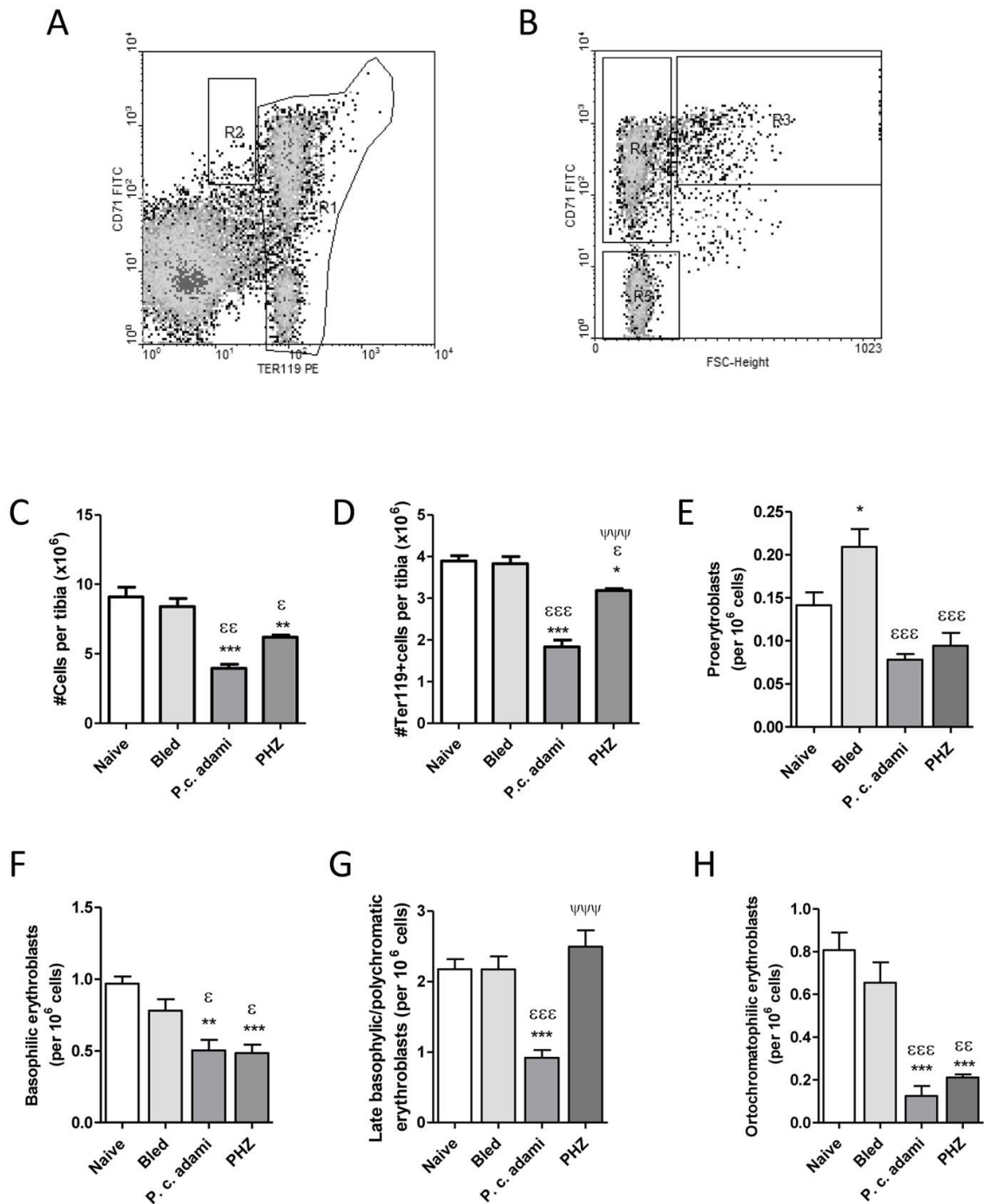
Significant drops in hemoglobin concentrations occurred in the three groups of treated mice (Fig. 1E), whereas reticulocytosis was significantly enhanced in PHZ-treated mice and suppressed in mice with malaria relative to bled mice (Fig. 1F). The most pronounced erythropoietic response occurred in PHZ-treated mice, which also displayed more marked reticulocytosis. At day 8, EPO levels were significantly high in mice with acute malaria relative to naive mice, lower in PHZ-treated mice compared to bled mice and comparable to controls in bled mice (Fig. 1G).

##### Reduced bone mass in hemolytic anemia

MicroCT morphometric analysis of the tibia revealed osteoporotic features in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice with HA (Fig. 2A). Quantitative morphometric values were determined for the trabecular portion of the tibiae and revealed significant reductions of specific trabecular bone volume (BV/TV) (Fig. 2B) and increased trabecular spacing (Tb.Sp) (Fig. 2C). Plotting Tb.Sp against BV/TV gave significant Pearson correlation coefficient ( $r^2 = 0.77$ ,  $P<0.0001$ ) (Fig. 2D). As shown in Fig. 3A, the observed low bone mass for mice with HA associated with reduced trabecular number (Tb.N), with a significant Pearson correlation coefficient ( $r^2 = 0.65$ ,  $P<0.0001$ ) (Fig. 3B). No difference was noticed for trabecular thickness (data not shown) and no significant difference was observed for the femurs.

##### Analysis of erythroid precursors in non-hemolytic and hemolytic anemia

Considering the reduced BMD found in the tibiae of *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice, the cellular status



**Figure 4. Bone marrow erythroblast subsets.** Fresh bone marrow cell suspensions from the tibia of naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were stained with anti-CD71-FITC and anti-Ter119-PE antibody for analysis of stage specific erythroblasts. Ter119<sup>+</sup> cells were gated in R1 whereas a R2 region selected proerythroblasts (A). Cells within the R1 gate (Ter119 high) were further analyzed with respect to their CD71 and forward scatter (FSC) profiles (B) and the percentages of proerythroblasts (C), basophilic erythroblasts (R3) (D), basophilic/polychromatic erythroblasts (R4) (E) and late polychromatophilic erythroblasts (R5) (F) were estimated. Data are mean  $\pm$  SEM from n=4–5 mice per

group and are compared to naive mice ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ), bled mice ( ${}^{\epsilon}P<0.01$ ,  ${}^{\epsilon\epsilon}P<0.01$ ,  ${}^{\epsilon\epsilon\epsilon}P<0.001$ ) or between *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice ( ${}^{\psi\psi\psi}P<0.001$ ) using a one-way ANOVA and Tukey's multiple test. doi:10.1371/journal.pone.0046101.g004

and populations of erythroid precursors in the bone marrow were investigated by flow cytometry (Fig. 4A, B). Lower cell numbers (Fig. 4C), as well as significant drops in the numbers of erythroid Ter119 positive cells (Fig. 4D) were found in mice with HA. Analysis of the subpopulations of bone marrow erythroblasts as a function of Ter119 and CD71 expression and cell size (FSC) revealed significantly higher numbers of proerythroblasts in bled mice (Fig. 4E), whereas the numbers of proerythroblasts and basophilic erythroblasts decreased significantly in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice (Fig. 4F). Numbers of late basophilic/polychromatic erythroblasts were low in mice with malaria compared to control and PHZ-treated mice (Fig. 4G), whereas lower numbers of late orthochromatophilic erythroblasts/reticulocytes were measured in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice (Fig. 4H).

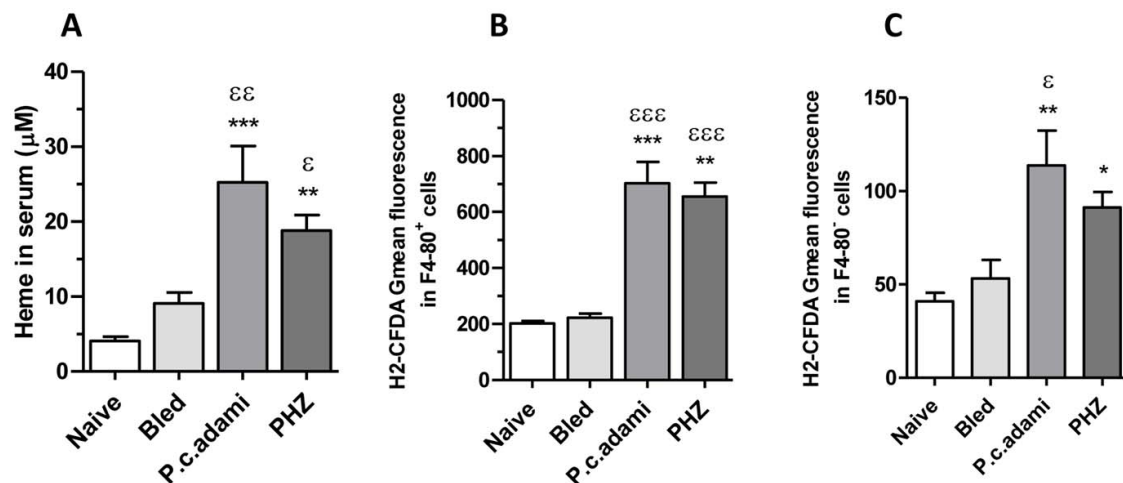
Acute hemolysis is accompanied by a rapid saturation of hemoglobin/heme scavenging and concomitant accumulation of free heme [42,43]. Accordingly, increased concentrations of heme were measured in the serum of *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice the day of euthanasia (Fig. 5A). Significantly high ROS levels were also measured in F4-80<sup>+</sup> (myeloid) and F4-80<sup>-</sup> cells from freshly prepared bone marrow cells of mice with acute HA (Fig. 5B,C), indicating oxidative stress in the bone marrow of PHZ-treated and *Plasmodium*-infected mice.

In parallel to the analysis of phenotypic markers of erythroid precursors in the tibia bone marrow, functional assays were performed to determine the capacity of bone marrow erythroid precursors to respond to EPO. Fewer bone marrow-derived BFU-E colonies were generated in bone marrow cultures from PHZ-treated and *Plasmodium*-infected mice when compared to bled mice (Fig. 6A). In contrast, significantly higher numbers of BFU-E

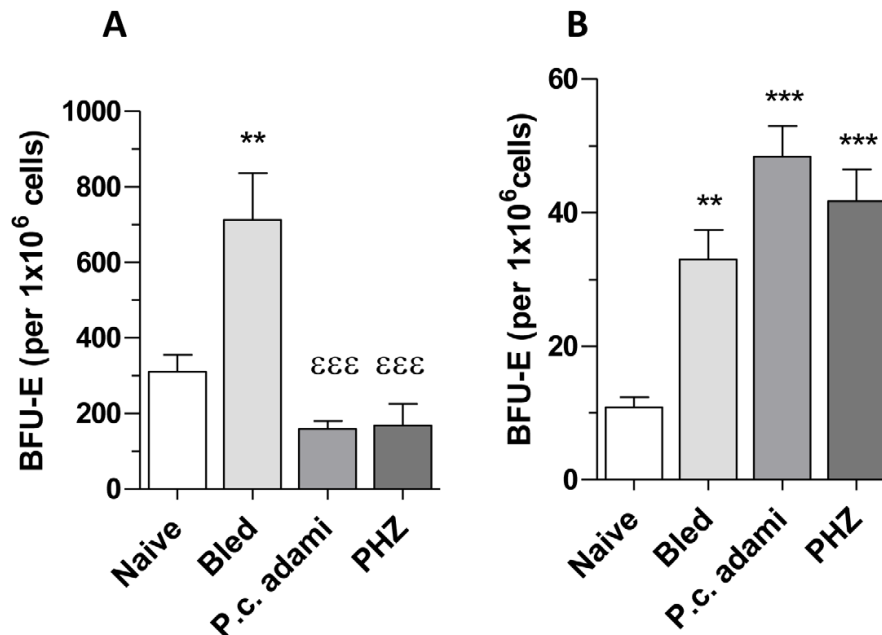
generated from bone marrow cell cultures of bled mice when compared to naive mice (Fig. 6A). Considering that the spleen represents the major site for production of RBC in response to stress erythropoiesis in mice, BFU-Es from splenic precursors were also investigated. As shown in Fig. 6B, higher and comparable numbers of BFU-E differentiated from splenic precursors in all the anemic mice.

#### Levels of bone remodeling markers and osteoclastogenesis in non-hemolytic and hemolytic mice

To further characterize the impact of non-hemolytic and hemolytic erythropoietic stress in bone remodeling, markers for bone resorption and formation were studied. Concentrations of OCN (Fig. 7A) and PINP (Fig. 7B), indicatives of bone formation, were assessed in the serum of control and anemic mice, revealing drops in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice when compared to naive mice or bled mice. Interestingly, although CTX levels, indicatives of osteoclast activity [44] remained comparable in all the mice (Fig. 7C), the concentrations of TRAP5b, which correlate to osteoclast numbers [44] were significantly lower in mice with HA (Fig. 7D), remaining comparable in bled and naive mice. Considering the drops in serum TRAP5b concentrations in mice with acute HA, we investigated the capacity of precursors to differentiate into osteoclasts *in vitro*. Higher numbers of F4-80 positive cells, which include monocyte/macrophage and osteoclast precursors were found in *Plasmodium*-infected mice compared to bled mice, whereas their numbers dropped drastically in PHZ-treated mice when compared to control or infected mice (Fig. 7E). Interestingly, the differentiation of myeloid precursors into multinucleated osteoclasts in response to RANKL and M-CSF



**Figure 5. Reactive oxygen species in the bone marrow and serum heme levels.** Naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized. (A) Serum levels of heme were assessed as described in Material and Methods. (B) Bone marrow cells were recovered from the tibia by flushing and cell aliquots were stained with anti-F4-80 biotin/streptavidin PERCP and then labelled with 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>-DCFDA). The mean cellular fluorescence was measured and analyzed in F4-80<sup>+</sup> cells (B) and F4-80<sup>-</sup> cells (C) in a FACScan cytofluorometer. Results are mean  $\pm$  SEM from 4 mice per group and are compared using a one-way ANOVA and Tukey's multiple test.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  and  $***P<0.001$  are comparisons to naive;  ${}^{\epsilon}P<0.05$ ,  ${}^{\epsilon\epsilon}P<0.01$  and  ${}^{\epsilon\epsilon\epsilon}P<0.001$  are comparisons to bled mice. doi:10.1371/journal.pone.0046101.g005



**Figure 6. Erythroid blast forming units (BFU-E) in tibial bone marrow and spleen of mice with anemia.** Naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized and BFU-Es were determined in 12-days bone marrow (A) and spleen (B) cultures using MethoCult® 03434 media. Data are mean  $\pm$  SEM from 4 mice per group and compared to naive (\*\* $P$ <0.001; \*\*\* $P$ <0.01) or to bled mice ( $P$ <0.001) using a one-way ANOVA and Tukey's multiple test. doi:10.1371/journal.pone.0046101.g006

was significantly impaired in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice whereas it was enhanced in bled mice (Fig. 7F).

Von Kossa staining further confirmed the results from tibia bone scans, as comparable mineralized bone was evident in naive and bled mice, whereas it was relatively reduced in tibias from *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice (Fig. 8). No major differences were observed for TRAP staining of bone tissue sections from naive and bled mice, whereas relatively weaker intensity of TRAP staining was noticed in samples from *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice (Fig. 8) which likely correspond to decreased trabecular number.

## Discussion

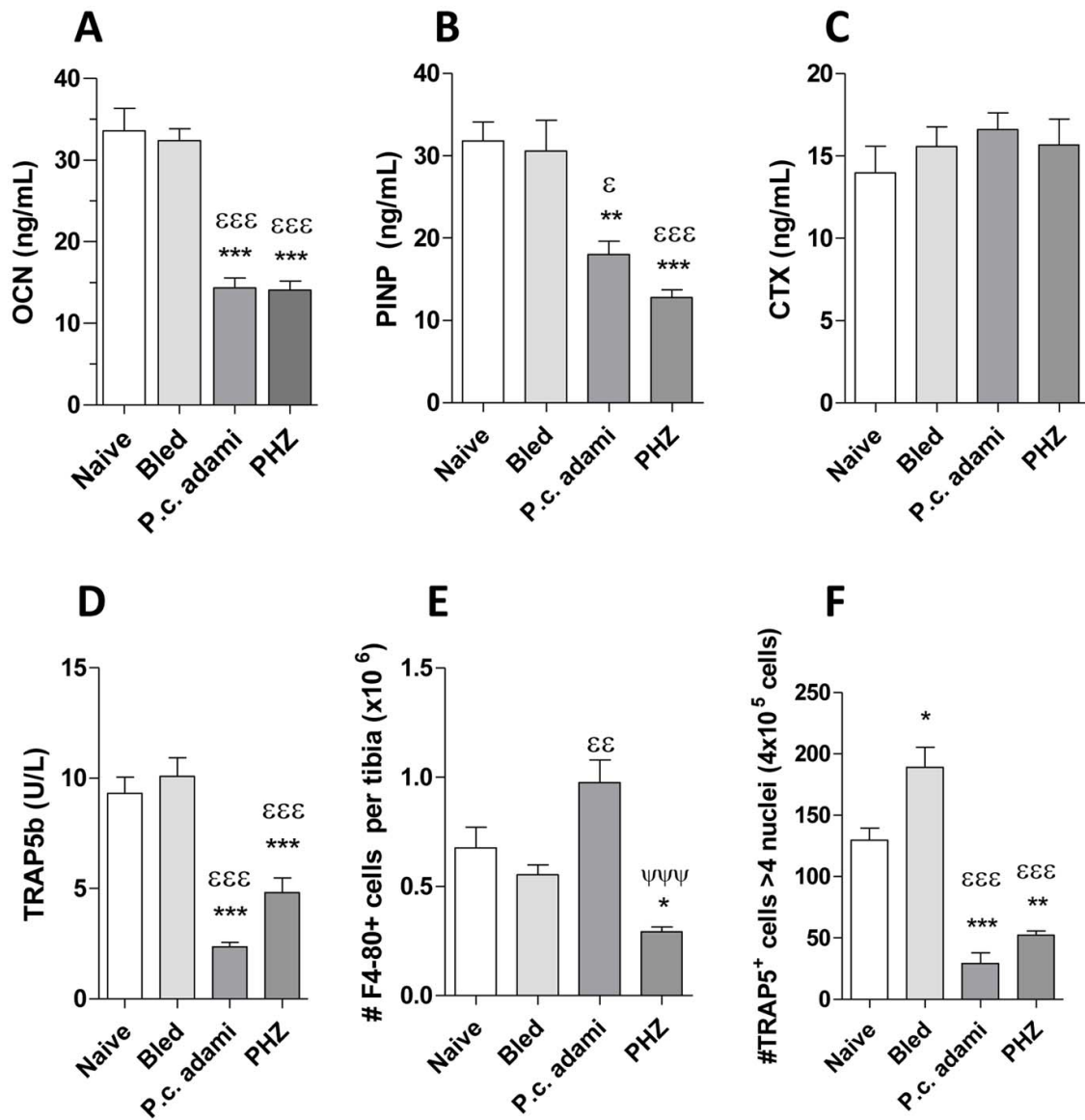
Low bone mass and high risk of fractures identified as osteoporosis are frequent in hemoglobinopathies characterized by anemia and hemolysis, which also generate dysfunctional marrow erythropoiesis and extramedullary erythropoiesis. Although the sustained erythropoietic stress caused by chronic hypoxia may at long-term alter bone metabolism in affected people, the contribution for the hemolytic nature of this stress has not been yet studied. We investigated bone metabolism and erythropoiesis in mice with non-hemolytic anemia induced by bleeding and in mice with HA concurrent to infection with *Plasmodium c. adami* or PHZ treatment. Our analysis reveals that acute hemolytic stress results in significant loss in BMD, characterized by lower trabecular numbers and less mineralized bone, and important drops in the bone formation markers OCN and PINP, effects which are absent in bled mice. Our data also indicates that short-term hemolysis decreases the numbers of osteoclasts progenitors in the bone marrow and/or their ability to fuse and form

multinucleated osteoclasts in response to M-CSF and RANKL, whereas bleeding enhances the ability of precursors to form osteoclasts. The latter result is in agreement with Kollet et al, which reported increased numbers of endosteal TRAP<sup>+</sup> osteoclasts in mice 7 days after bleeding through a comparable procedure [45].

The loss in tibia trabecular bone mass in mice with HA was accompanied by significant drops in the numbers of bone marrow cells as well as in early and late erythroid progenitors. The drops in total erythroid precursors do not seem consequent to fewer bone marrow cells but rather to impaired proliferation. Indeed, although the percentages of immature erythroid precursors (Ter119<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> cells) were similar in naive, bled and *Plasmodium*-infected mice and were enhanced in PHZ-treated mice (data not shown), significantly lower numbers of BFU-E generated from marrow cell cultures plated at comparable concentrations in methylcellulose culture media.

Considering the distinct natures of malarial and PHZ-induced hemolysis, we cannot rule out that in addition to heme, other factors may contribute to altered bone remodeling and marrow function. In this respect, the malarial pigment hemozoin has been identified as an important contributor to deficient bone marrow erythropoiesis in malaria [46,47], but its effects in osteoclasts and osteoblasts has not been yet investigated.

We know that bleeding, infection and PHZ-treatment caused significant drops in hemoglobin concentrations and enhanced erythropoiesis in the spleen, which represents the major site generating new RBC in response to acute erythropoietic stress in mice [48]. As such, all three treatments led to important erythropoietic stress. Albeit inducing comparable erythropoiesis

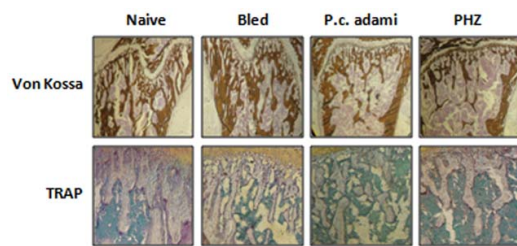


**Figure 7. Bone remodeling markers and osteoclastogenesis in anemic mice.** Naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized eight days after treatment. Sera were assessed for concentrations of (A) osteocalcin (OCN), (B) procollagen type I N-terminal propeptide (PINP), (C) carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) and (D) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b. Bone marrow cells were recovered from the tibia by flushing, an aliquot of each bone marrow cell suspension was stained with anti F4-80-PE antibody for estimation of osteoclast F4-80<sup>+</sup> progenitors by flow cytometry (E). The remaining cells were allowed to adhere overnight after which non adherent cells were stimulated with recombinant M-CSF and RANK-L for 6 days for induction of osteoclastogenesis, and the numbers of multinucleated osteoclasts (>4 nuclei, TRAP<sup>+</sup> cells) was determined by TRAP/Giemsa staining and confocal microscopy (D). Results are mean  $\pm$  SEM from 4–10 mice per group, compared by a one-way ANOVA and a Tukey's multiple comparison test. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 are comparisons to naive mice;  $\epsilon$  $P$ <0.05,  $\epsilon\epsilon$  $P$ <0.01,  $\epsilon\epsilon\epsilon$  $P$ <0.001 are comparisons to bled mice;  $\Psi\Psi\Psi$  $P$ <0.001 represents comparison between PHZ-treated and *Plasmodium*-infected mice.

doi:10.1371/journal.pone.0046101.g007

in the spleen, distinct kinetics of anemia was measured in these mice. Three times bleeding every 48 h led to moderate decreases in hemoglobin concentrations starting the day after the first blood withdrawal, which were accompanied by persisting but moderate

reticulocytosis. In contrast, *Plasmodium* infection resulted in delayed induction of anemia and delayed reticulocytosis. In PHZ-treated mice, a relatively major hemolytic stress was induced, as hemoglobin concentrations dropped abruptly during the first



**Figure 8. Bone histochemical analysis of tibia.** Naive, bled, *P.c. adami*-infected and PHZ-treated female BALB/c mice (4–6 weeks old) were euthanized and tibias were used for Von Kossa and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining on representative bone sections.  
doi:10.1371/journal.pone.0046101.g008

three days following administration of the complete PHZ-dose and induced robust reticulocytosis until the day 6 post-treatment. Assessment of EPO levels in our group of mice at the day of euthanasia revealed significantly higher EPO concentrations in mice with acute malaria, and comparable levels in naive, bled and PHZ-treated mice. Considering that EPO levels inversely correlate with the erythropoietic activity (Lezon C et al., 1995) and the short half-life time of EPO (less than 3 hours) these results suggest ongoing erythropoietic stress in mice with malaria, which is accordance with the parasitemia kinetics and the delayed reticulocytosis measured. Indeed in BALB/c mice infected with *P. c. adami* DK parasites, reticulocytosis is readily enhanced at day 9 post-infection, when parasitemia is efficiently controlled (unpublished data). As comparable effects in BMD and bone remodeling markers were measured in mice with malaria and PHZ-treated mice, we suggest that drastic as well as relatively progressive hemolysis lead to comparable effects in the bone marrow and bone tissue. The levels of the hemoglobin and heme scavengers haptoglobin and hemopexin drastically drop in malaria [30], thalassemia and sickle cell disease [43] which confirm accumulation of free heme in all these conditions albeit their distinct kinetics.

Inefficient erythropoiesis concurrent to bone marrow dysfunction has been reported in *P. falciparum* [32,49] and experimental mouse malaria [30]. In *B*-thalassemia, decreased differentiation of erythroid precursors contributes to dyserythropoiesis [5], and paraspinal erythropoiesis in thalassemia intermedia also suggest insufficient bone marrow function [12]. The hemolysis in *Plasmodium*-infected and PHZ-treated mice generated high concentrations of free heme and high ROS levels in the bone marrow, both in F4-80<sup>+</sup> and F4-80<sup>-</sup> cells. Altogether, these data suggest dyserythropoiesis and altered bone remodeling in acute hemolytic conditions and indicate that the spleen (and probably the liver) is in charge of generating new erythrocytes. Comparatively, non hemolytic acute erythropoietic stress enhances erythropoiesis in the bone marrow and spleen but does not promote major changes in BMD and increases osteoclastogenesis *ex-vivo*.

Singbrandt et al (2011) recently reported increased trabecular spacing and lower trabecular numbers in the tibia of mice treated with recombinant EPO or PHZ [50]. Selective alteration in tibia morphology has also been reported in  $\beta^{IVSII-654}$  knocking thalassemic mice, which do not produce  $\beta$ -globin and suffer from chronic HA [51]. In the latter, the changes in bone mass seem

concurrent to impaired osteoblast function and concomitant increase in osteoclast resorption activities, as drops in osteoblast surface and mineral apposition rate and increased osteoclast surface and eroded surface are measured [51], which agree with our own data. It seems feasible that high EPO concentrations in  $\beta^{IVSII-654}$  knocking thalassemic mice contribute to bone loss through a mechanism relying on osteoclast activation, as reported by Singbrandt and collaborators. However, although this team reported enhanced EPO levels, reticulocytosis and increased trabecular spacing in PHZ-treated mice [50], the capacity of bone marrow precursors to generate BFU-E or the effect of bisphosphonate were not investigated. Furthermore, the authors concluded, based on their finding that bisphosphonate abolished the erythropoietic response to EPO, that EPO-dependent activation of osteoclasts is required for sustainment of the erythropoietic response. However, it is important to keep in mind that aminobisphosphonates, as those used by Singbrandt et al (2011) deplete central macrophages and may as such inhibit erythropoiesis through an osteoclast-independent mechanism [52,53]. Based on our data, we speculate that the impact of EPO on bone resorption may be relevant in stresses as bleeding. In conditions of hemolysis, heme may impair both osteoblast/osteoclast function, and a relatively more pronounced inhibitory effect on bone formation may account for lower trabecular bone mass. Hemolysis results in high concentrations of free heme and oxidative stress, which may contribute to altered bone physiology in hemoglobinopathies and may further enhance anemia and concomitant production of EPO by inducing erythropoietic distress. Accordingly, our data with the *P.c. adami* model indicates delayed recovery from malarial anemia in mice preconditioned with heme (manuscript in preparation). Heme inhibits osteoclastogenesis *in vitro* and LPS-driven inflammatory bone loss *in vivo* through a mechanism involving HO-1 [28], and a protective role for heme/HO-1 through prevention of osteoclast activation in hemolytic/inflammatory conditions cannot be ruled out. The effect of heme on bone forming osteoblasts is less understood as induction of HO-1 has been associated to impaired maturation of osteoblasts in one study [54], whereas genetic over-expression of HO-1 increased human osteoblast stem cell differentiation in another [27].

We propose that the loss in BMD in malarial and PHZ-induced HA is concurrent to impaired bone formation and to an imbalance favoring bone resorption, as has been proposed for murine and human thalassemia [51,55]. Since our models represent conditions of acute rather than chronic hemolytic stress, our results also suggest that hemolysis provokes rapid effects in the bone marrow and bones. Robust release of hemoglobin/heme is a major contributor to the systemic inflammatory/oxidative status in malaria and other hemolytic disorders, and inflammation is a complex response that may also affect bone tissue and exert an additional hematopoietic demand in the bone marrow. We are currently investigating the specific interactions of heme with erythropoietic niches and bone remodeling cells in absence of erythropoietic stress, which will facilitate understanding of complex pathologies as malaria and genetic hemolytic disorders.

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM TS DSB. Performed the experiments: RM DTM VG HR OK JSD ELD TS MD ED CM. Analyzed the data: RM TS. Contributed reagents/materials/analysis tools: RM TS. Wrote the paper: RM TS.

## References

- Faber T, Yoon D, White S (2002) Fourier analysis reveals increased trabecular spacing in sickle cell anemia. *J Dent Res* 81: 214–218.
- Voskaridou E, Stoupa E, Antoniadou L, Premetis E, Konstantopoulos K, et al. (2006) Osteoporosis and osteoclerosis in sickle cell/beta-thalassemia: the role of the RANKL/osteoprotegerin axis. *Haematologica* 91: 813–816.
- Gurevitch O, Khitritin S, Valitov A, Slavin S (2007) Osteoporosis of hematologic etiology. *Exp Hematol* 35: 128–136.
- Walkley CR (2011) Erythropoiesis, anemia and the bone marrow microenvironment. *Int J Hematol* 93: 10–13.
- Libani IV, Guy EC, Melchiori L, Schiro R, Ramos P, et al. (2008) Decreased differentiation of erythroid cells exacerbates ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Blood* 112: 875–885.
- Wu CJ, Krishnamurti L, Kutok JL, Biernacki M, Rogers S, et al. (2005) Evidence for ineffective erythropoiesis in severe sickle cell disease. *Blood* 106: 3639–3645.
- Padate B, Bain BJ, de la Fuente J (2011) Ineffective hemopoietic in beta thalassemia major visualised. *Am J Hematol* 86: 372.
- Melchiori L, GS, Rivella S. (2010)  $\beta$ -Thalassemia: H<sub>2</sub>A/JAKing Ineffective Erythropoiesis and Iron Overload. *Adv Hematol* doi:10.1155/2010/938640
- Haidar R, Mhaidi H, Taher AT (2010) Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia. *Eur Spine J* 19: 871–878.
- Ileri T, Azik F, Ertem M, Uysal Z, Gozdasoglu S (2009) Extramedullary hematopoiesis with spinal cord compression in a child with thalassemia intermedia. *J Pediatr Hematol Oncol* 31: 681–683.
- Skordis N, Toumba M (2011) Bone disease in thalassaemia major: recent advances in pathogenesis and clinical aspects. *Pediatr Endocrinol Rev* 8 Suppl 2: 300–306.
- Haidar R, Musallam KM, Taher AT (2010) Bone disease and skeletal complications in patients with beta thalassemia major. *Bone* 48: 425–432.
- Voskaridou E, Kyrtsonis MC, Terpos E, Skordili M, Theodoropoulos I, et al. (2001) Bone resorption is increased in young adults with thalassaemia major. *Br J Haematol* 112: 36–41.
- Nielsen M, Moller H, Moestrup S (2010) Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxid Redox Signal* 12: 261–273.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti G, et al. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100: 879–887.
- Gutteridge J, Smith A (1988) Antioxidant protection by haemopexin of heme-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J* 256: 861–865.
- Phumala N, Porasuphatana S, Unchern S, Pootrakul P, Fucharoen S, et al. (2003) Hemin: a possible cause of oxidative stress in blood circulation of beta-thalassemia/hemoglobin E disease. *Free Radic Res* 37: 129–135.
- Fasola F, Adedapo K, Anetor J, Kuti M (2007) Total Antioxidants Status and Some Hematological Values in Sickle Cell Disease Patients in Steady State. *Natl Med Assoc* 99: 891–894.
- Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob H, et al. (2000) Ferritin and endothelium: a 2-edged sword promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood* 95: 3442–3450.
- Raggatt L, Partridge N (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285: 25103–25108.
- Hofbauer L, Kühne C, Viereck V (2004) The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4: 268–275.
- Mackie E (2003) Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1301–1305.
- Isidro M, Ruano B (2010) Bone disease in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 6: 144–155.
- Crepaldi G, Maggi S (2009) Epidemiologic link between osteoporosis and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest* 32: 2–5.
- McLean R (2009) Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporosis Rep* 7: 134–139.
- Lin T, Tang C, Hung S, Liu S, Lin Y, et al. (2010) Upregulation of heme oxygenase-1 inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts. *J Cell Physiol* 222: 757–768.
- Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, Kim DH, Tibullo D, et al. (2010) Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 28: 276–286.
- Zwerina J, Tzima S, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, et al. (2005) Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 19: 2011–2013.
- Lamikanra A, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, et al. (2007) Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110: 18–28.
- Chang K, Tam M, Stevenson M (2004) Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* 103: 3727–3735.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, et al. (2011) Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* 7: 1427–1442.
- Helleberg M, Goka BQ, Akanmori BD, Obeng-Adjegi G, Rodrigues O, et al. (2005) Bone marrow suppression and severe anaemia associated with persistent *Plasmodium falciparum* infection in African children with microscopically undetectable parasitaemia. *Malar J* 4: 56.
- Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, et al. (2007) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat med* 13: 703–710.
- Berger J (2007) Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* 7: 125–130.127.
- Maines M, Veltman J (1984) Phenylhydrazine-mediated induction of haem oxygenase activity in rat liver and kidney and development of hyperbilirubinemia. Inhibition by zinc-protoporphyrin. *Biochem J* 217: 409–417.
- Clemens M, Remmer HWH (1984) Phenylhydrazine-induced lipid-peroxidation of red-blood-cells invitro and invivo. *Biochem Pharmacol* 33.
- Turner AS (2001) Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1: 66–81.
- Erben RG (1997) Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 45: 307–313.
- Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, Chai S, Valderrama-Carvajal H, et al. (2004) Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3<sup>-/-</sup> mice. *Hum Mol Genet* 13: 271–284.
- Falk J (1965) Porphyrins and metalloporphyrins. Their General, Physical and Coordination Chemistry and Laboratory Methods. Amsterdam-London-New York/Elsevier Publishing Company 1964.
- Russell E, Bernstein S (1966) Blood and Blood Formation. In: *Biology of the Laboratory Mouse; The Staff of the Jackson Laboratory*, Dover Publications, Inc, New York.
- Kumar S, Bandyopadhyay U (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157: 175–188.
- Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M (1968) Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* 32: 811–815.
- Henriksen K, Tanko LB, Qvist P, Delmas PD, Christiansen C, et al. (2007) Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporos Int* 18: 681–685.
- Kollet O, Dar A, Shiviel S, Kalinkovich A, Lapid K, et al. (2006) Osteoclasts degrade osteoclast components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12: 657–664.
- Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ (2009) Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One* 4: e8446.
- Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, Migliardi G, Barrera V, et al. (2010) Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood* 116: 4328–4337.
- Bozzini CE, Barrio Rendo ME, Devoto FC, Epper CE (1970) Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse. *Am J Physiol* 219: 724–728.
- Kurtzhals JA, Rodrigues O, Addae M, Commey JO, Nkrumah FK, et al. (1997) Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* 97: 169–174.
- Singbrant S, Russell MR, Jovic T, Liddicoat B, Izon DJ, et al. (2011) Erythropoietin couples erythropoiesis, B-lymphopoiesis, and bone homeostasis within the bone marrow microenvironment. *Blood* 117: 5631–5642.
- Thongchote K, Svasti S, Sa-ardrit M, Krishnamra N, Fucharoen S, et al. (2011) Impaired bone formation and osteopenia in heterozygous beta(IVSII-654) knockin thalassemic mice. *Histochem Cell Biol* 136: 47–56.
- Nakamura M, Yagi H, Endo Y, Kosugi H, Ishi T, et al. (1999) A time kinetic study of the effect of aminobisphosphonate on murine haemopoiesis. *Br J Haematol* 107: 779–790.
- Lisa Giuliani A, Graldi G, Veronesi M, Lorenzini F, Gandini G, et al. (2007) Potentiation of erythroid abnormalities following macrophage depletion in aged rats. *Eur J Haematol* 78: 72–81.
- Zwerina J, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, Hanslik-Schnabel B, et al. (2005) Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 19: 2011–2013.
- Perisano C, Marzetti E, Spinelli MS, Calla CA, Graci C, et al. (2012) Physiopathology of Bone Modifications in beta-Thalassemia. *Anemia* 2012: 320737.



## **ANNEXE 2**

Ma contribution à cette étude a été la vérification de la classification des patients d'après leurs sous-phénotypes cliniques, et la relecture de l'article.

Les références citées dans l'Annexe 2 ont été incluses à la fin du manuscrit.

---

**Evidence of IL-17 involvement in *Plasmodium falciparum* malaria associated Multi-Organ Dysfunction.**

Fabien Herbert<sup>1 #</sup>, Nicolas Tchitchek<sup>2#</sup>, Devendra Bansal<sup>1#</sup>, Julien Jacques<sup>3</sup>, Sulabha Pathak<sup>4</sup>, Christophe Bécavin<sup>5</sup>, Constantin Fesel<sup>6</sup>, Esther Dalko<sup>1,7</sup>, Pierre-André Cazenave<sup>1,8</sup>, Cristian Preda<sup>3</sup>, Balachandran Ravindran<sup>9</sup>, Shobhona Sharma<sup>6</sup>, Bidyut Das<sup>10</sup>, and Sylviane Pied<sup>1</sup>

<sup>#</sup>These three authors have contributed equally.

<sup>1</sup>Centre for Infection and Immunity of Lille, CIIL—Center for Infection and Immunity of Lille, INSERM U1019—CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, France; <sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Washington, Seattle, WA 98195 USA; <sup>3</sup>LPP - Laboratoire Paul Painlevé, INRIA Lille - Nord Europe - MODAL; <sup>4</sup>Department Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India; <sup>5</sup>Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; <sup>6</sup>Instituto Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal; <sup>7</sup>Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada; <sup>8</sup>Immunologie – Immunopathologie – Immunothérapie, UPMC/CNRS UMR 7211, Paris, France; <sup>9</sup>Institute of Life Sciences, Bhubaneswar, Odisha, India; <sup>10</sup>SCB Medical College, Cuttack, Odisha, India.

**Running Title:** Cytokine signatures in severe malaria

---

**ABSTRACT**

**Background:** *Plasmodium falciparum* malaria in the state of Odisha, India, is characterized by high rates of severe disease, with multiple organ dysfunction (MOD)—mainly acute renal failure (ARF)—and associated mortality. In this study, we focused on the identification of cytokine/chemokine biomarkers to characterize severe *falciparum* malaria patients from Odisha into subclinical phenotypes: MOD, cerebral malaria (CM), and cerebral malaria with MOD (CM-MOD).

**Methods:** The study was conducted in the district hospital of Cuttack, Odisha, India. We enrolled *falciparum* malaria patients and three sets of controls: healthy individuals and patients with severe sepsis and encephalitis (n=222). Using a multiplex assay, we determined plasma concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines for all individuals. We used an ensemble of statistical analytical methods (linear discriminant analysis, logistic regression, multidimensional scaling, Student's *t*-test, etc.) to ascertain whether particular sets of cytokines/chemokines were predictors of severity or signatures of a disease category.

**Results:** Of the 26 cytokines/chemokines tested, the levels of 19 increased significantly during malaria. The cytokine patterns of malaria patients were clearly distinguishable from healthy controls and septicemia and encephalitis patients. High amounts of IL-17, IP-10, and IL-10 predicted MOD, decreased IL-17 and MIP-1 $\alpha$  segregated CM-MOD from MOD, and increased IL-12p40 differentiated CM from CM-MOD. Most severe malaria patients with ARF exhibited high levels of IL-17.

---

**Conclusion:** We demonstrate that CM, CM-MOD, and MOD are distinct malaria-associated pathologies. Our data also suggest a role for the IL-17 pathway in the pathogenesis of malaria-associated ARF but not in CM.

---

## INTRODUCTION

Malaria, caused by *Plasmodium* spp., results in 207 million cases worldwide and 627,000 deaths annually [301]. *P. falciparum* infection may lead to cerebral malaria (CM), a major contributor to malaria-associated mortality [302]. In India, the incidence of *falciparum* malaria is on the rise [208], and the clinical presentation of severe *falciparum* malaria has dramatically changed in the last decade, with a shift toward multiple complications [209]. The incidence of CM patients with MOD (CM-MOD), most commonly acute renal failure (ARF), is increasing; mortality is mainly observed in ARF patients [303]. However, the underlying pathophysiology for this manifestation of malaria severity remains poorly understood.

Severe malarial pathology has been attributed to the interaction of parasite- and host-origin factors [303, 304]. Although pro-inflammatory cytokines (e.g., IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) are associated with protection [305-307], several studies show that severe malaria is associated with increased TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-1 $\beta$  but decreased IL-10 and TGF- $\beta$  [242, 308]. IL-10, too, has been associated with both severe disease and protection [163, 309]. Thus, the general consensus is that a disturbed pro- and anti-inflammatory cytokine balance results in malaria pathology [108, 310].

The literature on malaria as a systemic inflammatory disease is extensive. However, studies typically have small sample sizes with subjects of disparate ages and ethnicities and investigate only a few cytokines. Although cytokines form a complex network with multiple regulatory pathways, their changed expression patterns have potential as disease biomarkers. In a study in Gondia, India, we identified two cytokine clusters that could differentiate CM from mild malaria (MM) using a two-way coupled clustering

---

approach [108]. We concluded that this approach was suited to distinguishing severe malaria sub-phenotypes. Currently, there is no prediction scoring system to prognosticate disease outcome in adult patients. Therefore, identification of biomarkers that are sensitive and specific to disease severity will be beneficial, especially as blood-based markers such as cytokines can be used in clinical trials.

In this study, we profiled plasma cytokine/chemokine levels in *falciparum* malaria patients from an area of Odisha with an Annual Parasite Index (API)>5 [207]. The state is *falciparum* malaria endemic, with manifestations including asymptomatic, MOD, and CM [208, 209]. We also determined whether cytokine clusters identified in Gondia could discriminate CM from other sub-phenotypes in Odisha [108]. Using multiple statistical tests, we identified differentially expressed cytokines and their contributions to the clinical malaria spectrum. We focused on cytokine signatures differentiating the MOD, CM, and CM-MOD categories. High amounts of IL-17, IP-10, and IL-10 were predictors of MOD; decreased IL-17 and MIP-1 $\alpha$  separated CM-MOD from MOD; and increased IL-12p40 differentiated CM from CM-MOD. Our data indicate that IL-17 may be a critical factor in ARF but not CM.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Ethics statement***

The Institutional Human Ethics Committee of S.C.B. Medical College, Cuttack and Institute Pasteur, Lille, approved the study. Blood and urine were collected after obtaining written informed consent from participants or, for comatose patients, the accompanying person.

---

***Study site, clinical definition of malaria, and sample collection***

The study was conducted at SCB Medical College and Hospital, Cuttack, Odisha. More than 85% cases in Odisha are due to *P. falciparum* [207]. Subjects (n=222) from coastal district areas with an API of 6.6 were enrolled from 2008–2010 [207]. Parasite presence was tested with ICT (SD Bio Standard Diagnostic, India) and thick and thin blood smears. Nested PCR was used to detect *P. falciparum*/*P. vivax* co-infections [202]. Only *falciparum* positive cases were included. Clinical histories, detailed physical assessments, and demographic profiles were recorded at admission. Using the World Health Organization's severity criteria, patients were categorized as MM, SNCM, MOD, CM, and CM-MOD (Table 1) [68]. Healthy patient relatives from malaria-endemic areas who had not suffered from malaria in the preceding two years and were not asymptomatic carriers (EC), severe sepsis (SEPT) patients, and viral encephalitis (ENC) patients were enrolled as controls.

***Blood collection, diagnosis, and assessment of biological parameters***

Peripheral venous blood (5 ml) was collected on day 0, before treatment. Plasma, obtained by centrifuging (4500 g, 15 min), was stored at -80°C. Participants underwent tests for complete blood count, renal and liver function, blood sugar, electrolytes, and lactates, besides urine examinations. Coagulation profile was obtained for patients with disseminated intravascular coagulation, viral markers for those with hepatopathy and jaundice, and arterial blood gas analysis for ones with respiratory distress syndrome.

***Cytokine measurements***

---

Plasma concentrations of 26 cytokines: Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  were measured using Luminex multianalytic profiling (MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine – Premixed 26 Plex), according to manufacturer instructions (Millipore, USA). Cytokine detection (range 1–10,000 pg/ml) and quantification were performed using a Bio-Plex 200 system (Bio-Rad, USA). Samples were tested in duplicate. Data were analyzed using Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad).

### ***Statistical methods***

All analysis was conducted on log<sub>10</sub>-transformed data. Differentially expressed cytokines were identified using Student's *t*-test;  $p < 0.05$  was considered significant. Cytokine expression heatmaps, and hierarchical clustering of cytokines and of the samples within each category, were generated based on the Euclidean metric and using R/Bioconductor. Multidimensional scaling (MDS) representation was generated using SVD-MDS [311]. MDS methods represent similarities and differences among high dimensionality objects into a space with two or three dimensions [312]. Linear Discriminant Analysis (LDA) was performed on log-transformed data from the Gondia study and the present study using macros and IgorPro software (version 3.16; WaveMetrics). Samples with incomplete information were rejected.

R software's glm function was combined with a stepwise selection procedure based on the Akaike information criterion for logistic regression analysis [313]. Such selection introduces, at each step, the cytokine yielding the best Akaike information criterion and removes non-significant cytokines ( $p > 0.05$ ). The true positive rate (sensitivity) and true



negative rate (specificity) were estimated for the obtained model; area under the Receiver Operating Characteristic curve was used to assess quality.

## RESULTS

### *Distributions of circulating cytokines/chemokines in clinical subphenotypes of falciparum malaria in Odisha patients*

We quantified levels of Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  by multiplex assay and generated an expression heatmap. Hierarchical clustering identified cytokine groups having similar expression profiles across subphenotypes and in patients having similar expression profiles within each subphenotype (Figure 1). Two clusters were identified. The first consisted of cytokines abundantly present in patient plasma—GM-CSF, Eotaxin, IL-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-10, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ 2, IL-7, G-CSF, and IP-10 (**Figure 2A**); the second, characterized by lower cytokine levels, comprised IL-3, IL-5, IL-15, TNF- $\beta$ , IL-2, IL-13, IL-4, IL-12p40, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-12p70, and IL-1 $\beta$  (**Figure 2B**). All malarial subgroups, but not controls (EC, SEPT, and ENC), exhibited increased levels of TNF- $\beta$ , IL-12, and IL-4. However, IL-15 and IL-12p40 levels were higher in SEPT and ENC patients. All malarial subgroups showed large variation in cytokine expression and had subpopulations with very low cytokine levels. Medians of cytokine levels tended to increase with disease severity. We compared malaria subgroups with EC using the Student's *t*-test. Additionally, we compared the CM and CM-MOD groups with a group comprising SEPT and ENC—non-parasitic diseases with brain/multi-organ involvement—and EC. Of 26 cytokines/chemokines, 19

---

increased significantly during malaria (Figure 3). When cytokine profiles of patients in individual categories were compared to the cytokine profiles of controls, distinct patterns emerged. Many more cytokines were upregulated in MM and SNCM patients than in MOD, CM, and CM-MOD patients (Figure 3). IL-10 clearly rose with severity (~fold increase of 29, 44, 93, and 61 in MM, SNCM, MOD, and CM/CM-MOD respectively; Figure 3).

Although control groups (EC, SEPT, ENC) clustered together in MDS, malaria subgroups, particularly severe forms, could not be clearly distinguished (Figure 4). Only the MOD group could be distinguished from the control groups. This suggests that the malarial inflammatory process is different from that of encephalitis and septicemia.

***Cytokines/chemokine clusters differentiating MM from CM in Gondia do not differentiate them in Odisha***

We investigated whether the cytokine clusters that discriminated MM from CM in Gondia could differentiate these subgroups in Odisha [108]. We selected cytokines common to both studies, i.e., IFN-g, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, and TNF- $\alpha$ , and performed an LDA. Resulting Gondia LDA factors discriminated infection (Gondia LDA factor 1) and clinical manifestations (Gondia LDA factor 2; **Figure 5a**). We projected the Odisha data onto Gondia LDA factor 1 and calculated a new LDA factor for the Odisha dataset (**Figure 5b**). Although these factors distinguished malaria patients from controls (**Figure 5b**), the cytokines that distinguished malarial subgroups in Odisha were very different from those in Gondia (**Figure 5c**). Furthermore, the clear separation of clinical subgroups observed in Gondia (factor 2) was not seen in Odisha.

---

However, LDA of the entire dataset distinguished the control groups from malaria subgroups and MOD from CM-MOD (**Figure 5d**).

***Identification of cytokines that differentiate Odisha MOD, CM, and CM-MOD subphenotypes***

Using the Student's *t*-test, we characterized cytokine patterns associated with each severe malaria subgroup and patterns differentiating MM from severe malaria (SNCM, MOD, CM, CM-MOD). The MOD and CM-MOD groups were statistically indistinguishable (Supplementary Figure 1). Only IL-1 $\alpha$  levels were significantly different between the CM-MOD and CM groups, with a fold-change of 1.43 ( $p=0.009$ ). By contrast, IP-10 and GM-CSF distinguished CM from the MOD group, with fold-changes of -1.46 ( $p=0.006$ ) and -1.66 ( $p=0.03$ ) respectively. We found the cytokine set associated with each severe malaria subgroup using logistic regression. This allowed determination of the discriminant power of some cytokines, accounting for multivariate dependence between predictors. Once a cytokine was identified as discriminant, we characterized its effect through an odds-ratio (OR). When the severe non-cerebral (SNCM+MOD) group was compared to the cerebral malaria (CM+CM-MOD) group (**Table 2**), only MIP-1 $\alpha$  discriminated the two (OR=0.71;  $p=0.0003$ ). Within the SNCM+MOD group, only IL-17 (OR=0.63;  $p=0.04$ ) and IP-10 (OR=0.08;  $p=0.03$ ) differentiated SNCM from MOD. Levels of both cytokines were higher in MOD than SNCM. Most patients (SNCM, MOD, and CM-MOD) with ARF exhibited high IL-17 (**Figure 6a**) or IP-10 (**Figure 6b**) levels. Interestingly, in SNCM patients with ARF, IP-10 concentrations were negatively correlated to IL-17 (OR= -0.59;  $p=0.03$ ) (**Figure 6c**).

---

Cytokine patterns in severe malaria subgroups were then compared to identify cytokines contributing to a given clinical subphenotype (**Table 3**). Levels of GM-CSF and IL-17 were significantly higher in the MOD than in the CM group, allowing for their differentiation (OR=0.2; p=0.03 and OR=0.5; p=0.02 for GM-CSF and IL-17, respectively). Besides IL-17, high levels of MIP-1 $\alpha$  also differentiated CM-MOD from MOD. This approach was further used to define cytokines that discriminated all clinical malaria subgroups. The results are represented in **Figure 7**. This cytokine/chemokine network could be helpful in stratifying severe malaria manifestations into clinical subphenotypes (**Table 1**).

## DISCUSSION

*Falciparum* malaria, whose manifestations vary from mild clinical illness to coma, severe anemia, respiratory distress, shock, and MOD, is characterized by marked changes in cytokine production. Therefore, we examined cytokine patterns in a large cohort of malaria patients in Odisha, India, and compared them to healthy, uninfected controls to determine whether differences in plasma cytokine levels could characterize severe malaria subsets. In Odisha, severe *falciparum* malaria is often associated with ARF, and over 86% deaths are due to CM-associated renal failure [209]. In this study too, 88% of MOD and 100% of CM-MOD patients had ARF. Reasons for the increase in ARF, mechanisms precipitating it, and the relationship between cytokines and ARF remain unclear.

We could clearly distinguish malaria patients from healthy controls and from patients of the severe infections encephalitis and severe sepsis. However, the cluster of cytokines—TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-1 $\beta$ —that differentiated CM from other *falciparum*

---

malaria manifestations in Gondia could not distinguish severe malaria cases in Odisha [108]. Indeed, in this population, cytokine responses differed from published reports. As in other studies, IL-1 $\beta$  was the only cytokine that contributed significantly to the discrimination of CM in Gondia [108, 314]. Surprisingly, in Odissi patients, IL-1 $\beta$  levels decreased with disease severity and were highest in severe malaria patients with no brain injury. Moreover, TNF- $\alpha$ , linked to disease severity and death in several studies, was not thus linked in this population [242, 307]. These differences could be attributed to multiple factors. First is the difference in malaria endemicity. Gondia has an API of <1%, whereas coastal Odisha has an API of >5% [207]. The sites also differ in range of manifestations—MOD, observed in Odisha, was absent in Gondia. Factors such as co-infections, population genetics, and environment could also influence response. Our data suggest that the pathophysiology of malaria, cytokine profiles, and range of manifestations may vary greatly across regions; this must be taken into consideration when designing studies and interpreting results.

To detect cytokine clusters distinguishing severe malaria sub-phenotypes in Odisha, we used an ensemble of methods including the capacity to predict the outcome using a test data set. The cytokine expression heatmaps did not reveal distinctive patterns associated with particular sub-phenotypes, IL-17 and MCP-1 levels increased during MOD and IL-1 $\beta$  during SNCM. Our results are consistent with previous studies implicating dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines/chemokines in disease progression.

All malarial patients showed higher IL-4 and IL-10 levels and lower Eotaxin levels than EC. It is noteworthy that cytokine identification in our logistic regression model is not subject to confounding effect. For example, Eotaxin alone has a marginal effect when

---

EC are compared to malaria patients, whereas it becomes significant when calculated with covariates (IL-4 and IL-10). However, the decrease in Eotaxin levels was not unique to malaria; a similar decline was observed in SEPT and ENC. IL-4 and IL-10 are key anti-inflammatory cytokines involved in both malarial protection and immunopathology [163, 315, 316].

High IL-10 concentrations have been reported in severe malaria, suggesting it has a detrimental role [316, 317]. Conversely, elevated IL-10 has been found in asymptomatic, but not symptomatic, *P. falciparum*-infected children (Guiyedi, V. et al, unpublished results). Significantly increased plasma IL-10 levels that correlate with parasite load have been reported in *P. falciparum*-infected Gabonese children and *P. vivax*-infected Brazilian children [317, 318]. In the present cohort too, we found a significant positive correlation between IL-10 levels and parasite histidine rich protein 2, which is an indicator of parasite load (Dalko, E., unpublished results). Therefore, IL-10 likely plays a protective role in anti-parasitic immunity and/or inflammation control in our population.

Mild disease was distinguished from cerebral outcomes (CM+CM-MOD) by high levels of MCP-1 associated with low levels of MIP-1 $\alpha$ . MCP-1 is thought to contribute to increased permeability of the blood–brain barrier [319], and high levels of MCP-1 have been reported in patients with several neuro-inflammatory diseases, including multiple sclerosis, cerebral ischemia, and HIV-1 encephalitis [276]. To our knowledge, this is the first study to show increased MCP-1 levels in CM patients.

IP-10, a potent pro-inflammatory chemokine, has been implicated in the recruitment and migration of leukocytes to the brain in experimental CM [117]. High levels of IP-10 in

---

CSF and plasma are proposed predictors of severe and fatal CM in African and Indian populations [109, 246]. In our study, IP-10 levels correlated significantly with malarial severity and were highest in MOD patients. Median IP-10 levels were similar in CM and SNCM patients. Nevertheless, 70% of the CM-MOD group had very high IP-10 concentrations; in 50%, the disease proved fatal. This suggests that IP-10 alone may not be a predictor of fatal CM in the Odisha population.

A key study finding was that IL-17 was higher in MOD than in other severe malaria subgroups, including CM and CM-MOD. IL-17 and the Th17 cells that produce it are involved in the development of inflammatory renal diseases, such as lupus nephritis and nephrotoxic nephritis, as well as in allograft rejection [320]. Our observations suggest a role for the IL-17/Th17 pathway in renal inflammatory pathology in *falciparum* infections in Odisha. Thus, an excess of IL-17 may promote MOD, particularly ARF. Notably, most CM-MOD mortalities with ARF exhibited the highest IL-17 plasma concentrations. Interestingly, IL-12p40 was the only cytokine that segregated CM from CM-MOD. IL-12p40 is a shared subunit between IL-12 and IL-23 [321]. As IL-12p40, but not IL-12p70, distinguishes CM and CM-MOD, our results suggest a critical role for IL-23 in MOD. IL-23 promotes the differentiation of Th1 cells, and the IL-23/Th17 axis is known to contribute to renal tissue injury [320, 322]. Elucidating the pathways that regulate Th17 differentiation, Th17 effector functions, and IL-17 secretion during malaria may clarify the role of inflammatory processes in ARF etiology.

IL-17 associated with high GM-CSF distinguished MOD from CM group and was segregated from the CM-MOD group when associated with high levels of MIP-1 $\alpha$ . GM-CSF promotes neutrophil recruitment and function, and it is implicated in neuro-inflammation [323]. Distinct and counter-regulatory pathways have been associated

---

with the generation of IL-17 and GM-CSF producing cells [324]. It is tempting to speculate that high levels of IL-17 may protect from malaria-associated neurological complications although beyond a threshold it may result in renal complications.

In conclusion, we report distinct differences in cytokine production correlating with infection and disease severity. We also report discrete cytokine patterns in subphenotypes of severe malaria. Limitations of examining cytokine production at single time points and in circulation (rather than local microenvironments) complicate the interpretation of these results. Nevertheless, the differences in cytokine patterns of MM and severe malaria patients as well as the distinct cytokine profiles of CM, CM-MOD, and MOD patients may prove insightful. A broader understanding of the interplay of cytokines/chemokines produced in response to falciparum infection and their relation to disease severity may assist in developing more targeted interventions.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS.**

We thank Shabda communication for helping in the manuscript editing.

#### **FUNDINGS.**

This work was supported by the Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research (IFCPAR project N° 3703), the International Associated Laboratory Systems Immunology and Genetics of Infectious Diseases (LIA SIGID - CNRS, Lille University and the Department of Biotechnology (DBT), Ministry of Science and Technology of India and the ANR LAbEx Parafrap.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare having no conflict of interest.



**Table 1. Demographic profiles of the patients infected with *P. falciparum* malaria and controls.**

Groups	Criterion	No. of Patients (%)	Median age (range)	Sex (M/F)
EC	Healthy subjects from malaria-endemic areas	21 (9.46)	29 (17-52)	20/1
SEPT	Severe sepsis patients	10 (4.5)	39 (24-70)	5/5
ENC	Viral encephalitis patients	9 (4.06)	35 (13-72)	7/2
MM	Patients having fever without complications	37 (16.67)	28 (15-62)	25/12
SNCM	Patients without cerebral involvement, but with either: severe anemia <sup>a</sup> or jaundice <sup>b</sup> , or ARF <sup>c</sup> , or acute respiratory distress <sup>d</sup> , or shock <sup>e</sup> or haemoglobinuria	53 (23.87)	34 (15-65)	36/17
MOD	Patients showing involvement of two or more organs: CNS, respiratory distress, ARF, or hepatic dysfunction <sup>f</sup>	9 (4.06)	28 (16-55)	8/1
CM	Patients with fever and altered sensorium, unarousable coma with Glasgow Coma Scale of $\leq 10$ <sup>g</sup>	42 (18.91)	28 (15-65)	32/10
CM-MOD	CM patients with MOD	41 (18.47)	35 (15-70)	31/10
Total		222 (100%)	30 (13-72)	164/58

Legend: EC – endemic control, SEPT – septicemia, ENC – encephalitis, MM- mild malaria, SNCM – severe non-cerebral malaria, MOD – Multi-organ dysfunction, CM – cerebral malaria, CM-MOD – cerebral malaria with multi-organ dysfunction.

<sup>a</sup>haemoglobin  $\leq 5$  g/dl

<sup>b</sup>serum bilirubin  $\geq 3$  mg/dl

<sup>c</sup>serum creatinin  $\geq 3$  mg/dl

<sup>d</sup>PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>  $\leq 200$

<sup>e</sup>systolic BP  $\leq 80$  mm Hg

<sup>f</sup>ALT/AST  $\geq 3$  times of normal, prolonged prothrombin time, and albuminaemia

<sup>g</sup>categorized as CM after excluding other causes of encephalopathy, such as encephalitis, meningitis, and metabolic encephalopathy, by biochemical investigations of CSF.

**Table 2. Discriminant cytokines contributing to distinguishing malarial subphenotypes**

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio <sup>#</sup>	p-values
	EC	Malaria		
IL-4	0.43 [0.43 ; 0.53]	4.01 [3.22 ; 8.37]	66.38	0.0007
IL-10	4.08 [2.20 ; 8.69]	264.36 [91.29 ; 863.32]	3.26	0.0076
Eotaxin	234.96 [50.06 ; 409.64]	159.78 [83.77; 265.29]	0.15	0.0388

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio <sup>#</sup>	p-values
	MM	MOD + SNCM		
IL-7	16.72 [7.84; 40.78]	32.44 [14.29; 59.42]	1.71	0.0113

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio <sup>#</sup>	p-values
	MM	CM + CM-MOD		
MCP-1	281.20 [161.07; 629.90]	578.28 [322.64; 1039.07]	1.78	0.0053
MIP-1 $\alpha$	92.42 [29.71 ; 1251.47]	53.58 [30.18 ; 168.54]	0.70	0.0021

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio <sup>#</sup>	p-values
	MOD	SNCM		
IL-17	5.30 [4.61; 59.32]	2.37 [0.67; 7.55]	0.63	0.0443
IP-10	9307.78 [6256.92; 9648.60]	4246.96 [1580.30; 8515.69]	0.08	0.0374

---

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio <sup>#</sup>	p-values
	SNCM + MOD	CM + CM-MOD		
MIP-1a	79.84 [26.42; 1071.65]	53.58 [30.18; 168.54]	0.71	0.0003

<sup>#</sup>Odds ratio are in logarithm scale

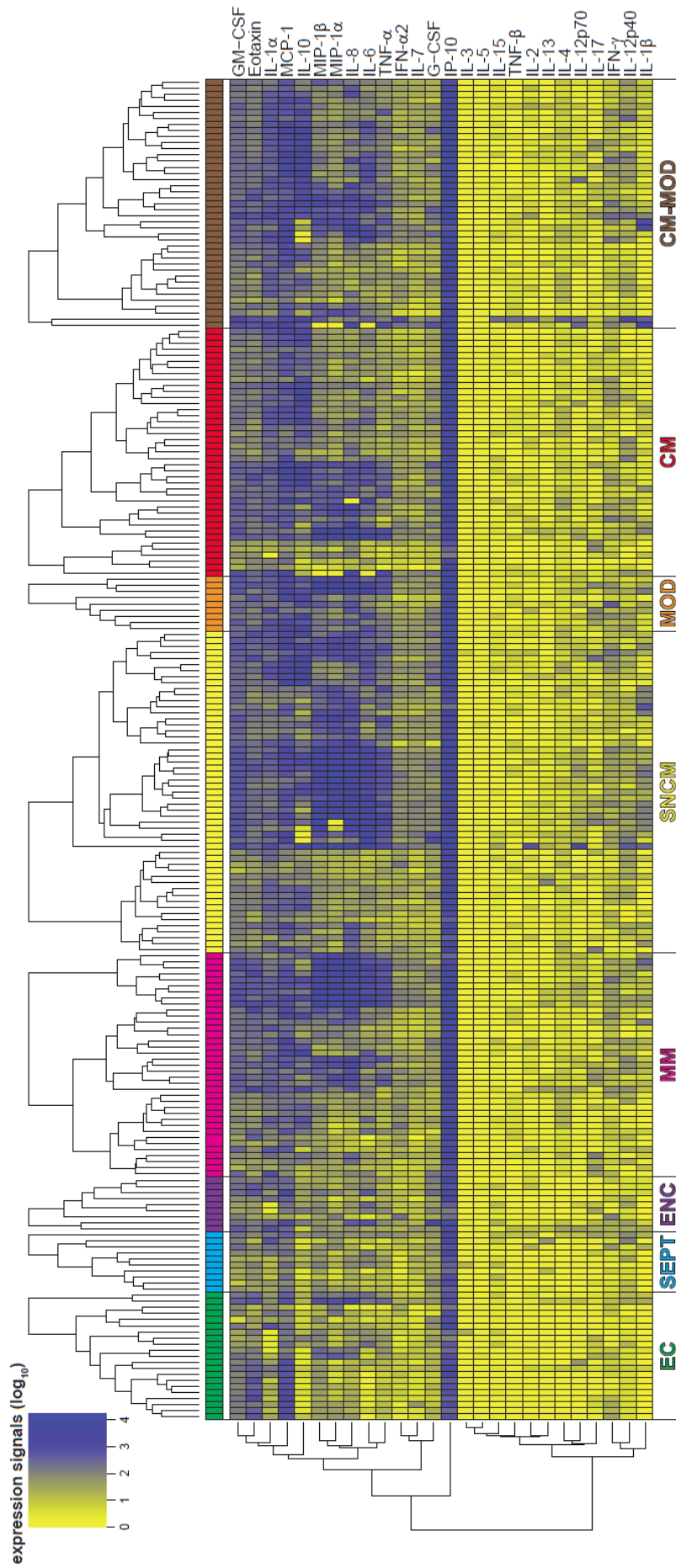
**Table 3. Select severe malarial subgroups and discriminant cytokines that may contribute to those subphenotypes.**

Cytokines	Median [q1; q3]		Odds-Ratio	p-values
	MOD	CM		
GM-CSF	286.08 [257.48; 463.00]	168.72 [105.88; 283.04]	0.21	0.0315
IL-17	5.30 [4.61; 59.32]	2.23 [0.66; 5.17]	0.51	0.0263

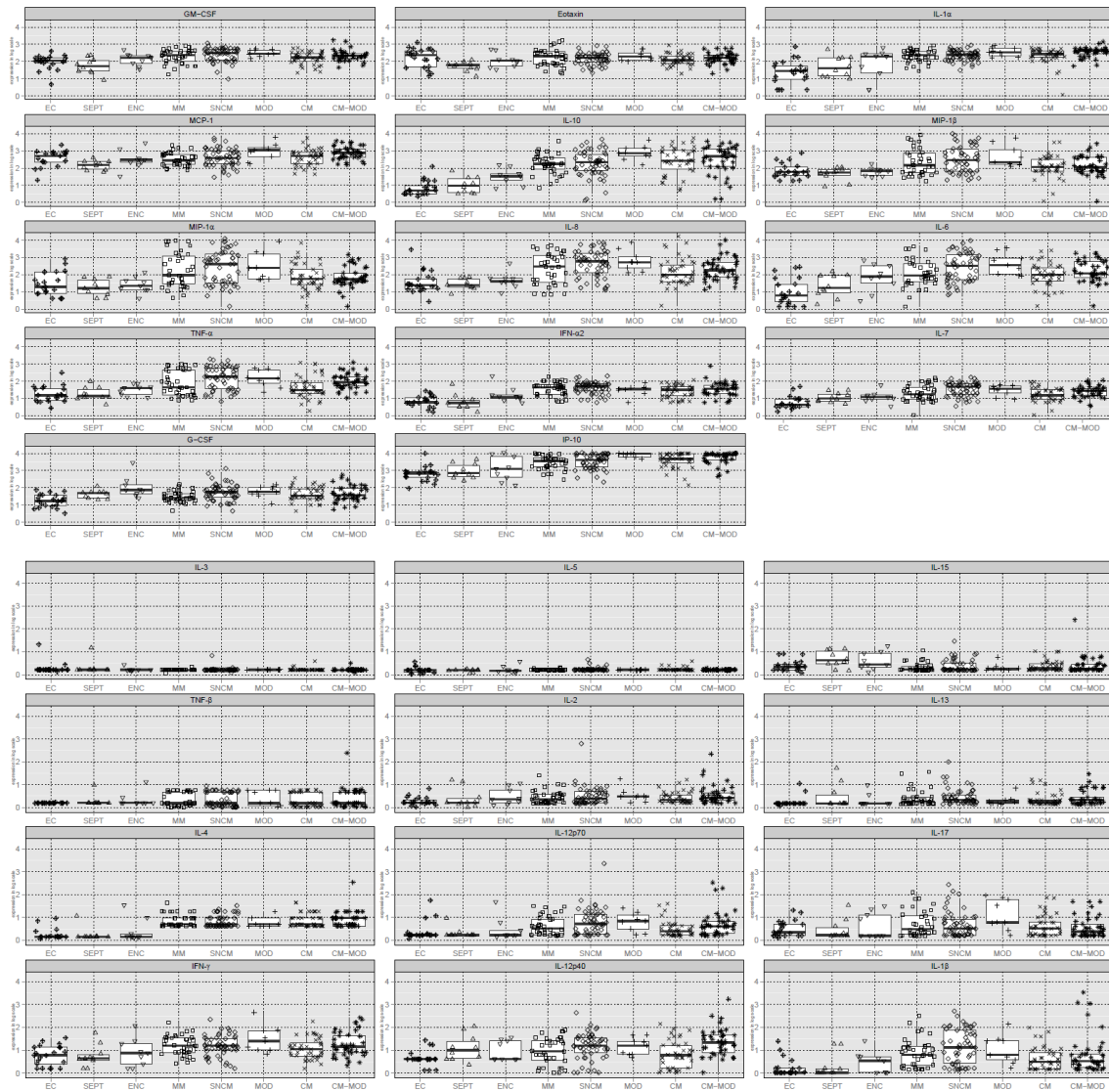
Cytokines	Median [q1 ; q3]		Odds-Ratio	p-values
	MOD	CM-MOD		
IL-17	5.30 [4.61; 59.32]	1.74 [0.65; 4.56]	0.55	0.0212
MIP-1a	240.41 [54.49; 1619.08]	53.33 [35.93; 122.69]	0.57	0.0459

Cytokines	Median [q1 ; q3]		Odds-Ratio	p-values
	MOD	CM + CM-MOD		
IL-17	5.30 [4.61; 59.32]	2.15 [0.65; 5.17]	0.54	0.0212
MIP-1a	219.74 [170.86; 1136.23]	112.52 [66.23; 364.32]	0.52	0.0239

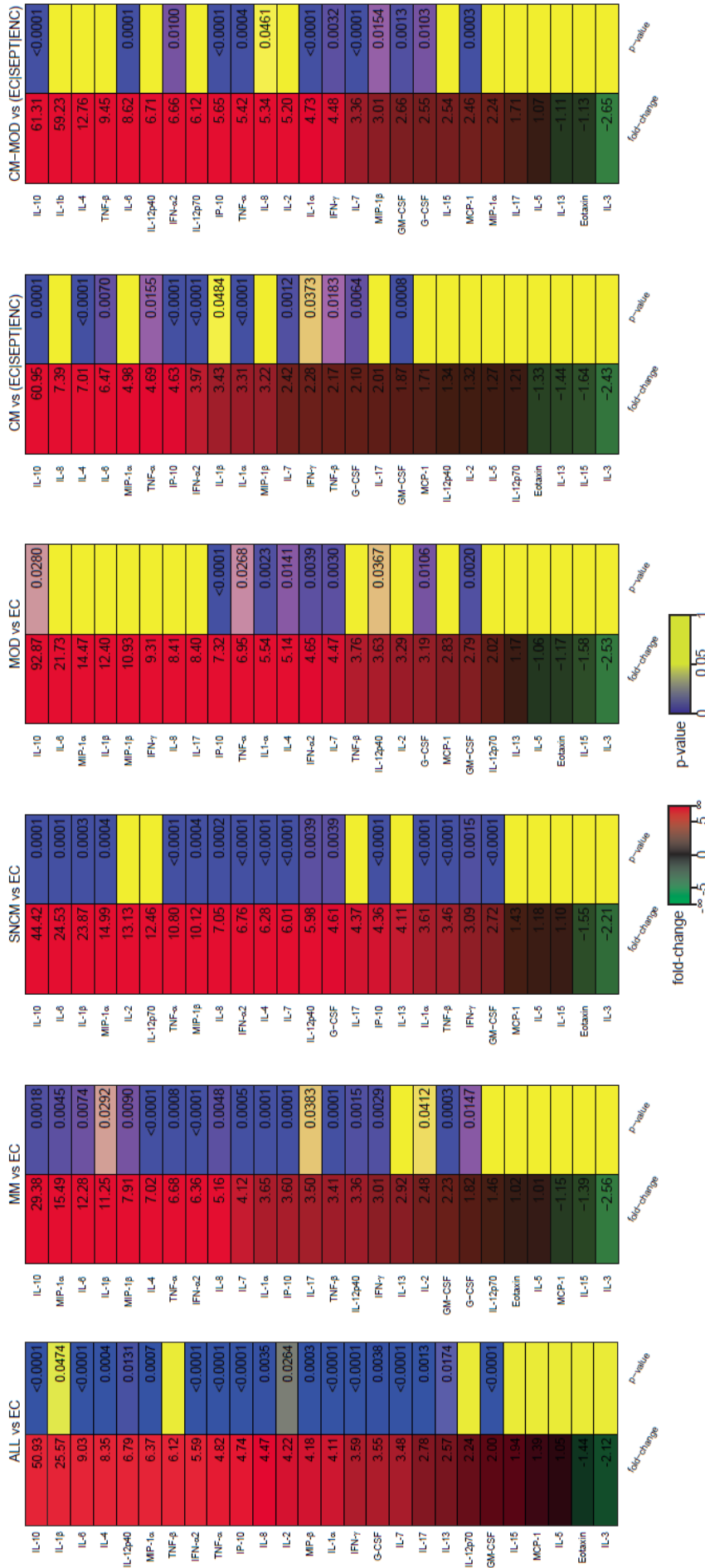
Cytokines	Median [q1 ; q3]		Odds-Ratio	p-values
	CM	CM-MOD		
IL-12p40	5.23 [0.98; 15.27]	21.86 [6.86; 44.20]	1.66	0.0011



**Figure 1. Heatmaps of cytokine profiles in malarial subgroups and controls.** Heatmaps showing the  $\log_{10}$ -transformed cytokine expression values for each individual sample. Hierarchical clusters of cytokines are represented by a vertical dendrogram. In order to identify group sub-populations, hierarchical clusters within each biological condition are represented by horizontal dendrograms. Hierarchical clusters of cytokines and samples were created based on the Euclidean distance and using the complete linkage agglomeration method.



**Figure 2. Boxplots and plot-jittering representations showing cytokine distributions across different subphenotypes of malarial patients and controls.** Box plots showing the first and third quartiles, together with the medians of the cytokines levels expressed as  $\log_{10}$ -transformed values (ng/ml of plasma) across categories of malarial patients (MM, SNCM, MOD, CM, CM-MOD) and controls (EC, SEPT, ENC). Individual cytokines within each category are represented using a jittering method in order to reduce display overlap. (Upper panel) Set of cytokines abundantly produced during infection. (Lower panel) Set of cytokines characterized by relatively lower levels of expression during infection.



**Figure 3. Heatmaps of observed fold-changes in cytokine concentrations in malaria subphenotypes as compared to controls.** Each panel shows a heatmap of the observed fold-change in cytokine concentration in the plasma of a particular subgroup of malarial patients with respect to the indicated control group. Heatmaps were sorted by fold-change values. Associated p-values obtained using the Student's *t*-test are also indicated. Fold-change= $\log_2(\mu_1/\mu_2)$ , where  $\mu_1$  is the mean of the first group,  $\mu_2$  the mean of the second group.

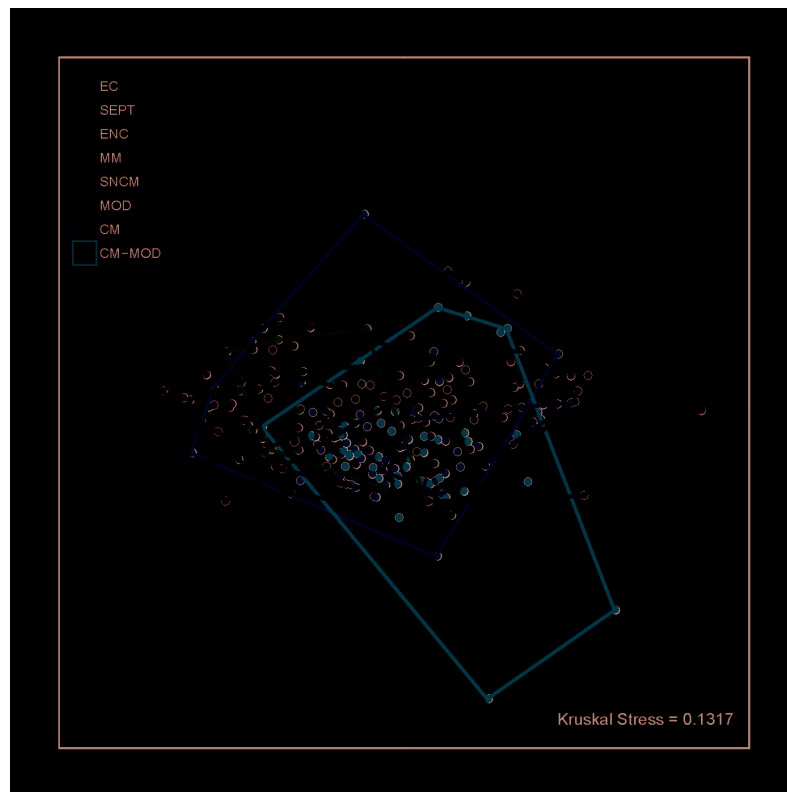


Figure 4

**Figure 4. Multidimensional scaling representation of samples on the basis of their cytokine profiles.** Each dot represents a cytokine profile of a sample plotted in the intensity space of the expression signals. Pairwise distances between dots are proportional to the Euclidean distances between samples. Euclidean distances have been calculated based on the  $\log_{10}$  transformed signals and using all measured cytokines values. Convex hulls (i.e. the smallest convex set containing the points) delineate each biological condition [23]. The Kruskal Stress criterion shown in the representation quantifies the quality of the representation as a fraction of the information lost during the dimensionality reduction procedure.



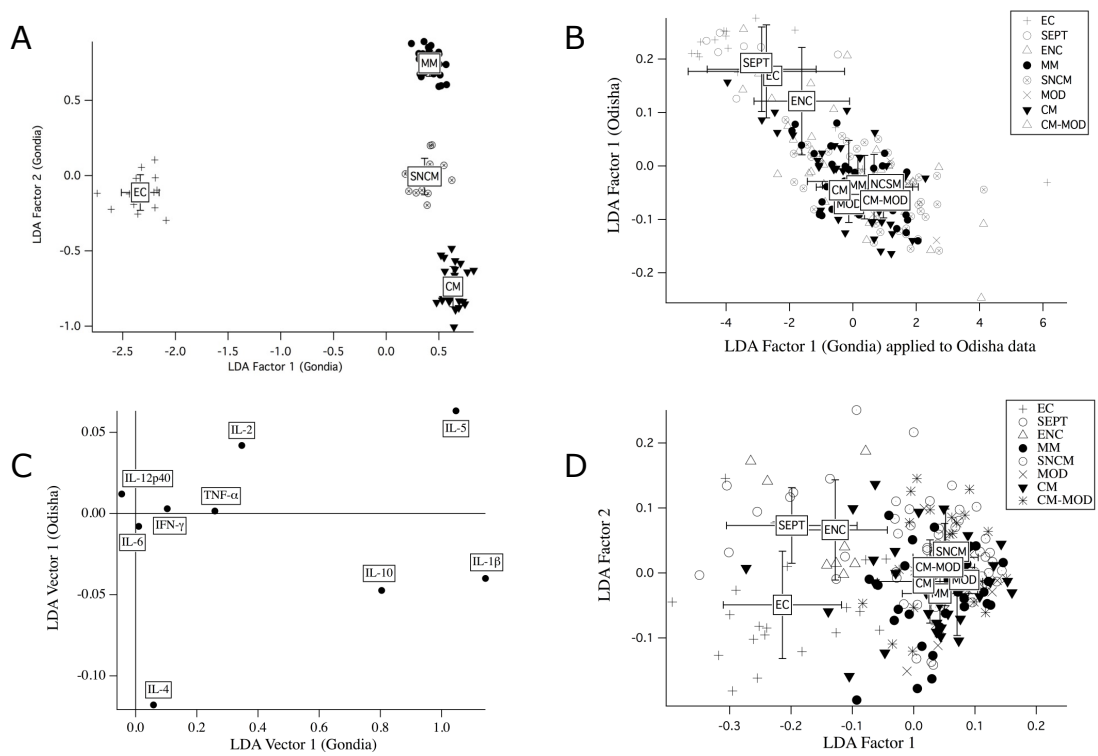
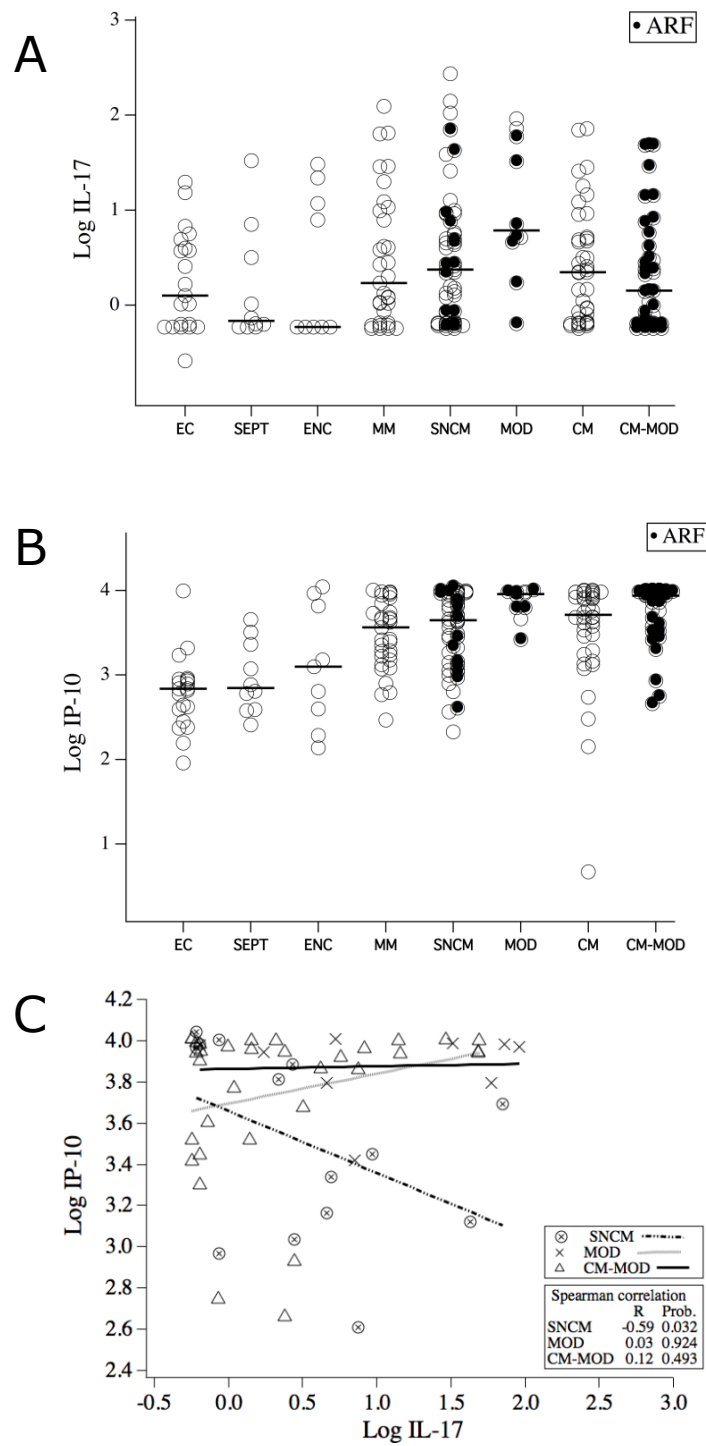


Figure 5

**Figure 5. Linear Discriminant Analysis.** (A) Discrimination of malaria clinical subphenotypes in Gondia patients. Factor 1 discriminates infection; factor 2 discriminates different manifestations. (B) Projection of Gondia LDA factor 1 using data from Odisha, compared to direct LDA discrimination of Odisha subjects by the same cytokines studied in Gondia: both 1st factors discriminate *P. falciparum* infection. (C) Factor loads of the respective 1st LDA factors. (D) LDA discrimination of the patient subgroups studied in Odisha using all 26 cytokines.



**Figure 6. Cytokine levels in different malarial subgroups.** Levels of  $\log_{10}$ -transformed IL-17 (A) and IP-10 (B) were measured and plotted according to groups. Horizontal bars indicate the median. Black dots represent patients with ARF. Correlations between these two cytokines for MOD, CM, and CM-MOD patients are represented in (C). Data we analyzed using the Spearman correlation test.  $p \leq 0.05$  was considered as significant.

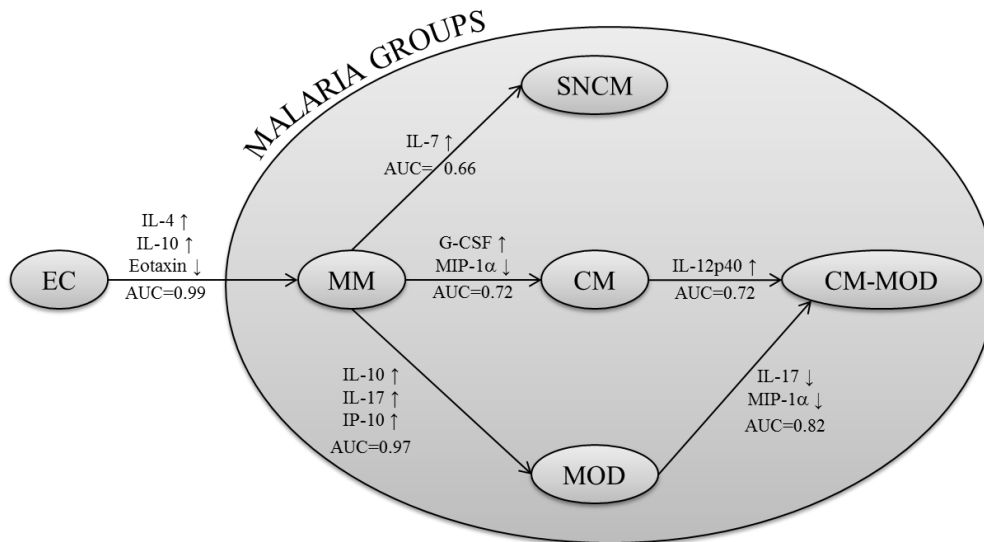
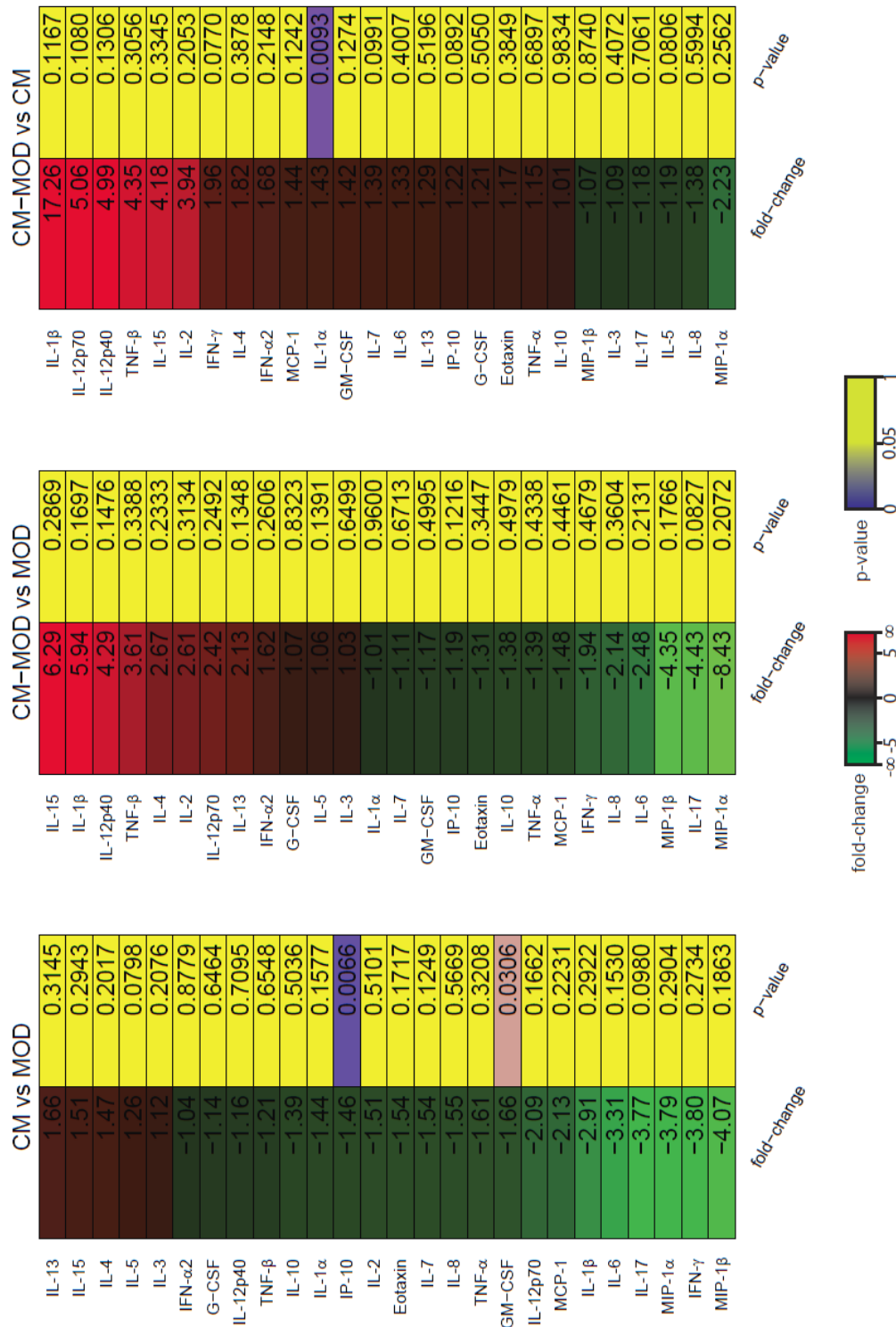


Figure 7

**Figure 7. Logistic regression.** Schematic representation of the results of the logistic regressions applied to discriminate patient subphenotypes. Each regression is represented by a long arrow between the two subgroups under consideration (from reference subgroup to target subgroup). On each arrow is inscribed: the area under the Receiver Operating Characteristic curve (AUC), indicating the quality of the discrimination; the significant cytokines and the sign of their effect (↑ if an increase of the value of the cytokine is in favor of the target subgroup; ↓ if a decrease of the value of the cytokine is in favor of the target subgroup).



**Supplementary Figure 1 – Heatmaps of cytokine signatures between MOD, CM, and CM-MOD groups.** Heatmaps show the cytokine fold-change with the associated p-values for comparison between CM and MOD, CM-MOD and MOD, and CM-MOD and CM groups. Each heatmap has been sorted by the fold-change values. Fold-change values and p-values are indicated for all cytokines.  $\text{Fold-change} = \log_2(\mu_1 / \mu_2)$ , where  $\mu_1$  is the mean of the first group;  $\mu_2$  the mean of the second group.

## **PARTIE V. REFERENCES**

---



1. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* **2002**; 415(6872): 680-5.
2. Kihara M, Carter JA, Newton CR. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health* **2006**; 11(4): 386-97.
3. Mendonca VR, Luz NF, Santos NJ, et al. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infect Immun* **2012**; 80(4): 1445-54.
4. World Health Organization. World Malaria Report **2014**. Disponible sur: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr-2014-no-profiles.pdf?ua=1)
5. Beri R, Chandra R. Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev* **1993**; 25(1-2): 49-152.
6. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* **2006**; 111(2): 327-45.
7. Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol* **2012**; 3: 77.
8. Wagener FA, Volk HD, Willis D, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* **2003**; 55(3): 551-71.

- 
9. Ponka P, Schulman HM. Regulation of heme synthesis in erythroid cells: hemin inhibits transferrin iron utilization but not protoporphyrin synthesis. *Blood* **1985**; 65(4): 850-7.
  10. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)* **2008**; 86(10): 1097-111.
  11. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* **2005**; 157(3): 175-88.
  12. Schipper HM. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med* **2004**; 37(12): 1995-2011.
  13. Xia ZW, Xu LQ, Zhong WW, et al. Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor- 1. *Am J Pathol* **2007**; 171(6): 1904-14.
  14. Morello N, Tonoli E, Logrand F, et al. Haemopexin affects iron distribution and ferritin expression in mouse brain. *J Cell Mol Med* **2009**; 13(10): 4192-204.
  15. Liu M, Amodu AS, Pitts S, et al. Heme Mediated STAT3 Activation in Severe Malaria. *PLoS One* **2012**; 7(3).
  16. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* **1988**; 2(10): 2557-68.
  17. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Tolosano E. Haptoglobin and hemopexin in heme detoxification and iron recycling. *Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins*, **2011**.



18. Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* **1968**; 32(5): 811-5.
19. Rolla S, Ingoglia G, Bardina V, et al. Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development. *J Immunol* **2013**; 191(11): 5451-9.
20. Dong B, Cai M, Fang Z, et al. Hemopexin induces neuroprotection in the rat subjected to focal cerebral ischemia. *BMC Neurosci* **2013**; 14: 58.
21. Cunnington AJ, de Souza JB, Walther M, Riley EM. Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat Med* **2012**; 18(1): 120-7.
22. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **1999**; 340(6): 448-54.
23. Ray S, Renu D, Srivastava R, et al. Proteomic investigation of falciparum and vivax malaria for identification of surrogate protein markers. *PLoS One* **2012**; 7(8): e41751.
24. Vinchi F, Gastaldi S, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. Hemopexin prevents endothelial damage and liver congestion in a mouse model of heme overload. *Am J Pathol* **2008**; 173(1): 289-99.
25. Ascenzi P, Fasano M. Serum heme-albumin: an allosteric protein. *IUBMB Life* **2009**; 61(12): 1118-22.
26. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem* **2007**; 79(12): 2325-38.
27. Chiu DT, van den Berg J, Kuypers FA, Hung IJ, Wei JS, Liu TZ. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of

- 
- hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. *Free Radic Biol Med* **1996**; 21(1): 89-95.
28. Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol* **2005**; 74(4): 324-32.
29. Nuchsongsin F, Chotivanich K, Charunwatthana P, et al. Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 77(4): 617-22.
30. Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J Biol Chem* **1984**; 259(1): 301-5.
31. Watanabe-Matsui M, Muto A, Matsui T, et al. Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2. *Blood* **2011**; 117(20): 5438-48.
32. Mense SM, Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* **2006**; 16(8): 681-92.
33. Laird MD, Wakade C, Alleyne CH, Jr., Dhandapani KM. Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes. *Free Radic Biol Med* **2008**; 45(8): 1103-14.
34. Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* **2002**; 99(11): 4160-5.

- 
35. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **2007**; 282(28): 20221-9.
  36. Fernandez PL, Dutra FF, Alves L, et al. Heme amplifies the innate immune response to microbial molecules through spleen tyrosine kinase (Syk)-dependent reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* **2010**; 285(43): 32844-51.
  37. Lin S, Yin Q, Zhong Q, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation* **2012**; 9: 46.
  38. Cambos M, Bazinet S, Abed E, et al. The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages. *Int J Parasitol* **2010**; 40(9): 1003-12.
  39. Cambos M, Scorza T. Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J Leukoc Biol* **2011**; 89(1): 159-71.
  40. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood* **2012**; 119(10): 2368-75.
  41. Regan RF, Wang Y, Ma X, Chong A, Guo Y. Activation of extracellular signal-regulated kinases potentiates hemin toxicity in astrocyte cultures. *J Neurochem* **2001**; 79(3): 545-55.
  42. Sukumari-Ramesh S, Laird MD, Singh N, Vender JR, Alleyne CH, Jr., Dhandapani KM. Astrocyte-derived glutathione attenuates hemin-induced apoptosis in cerebral microvascular cells. *Glia* **2010**; 58(15): 1858-70.

- 
43. Gatidis S, Foller M, Lang F. Hemin-induced suicidal erythrocyte death. *Ann Hematol* **2009**; 88(8): 721-6.
  44. Arruda MA, Graca-Souza AV, Barja-Fidalgo C. Heme and innate immunity: new insights for an old molecule. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2005**; 100(7): 799-803.
  45. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* **2004**; 173(3): 2023-30.
  46. Porto BN, Alves LS, Fernandez PL, et al. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem* **2007**; 282(33): 24430-6.
  47. Spiller F, Costa C, Souto FO, et al. Inhibition of neutrophil migration by hemopexin leads to increased mortality due to sepsis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**; 183(7): 922-31.
  48. Cooper HM, Corradin G, Paterson Y. The heme moiety of cytochrome c is an autoreactive Ir gene-restricted T cell epitope. *J Exp Med* **1988**; 168(3): 1127-43.
  49. Sutherland RM, Pan ZK, Caton AJ, Tang XX, Cerasoli DM, Paterson Y. T cells from unprimed mice respond to the self antigen heme, in a class II restricted manner, at a frequency similar to alloresponses. *Int Immunol* **1995**; 7(5): 771-83.
  50. Sherman LA, Lara AM. Unrestricted recognition of a nonpeptide antigen by CD8+ cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* **1989**; 143(11): 3444-7.

- 
51. Wagener FA, Abraham NG, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **2001**; 22(2): 52-4.
  52. Hanafy KA. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation* **2013**; 10: 83.
  53. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med* **2010**; 2(51): 51ra71.
  54. World Health Organization. Malaria - Fact sheet N°94. **Avril 2012**.
  55. Garraud O, Assal A, Pelletier B, et al. Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. *Vox Sang* **2008**; 95(3): 226-31.
  56. Preiser P, Kaviratne M, Khan S, Bannister L, Jarra W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* **2000**; 2(12): 1461-77.
  57. Richie TL, Parekh FK. *Malaria*, **2009**.
  58. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* **2005**; 5(9): 722-35.
  59. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* **2009**; 9(9): 555-66.
  60. World Health Organization. World Malaria Report 2012. Disponible sur [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_no\\_profiles.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_no_profiles.pdf?ua=1)

- 
61. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2005**; 434(7030): 214-7.
  62. Centre National de Référence du Paludisme pour la France métropolitaine. Chiffres clés **2011**. Disponible sur: <http://www.cnrpalu-france.org/>
  63. Vanderberg JP, Frevert U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol* **2004**; 34(9): 991-6.
  64. Sturm A, Amino R, van de Sand C, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **2006**; 313(5791): 1287-90.
  65. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care* **2003**; 7(4): 315-23.
  66. World Health Organization. Management of severe malaria **2012**. Disponible sur : [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79317/1/9789241548526\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79317/1/9789241548526_eng.pdf)
  67. Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* **2009**; 22(5): 430-5.
  68. World Health Organization. Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2000**; 94 Suppl 1: S1-90.

- 
69. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, et al. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA* **2005**; 293(12): 1461-70.
  70. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* **2011**; 7(9): 1427-42.
  71. Ong'echa JM, Keller CC, Were T, et al. Parasitemia, anemia, and malarial anemia in infants and young children in a rural holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission area. *Am J Trop Med Hyg* **2006**; 74(3): 376-85.
  72. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood* **2000**; 95(4): 1481-6.
  73. Owusu-Agyei S, Fryauff DJ, Chandramohan D, et al. Characteristics of severe anemia and its association with malaria in young children of the Kassena-Nankana District of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* **2002**; 67(4): 371-7.
  74. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* **2000**; 16(11): 469-76.
  75. Howard CT, McKakpo US, Quakyi IA, et al. Relationship of hepcidin with parasitemia and anemia among patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 77(4): 623-6.
  76. Were T, Davenport GC, Hittner JB, et al. Bacteremia in Kenyan Children Presenting with Malaria. *J Clin Microbiol* **2011**; 49(2): 671-6.

- 
77. Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* **2005**; 4(12): 827-40.
  78. Newton CR, Krishna S. Severe *falciparum* malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* **1998**; 79(1): 1-53.
  79. Naqvi R, Ahmad E, Akhtar F, Naqvi A, Rizvi A. Outcome in severe acute renal failure associated with malaria. *Nephrol Dial Transplant* **2003**; 18(9): 1820-3.
  80. Sattar MA, Hoque HW, Amin MR, Faiz MA, Rahman MR. Neurological findings and outcome in adult cerebral malaria. *Bangladesh Med Res Counc Bull* **2009**; 35(1): 15-7.
  81. Newton CR, Hien TT, White N. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2000**; 69(4): 433-41.
  82. Craig AG, Grau GE, Janse C, et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog* **2012**; 8(2).
  83. Langhorne J, Buffet P, Galinski M, et al. The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. *Malar J* **2011**; 10: 23.
  84. De Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* **2010**; 137(5): 755-72.
  85. Chang KH, Stevenson MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* **2004**; 34(13-14): 1501-16.



- 
86. McDevitt MA, Xie J, Shanmugasundaram G, et al. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* **2006**; 203(5): 1185-96.
  87. Silverman PH, Schooley JC, Mahlmann LJ. Murine malaria decreases hemopoietic stem cells. *Blood* **1987**; 69(2): 408-13.
  88. Medana IM, Chaudhri G, Chan-Ling T, Hunt NH. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunol Cell Biol* **2001**; 79(2): 101-20.
  89. Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, et al. Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci* **2005**; 25(32): 7352-8.
  90. Bansal D, Herbert F, Lim P, et al. IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PLoS One* **2009**; 4(12): e8245.
  91. Medana IM, Day NP, Hien TT, et al. Axonal injury in cerebral malaria. *Am J Pathol* **2002**; 160(2): 655-66.
  92. Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol* **2011**; 178(5): 2146-58.
  93. Silamut K, Phu NH, Whitty C, et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol* **1999**; 155(2): 395-410.
  94. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of

- 
- parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* **1985**; 119(3): 385-401.
95. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* **2004**; 10(2): 143-5.
96. Pongponratn E, Turner GD, Day NP, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **2003**; 69(4): 345-59.
97. Nash GB, O'Brien E, Gordon-Smith EC, Dormandy JA. Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by *Plasmodium falciparum*. *Blood* **1989**; 74(2): 855-61.
98. Brown H, Hien TT, Day N, et al. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* **1999**; 25(4): 331-40.
99. Favre N, Da Laperousaz C, Ryffel B, et al. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect* **1999**; 1(12): 961-8.
100. Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, et al. IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* **2012**; 189(2): 968-79.
101. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevert U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* **2012**; 8(10): e1002982.

- 
102. Turner GD, Morrison H, Jones M, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* **1994**; 145(5): 1057-69.
  103. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* **2013**; 61(12): 1939-58.
  104. Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **2006**; 36(5): 555-68.
  105. Schwartz M, Kipnis J, Rivest S, Prat A. How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J Neurosci* **2013**; 33(45): 17587-96.
  106. Schluesener HJ, Kreamsner PG, Meyermann R. Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells. *Acta Neuropathol* **1998**; 96(6): 575-80.
  107. Hanum PS, Hayano M, Kojima S. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *Int Immunol* **2003**; 15(5): 633-40.
  108. Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis* **2006**; 194(2): 198-207.
  109. Jain V, Armah HB, Tongren JE, et al. Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malar J* **2008**; 7: 83.

- 
110. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **1990**; 336(8725): 1201-4.
  111. John CC, Panoskaltsis-Mortari A, Opoka RO, et al. Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* **2008**; 78(2): 198-205.
  112. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* **2007**; 6: 147.
  113. Togbe D, de Sousa PL, Fauconnier M, et al. Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One* **2008**; 3(7): e2608.
  114. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* **2001**; 4(11): 1116-22.
  115. Sanni LA, Jarra W, Li C, Langhorne J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* **2004**; 72(5): 3054-8.
  116. Miu J, Mitchell AJ, Muller M, et al. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* **2008**; 180(2): 1217-30.
  117. Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105(12): 4814-9.

- 
118. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* **2002**; 169(11): 6369-75.
  119. Pai S, Qin J, Cavanagh L, et al. Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *PLoS Pathog* **2014**; 10(7): e1004236.
  120. Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, et al. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* **2003**; 170(4): 2221-8.
  121. Ohno T, Kobayashi F, Nishimura M. Fas has a role in cerebral malaria, but not in proliferation or exclusion of the murine parasite in mice. *Immunogenetics* **2005**; 57(3-4): 293-6.
  122. Potter SM, Chan-Ling T, Rosinova E, Ball HJ, Mitchell AJ, Hunt NH. A role for Fas-Fas ligand interactions during the late-stage neuropathological processes of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol* **2006**; 173(1-2): 96-107.
  123. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* **2000**; 21(10): 479-83.
  124. Cabantous S, Poudiougou B, Traore A, et al. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *J Infect Dis* **2005**; 192(5): 854-60.
  125. Bostrom S, Giusti P, Arama C, et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* **2012**; 11: 109.

- 
126. Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigario AM. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun* **2010**; 78(9): 4033-9.
  127. Ma N, Madigan MC, Chan-Ling T, Hunt NH. Compromised blood-nerve barrier, astrogliosis, and myelin disruption in optic nerves during fatal murine cerebral malaria. *Glia* **1997**; 19(2): 135-51.
  128. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, et al. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe* **2014**; 15(5): 551-63.
  129. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* **2003**; 126(Pt 3): 515-30.
  130. Medana IM, Idro R, Newton CR. Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *J Neurol Sci* **2007**; 258(1-2): 93-8.
  131. Medana IM, Lindert RB, Wurster U, et al. Cerebrospinal fluid levels of markers of brain parenchymal damage in Vietnamese adults with severe malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2005**; 99(8): 610-7.
  132. Dobbie M, Crawley J, Waruiru C, Marsh K, Surtees R. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? *Am J Trop Med Hyg* **2000**; 62(2): 284-90.
  133. Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, Pescarmona GP, Serra MV, Arese P. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood* **1992**; 80(3): 801-8.

- 
134. Koram KA, Owusu-Agyei S, Utz G, et al. Severe anemia in young children after high and low malaria transmission seasons in the Kassena-Nankana district of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* **2000**; 62(6): 670-4.
135. Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, et al. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 60(5): 733-7.
136. Fendel R, Brandts C, Rudat A, et al. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *PLoS One* **2010**; 5(4): e10038.
137. Thawani N, Tam M, Bellemare MJ, et al. *Plasmodium* products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors. *J Infect Dis* **2014**; 209(1): 140-9.
138. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* **2007**; 110(1): 18-28.
139. Griffiths MJ, Ndungu F, Baird KL, Muller DP, Marsh K, Newton CR. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* **2001**; 113(2): 486-91.
140. Omodeo-Sale F, Motti A, Basilico N, Parapini S, Olliaro P, Taramelli D. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood* **2003**; 102(2): 705-11.
141. Helegbe GK, Goka BQ, Kurtzhals JA, et al. Complement activation in Ghanaian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* **2007**; 6: 165.

- 
142. Awandare GA, Goka B, Boeuf P, et al. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. *J Infect Dis* **2006**; 194(10): 1438-46.
  143. Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE, Mabeza GF, Weiss G. Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria. *Trop Med Int Health* **1998**; 3(1): 60-5.
  144. Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* **2006**; 107(3): 1192-9.
  145. Layez C, Nogueira P, Combes V, et al. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* **2005**; 106(10): 3632-8.
  146. Awah N, Balogun H, Achidi E, et al. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children. *Parasite Immunol* **2011**; 33(2): 104-15.
  147. Sonani R, Bhatnagar N, Maitrey G. Autoimmune hemolytic anemia in a patient with Malaria. *Asian J Transfus Sci* **2013**; 7(2): 151-2.
  148. Koury MJ. Self-renewal in late-stage erythropoiesis. *Blood* **2011**; 117(9): 2562-4.
  149. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **1995**; 83(1): 59-67.
  150. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* **2011**; 589(Pt 6): 1251-8.



- 
151. Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol* **2011**; 82(10): 1291-303.
  152. Dolznig H, Habermann B, Stangl K, et al. Apoptosis protection by the EPO target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol* **2002**; 12(13): 1076-85.
  153. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2004**; 286(6): R977-88.
  154. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* **2010**; 116(16): 3039-48.
  155. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin *in vitro* and *in vivo*. *Blood* **2006**; 108(8): 2569-77.
  156. Abugri J, Tetteh JK, Oseni LA, et al. Age-related pattern and monocyte-acquired haemozoin associated production of erythropoietin in children with severe malarial anaemia in Ghana. *BMC Res Notes* **2014**; 7: 551.
  157. Yap GS, Stevenson MM. *Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol* **1992**; 75(3): 340-52.
  158. Chang KH, Tam M, Stevenson MM. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* **2004**; 103(10): 3727-35.

- 
159. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One* **2009**; 4(12): e8446.
  160. Awandare GA, Ouma Y, Ouma C, et al. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect Immun* **2007**; 75(1): 201-10.
  161. Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* **1989**; 57(5): 1542-6.
  162. Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* **1999**; 179(1): 279-82.
  163. Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* **1998**; 351(9118): 1768-72.
  164. May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* **2000**; 182(5): 1570-3.
  165. Huang H, Lamikanra AA, Alkaitis MS, et al. Interleukin-10 regulates hepcidin in *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* **2014**; 9(2): e88408.

- 
166. Geissler K, Ohler L, Fodinger M, et al. Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. *Blood* **1998**; 92(6): 1967-72.
  167. Musa BOP, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol* **2010**; 17(4): 602-8.
  168. Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* **1998**; 92(7): 2551-5.
  169. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* **1997**; 89(11): 753-7.
  170. Toriani-Terenzi C, Fagiolo E. IL-10 and the cytokine network in the pathogenesis of human autoimmune hemolytic anemia. *Ann N Y Acad Sci* **2005**; 1051: 29-44.
  171. Barcellini W, Clerici G, Montesano R, et al. *In vitro* quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation. *Br J Haematol* **2000**; 111(2): 452-60.
  172. Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* **2002**; 14(2): 201-12.

- 
173. Wang M, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived. *Clin Immunol* **1999**; 90(1): 47-54.
174. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* **1997**; 65(5): 1593-8.
175. Inoue SI, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F. Roles of IFN- $\gamma$  and  $\gamma\delta$  T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Front Immunol* **2013**; 4.
176. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* **2007**; (5): 125-30.
177. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, et al. Basophils contribute to T(h)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* **2009**; 10(7): 706-12.
178. Frandji P, Oskeritzian C, Cacaraci F, et al. Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol* **1993**; 151(11): 6318-28.
179. Barcellos-de-Souza P, Moraes JA, de-Freitas-Junior JC, Morgado-Diaz JA, Barja-Fidalgo C, Arruda MA. Heme modulates intestinal epithelial cell activation: involvement of NADPHox-derived ROS signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **2013**; 304(2): C170-9.
180. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* **2013**; 1830(8): 4117-29.

- 
181. Sun SY. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol Ther* **2010**; 9(2): 109-10.
  182. Verhasselt V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J Immunol* **1999**; 162(5): 2569-74.
  183. Ayi K, Cappadoro M, Branca M, Turrini F, Arese P. *Plasmodium falciparum* glutathione metabolism and growth are independent of glutathione system of host erythrocyte. *FEBS Lett* **1998**; 424(3): 257-61.
  184. Shear HL, Grinberg L, Gilman J, et al. Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood* **1998**; 92(7): 2520-6.
  185. Paulson RF, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol* **2011**; 18(3): 139-45.
  186. Mohan K, Stevenson MM. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient IL-12 production. *Br J Haematol* **1998**; 103(4): 942-9.
  187. Francis SE, Sullivan DJ, Jr., Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **1997**; 51: 97-123.
  188. Thuma PE, van Dijk J, Bucala R, et al. Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *J Infect Dis* **2011**; 203(2): 211-9.
  189. Anstey NM, Hassanali MY, Mlalasi J, Manyenga D, Mwaikambo ED. Elevated levels of methaemoglobin in Tanzanian children with severe

- and uncomplicated malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1996**; 90(2): 147-51.
190. Maitland K, Pamba A, English M, et al. Randomized trial of volume expansion with albumin or saline in children with severe malaria: preliminary evidence of albumin benefit. *Clin Infect Dis* **2005**; 40(4): 538-45.
191. Smith HJ, Meremikwu M. Iron chelating agents for treating malaria. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**; (2): CD001474.
192. Andrade BB, Araujo-Santos T, Luz NF, et al. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. *J Immunol* **2010**; 185(2): 1196-204.
193. World Health Organization. World Malaria Report 2010. Disponible sur: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalaria\\_report2010.pdf?ua=1](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalaria_report2010.pdf?ua=1).
194. Sharma SK, Tyagi PK, Padhan K, et al. Epidemiology of malaria transmission in forest and plain ecotype villages in Sundargarh District, Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2006**; 100(10): 917-25.
195. Sharma SK, Chattopadhyay R, Chakrabarti K, et al. Epidemiology of malaria transmission and development of natural immunity in a malaria-endemic village, San Dulakudar, in Orissa state, India. *Am J Trop Med Hyg* **2004**; 71(4): 457-65.
196. Clasen T, Boisson S, Routray P, et al. Effectiveness of a rural sanitation programme on diarrhoea, soil-transmitted helminth infection, and child malnutrition in Odisha, India: a cluster-randomised trial. *Lancet Glob Health* **2014**; 2(11): e645-53.

- 
197. Panda AK, Ravindran B, Das BK. Rheumatoid arthritis patients are free of filarial infection in an area where filariasis is endemic: comment on the article by Pineda et al. *Arthritis Rheum* **2013**; 65(5): 1402-3.
198. Panda M, Sahoo PK, Mohapatra AD, et al. Decreased prevalence of sepsis but not mild or severe *P. falciparum* malaria is associated with pre-existing filarial infection. *Parasit Vectors* **2013**; 6: 203.
199. Tewari S, Rees D. Morbidity pattern of sickle cell disease in India: a single centre perspective. *Indian J Med Res* **2013**; 138(3): 288-90.
200. Balgir RS. Spectrum of hemoglobinopathies in the state of Orissa, India: a ten years cohort study. *J Assoc Physicians India* **2005**; 53: 1021-6.
201. Kaeda JS, Chhotray GP, Ranjit MR, et al. A New Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase variant, G6PD Orissa (44 Ala→Gly), is the major polymorphic variant in tribal populations in India. *Am J Hum Genet* **1995**; 57(6): 1335-41.
202. Panda AK, Panda SK, Sahu AN, Tripathy R, Ravindran B, Das BK. Association of ABO blood group with severe *falciparum* malaria in adults: case control study and meta-analysis. *Malar J* **2011**; 10: 309.
203. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. Disponible sur:  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf?](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf?ua=1)  
ua = 1
204. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked

- 
- immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49(8): 3575-7.
205. Bindu S, Pal C, Dey S, et al. Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury. *J Biol Chem* **2011**; 286(45): 39387-402.
206. Dondorp AM, Desakorn V, Pongtavornpinyo W, et al. Estimation of the total parasite biomass in acute *falciparum* malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med* **2005**; 2(8): e204.
207. National Vector Borne Disease Control Programme. Disponible sur : <http://nvbdcp.gov.in/malaria-new.html>.
208. Kumar A, Valecha N, Jain T, Dash AP. Burden of malaria in India: retrospective and prospective view. *Am J Trop Med Hyg* **2007**; 77(Suppl 6): 69-78.
209. Das BS. Renal failure in malaria. *J Vector Borne Dis* **2008**; 45(2): 83-97.
210. Pamplona A, Hanscheid T, Epiphanyo S, Mota MM, Vigario AM. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2009**; 41(4): 711-6.
211. Dalko E, Gaudreault V, Sanchez Dardon J, Moreau R, Scorza T. Preconditioning with hemin decreases *Plasmodium chabaudi adami* parasitemia and inhibits erythropoiesis in BALB/c mice. *PLoS One* **2013**; 8(1): e54744.
212. Dey S, Bindu S, Goyal M, et al. Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme



- 
- overload, NF-kappaB activation, and neutrophil infiltration. *J Biol Chem* **2012**; 287(32): 26630-46.
213. Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, et al. Relationship of cell-free hemoglobin to impaired endothelial nitric oxide bioavailability and perfusion in severe *falciparum* malaria. *J Infect Dis* **2009**; 200(10): 1522-9.
214. Pathak S, Rege M, Gogtay NJ, et al. Age-dependent sex bias in clinical malarial disease in hypoendemic regions. *PLoS One* **2012**; 7(4): e35592.
215. Patankar TF, Karnad DR, Shetty PG, Desai AP, Prasad SR. Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology* **2002**; 224(3): 811-6.
216. Janz DR, Bastarache JA, Sills G, et al. Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. *Crit Care* **2013**; 17(6): R272.
217. Jain V, Nagpal AC, Joel PK, et al. Burden of cerebral malaria in central India (2004-2007). *Am J Trop Med Hyg* **2008**; 79(4): 636-42.
218. Tracz MJ, Alam J, Nath KA. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **2007**; 18(2): 414-20.
219. Wilson NO, Solomon W, Anderson L, et al. Pharmacologic inhibition of CXCL10 in combination with anti-malarial therapy eliminates mortality associated with murine model of cerebral malaria. *PLoS One* **2013**; 8(4): e60898.
220. Pittock ST, Norby SM, Grande JP, et al. MCP-1 is up-regulated in unstressed and stressed HO-1 knockout mice: Pathophysiologic correlates. *Kidney Int* **2005**; 68(2): 611-22.

- 
221. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* **2001**; 60(6): 2118-28.
222. Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis* **2005**; 58(5): 268-71.
223. Walther M, De Caul A, Aka P, et al. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathog* **2012**; 8(3): e1002579.
224. Casals-Pascual C, Idro R, Gicheru N, et al. High levels of erythropoietin are associated with protection against neurological sequelae in African children with cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105(7): 2634-9.
225. Diez-Padrisa N, Aguilar R, Machevo S, et al. Erythropoietin levels are not independently associated with malaria-attributable severe disease in Mozambican children. *PLoS One* **2011**; 6(8): e24090.
226. Shabani E, Opoka RO, Idro R, et al. High plasma erythropoietin levels are associated with prolonged coma duration and increased mortality in children with cerebral malaria. *Clin Infect Dis* **2014**.
227. Idro R, Kakooza-Mwesige A, Balyejjussa S, et al. Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Res Notes* **2010**; 3: 104.
228. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **2000**; 30(3): 271-8.

- 
229. Medana IM, Day NP, Hien TT, White NJ, Turner GD. Erythropoietin and its receptors in the brainstem of adults with fatal *falciparum* malaria. *Malar J* **2009**; 8: 261.
230. Casals-Pascual C, Idro R, Picot S, Roberts DJ, Newton CR. Can erythropoietin be used to prevent brain damage in cerebral malaria? *Trends Parasitol* **2009**; 25(1): 30-6.
231. Bond WS, Rex TS. Evidence that erythropoietin modulates neuroinflammation through differential action on neurons, astrocytes, and microglia. *Front Immunol* **2014**; 5.
232. Subiros N, Del Barco DG, Coro-Antich RM. Erythropoietin: still on the neuroprotection road. *Ther Adv Neurol Disord* **2012**; 5(3): 161-73.
233. Kaiser K, Texier A, Ferrandiz J, et al. Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. *J Infect Dis* **2006**; 193(7): 987-95.
234. Wiese L, Hempel C, Penkowa M, Kirkby N, Kurtzhals JA. Recombinant human erythropoietin increases survival and reduces neuronal apoptosis in a murine model of cerebral malaria. *Malar J* **2008**; 7: 3.
235. Wei X, Li Y, Sun X, et al. Erythropoietin protects against murine cerebral malaria through actions on host cellular immunity. *Infect Immun* **2014**; 82(1): 165-73.
236. Picot S, Bienvenu AL, Konate S, et al. Safety of epoietin beta-quinine drug combination in children with cerebral malaria in Mali. *Malar J* **2009**; 8: 169.

- 
237. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **2002**; 8(8): 495-505.
238. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* **2009**; 40(12): e647-56.
239. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Disponible sur:  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf?ua=1).
240. Ehrenreich H, Kästner A, Weissenborn K, et al. Circulating damage marker profiles support a neuroprotective effect of erythropoietin in ischemic stroke patients. *Mol Med* **2011**; 17(11-12): 1306-10.
241. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology* **1997**; 91(4): 536-40.
242. Grau GE, Piguet PF, Vassalli P, Lambert PH. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev* **1989**; 112: 49-70.
243. Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, et al. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol* **1997**; 150(1): 257-66.
244. Kanakiriya SK, Croatt AJ, Haggard JJ, et al. Heme: a novel inducer of MCP-1 through HO-dependent and HO-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **2003**; 284(3): F546-54.

- 
245. Nath KA, Grande JP, Haggard JJ, et al. Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *Am J Pathol* **2001**; 158(3): 893-903.
246. Nie CQ, Bernard NJ, Norman MU, et al. IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog* **2009**; 5(4): e1000369.
247. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Simpson JA, et al. Parasite multiplication potential and the severity of *falciparum* malaria. *J Infect Dis* **2000**; 181(3): 1206-9.
248. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, et al. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* **2002**; 111(1): 1-8.
249. Wagener FA, Toonen EJ, Wigman L, et al. HMOX1 promoter polymorphism modulates the relationship between disease activity and joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **2008**; 58(11): 3388-93.
250. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, et al. Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* **2011**; 145(3): 398-409.
251. May J, Evans JA, Timmann C, et al. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe *falciparum* malaria. *JAMA* **2007**; 297(20): 2220-6.
252. Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood* **2004**; 104(1): 270-80.

- 
253. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* **2007**; 13(6): 703-10.
254. David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* **2011**; 12(7): 388-99.
255. Bagot S, Nogueira F, Collette A, et al. Comparative study of brain CD8+ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infect Immun* **2004**; 72(5): 2817-26.
256. Boubou MI, Collette A, Voegtli D, Mazier D, Cazenave PA, Pied S. T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. *Int Immunol* **1999**; 11(9): 1553-62.
257. Dalko E, Das B, Herbert F, et al. Multifaceted role of heme during severe *Plasmodium falciparum* infections in India. **Submitted to final revision**
258. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* **2013**; 81(12):1079-88.
259. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* **1997**; 150(4): 1473-86.
260. Collette A, Bagot, Ferrandiz ME, Cazenave P-A, Six A, Pied S. A profound alteration of blood TCRB repertoire allows prediction of cerebral malaria. *J Immunol* **2004**; 173(7):4568-75.

- 
261. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2006**; 2(12): 679-89.
262. Miranda AS, Vieira LB, Lacerda-Queiroz N, et al. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. *Braz J Med Biol Res* **2010**; 43(12): 1173-7.
263. Medana IM, Chan-Ling T, Hunt NH. Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to disruption of the blood-retinal barrier. *Glia* **1996**; 16(1): 51-64.
264. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* **1990**; 10(5): 1583-91.
265. Corna G, Campana L, Pignatti E, et al. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* **2010**; 95(11): 1814-22.
266. Hammond MD, Taylor RA, Mullen MT, et al. CCR2+Ly6Chi inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. *J Neurosci* **2014**; 34(11): 3901-9.
267. Cohen SB, Maurer KJ, Egan CE, Oghumu S, Satoskar AR, Denkers EY. CXCR3-dependent CD4+ T cells are required to activate inflammatory monocytes for defense against intestinal infection. *PLoS Pathog* **2013**; 9(10): e1003706.
268. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* **2009**; 29(7): 2089-102.

- 
269. Belnoue E, Costa FT, Vigarío AM, et al. Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun* **2003**; 71(6): 3648-51.
270. Nikodemova M, Watters JJ. Efficient isolation of live microglia with preserved phenotypes from adult mouse brain. *J Neuroinflammation* **2012**; 9: 147.
271. Reynolds G, Wilson M, Peet A, Arvanitis TN. An algorithm for the automated quantitation of metabolites in in vitro NMR signals. *Magn Reson Med* **2006**; 56(6): 1211-9.
272. Wilson M, Reynolds G, Kauppinen RA, Arvanitis TN, Peet AC. A constrained least-squares approach to the automated quantitation of in vivo (1)H magnetic resonance spectroscopy data. *Magn Reson Med* **2011**; 65(1): 1-12.
273. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* **2001**; 98(6): 1802-11.
274. Porcherie A, Mathieu C, Peronet R, et al. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* **2011**; 208(11): 2225-36.
275. Francischetti IM, Gordon E, Bizzarro B, et al. Tempol, an intracellular antioxidant, inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria. *PLoS One* **2014**; 9(2): e87140.
276. Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* **2010**; 224(1-2): 93-100.



- 
277. Rifkind JM, Mohanty JG, Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol* **2014**; 5: 500.
278. Tolosano E, Fagoonee S, Hirsch E, et al. Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis. *Blood* **2002**; 100(12): 4201-8.
279. Bachmann J, Burte F, Pramana S, et al. Affinity proteomics reveals elevated muscle proteins in plasma of children with cerebral malaria. *PLoS Pathog* **2014**; 10(4): e1004038.
280. Davis TM, Pongponratan E, Supanaranond W, et al. Skeletal muscle involvement in *falciparum* malaria: biochemical and ultrastructural study. *Clin Infect Dis* **1999**; 29(4): 831-5.
281. Seixas E, Gozzelino R, Chora A, et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**; 106(37): 15837-42.
282. Mohanty N, Satpathy SK, Nanda P. Hepatopathy in complicated *falciparum* malaria: report from eastern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2004**; 98(12): 753-4.
283. Jeney V, Balla G, Balla J. Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis. *Front Physiol* **2014**; 5: 379.
284. de Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol* **2014**; 5: 9.

- 
285. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and beta-thalassemia. *Nat Med* **2013**; 19(4): 437-45.
286. Qian Q, Nath KA, Wu Y, Daoud TM, Sethi S. Hemolysis and acute kidney failure. *Am J Kidney Dis* **2010**; 56(4): 780-4.
287. Reynaud F, Mallet L, Lyon A, Rodolfo JM. Rhabdomyolysis and acute renal failure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nephrol Dial Transplant* **2005**; 20(4): 847.
288. Knochel JP, Moore GE. Rhabdomyolysis in Malaria. *N Engl J Med* **1993**; 329(16): 1206-7.
289. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **1997**; 216(3): 456-63.
290. Pino P, Vouldoukis I, Kolb JP, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* **2003**; 187(8): 1283-90.
291. Ortega LM, Fornoni A. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* **2010**; 2: 49-62.
292. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2010**; 50: 323-54.
293. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun* **1999**; 67(9): 4435-42.

- 
294. Gadsby N, Lawrence R, Carter R. A study on pathogenicity and mosquito transmission success in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi adami*. *Int J Parasitol* **2009**; 39(3): 347-54.
295. Paul WE, Zhu J. How are T(h)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* **2010**; 10(4): 225-35.
296. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2005**; 6(2): 135-42.
297. Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, et al. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **2001**; 65(6): 834-6.
298. Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol* **2000**; 22(3): 107-13.
299. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* **2013**; 339(6116): 156-61.
300. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci* **2012**; 32(34): 11706-15.
301. World Health Organization. *World Malaria Report 2013*.
302. Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* **1999**; 77(8): 624-40.
303. Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol* **2004**; 20(12): 597-603.

- 
304. Ochola LB, Siddondo BR, Ocholla H, et al. Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. PLoS One **2011**; 6(3): e14741.
305. Deloron P, Chougnet C, Lepers JP, Tallet S, Coulanges P. Protective value of elevated levels of gamma interferon in serum against exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. J Clin Microbiol **1991**; 29(9): 1757-60.
306. Sedegah M, Finkelman F, Hoffman SL. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. Proc Natl Acad Sci U S A **1994**; 91(22): 10700-2.
307. Dodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. J Infect Dis **2002**; 185(7): 971-9.
308. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. Infect Immun **2004**; 72(10): 5630-7.
309. Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J. High levels of circulating IL-10 in human malaria. Clin Exp Immunol **1994**; 95(2): 300-3.
310. Clark IA, Rockett KA. The cytokine theory of human cerebral malaria. Parasitol Today **1994**; 10(10): 410-2.
311. Becavin C, Tchitchek N, Mintsá-Eya C, Lesne A, Benecke A. Improving the efficiency of multidimensional scaling in the analysis of high-

- 
- dimensional data using singular value decomposition. *Bioinformatics* **2011**; 27(10): 1413-21.
312. Kruskal JB, Wish M. *Multidimensional Scaling*: Beverly Hills and London: Sage Publications, **1978**.
313. Akaike H. A new look at the statistical model identification *IEEE Trans Automat Control* **1974**: 716-23.
314. Brown H, Turner G, Rogerson S, et al. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis* **1999**; 180(5): 1742-6.
315. Boeuf PS, Loizon S, Awandare GA, et al. Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia. *Malar J* **2012**; 11: 253.
316. Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Bjorkman A. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol* **2004**; 26(3): 111-7.
317. da Costa AG, Antonelli LR, Costa PA, et al. The robust and modulated biomarker network elicited by the *Plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. *J Immunol Res* **2014**; 2014: 318250.
318. Issifou S, Mavoungou E, Borrmann S, et al. Severe malarial anemia associated with increased soluble Fas ligand (sFasL) concentrations in Gabonese children. *Eur Cytokine Netw* **2003**; 14(4): 238-41.
319. Yao Y, Tsirka SE. Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci* **2014**; 71(4): 683-97.
320. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int* **2010**; 77(12): 1070-5.

- 
321. Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier MC. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med* **2011**; 43(7): 503-11.
  322. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* **2014**; 14(9): 585-600.
  323. van Nieuwenhuijze A, Koenders M, Roeleveld D, Sleeman MA, van den Berg W, Wicks IP. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Mol Immunol* **2013**; 56(4): 675-82.
  324. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, et al. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med* **2014**; 6(241): 241ra80.

**PARTIE VI. PARTICIPATIONS AUX  
CONGRES**

---





---

## PRESENTATIONS ORALES

Unraveling a possible implication for free heme in skewed T<sub>h</sub>1 responses during malaria, 11<sup>th</sup> Annual Quebec Molecular Parasitology Symposium (Montréal, Canada), Juin 2011.

Effets de l'hème sur la différenciation des cellules T CD4 en T<sub>h</sub>1. 8<sup>ième</sup> Colloque Annuel BioMed (Montréal, Canada), Avril 2012.

Assessment of free heme as a contributor of blunted T helper 1 responses in malaria, 16<sup>th</sup> Annual Woods Hole Immunoparasitology Meeting (Woods Hole, États-Unis d'Amérique), Avril 2012.

The antagonist effect of free heme on CD4 T cell responses and clearance of *Plasmodium* infection in mice. 12<sup>th</sup> Annual Quebec Molecular Parasitology Symposium (Sainte-Anne-de-Bellevue, Canada), Mai 2012.

The role of heme in the pathophysiology of severe malaria. Séminaires du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (Lille, France), Mai 2014.

Plasma heme levels correlate with IP-10 levels during *P. falciparum* malaria in Odisha, India. Congrès Annuel de la Société Française d'Immunologie (Lille, France), Novembre 2014.

Heme and severe *P. falciparum* malaria. Symposium on Systems Immunology Approach in Infectious Diseases, LIA SIGID (Lille, France), Février 2015.



## **PRESENTATIONS PAR POSTER**

Les effets de l'hème sur la fonction des lymphocytes B et T, 80<sup>ième</sup> Congrès de l'Association Francophone pour le Savoir (Montréal, Canada), Mai 2012.

High levels of heme correlate with malaria pathology and morbidity in patients from endemic areas in India, 9<sup>th</sup> Annual BioMalPar/EVIMalaR Conference (Heidelberg, Allemagne), Mai 2013.

High levels of heme correlate with malaria pathology and morbidity in patients from endemic areas in India, Journée hors site du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (Bouvines, France), Mai 2013.

High levels of heme correlate with malaria pathology and morbidity in patients from endemic areas in India, 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Milan, Italie), Août 2013.