



UNIVERSITE DE LILLE, NORD DE FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ
Année 2023-2024

THESE
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR
SPECIALITE : BIOLOGIE-CELLULAIRE

Impact du microbiote intestinal sur le développement du neuropaludisme

Présenté par
Jérémy ALLOO

Soutenue publiquement le 18 janvier 2024
à Lille, devant le jury composé de

PuPh. Boualem Sendid
Dr. Agnès Aubouy
Pr. Jean Paul Coutelier
Dr. Gérard Eberl
Dr. Anne-Judith Waligora Dupriet
Dr. Sylviane Pied
Dr. Corinne Grangette

CHU-Lille
IRD-Toulouse
Institut de Duve
Pasteur Paris
UPMC-Paris
CIIL, Lille
CIIL, Lille

Président du jury
Rapportrice
Rapporteur
Examineur
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

A ma famille de cœur,

« On se réveille ! ta l'univers à bouffer ! ta le monde qui t'attend ! On va secouer nos existences. On va faire pleurer la chance ! et la fatalité on l'emmerde ! on lui fait des doigts. Alors lève la tête respire, un grand coup et répète après moi : j'emmerde le monde et sa fatalité. Jle bouffe ! jle cogne ! Jle ferais trembler ! et puis j'aimerai fort ! j'aimerai fort ! même si ça brule ! même si on m'a déjà déchiré ! même si dans 150 ans on ne se rappellera pas de moi parce que je n'en ai rien à foutre. Je vivrai comme si ça avait du sens. Parce que ça en a un. »

Felix Radu, 2023

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is a parasitic neuroinflammatory disease due to infection with *Plasmodium (P.) falciparum*. The neurophysiopathological process is mainly linked to the sequestration of parasite infected erythrocytes in brain microvessels and to the activation of astrocytes and microglial cells, which create a neurotoxic environment via the production of pro-inflammatory mediators and the recruitment of pathological TCD8 lymphocytes to brain. Recent findings on the gut-brain axis demonstrate the importance of the gut microbiota in modulating brain inflammation in different autoimmune neuropathological situations such as Alzheimer or multiple sclerosis which share similarities with inflammatory mechanisms involved in CM. Here, we show that modification of the gut microbiota inhibits the development of CM. Indeed, CM susceptible mice with a modified gut microbiota mediated by the treatment with an antibiotic cocktail are protected from CM induced by *P. berghei* ANKA infection. Next-generation sequencing (NGS) analysis of the gut microbiota showed a change in the microbiome composition both in infected and treated-infected mice. This change correlated with the integrity of the brain blood and intestinal barriers. Indeed, *Akkermensia* and *Parabacteroides* abundance, bacteria known for their anti-inflammatory properties, were among the most affected in CM infected resistant mice. Moreover, RTq-PCR analysis of proinflammatory cytokines and chemokines gene expression showed a reduction of the brain and systemic inflammatory response. In addition, flow cytometry analysis of astrocytes and microglia confirmed the decrease in their inflammatory phenotype during dysbiosis in infected mice similarly to mice resistant to CM. Altogether these results suggest

that the gut microbiota composition can control brain inflammation by modulating the activity of glial cells during Malaria.

RÉSUMÉ

Le neuropaludisme (NP) est une maladie neuroinflammatoire parasitaire due à une infection à *Plasmodium (P.) falciparum*. Le processus neurophysiopathologique est principalement lié à la séquestration d'érythrocytes infectés par le parasite dans des micro-vaisseaux cérébraux et à l'activation d'astrocytes et de cellules microgliales, ce qui crée un environnement neurotoxique par la production de médiateurs pro-inflammatoires et le recrutement de lymphocytes pathologiques TCD8 au niveau du cerveau. Des découvertes récentes sur l'axe intestin-cerveau démontrent l'importance du microbiote intestinal dans la modulation de l'inflammation cérébrale dans différentes atteintes neuropathologiques auto-immunes telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques qui partagent des similitudes avec les mécanismes inflammatoires impliqués dans le NP. Nous montrons ici que la modification du microbiote intestinal inhibe le développement du NP. En effet, les souris sensibles au NP présentant une modification du microbiote intestinal induit par l'administration d'un cocktail d'antibiotique sont protégées contre le NP induit par une infection par *P. berghei* ANKA. Le séquençage NGS du microbiote intestinal a montré un changement dans la composition du microbiome chez les souris infectées et traitées infectées. Ce changement est corrélé à l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière intestinale. En effet, l'abondance en *Akkermensia* et *Parabacteroides*, genres bactériens connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, étaient parmi la plus touchée chez les souris résistantes au

NP. De plus, l'analyse RTq-PCR des cytokines proinflammatoires et de l'expression des gènes des chimiokines a montré une réduction de la réponse inflammatoire cérébrale et systémique. En outre, l'analyse cytométrique en flux des astrocytes et des microglies a confirmé la diminution de leur phénotype inflammatoire au cours de la dysbiose chez les souris infectées de la même façon que chez les souris résistantes au NP. Globalement, ces résultats suggèrent que la composition du microbiote intestinal peut contrôler l'inflammation du cerveau en modulant l'activité des cellules gliales pendant le neuropaludisme.

REMERCIEMENTS

Les remerciements, un exercice complexe pour quelqu'un qui a le compliment difficile. Mais cette aventure qu'est ma thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de gens incroyables. Ainsi, laissez-moi à travers ces quelques lignes vous montrer ma gratitude.

Tout d'abord à **Sylviane Pied**, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire. Je vous remercie pour votre transparence, honnêteté et avoir su me mettre la bonne pression pour me faire avancer, moi « le petit dernier du labo ».

A **Pierre-André Cazenave**, pour vos histoires passionnantes sur l'histoire de la science et les petits potins sur les grands pontes de la science autour d'un petit verre de punch (mais ça reste entre nous).

A ma tutrice **Ines Leleu**, qui est devenue une amie, une grande sœur. Une boule d'énergie avec une passion pour la science et une volonté à toute épreuve qui m'aura toujours fasciné. Te rappelles-tu nos débuts ? Ton premier stagiaire posant des milliards de questions (souvent idiote je te l'accorde), peu confiant et maladroit. Un petit « Gaston la gaffe » débarquait dans ton environnement de travail si organisé. Te rappelles-tu l'odeur de poisson pourri dans le labo à cause du TEMED que j'avais renversé sur la paillasse ... Et malgré tout, tu as été patiente,

investie et tu m'as toujours soutenue tout en veillant à ce que je devienne autonome. J'ai eu de la chance de t'avoir comme tutrice ! Quelqu'un qui avait la « Gnac » !

A **Kevin Neron**, J'ai peu d'ami et je suis heureux que tu en fasses partie. Comment vous décrire ce personnage ? C'est un petit soleil ! Sa bienveillance et sa gentillesse n'ont d'égal que sa rigueur et son côté maniaque du rangement. A toutes nos discussions scientifiques (ou pas) qui se terminent par des rires. Ton arrivé dans l'équipe a été une bouffée d'air frais. Tu m'as redonné goût au défi que j'avais petit à petit perdu au cours de ma thèse ! Tu m'as poussé à reprendre le sport, à me dépasser et qu'est-ce qu'on s'est marré ! Me vider l'esprit et raconter nos aléas de la vie au labo ou en général m'aura fait un bien fou et pour ça MERCI ! Avec Inès on aura formé un trio bien atypique, le bon la brute et le truand, je vous laisse deviner qui est qui.

A **Jacques Roland** alias Jacquot !! Un doux chercheur retraité qui saura vous donner les mots justes pour vous déstresser avant une présentation en vous proposant une blague ou un verre de rhum. C'est un bonhomme dans le sens littéral du terme qui aura laissé des traces de son humour un peu partout dans le labo. Merci pour ton regard critique, tes blagues et pour tous tes conseils de manipulations en expérimentation animale. *Nota bene*, J'ai bien pris soins de tes outils de dissection dans ta boîte à outils nommé « Jacquouille la fripouille »).

Dans cette thèse j'aurai passé une bonne partie à l'animalerie, je tenais donc à remercier chaleureusement l'ensemble des membres de l'animalerie de l'institut Pasteur de Lille.

Thierry Chassat, un « papa poule » qui m’aura donné de nombreux coup de main et toujours avec plaisir (enfin je crois). A **David Hannebique, Romain** et **Ludovic Mercier** pour avoir pris soin, veiller à l’enrichissement et réduire le stress de mes petites bêtes. Une pensée à tous ces petits êtres que j’ai dû sacrifier pour le bien de l’humanité.

Merci à deux personnes de la plateforme BICEL de l’institut Pasteur de Lille, **Hélène Bauderlique** et **Olivier Molendi-Coste** pour m’avoir fait découvrir les « joies » de la cytométrie en flux. Vous m’avez fait découvrir une machine incroyable mais qui nécessite beaucoup d’optimisation et donne une masse de data à analyser sur un logiciel qui de prime abord est indigeste. J’en aurai mangé des tutoriels sur Youtube pour comprendre les différentes fonctionnalités de Flowjo et comprendre ce qui se cache derrière le mot « bonne compensation ». Merci pour votre soutien dans la mise en place des stratégies de ciblage, vos réponses à mes questions et votre bonne humeur malgré les journées entières d’acquisition.

Oulfata Mze, Capucine Picavet et **Thomas Monchy**, je tenais également à vous montrer ma gratitude. Vous avez été des stagiaires en or chacun à votre façon. J’ai muri avec et grâce à vous. Vous transmettre mes connaissances, travailler ensemble et vous aider à développer vos compétences scientifiques on fait naître chez moi une passion pour l’enseignement et la vulgarisation scientifique. J’ai pris énormément de plaisir à interagir avec vous et suis fier de vous. On en aura bavé, Oulfata, avec la culture cellulaire pour le projet PROMAL, des contraintes de temps et d’argent qui nous ont mis une grosse pression mais finalement ça a fonctionné, ton acharnement a payé. Capucine, tu as été une sacrée bosseuse, malgré les

expériences le week-end et les jours fériés tu n'as jamais rechigné bien au contraire c'était plutôt moi le râleur du duo. Tu es le symbole de la persévérance et je te souhaite le meilleur pour ta thèse à Hong-Kong. Enfin Thomas, mon petit dernier, je me voyais en toi à mes tous débuts. Une grande vivacité d'esprit mais maladroit. Tu pouvais comprendre en clin d'œil des interactions cellulaires complexes et l'instant d'après faire un « miss click » faisant rater ta PCR. Bref, merci à vous trois, vous avez remplis ma thèse d'émotions, vous l'avez rendue vivante.

A **Corine Glineur**, notre mamie belge de l'équipe. Fervente défenseuse des chats et conteuse de blagues belges à ses heures perdues. Tu aimais partager tes connaissances et adorer parler de tes cellules endothéliales. Merci pour ta générosité, tes conseils en culture cellulaire, en PCR et j'en passe.

A **Corinne Grangette**, merci de m'avoir ouvert les portes du monde de la bactériologie. Merci pour vos enseignements sur la microbiologie, votre aide dans les expériences de culture de bactérie. Vous avez toujours été disponible que ce soit pour relire mes écrits ou répondre à mes questions naïves sur le microbiote. C'était rassurant d'avoir votre expertise sur ce projet ambitieux.

A l'équipe CGIM, **Julien, Alexandre, Arnaud, Valentin, Amine, Joan, Axelle, Grégoire, Yoel et Audrey**. Merci pour ces moments de rigolade et de partage. Je me rappellerai nos parties de carte, de football, de ping-pong, de badminton et d'alchimiste (Ce qui se passe à l'alchimiste

reste à l'alchimiste ...) qui m'ont permis d'aérer ma petite tête avant de me replonger dans mes travaux. Merci.

A ma famille, **Carole Ritaine**, **Pascal Ritaine** et **Abigael Ritaine**, merci pour votre soutien, j'avais sereinement car je savais que derrière moi vous étiez là, que vous me faisiez confiance. A tous ces week-ends apéro en famille qui m'ont permis de décompresser, me reposer, me ressourcer. Les petits plats de mamounette ont terriblement fait du bien au moral et à mon microbiote intestinal.

Enfin, je voulais terminer mes remerciements par la personne qui compte le plus à mes yeux. A ma femme, **Solenne Ritaine**. Ne lui répétez pas ces mots elle serait capable de me taquiner jusqu'à la fin de mes vieux jours. C'est une femme incroyable, qui me supporte depuis déjà bien longtemps et qui pourtant me pousse toujours à m'améliorer. Je ne serais pas là aujourd'hui sans elle. Elle est mon cocon, mon repère, mon modèle.

Étant maladroit, vous vous doutez que j'ai sûrement oublié des personnes à remercier. Alors pour tous ceux que je n'ai pas cités, aux oubliés. Je m'excuse et vous remercie à la fois. Vous avez participé de près ou de loin à un projet auquel j'ai consacré 4 ans de ma vie. J'y ai sué des gouttes, j'ai râlé sur mes expériences, j'ai eu des remises en question sur le projet, sur moi-même mais je n'ai pas baissé les bras et cela grâce à vous. Merci !

Table des matières

ABSTRACT	4
RÉSUMÉ	5
REMERCIEMENTS	7
ABRÉVIATIONS	16
TABLE DES ILLUSTRATIONS	19
LISTE DES TABLES	19
INTRODUCTION.....	20
LE NEUROPALUDISME.....	23
GENERALITES	23
DIAGNOSTIQUE ET MOYEN DE LUTTE CONTRE LE NEUROPALUDISME.....	26
1) <i>Lutte antivectorielle :</i>	27
2) <i>Diagnostic précoce et traitement :</i>	28
3) <i>Prise en charge médicale :</i>	29
4) <i>Éducation et sensibilisation :</i>	30
5) <i>Recherche et développement de vaccins :</i>	30

LE CYCLE DE VIE DU PARASITE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	31
LA PATHOGENESE DU NEUROPALUDISME	34
LE PHENOMENE D'ADHESION ET DE LA SEQUESTRATION DES GLOBULES ROUGES PARASITES ...	35
LE PHENOMENE DU SYNDROME INFLAMMATOIRE	38
<i>Les astrocytes</i>	38
<i>Les microglies</i>	43
<i>Les astrocytes et les microglies dans un contexte de NPE</i>	46
<i>Les lymphocytes T dans un contexte de NPE</i>	49
<i>La réponse immune humorale, lymphocytes B et autoanticorps</i>	53
<i>Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer)</i>	60
LE MICROBIOTE INTESTINAL	62
L'IMPACT DE L'INFECTION PLASMODIALE SUR LE TRACTUS DIGESTIF	62
GENERALITES SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL	63
ÉVOLUTION DU MICROBIOTE INTESTINAL AU COURS DE LA VIE	64
LA DISTRIBUTION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LE TRACTUS DIGESTIF	66
LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	67
LES FACTEURS MODULATEURS DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	69

LES FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL ET SON ROLE DANS LA REGULATION DE L'IMMUNITE DE L'HOTE	70
<i>Rôle du microbiote intestinal dans les infections parasitaires</i>	<i>73</i>
<i>L'impact du microbiote intestinal sur la barrière hémato-encéphalique et les cellules du système nerveux central.....</i>	<i>77</i>
AXE INTESTIN-CERVEAU	82
LES DIFFERENTES VOIES DE COMMUNICATION ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	82
<i>La communication via le système nerveux.....</i>	<i>82</i>
<i>La communication via le système immunitaire.....</i>	<i>83</i>
<i>La communication via le système neuroendocrine</i>	<i>84</i>
IMPACT DE LA DYSBIOSE INTESTINAL DANS LES PROCESSUS <i>NEURO-INFLAMMATOIRES</i>	85
<i>Dysbiose et astrocytes.....</i>	<i>86</i>
<i>Dysbiose et microglies.....</i>	<i>89</i>
PARTIE II : TRAVAUX DE RECHERCHE	106
STRATÉGIES.....	107
IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LE DEVELOPPEMENT DU NEUROPALUDISME (ARTICLE 1)	109

LA MORTALITE PAR SEPTICEMIE BACTERIENNE PENDANT LE PALUDISME EST ASSOCIEE A LA	
DYSBIOSE DU MICROBIOTE INTESTINAL (ARTICLE 2).....	159
PROJET PROMAL : LA MODIFICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR ADMINISTRATION DE	
PROBIOTIQUES PROTEGE DU NEUROPALUDISME EXPERIMENTAL	185
DISCUSSION GÉNÉRALE	195
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	206
RÉFÉRENCES.....	209
ANNEXES	232
<i>Annexe 1</i>	233
<i>Annexe 2</i>	233
<i>MÉDIATION SCIENTIFIQUE</i>	234

ABRÉVIATIONS

aAC	Auto-Anticorps
ABX	Antibiotiques
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AGCC	Acides Gras à Chaines Courtes
AHR	Récepteurs d'Hydrocarbures Aryles
aMBC	Cellules B Mémoires atypiques
B6.WLA.Berr2	C57Black/6 (congénique), souche de souris résistante au neuropaludisme
BDNF	Facteurs Neurotrophiques Dérivé du Cerveau
BHE	Barrière hématoencéphalique
C57BL/6	C57Black/6, souche de souris sensible au neuropaludisme
CCL2	Chemokine ligand 2
CCL2	Chimiokines aux motifs C-C Ligand 2
CE	Cellule endothéliale
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSF	Facteur de Stimulation des Colonies
CTA	Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine
CTLA-4	Protéines Associées aux Lymphocytes T Cytotoxiques 4
CTRL	Contrôle
CXCL-10	Chemokine ligand (C-X-C motif) 10
CXCL4	Chimiokines aux motifs C-X-C Ligand 4
CXCR	Récepteur de chimiokines aux motifs C-X-C
DAMP	Modèles Moléculaires Associées aux Dommages
DDT	Dichloro Diphényl Trichloro-éthane
EPDR	Récepteur de la Protéine C Endothéliale
FFAR	Récepteur des Acides Gras Libres
FGF	Facteur de Croissance des Fibroblastes
GABA	Acide Gamma-AminoButyrique
GNDF	Facteurs Neurotrophiques Dérivés de cellules Gliales
GFAP	Protéine Acide Fibrillaire Gliale
GFP	Protéine fluorescente verte
GLAST	Transporteur du Glutamate et de l'Aspartate
GM-CSF	Facteur de Stimulation des Colonies de Granulocytes et de Macrophages
GPI	GlycosylPhosphatidylinositols

GR	Globule rouge
Gri	Globule rouge infecté
GRp	Globule Rouge parasité
HDAC	Histones Désacétylases
i.p	Intrapéritonéale
ICAM-1	Molécule d'Adhésion Intercellulaire 1
IFN-I	Interferon de type I
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL1β	Interleukine 1 β
INA	Immunité Naturelle Acquisée
JC	Jésus christ
LIF	Facteur Inhibiteur des cellules Leucémiques
LLPC	Plasmocytes à longue durée de vie
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Lymphocyte T pathologique
MI	Microbiote intestinal
NGF	Facteurs de Croissance Nerveux
NK	Natural Killer
NKC	Le Complexe NK
NP	Neuropaludisme
NPE	Neuropaludisme expérimental
NP^R	Résistante au neuropaludisme
NP^S	Sensible au neuropaludisme
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ON	Oxyde Nitrique
P.	Plasmodium
PAMPs	Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes
PB	Plasmablastes
PbA	Plasmodium <i>berghei</i> ANKA
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
PI	Post infection
PRR	Pattern recognition receptor
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
SNC	Système Nerveux Central
Tfh	Lymphocyte T folliculaire « helper »
TGF	Facteur de Croissance Transformant
TH1	T Helper 1

TLR	Toll like receptor
TMAO	N-oxyde Triméthylamine
TMF	Transplantation de Matières Fécale
TNFα	Facteur de Nécrose Tumoral-alpha
Treg	Lymphocyte T Régulateur
VCAM-1	Adhésion Cellulaire Vasculaire-1

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : MOUSTIQUE ANOPHELE FEMELLE	21
FIGURE 2 : PAYS PRESENTANT DES CAS INDIGENES DE PALUDISME EN 2000 ET LEURS STATUTS JUSQU'EN 2021	24
FIGURE 3 : CYCLE PARASITAIRE DU PLASMODIUM.....	32
FIGURE 4 : DEFORMATION DE LA MEMBRANE D'UN GLOBULE ROUGE INFECTE PAR P. FALCIPARUM SUREXPRIMANT PfEMP1.	33
FIGURE 5 : IMMUNOPATHOLOGIE DU NEUROPALUDISME EXPERIMENTAL	38
FIGURE 6 : LES DIFFERENTES FONCTIONS DES ASTROCYTES.....	39
FIGURE 7 : POLARISATION DES ASTROCYTES VERS UN PHENOTYPE A1 OU A2 ET LEURS EFFETS SUR LES CELLULES DU SNC.	43
FIGURE 8 : LA POLARISATION DES MICROGLIES.....	46
FIGURE 9 : ROLE DES CELLULES GLIALES DANS LA PATHOGENESE DU NEUROPALUDISME.	49
FIGURE 10 : SCHEMA DE L'IMPLICATION DES LYMPHOCYTES T SPLENIQUE DANS LA PATHOGENESE DU NPE.....	52
FIGURE 11 : POLARISATION DES CELLULES B DANS LA MISE EN PLACE D'UNE IMMUNITE HUMORAL.	55
FIGURE 12 : MODIFICATION DU MICROBIOTE HUMAIN AU COURS DE LA VIE.....	65
FIGURE 13 : REPARTITION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LE TUBE DIGESTIF.....	67
FIGURE 14 : REPARTITION DES PHyla BACTERIENS FECAUX ISSUS DE LA SOURIS, LE RAT, LE SINGE ET L'HOMME	69
FIGURE 15 : IMPACT DES AGCC SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HOTE.....	80
FIGURE 16 : LES DIFFERENTES VOIES DE COMMUNICATION CONNUES DE L'AXE INTESTIN-CERVEAU	85
FIGURE 17 : AXE MICROBIOTE INTESTINAL-ASTROCYTES	89
FIGURE 18 : IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LA MICROGLIE DANS DIFFERENTS CONTEXTES PATHOLOGIQUES	91

LISTE DES TABLES

TABLEAU 1 : MANIFESTATIONS CLINIQUE DU NEUROPALUDISME CHEZ L'ENFANT ET L'ADULTE.....	26
TABLEAU 2 : TABLEAU CLINIQUE DU NEUROPALUDISME CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS C57BL/6	35
TABLEAU 3 : EFFETS DE LA RELATION BIDIRECTIONNELLE ENTRE LES PARASITES ET LE MICROBIOTE INTESTINAL ..	76

INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une « maladie aussi vieille que le monde ». Les traces de l'ancêtre de *Plasmodium* (P.) ont été retrouvées dans de l'ambre datant du Crétacé, soit il y a environ 100 millions d'années¹. *P. falciparum* aurait fait son apparition chez l'homme il y a environ 40 à 60 000 ans. Cependant, la première trace écrite d'infection palustre daterait de -1500 ans avant JC, dans le papyrus d'Ebers retrouvé à Louxor, où des symptômes similaires à une crise paludéenne sont évoqués^{2,3}. Une analyse de l'ADN du corps de Toutankhamon a révélé qu'il souffrait du paludisme au moment de sa mort⁴.

Le célèbre Hippocrate, précisera les signes cliniques dans « Le livre des épidémies » et « Consultations » au IV^e siècles avant JC, où il y fera allusion à des crises fébriles corrélées à la présence des marécages⁵. Le paludisme a donc été associé aux zones marécageuses et aux zones où l'air était putréfié d'où le nom de « paludisme » dérivé de l'ancien français « palud » qui veut dire « marais » ou « malaria » qui en italien signifie « mauvais air ».

Le paludisme a d'abord sévi principalement en Europe et causé des dégâts comparables à ceux qu'il cause en Afrique de nos jours. Au XVI^e siècle, débute la conquête du Nouveau Monde et le commerce d'esclaves emportant avec eux le paludisme aux Amériques. En 1630 le jésuite espagnol Don Francisco Lopez découvre les propriétés curatives d'un arbre du Pérou, le Quinquina déjà connue des Indiens pour soigner les fièvres. La précieuse poudre des jésuites est ramenée en Europe et en 1820, deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, isolent la molécule, la quinine, à partir des écorces de quinquina. En 1880, le médecin Alphonse Laveran sera le premier à observer dans les globules rouges (GR) des malades, le parasite du

paludisme, le *Plasmodium*⁶. En 1897 le britannique Ronal Ross fait lui aussi une découverte capitale : c'est l'anophèle, le moustique qui transmet le parasite à l'homme⁷ (Figure 1).



Figure 1 : Moustique Anophèle femelle⁸

Jusqu'au début du XXe siècle, la quinine reste le seul médicament antipaludéen. La chloroquine, et d'autres antipaludéens de synthèse arrivent au début des années 1940. En parallèle on pulvérise massivement des insecticides comme le Dichloro Diphényl Trichloro-éthane (DDT). En 1955 l'organisation mondiale de la santé (OMS) lance le programme mondial d'éradication du paludisme mais le parasite se défend et devient de plus en plus résistant aux traitements. En 2001, l'OMS préconise une nouvelle thérapie, les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA), qui consiste à associer l'artémisinine, avec d'autres antipaludéens. Dans un premier temps il fut très efficace mais des résistances face à ce nouveau traitement sont apparues en Asie en 2005⁹.

Aujourd'hui, malgré des avancées scientifiques majeures, de nombreuses questions demeurent encore sans réponse. La recherche vaccinale n'est toujours pas aboutie et les

parasites ont développé des mécanismes de résistance à tous les antipaludiques disponibles aujourd'hui. Les recherches sur le parasite et la réponse de l'hôte sont donc essentielles afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du paludisme pour lutter plus efficacement contre cette maladie.

L'introduction se déclinera en trois parties. Dans la première partie, je présenterai tout d'abord les généralités sur le neuropaludisme (NP), sa physiopathologie et les mécanismes de défense de l'hôte mis en œuvre pour lutter contre l'infection palustre. Je développerai, dans ce cadre, le rôle majeur des cellules gliales, que sont les astrocytes et la microglie, des cellules clefs de la réponse immune innée au sein du système nerveux central (SNC). Non seulement ces cellules jouent un rôle dans la défense immunitaire, mais elles participent aussi activement au maintien de l'homéostasie cérébrale et sont la clef de voûte dans le développement du neuropaludisme. La deuxième partie se focalisera sur l'importance du microbiote intestinal (MI) dans la régulation de la neuro-inflammation dans un contexte d'infection parasitaire. Contrairement aux maladies neurodégénératives : Alzheimer, Parkinson ou encore la sclérose en plaques, nous avons peu d'informations sur l'implication de la flore intestinale dans les maladies parasitaires inductrices de neuro-inflammation. Le microbiote intestinal est-il capable de moduler le développement du NP ? Impacte-t-il la biologie du parasite ? Existe-t-il une communication entre le microbiote intestinal et le cerveau ? Est-ce que le microbiote intestinal peut limiter la neuro-inflammation résultant de l'infection ? Quelles bactéries de cet écosystème intestinal peuvent être impliquées dans la pathogénèse ou à l'inverse la prévenir ? Quels facteurs produits par le microbiote intestinal impacteraient les cellules gliales ?

Pour répondre à ces interrogations, nous avons utilisé un modèle murin de neuropaludisme, le neuropaludisme expérimental (NPE), dans lequel nous avons modifié le microbiote intestinal à l'aide d'un traitement avec des antibiotiques (ABX) avant l'infection palustre.

LE NEUROPALUDISME

Généralités

Le neuropaludisme est la complication neurologique majeure de l'infection à *P. falciparum*. Avec ces 241 millions de personnes infectées et 627 000 décès chaque année, elle est l'une des parasitoses la plus répandue à travers le monde et la plus mortelle¹ (Figure 2). De ce constat, le NP est un problème majeur de santé publique et fait partie des 3 maladies prioritaires de l'OMS avec le VIH/SIDA et la tuberculose¹¹.

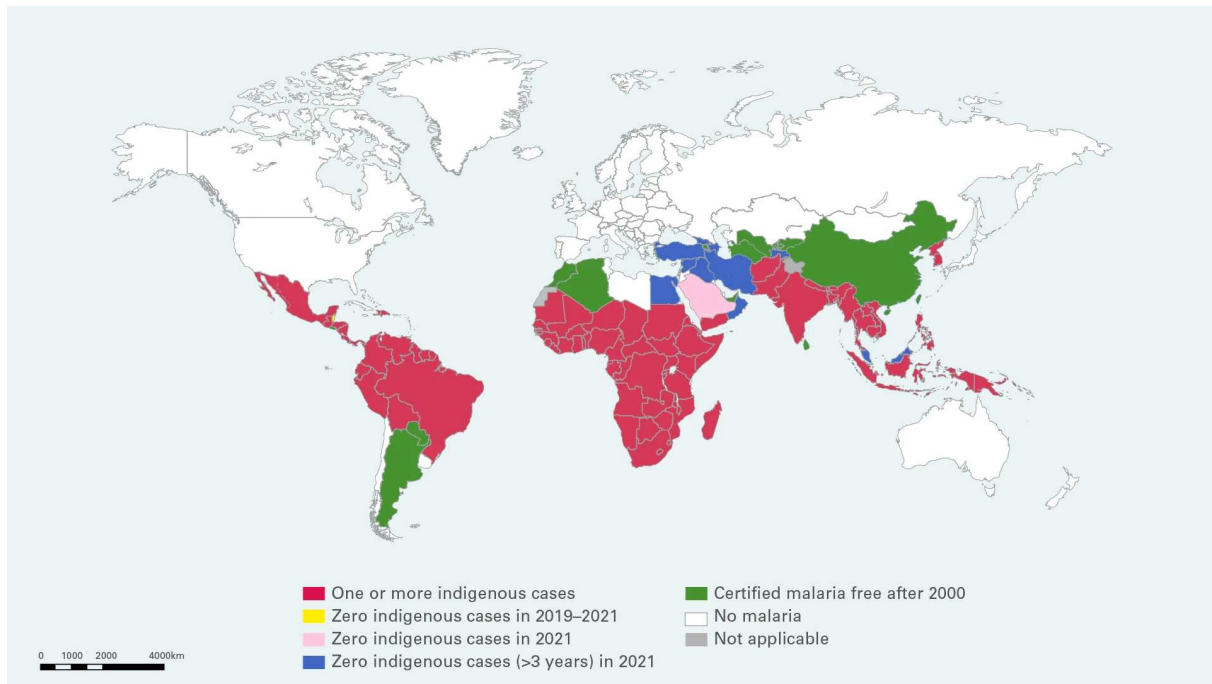


Figure 2 : Pays présentant des cas indigènes de paludisme en 2000 et leurs statuts jusqu'en 2021. (source : WHO- Rapport sur le paludisme dans le monde en 2021¹¹)

L'Afrique Sub-Saharienne est une zone avec une forte transmission du parasite et est la plus affectée par ce fléau. La majorité des cas de NP sont :

- Les enfants de moins de cinq ans en raison de leur système immunitaire encore incompetent (représentent 70% des décès dus à l'infection *P. falciparum*). Toutefois, lors d'un transfert d'immunité maternelle et chez des enfants de plus de 3 ans exposés et qui survivent aux infections palustres, il est observé la mise en place de ce que l'on nomme une « prémunition ». En effet, ces enfants ont moins de risques de développer une forme sévère du paludisme incluant le NP.

- Des femmes enceintes chez qui les complications graves peuvent conduire à un avortement spontané ou à des naissances de morts nés.

En Asie du Sud-Est, la transmission de paludisme est faible et les formes graves touchent principalement les adultes¹¹. Les raisons biologiques qui expliquent pourquoi certains individus contrairement à d'autres développent un NP restent indéterminées. Le tableau clinique du NP chez l'adulte se caractérise par des dysfonctions du SNC et des atteintes multi-organes comme le foie, les reins et le système respiratoire, contrairement aux enfants qui développent des anémies sévères, des encéphalopathies diffuses, des troubles neurologiques (hypotonie), des paralysies, des convulsions et un coma pouvant aboutir à la mort¹². L'évolution du NP dépend de la rapidité du diagnostic. Toutefois, on observe 15-20% de décès causés par le NP malgré les thérapies antipaludiques et les soins intensifs prodigués. Onze pour cent des survivants de l'infection développent à long terme des déficits neurologiques^{13,14} (Tableau 1).

Clinical features		Children	Adults
Preceding symptoms		Fever, failure to eat or drink, vomiting and cough, and convulsions (Molyneux et al., 1989).	General malaise, head, back, and limb pain, dizziness, anorexia, nausea, vomiting, and mild diarrhea (NIH (2014)).
Neurological system	Coma	It develops rapidly, often after a seizure, and lasts for 1 to 2 days, reversible (Genton et al., 1997; Newton et al., 2000).	Develops gradually following delirium, Disorientation, and agitation over 2 to 3 days or follows a generalized seizure, lasts longer (2 days) (Idro et al., 2005).
	Nerve reflex	More common (Waller et al., 1995).	Rare.
	Neurological impairments	Ataxia (43%), hemiplegia (39%), speech disorders (39%) and blindness (30%). Other sequelae include behavioral disturbances, hypotonia, generalized spasticity, and a variety of tremors (van Hensbroek et al., 1997).	Psychosis, psychosis, ataxia, transitory cranial nerve palsies, mononeuritis multiplex, polyneuropathy, extrapyramidal and extrapyramidal tremors, and other cerebellar signs (van Hensbroek et al., 1997).
Motor system	Seizures	High incidence, frequently mostly partial motor (Crawley et al., 1996).	Low incidence, generalized seizures frequently, less focal (Idro et al., 2005).
	Status epilepticus	Usual (Crawley et al., 1996).	Rare (Vespa et al., 1999).
	Abnormal behavior	Hyperactivity, impulsiveness, and inattentiveness or conduct disorders (Birbeck et al., 2010; Idro et al., 2010).	Ataxia of gait, intention tremor, dysmetria, dysidiadochokinesis, nystagmus, and cerebellar dysarthria (Senanayake, 1987).
Systemic complications		Hyponatremia, anemia, hypoglycemia, jaundice, metabolic acidosis, respiratory distress, hepatosplenomegaly, and intracranial pressure (English et al., 1996; English et al., 1997; English et al., 1998; Idro et al., 2005).	Anemia, hypoglycemia, hemoglobinuria, jaundice, shock, renal failure, severe lactic acidosis, abnormal bleeding, pulmonary edema, and adult respiratory distress syndrome, Kussmaul's breathing (Garg et al., 1999; Hora et al., 2016).
Retinopathy		Retinal whitening, orange or white discoloration of the retinal vessels, retinal hemorrhages, and infrequent papilledema (MacCormick et al., 2014).	Less prominent. Characterized by retinal hemorrhages and retinal whitening, no change in retinal vessel discoloration (NIH (2014)).

Tableau 1 : Manifestations cliniques du neuropaludisme chez l'enfant et l'adulte¹⁵

Diagnostic et moyens de lutte contre le neuropaludisme

Lors d'une infection à *P. falciparum*, la phase hépatique est asymptomatique, le diagnostic ne sera réalisable qu'au cours de l'apparition des symptômes cliniques durant la phase érythrocytaire. Le développement du NP peut se mettre en place très rapidement. Ce qui nécessite un traitement rapide et adéquat du patient. Ainsi, La réalisation d'un diagnostic précoce permet d'améliorer le taux de survie. Malheureusement, le tableau clinique du paludisme ressemble à la plupart des maladies infectieuses (grippe, autres parasitoses, septicémie). Toutefois, certains signes peuvent être plus indicatifs comme l'anémie progressive avec une hémoglobinurie, une thrombocytopénie (séquestration des plaquettes dans le cerveau), une leucocytose ou encore un syndrome inflammatoire. Mais pour confirmer

l'infection paludéenne, un frottis sanguin ou une goutte épaisse est obligatoire. Voici quelques informations sur les moyens de lutte contre le paludisme en général :

1) Lutte antivectorielle :

-  Utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide : Les moustiquaires traitées avec un insecticide, comme la perméthrine, sont efficaces pour prévenir des piqûres de moustiques pendant 2 à 3 ans. Selon l'OMS, 70% des cas de paludisme sont évités par l'utilisation des moustiquaires.
-  Pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides à effet rémanent : 4 classes d'insecticides sont utilisées, les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les carbamates et les organophosphorés. Le vecteur développe de nombreuses résistances à l'ensemble des insecticides.
-  Utilisation de répulsifs cutanés : L'application de répulsifs sur des vêtements longs et sur la peau peut aider à éloigner les moustiques.
-  Élimination des habitats de reproduction des moustiques par drainage ou assèchement des zones d'eau stagnante. Le traitement des eaux par des larvicides ou encore l'introduction d'espèces prédatrices du moustique.
-  Modification génomique des vecteurs : De nouvelles approches antivectorielles se basent sur des approches de modification du génome du moustique afin de le stériliser et d'éviter le développement parasitaire.

Médicaments prophylactiques : Dans certaines régions où le paludisme est endémique, les voyageurs ou les résidents peuvent se faire prescrire des médicaments prophylactiques pour réduire le risque d'infection et de développer un paludisme sévère. Le choix de la molécule tient compte de plusieurs paramètres comme l'intensité de la transmission, la durée du séjour et les caractéristiques de l'individu. Ainsi il existe des traitements préventifs différents pour les femmes enceintes, les enfants de moins de 5 ans et les nourrissons. Les traitements actuellement recommandés sont composés principalement d'Atovaquone-Proguanil (MALARONE®), de sulfadoxine/pyriméthamine (FANSIDAR®), Chloroquine, Chloroquine- Proguanil, Doxycycline, Mefloquine, Proguanil.

2) Diagnostic précoce et traitement :

📌 Le diagnostic précoce de l'infection à *P. falciparum* est essentiel pour prévenir le développement du neuropaludisme. L'examen effectué en routine est l'analyse du sang des patients par microscopie à l'aide d'un frottis sanguin ou d'une goutte épaisse. Ces tests permettent d'évaluer la densité parasitaire et de proposer des traitements antipaludiques pour déceler de potentielles résistances parasitaires.

📌 Des tests rapides de diagnostic du paludisme sont disponibles dans de nombreuses régions touchées par la maladie. Ils sont appliqués en complément des examens de microscopie. Ils permettent de rechercher des traces d'antigènes parasitaires circulants et peuvent être positif jusqu'à 4 semaines après l'élimination du parasite.

✚ Les réactions en chaîne de polymérisation (PCR) ou les tests sérologiques sont appliqués de manière moins systématique car trop coûteux et longs pour du diagnostic dans les zones d'endémies. Ils sont utilisés d'avantage pour leurs sensibilités et leurs spécificités de détection dans les recherches épidémiologiques, pour évaluer les résistances, pour des études rétrospectives ou pour prévenir du paludisme transfusionnel.

3) Prise en charge médicale :

✚ Les patients atteints de neuropaludisme nécessitent généralement des soins médicaux intensifs dans un établissement de santé. Le traitement de première intention est l'administration intra-veineuse d'artésunate puis en seconde intention une CTA comme l'artéméther/luméfantrine (COARTEM®) qui est un dérivé d'artémisine, un antipaludique puissant à action rapide permettant d'éliminer le parasite dans le sang, et d'une autre molécule à action de plus longue durée permettant d'éviter de potentielles réinfections. En accompagnement, des soins de soutien pour maintenir les fonctions vitales sont administrés aux patients.

4) Éducation et sensibilisation :

📌 L'éducation des communautés locales sur les risques du paludisme, les moyens de prévention et la reconnaissance des symptômes est cruciale pour réduire la propagation de la maladie et garantir un traitement précoce.

5) Recherche et développement de vaccins :

📌 La plupart des travaux de recherche en cours dans le domaine des vaccins se concentrent actuellement sur *P. falciparum*, car il s'agit de l'espèce de *Plasmodium* la plus redoutable pour l'homme. Ces recherches portent sur différents types de vaccins : certains visent à cibler le stade pré-érythrocytaire ou hépatique (comme le RTS, S/ASO1, ChAd63/MVA ME-TRAP, PfSPZ), d'autres se concentrent sur la phase sanguine (comme GMZ2, P27A, MSP3), tandis que certains s'intéressent au cycle sexué du parasite. Le vaccin le plus avancé est le RTS, S/ASO1, également connu sous le nom de Mosquirix®, validé par l'agence européenne des médicaments et recommandé par l'OMS en 2021 dans la lutte antipaludique dans les zones d'endémies¹⁶. Cependant, le vaccin confère une protection partielle face au paludisme infantile et cette protection diminue significativement en à peine un an. Les instances le recommandent plutôt comme une mesure complémentaire et préventive. La recherche antipaludique est nécessaire pour développer de nouveaux médicaments antipaludiques, des vaccins et des approches innovantes pour prévenir et traiter le neuropaludisme. La modulation

du microbiote intestinal, notamment via l'utilisation de probiotiques aux propriétés anti-neuroinflammatoires est l'une de ces nouvelles approches.

Le cycle de vie du parasite *Plasmodium falciparum*

Le parasite *Plasmodium* se transmet à l'homme via la piqure d'un moustique femelle anophèle. Pendant le repas sanguin, 20 à 200 sporozoïtes présents dans la salive du moustique se retrouvent dans le derme puis migrent rapidement vers le foie via la circulation sanguine. Durant cette phase asymptomatique, les parasites sont visibles par le système immunitaire de l'hôte et peuvent donc être éliminés par des mécanismes de phagocytose. De manière individuelle, les sporozoïtes infectent les hépatocytes et se développent en mérozoïtes qui donneront naissance au schizonte hépatique. Ce dernier à maturité relarguera dans la circulation sanguine des dizaines de milliers de mérozoïtes. Débute alors le stade érythrocytaire symptomatique qui se traduit par l'endocytose des mérozoïtes dans les GR. Ils s'y développent en anneau, puis en trophozoïtes et en schizontes endo-érythrocytaire (Figure 3).

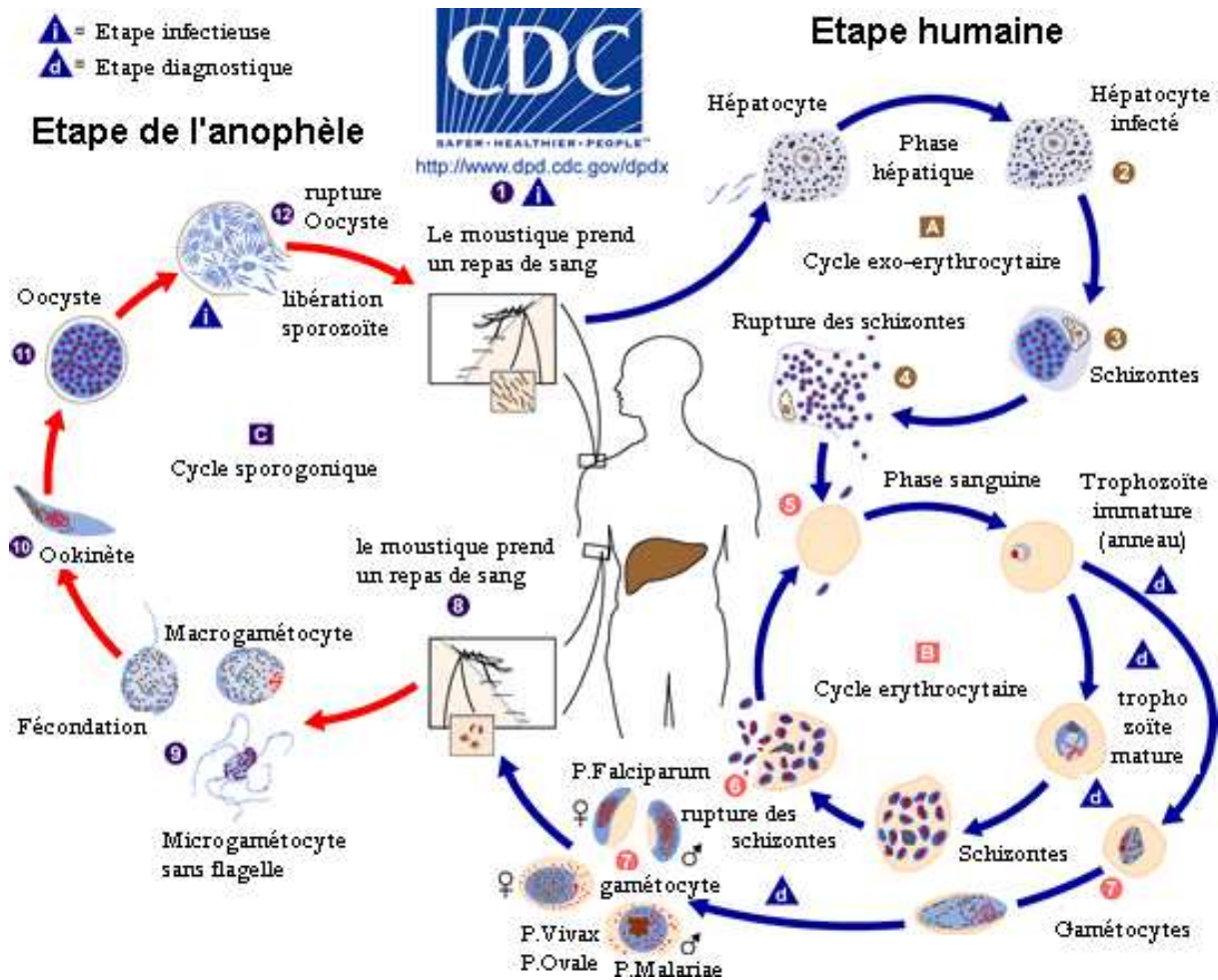


Figure 3 : Cycle parasitaire du *Plasmodium*¹⁷

Pour se développer, le parasite consomme et dégrade l'hémoglobine, et élimine ses déchets toxiques en les transformant en cristaux d'hémozoïne, un pigment malarique pyrogène responsable des accès fébriles, formant des amas pigmentaires intracytoplasmiques¹⁸. La membrane du GR infecté (GRi) est alors altérée. Sa morphologie et sa composition changent. De plus, le GRi par *P. falciparum* exprime à sa surface des protéines parasitaires appelées antigènes variants de surface, notamment la protéine *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (*PfEMP1*) codée par une famille de 60 gènes var¹⁹. Le GRi présente ainsi un contour irrégulier, plus antigénique et moins déformable (Figure 4).

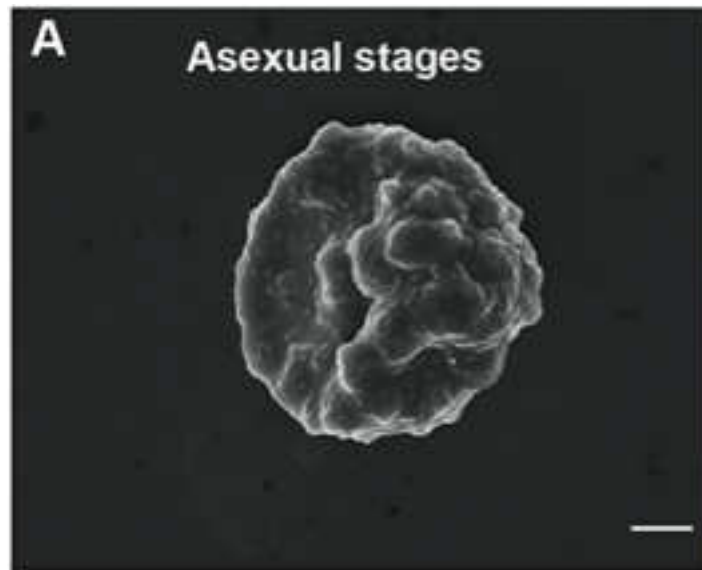


Figure 4 : Déformation de la membrane d'un globule rouge infecté par *P. falciparum* surexprimant *PfEMP1*²⁰.

Du fait de ses 60 gènes, *PfEMP1* présente une variabilité antigénique qui rend la tâche complexe et en particulier pour la production d'anticorps (Ac) spécifiques efficaces. Ces protéines parasitaires conditionnent la virulence du parasite et leur localisation dans les différents organes. Par exemple, lors d'un neuropoludisme, elles participent à la séquestration des hématies infectées dans les organes profonds, notamment le cerveau, en interagissant avec les récepteurs membranaires des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins. Cette cytoadhérence permet aux GRi d'échapper au système immunitaire et à leur destruction dans la rate. Dans le cas du neuropoludisme, la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales composant la barrière hémato-encéphalique (BHE) induit une obstruction du flux sanguin, et participe à la pathogénèse. Après maturation et multiplication au sein des GRi, les parasites sous forme de schizontes, se transforment en rosace et font éclater les Gri,

induisant une hémolyse et la libération de plusieurs dizaines de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ces mérozoïtes pourront ainsi infecter de nouvelles hématies. La destruction des GRi va également libérer de l'hémozoïne, des facteurs parasitaires, des glycoprotéines et glycolipides, qui vont favoriser l'inflammation²¹.

La pathogénèse du neuropaludisme

Le NP est présenté comme une complication neurologique sévère, d'ordre multifactoriel et dont la physiopathologie est complexe à démêler. L'étude du NP chez l'homme est limitée pour des raisons évidentes d'éthique et de pratiques culturelles. La plupart du temps elles sont rétrospectives et sont basées sur des analyses d'échantillons sanguins ou sur des analyses histopathologiques post-mortem. Ces études souffrent alors de fortes variabilités inter-individuelles liées à la méconnaissance de l'historique médical du patient. Ainsi, pour mieux comprendre et expliquer le développement de la neuropathologie, un modèle de neuropaludisme expérimental chez la souris C57BL/6 infectée par *P.berghei ANKA (PbA)* a été conçu, bien qu'il ne reproduise pas à l'identique la pathologie humaine (Tableau 2). Les souris développent après 6 à 10 jours post-infection (PI) une parasitémie faible associée à un syndrome cérébral proche de celui décrit chez l'homme. Il est actuellement admis que le NP serait la résultante de deux mécanismes mutuellement dépendants : la séquestration des globules rouges parasités (GRp) qui promeut une réponse pro-inflammatoire excessive et la réponse immune associée à l'infection au niveau du SNC²².

Cependant, ces mécanismes à eux seuls n'expliquent pas toute la pathogénèse du NP chez l'homme.

Parameter	Human CM	PbA model
Brain hemorrhage	++	++
Plugging of microvessels	++	++
Sequestration of pRBC	+++	+
Knobs on pRBC	++	–
Sequestration of leukocytes	++	+++
Sequestration of platelets	++	++
Necrosis of microvessels	+	+
CAM upregulated	ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, TSP, CD36	ICAM-1, VCAM-1
Overexpression of MHC	Class I and II	Class I and II
Upregulation of TNF receptors	p75	p75

Tableau 2 : Tableau clinique du neuropaludisme chez l'homme et la souris C57BL/6²³

Le phénomène d'adhésion et de la séquestration des globules rouges parasités

La séquestration des globules rouges infectés et sains a été le premier mécanisme incriminé dans le développement du NP. Au cours d'une infection palustre, de nombreux dommages sont constatés sur l'endothélium des micro-vaisseaux qui irriguent différents organes et plus particulièrement ceux du cerveau²⁴. Les GRi, en plus de leurs rigidité altérée, expriment à leur surface des variants de *PfEMP1* qui adhèrent aux récepteurs de l'hôte comme la Molécule d'Adhésion Intercellulaire 1 (ICAM-1), Récepteur de la Protéine C Endothéliale (EPCR) et l'Adhésion Cellulaire Vasculaire (VCAM-1) surexprimés par les cellules endothéliales

des veinules postcapillaires²⁵. Une augmentation des molécules d'adhésion de l'hôte est observée durant un NP, favorisant l'agrégation des GRp et sains, des leucocytes et des plaquettes²⁶. Ce phénomène d'adhésion produit des coagulum qui altèrent le flux sanguin et créent une hypoxie cérébrale^{24,27,28}. Tout ceci engendre une acidose métabolique, active les cellules endothéliales (CE) et participe au développement du NP (Figure 5). On observe alors, une augmentation de la sécrétion de facteurs tels que l'angiopoïétine 1 et 2 ainsi que du Facteur de Nécrose Tumorale- α (TNF α), ce qui induit une perte de fonction de la barrière des CE²⁹.

Le cerveau est particulièrement sensible à l'inflammation et ces GRp circulants ou séquestrés déclenchent des réponses immunes locales notamment via le relargage des glycosylphosphatidylinositols (GPI) qui sont distinctes des GPI humains³⁰. Les GPI de *P. falciparum* induisent via le Toll Like Receptor 2 (TLR2), la production de molécules pro-inflammatoires comme le TNF α et Interleukine 1- β (IL-1 β) dans les macrophages murins *in vitro*³¹. L'augmentation de ces médiateurs inflammatoires participe à l'infiltration de leucocytes, à l'amplification de l'inflammation locale et à la production de molécules d'adhésion par les CE³². Cette réponse pro-inflammatoire précoce est nécessaire pour l'élimination du parasite de la circulation sanguine. Cependant, la phagocytose des parasites par les monocytes circulants est compromise par une acidification phagosomale prononcée suite à une infection par *P. falciparum* ou son homologue murin *P.berghei* ANKA (*PbA*)³³. Ce cercle vicieux d'inflammation peut alors aboutir à de graves dommages endothéliaux et à une rupture de la BHE³⁴ qui est souvent bien plus prononcée chez les enfants que chez les adultes.

Leurs BHE serait plus vulnérable à cause de leurs système nerveux en cours de développement³⁵ (Figure 5).

Malgré l'accumulation d'évidences, l'implication du phénomène de séquestration des GRp dans le cerveau n'est pas une nécessité pour développer un NP. De nombreux cas de patients atteints de NP décrivent une séquestration parasitaire et une occlusion vasculaire minimales dans leurs micro-vaisseaux cérébraux³⁶. Le rôle de la séquestration des GRp dans la pathogénèse du NP n'étant pas totalement démontré, d'autres facteurs peuvent être impliqués dans la sévérité de la maladie. Maintes études réalisées chez l'homme et la souris proposent l'implication d'une réponse immunitaire délétère. La rupture de la BHE crée une porte d'entrée du parasite dans le parenchyme cérébral, ce qui peut alors affecter les cellules de l'immunité innée du SNC telles que les astrocytes et les microglies²⁷ et engendrer des désordres neuro-inflammatoires³⁷. On retrouve également un recrutement de monocytes dans le cerveau et une réponse immune humorale dirigée contre des antigènes (Ag) du cerveau^{38,39}. *In fine*, les conséquences de ce chaos sont des lésions axonales, de la démyélinisation et la mort neuronale⁴⁰.

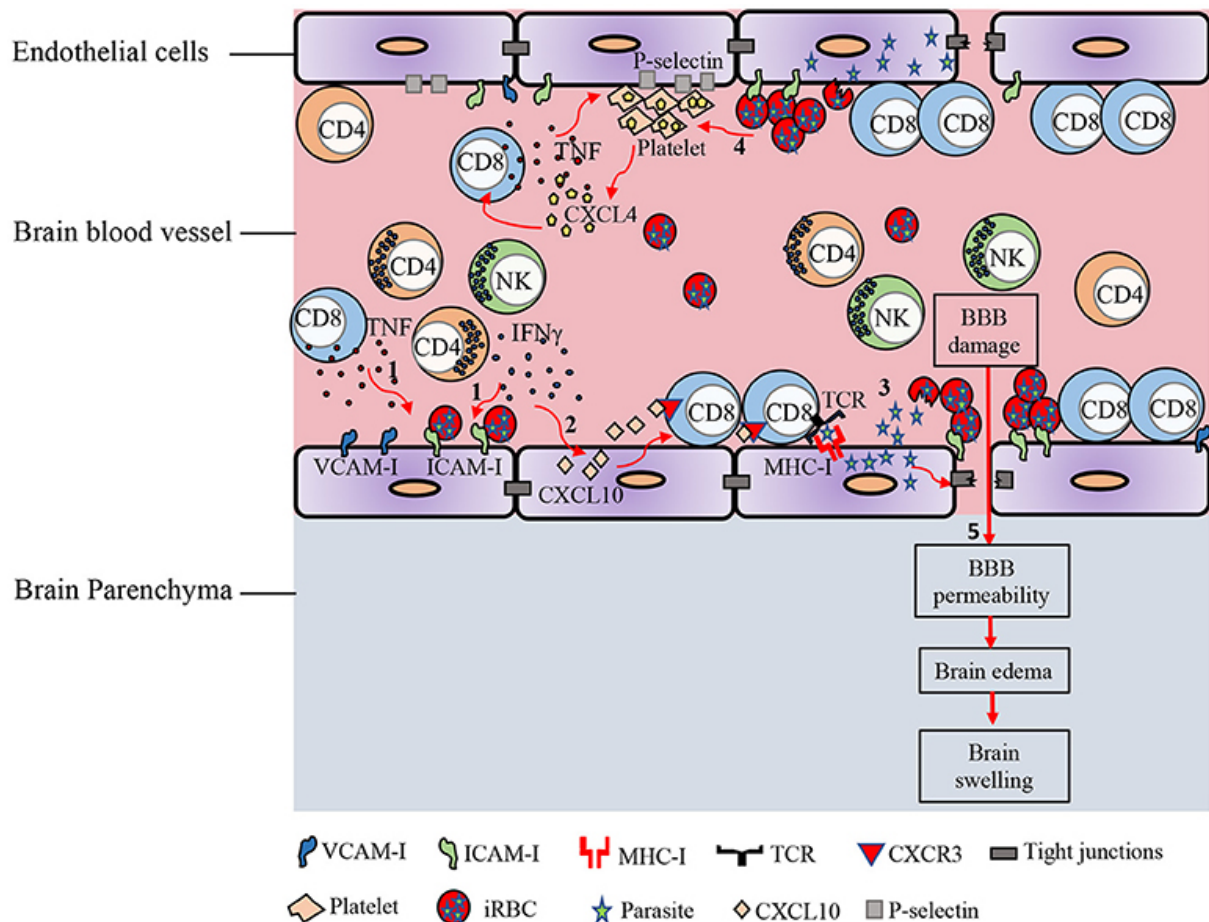


Figure 5 : Immunopathologie du neuropaludisme expérimental⁴¹.

Le phénomène du syndrome inflammatoire

Les astrocytes

Les astroglies, parfois désignées sous le nom d'astrocytes, appartiennent à une catégorie de cellules nerveuses qui ont une origine ectodermique et neuroépithéliale⁴². Leur rôle consiste à maintenir l'équilibre interne et à protéger le SNC. Les astrocytes participent à l'équilibre chimique, aident à la formation de nouvelles cellules nerveuses, soutiennent le

développement des connexions entre les neurones, maintiennent la barrière protectrice du cerveau et s'assurent que l'ensemble du système fonctionne correctement en détectant les niveaux d'oxygène, de dioxyde de carbone et de sodium dans le corps (Figure 6)^{43,44}.

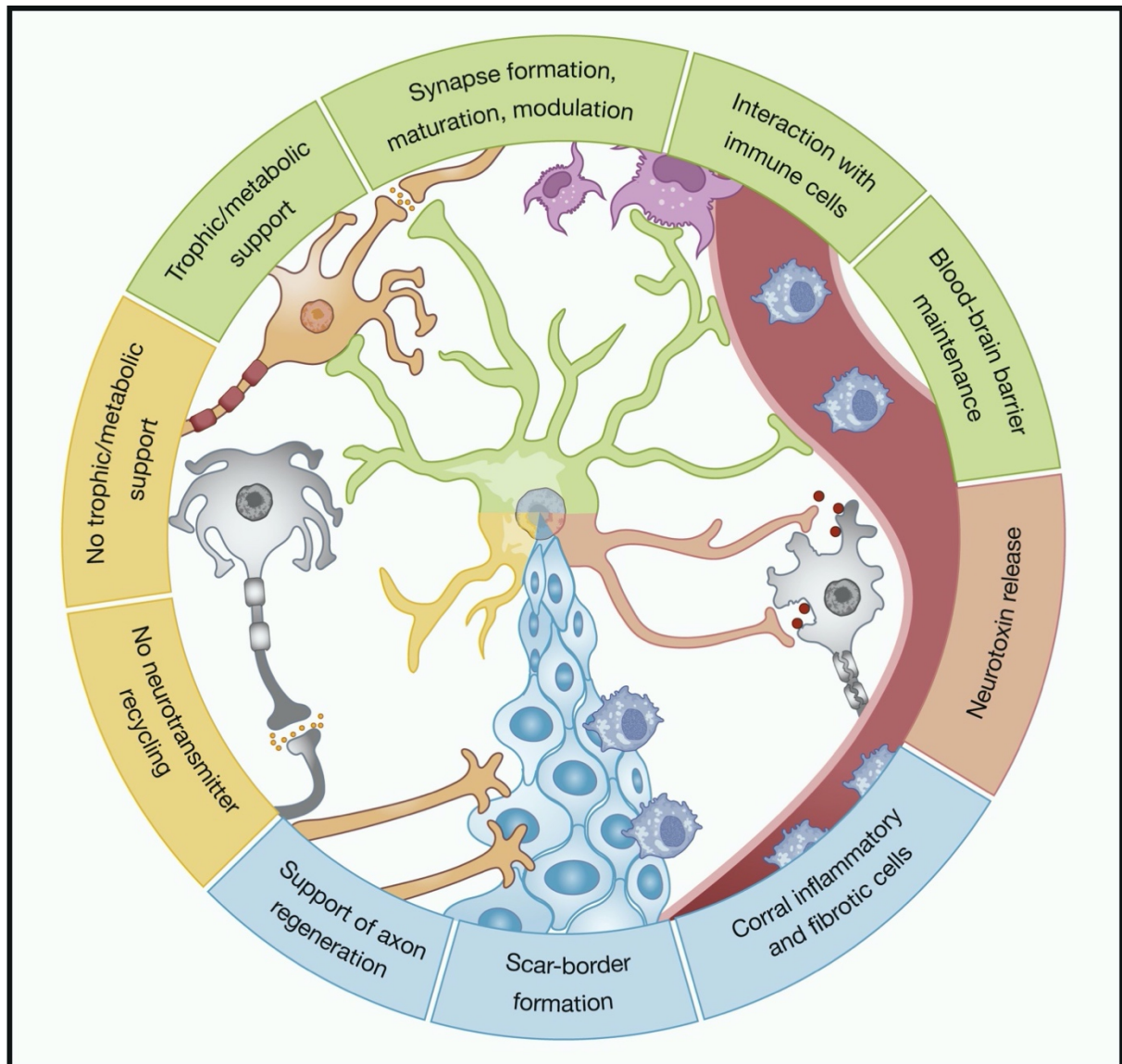


Figure 6 : Les différentes fonctions des astrocytes⁴⁵.

Les astrocytes sont également des cellules de l'immunité innée du SNC et sont l'un des constituants de la BHE. Plus de 99% des capillaires cérébraux sont recouverts par des

astrocytes⁴⁶. Néanmoins ces cellules sont très hétérogènes et varient d'une région cérébrale à une autre. Grâce aux études de séquençage de l'ARN unicellulaire et de la transcriptomique, on distingue 5 populations d'astrocytes distinctes dans le cortex et l'hippocampe⁴⁷. Lors d'un trouble du SNC comme le NP, elles subissent une gradation de changement cellulaire, moléculaire et fonctionnel que l'on nomme couramment le phénomène d'astrogliose^{48,49}. L'astrogliose est caractérisée par une augmentation de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) présent chez les astrocytes dit « réactifs » dans le SNC adulte. Ces astrocytes réactifs peuvent engendrer divers effets, parfois néfastes, tels qu'une neuro-inflammation aigüe, une perturbation des synapses ou de la croissance axonale, parfois bénéfiques, comme des activités anti-inflammatoires, neuroprotectrices et réparatrices de la BHE^{48,50,51}. On distingue alors les astrocytes réactifs de type A1 associés à un état pro-inflammatoire, à la sécrétion de neurotoxines et la neurodégénération tandis que les astrocytes réactifs de type A2 sont associés à une activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice⁵². Néanmoins, la diversité des phénotypes astrocytaires ne se limitent pas aux phénotypes A1 et A2. Notre compréhension des différentes sous populations astrocytaires et de leurs rôles dans divers troubles du système nerveux central restent à approfondir. Dans de nombreux troubles neuro-inflammatoires (lésions cérébrales aiguës, Parkinson, Sclérose en plaques) que ce soit chez la souris ou l'homme, une polarisation plus ou moins importante des astrocytes vers les phénotypes A1/A2 a été observée. Les astrocytes A1 ont une morphologie caractérisée par de longues dendrites contrairement aux astrocytes A2 qui présentent peu de dendrites et une hypertrophie^{43,53}. Ainsi, l'étude menée par *Althammer et al* a corrélié les changements morphométriques avec l'expression de certains marqueurs comme la molécule du

complément C3 accrue et la sphingosine kinase 1 ainsi que le marqueur transmembranaire 4s de la famille 1 réduit chez les astrocytes A1. Bien que de nombreuses études aient examiné les effets des astrocytes A1 sur les neurones, nous n'en savons pas autant sur les effets des astrocytes A2 dans le cerveau. Quelques études suggèrent que les astrocytes A2 peuvent protéger les neurones. Les astrocytes de type A2 semblent jouer un rôle protecteur envers les neurones, que ce soit directement ou de manière indirecte. En examinant les gènes actifs, on a découvert que lorsque ces astrocytes de type A2 sont stimulés dans des conditions spécifiques, ils augmentent la production de substances bénéfiques pour les neurones. Ces substances comprennent des facteurs de croissance cérébrale utiles et des molécules inflammatoires comme le facteur cytokinique similaire à la cardiotrophine 1, le Facteur Inhibiteur des cellules Leucémiques (LIF), l'IL-6, l'IL-10 et les thrombospondines (Figure 7)⁵⁴. Ces composés semblent contribuer à la survie des neurones et à la réparation du SNC. Les astrocytes de type A2 aurait également la capacité de diminuer la concentration de glutamate à l'extérieur des cellules en augmentant l'expression du Transporteur de Glutamate Aspartate (GLAST). Cette action pourrait jouer un rôle dans la protection des neurones en les préservant de l'excitotoxicité qui peut survenir en cas d'excès de glutamate⁵⁵.

Un dialogue entre les astrocytes et la microglie est un sujet d'intérêt qui émerge, les astrocytes ajustent l'activation des microglies, leur mobilité, leur capacité à éliminer des débris et influencent leurs caractéristiques en produisant diverses substances, telles que des cytokines, des chimiokines, des protéines du complément et d'autres médiateurs inflammatoires⁵⁶. Par exemple, le TGF- β sécrété par les astrocytes, régule positivement la phagocytose microgliale⁵⁶. D'autres travaux soutiennent que les astrocytes produisent des molécules telles

que l'IL-34, le TGF- β et le cholestérol qui maintiennent l'état homéostatique microgliale *in vivo*⁵⁷. Ces cas montrent quelques-uns des changements qui peuvent se produire lorsque des astrocytes communiquent avec d'autres cellules immunes tels que les microglies. Mais ce dialogue est bidirectionnel, ainsi les microglies qui sont généralement activées plus rapidement que les astrocytes en réponse à divers stimuli pathogéniques, interagissent avec les astrocytes via des facteurs dépendants du contact, ou sécrétés, pour stimuler la réactivité et orienter le phénotype des astrocytes^{58,59}.

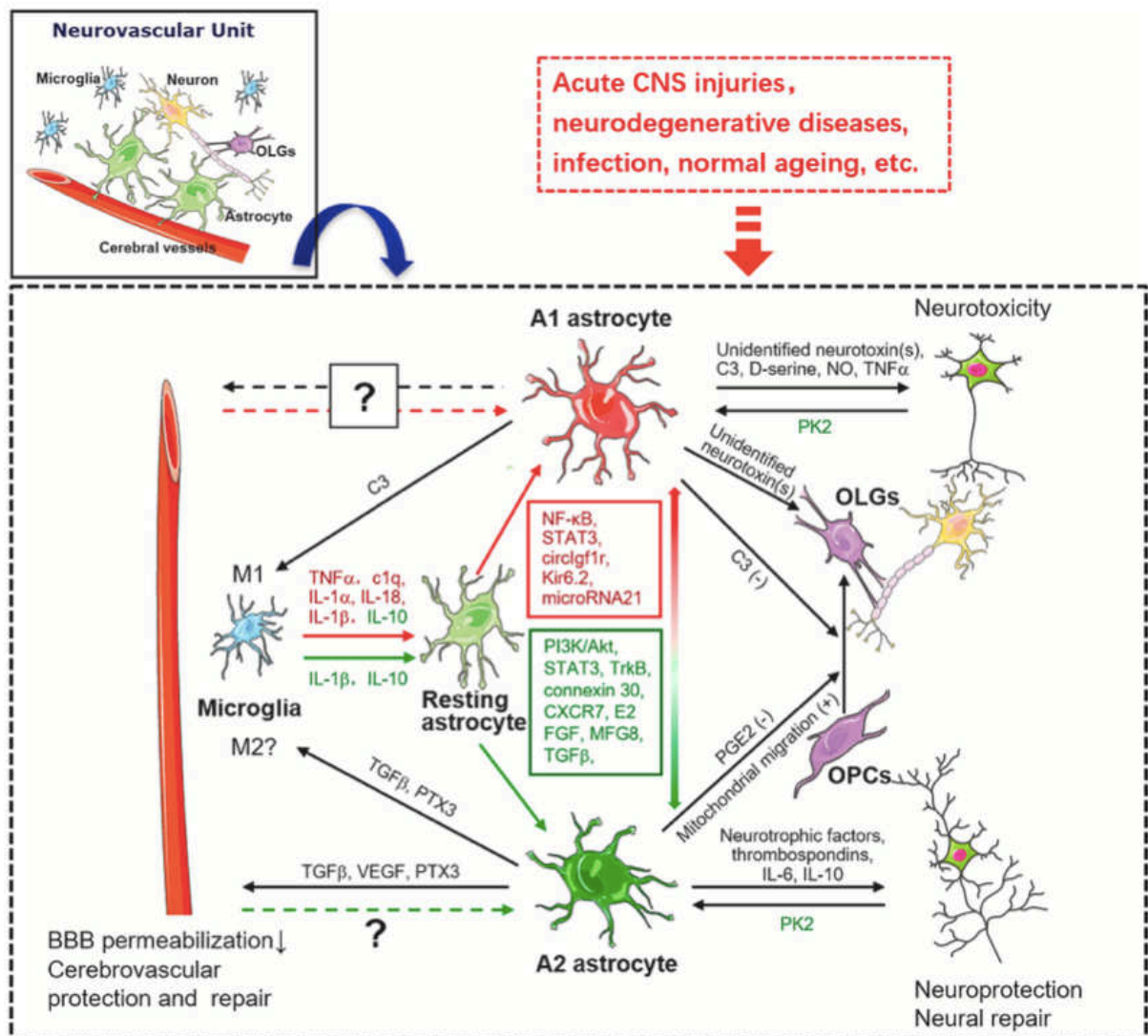


Figure 7 : Polarisation des astrocytes vers un phénotype A1 ou A2 et leurs effets sur les cellules du SNC⁴³. OLGs : Oligodendrocytes ; OPCs : Cellules précurseurs des oligodendrocytes

Les microglies

Les microglies sont des cellules immunes résidentes du SNC qui jouent un rôle crucial dans les réponses immunes, le développement et l'homéostasie cérébrale. Lors de l'embryogénèse, les microglies proviennent de la maturation et de la différenciation des

progéniteurs érythro-myéloïdes du sac vitellin. Elles sont limitées au cerveau et s'autorenouvellent tout au long de la vie^{60,61}. Tout comme les astrocytes, les microglies sont très hétérogènes. Elles sont plus présentes dans la matière grise que dans la matière blanche. Les cellules microgliales possèdent des récepteurs de reconnaissances de formes (PRR) qui leur permettent de sonder leur environnement et reconnaître des signaux de danger tels que les profils moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMPs). Dans des conditions physiologiques, les microglies semblent être « au repos », surveillant constamment les dommages potentiels dans le cerveau. Mais ces sentinelles s'activent lors d'un trouble du SNC, subissent des changements morphologiques et libèrent des cytokines et chimiokines pro et anti-inflammatoires⁶⁰. Anciennement on classifiait les microglies en 2 classes M1 et M2. Les microglies M1 sont associées à un statut pro-inflammatoire. Ces cellules sont cytotoxiques et éliminent rapidement les cellules infectées et les débris des cellules mourantes. Cependant l'activation excessive de la microglie M1, peut causer des dommages neuronaux. Les cellules sont alors caractérisées par des changements amoéboïdes avec des corps cellulaires larges et ronds et des protubérances épaisses⁶²⁻⁶⁴. Les microglies M1 sont connues pour leur sécrétion de médiateurs tels que le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IL-1}\beta$, l' IL-6 , des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de l'oxyde nitrique (NO), des métalloprotéinases mais également une augmentation de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), des intégrines (CD11b, CD11c), des marqueurs de co-stimulation (CD45, CD86, CD16/32) contribuant aux dommages neurologiques (Figure 8)⁶⁵⁻⁶⁸. A l'inverse, le phénotype M2 correspondrait à des microglies dans un état anti-inflammatoire et serait caractérisés par des branches distales, un petit corps et une sécrétion de facteurs trophiques

et anti-inflammatoires comme le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de stimulation des colonies (CSF), l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou encore le TGF- β ⁶⁹. Les microglies M2 peuvent être induites dans des environnements où l'IL-3, l'IL-21, l'IL-33 et les chimiokines aux motifs C-C ligand 2 (CCL2) et C-X-C ligand 4 (CXCL4) sont présentes^{64,70,71}. Elles favorisent alors la réparation et la régénération des tissus cellulaires, améliorent l'activité phagocytaire et jouent un rôle neuroprotecteur⁶⁴. Cependant cette vision des microglies ne reflète pas la réalité physiologique. L'hétérogénéité du phénotype microglial est bien plus vaste. En effet, la microglie peut adopter un large spectre de profil d'activation différents qui dépendent de la région anatomique de la microglie mais également de ses interactions étroites avec les cellules avoisinantes comme les astrocytes, les neurones ou encore les oligodendrocytes⁶⁹. Ainsi, la microglie de type M2 peut évoluer vers trois sous-types distincts : M2a, M2b et M2c^{72,73}. L'IL-4 ou l'IL-13 permettent la polarisation en M2a qui favorise la fibrose et la régénération tissulaire⁷². Le type M2c est stimulé par l'IL-10, le TGF- β et permet l'inhibition de la réponse inflammatoire⁷². Finalement les microglies M2 favorisent la résolution de l'inflammation et restaurent l'homéostasie grâce à des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10, l'IL-13, le TGF- β et l'arginase 1 (Arg1) contribuant ainsi à la réparation neuronale et la réduction des dommages^{74,75}.

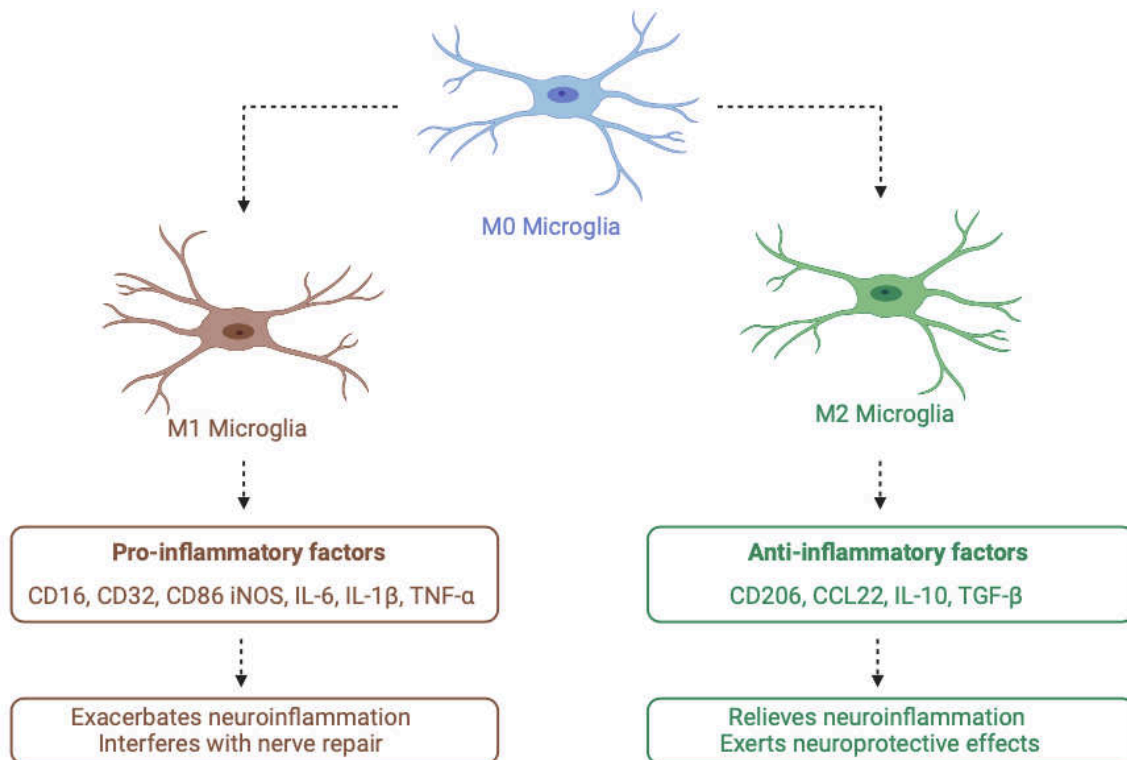


Figure 8 : La polarisation des microglies⁶⁴.

Les astrocytes et les microglies dans un contexte de NPE

Les astrocytes comme les microglies peuvent avoir des fonctions à la fois néfastes et bénéfiques. Ils peuvent être neuroprotecteurs en produisant des médiateurs tels que des facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF), des facteurs neurotrophiques dérivés de cellules gliales (GDNF) et des facteurs de croissance nerveuse (NGF) afin de limiter les dommages neuronaux⁶⁹. Cependant lors d'un NP leur activation se fait de manière excessive et s'amplifie au cours du temps favorisant leur activité pro-inflammatoire et neurotoxique. Au cours du neuropaludisme murin et humain, il a été observé une astrogliose et une activation des microglies^{40,76,77} (Figure 9). Des analyses transcriptomiques démontrent une prolifération

des microglies au démarrage du NP^{78,79}. Lors de la progression de la neuropathologie, des changements morphologiques comme la rétractation des ramifications, un large soma, une apparence d'amibe, l'expression du CMH-II et de CD68 sont des indicateurs de la stimulation de l'activité phagocytaire des microglies⁸⁰. Au stade final, les astrocytes perdent certaines fonctions créant une rupture dans le maintien de l'homéostasie du cerveau et de la protection des neurones. Nous pouvons citer comme exemples, une perturbation de la régulation de la production de la protéine S100-B par les astrocytes, qui contribue à la neuro-inflammation. Cette protéine a été observée chez des enfants kenyans et des vietnamiens adultes développant un neuropaludisme et sa présence a été corrélée avec les risques de convulsions récurrentes⁸¹. La perte de production de BDNF par les astrocytes de patients pédiatriques atteints de NP ou encore les astrocytes A1 qui sécrètent une toxine soluble inconnue contribuent à tuer rapidement et sélectivement différents types de neurones. La destruction des neurones et la perte de leur activité seraient probablement associées à un mécanisme de sécrétion de molécules du complément via des exosomes mais également à l'induction d'une cascade apoptotique au sein des neurones^{43,52,82}.

Grâce à une analyse *in situ* à partir de coupes de cerveaux de souris, nous savons que les astrocytes et les microglies produisent 2 vagues inflammatoires : la première au 5^{ème} jour post-infection et la seconde, plus conséquente, au 7^{ème} jour post-infection³⁸. En outre, la stimulation *in vitro* d'astrocytes et de microglies par des GRp par *PbA* a permis de mettre en avant que les astrocytes sont capables d'internaliser les GRp par un processus d'autophagie particulier, tandis que les microglies sont capables de les phagocyter, induisant la production de CXCL-10, du CCL2 et du TNF- α ^{76,83} (Figure 9). De manière intéressante chez les patients

atteints de neuropaludisme, on observe une nette augmentation de CXCL-10 et de TNF- α en comparaison aux patients ne développant pas la neuropathologie^{84,85}. De nombreuses études se sont intéressées à définir les biomarqueurs de sévérité du NP. Mais la variation d'âge, de genre et de l'historique infectieux engendre des hétérogénéités substantielles. Toutefois, les taux de molécules CXCL-10, CXCL-9, IFN- γ , IFN- α , CCL-2, TGF-B, IL-10, IL-1 β , BDNF, Angiopoïétine et *P.falciparum* Histidine riche en protéines 2 (*PfEMP1*) sont particulièrement élevés dans le sérum des patients neuropaludéens^{84,86-88}. En outre, la relevance de certaines cytokines a été démontrée dans le modèle NPE, dans lequel les souris déficiente en CXCL-10 sont moins susceptibles de développer un NPE⁸⁹. Même si la signature cytokinique/chimiokinique associée à la sévérité du NP n'a pas encore été clairement identifiée, il est établi que CXCL-10 est un biomarqueur de la gravité du NP car il permet notamment le recrutement sélectif et l'infiltration de lymphocyte T (LT) CD4 et CD8 dans le cerveau.

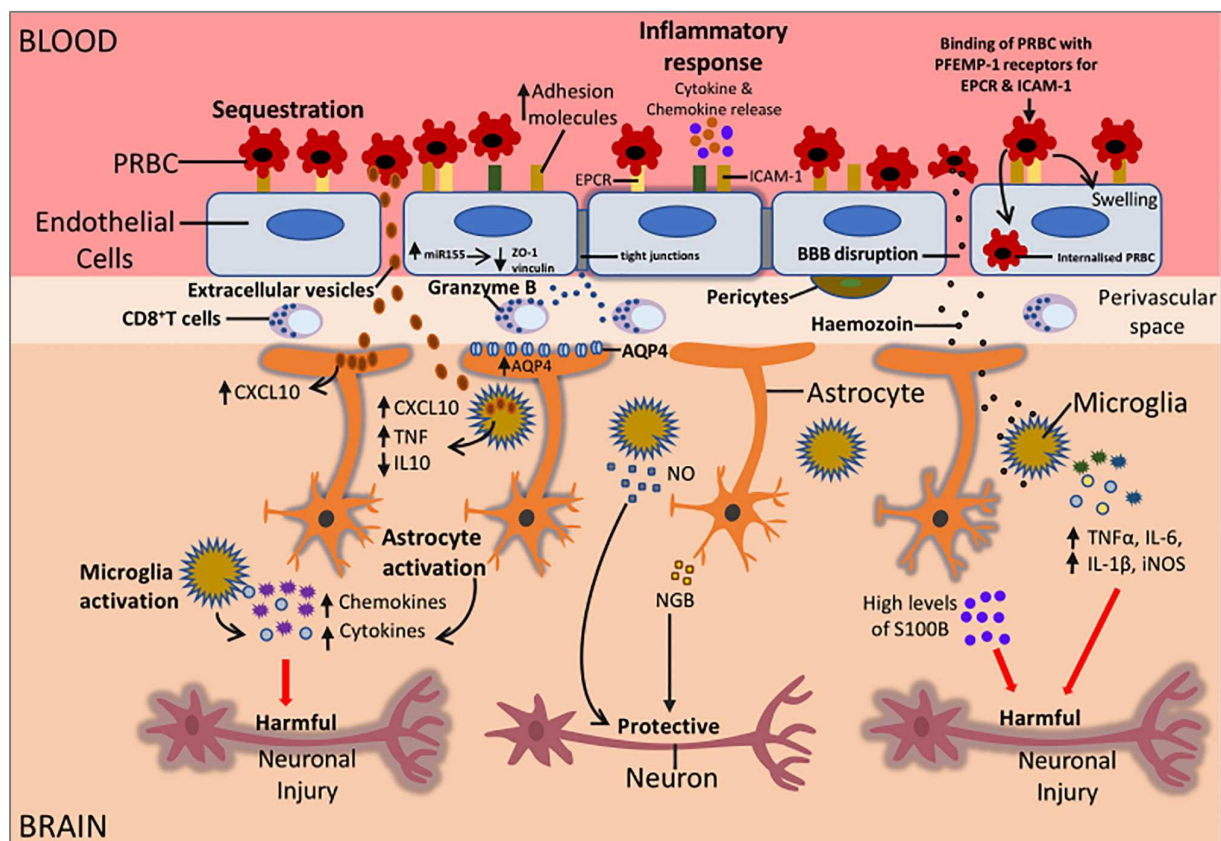


Figure 9 : Rôle des cellules gliales dans la pathogénèse du neuropaludisme⁸¹.

Les lymphocytes T dans un contexte de NPE

S'il est bien défini dans le modèle murin que les lymphocytes T sont essentiels dans la physiopathologie du NPE, chez l'homme il est plus difficile de déterminer leur rôle car la plupart des analyses post-mortem permettent difficilement d'identifier la séquestration des cellules T dans le cerveau. Néanmoins, de nombreuses études ont observé qu'au 3^{ème} et 5^{ème} jours post-infection par des GRp ou des sporozoïtes irradiés on note une prolifération des LT dans la rate plutôt que dans le foie ou les ganglions lymphatiques avant de les retrouver dans le sang et le cerveau⁹⁰. Une expérience de splénectomie chez des souris infectées par *PbA* à

démontré une réduction de l'infiltration de LT dans le cerveau ce qui a conduit à une protection partielle face au NPE⁹¹. Dans la rate, de nombreuses populations de cellules dendritiques présentent des antigènes aux cellules T. Des études sur la déplétion ou la modulation de la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles ont démontré une réduction de la présentation antigénique aux LTCD4 et LTCD8, une réduction de l'infiltration de LT dans le SNC ainsi que sur le développement du NPE^{92,93}.

Les principaux LT qui envahissent le cerveau sont des LT CD8 avec un TCR V β 8.1 et V β 8.2 suggérant une immunodominance épitopique parasitaire⁹⁴⁻⁹⁶. Les LTCD8 qui atteignent le site d'inflammation présentent un phénotype activé, sécrétant de la perforine, du granzyme B et de l'IFN- γ qui sont indispensables à la pathogénèse du NP^{97,98}. Lorsque l'on déplete les populations de LTCD8 et LTCD4 avant et au 4^{ème} jour post-infection, cela induit un retard dans le développement de la neuropathologie⁹⁴. En revanche, une déplétion des LTCD4 au 6^{ème} jour post-infection ne protège pas les souris du NPE. Par ailleurs, le transfert de LTCD4 issus de souris infectées promeut le recrutement de LTCD8 dans le cerveau, suggérant une implication séquentielle des cellules T au cours du NP⁹⁹.

Les chimiokines et leurs récepteurs sont cruciaux dans le recrutement, la migration et la séquestration des LT dans le cerveau de souris NP. Des études mettent en évidence une différence d'expression génique des protéines CCR3, CCR4, Récepteur 3 des chimiokines aux motifs C-X-C (CXCR3), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL6-9, CCL12, CCL25 et CXCL9-12 entre des cerveaux de souris sensibles et résistantes au NPE³⁵. En outre, des analyses de cytométrie en flux ont révélé qu'approximativement 90% des LT séquestrés dans le cerveau expriment le CXCR3¹⁰⁰. Une déficience de ce chimiorécepteur réduit la migration

des LTCD8 au cerveau et protège jusqu'à 90% des souris du NPE. Un transfert adoptif de LTCD8 CXCR3+ dans ces souris déficientes au CXCR3, restaure la susceptibilité à développer un NPE^{89,101}. Les principaux ligands de ce récepteur sont CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP10) et CXCL11 (I-TAC) et l'activation/détérioration des cellules endothéliales de la BHE sont associées à une réponse immunitaire TCD4 helper 1 (TH1) et à la présence de cytokines comme IFN- γ , TNF- α et le CXCL10 qui sont impliqués dans le développement du NP¹⁰². Malheureusement, les souris déficientes en la production de TNF- α de même que les thérapies anti-TNF- α via l'utilisation d'anticorps bloquant chez l'homme n'ont pas permis de protéger du NP^{103,104}. En revanche, une déficience en CXCL9 ou CXCL10 engendre une rétention des cellules T dans la rate et protège les souris du NPE¹⁰⁵. L'inhibition de CXCL10 par l'utilisation d'anticorps monoclonaux améliore également la survie des souris dans le modèle de NPE¹⁰⁶. Les neurones, les astrocytes et les microglies sécrètent fortement du CXCL10 et du CXCL9 lors d'un NPE et sont corrélés avec le recrutement des LT spléniques infiltrant le cerveau^{89,101}.

Les astrocytes et les microglies sont également des cellules qui produisent et qui sont sensibles à l'IFN- γ . Une déficience en IFN- γ ou de son récepteur diminue la production de CXCL9 et CXCL10 et protège du NPE, notamment en modulant l'activation des cellules endothéliales, le trafic des leucocytes et l'accumulation de parasites au niveau de la BHE³⁵ (Figure 10). Les cellules gliales ne sont pas les seules cellules productrices d'IFN- γ . À la survenue du NPE, les principales cellules productrices de cette cytokine dans le cerveau sont les « Natural Killer » (NK) puis les LTCD4 et LTCD8^{99,100}. Un transfert de LTCD4 et pas de LTCD8 dans des souris déficientes à l'IFN- γ restaure la susceptibilité à développer un NPE. Cependant, chez l'homme, on retrouve un niveau d'IFN- γ équivalant chez les patients développant un NP

comparé aux patients développant des formes de paludisme non graves. Le rôle des LT régulateurs (Treg) dans le contexte du NPE a aussi été étudié^{107,108}. Paradoxalement les Treg ne sont pas protecteurs hormis s'ils sont augmentés de manière artificielle au début de l'infection et cette protection est dépendante de l'IL-2, CTLA-4 et pas de l'IL-10¹⁰⁹.

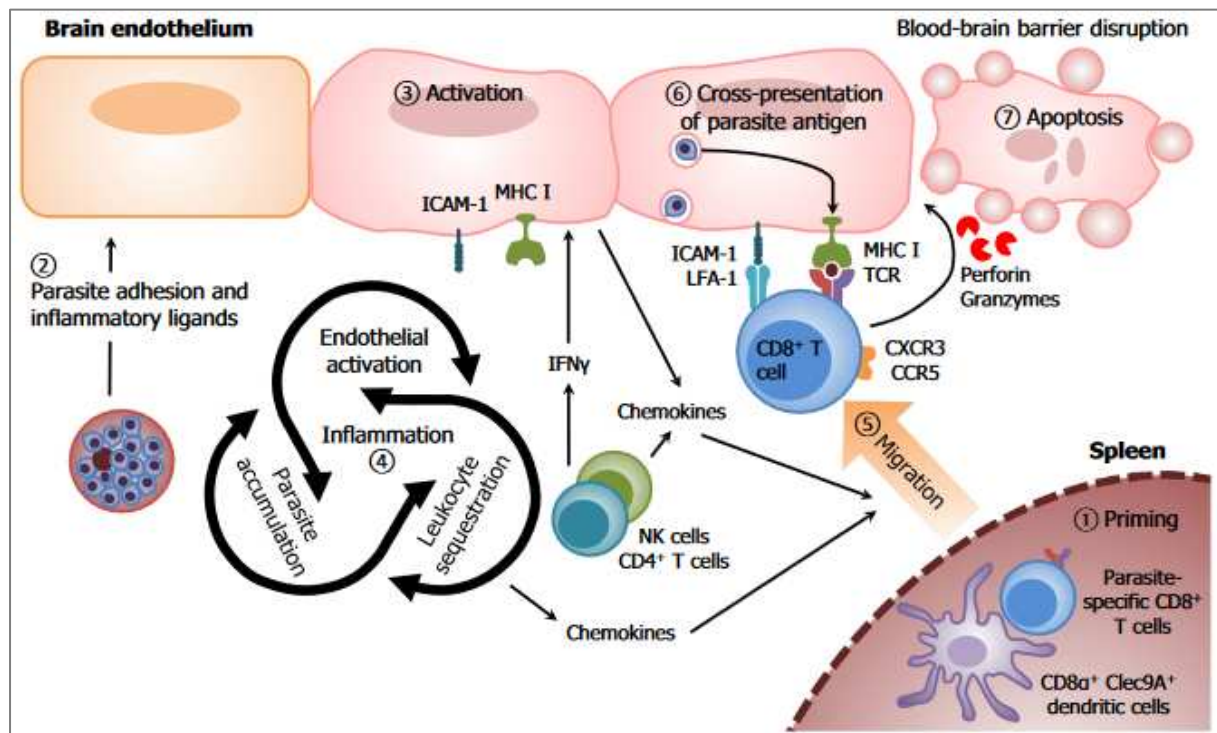


Figure 10 : Schéma de l'implication des lymphocytes T splénique dans la pathogénèse du NPE³⁵.

Ainsi, les cellules gliales sont des acteurs majeurs dans la régulation de l'inflammation cérébrale. L'infection parasitaire engendre une activation des astrocytes et des microglies faisant pencher la réponse de l'hôte vers un état pro-inflammatoire exacerbé et non contrôlé. Le recrutement massif et sélectif des cellules TCD8 cytotoxiques dans le parenchyme par les cellules gliales vient renforcer cet état inflammatoire et crée alors un environnement

neurotoxique. Dans les interactions hôte-parasite, la réponse inflammatoires des cellules gliales est fortement influencée par des facteurs environnementaux comme les facteurs génétiques de l'hôte, l'histoire immunologique et le microbiote intestinal (MI)^{110,111}.

La réponse immune humorale, lymphocytes B et autoanticorps

Les individus résidant dans des zones où le paludisme est endémique peuvent développer une immunité naturelle acquise (INA) à la maladie, ce qui se traduit par une résistance immunitaire à une pathologie grave, habituellement attribuée à une réponse anticorps acquise au cours de l'enfance, suite à une exposition répétée au parasite¹¹². Cependant, l'utilisation exclusive du nombre d'épisodes infectieux comme indicateur ne suffit pas pour prédire efficacement le développement de l'immunité au paludisme. Les données disponibles indiquent également que l'acquisition d'une immunité contre le paludisme est plus probable dans les régions où la prévalence de la maladie est faible et où l'exposition répétée au parasite est moins fréquente¹¹³. Toujours est-il que l'utilisation de transfert passif d'anticorps a permis de réduire la charge parasitaire chez les enfants infectés¹¹⁴. Néanmoins, Il est rare d'atteindre une immunité protectrice totale contre la réinfection, que l'on appelle parfois "immunité stérile"¹¹⁵. On observe que les patients ayant développé des Ac contres différents Ag du sporozoïte ont un risque réduit de développer des paludismes sévères¹¹⁶. Les anticorps ciblant la protéine circumsporozoïte agissent vraisemblablement en entravant la mobilité des sporozoïtes au niveau du site d'inoculation cutanée, et en restreignant leur passage dans la circulation sanguine¹¹⁷. Durant le stade érythrocytaire, les Ac jouent

également un rôle important. *In vitro*, Ils sont capables de prévenir l'infection des globules rouges par les mérozoïtes¹¹⁸. Les données obtenues *in vivo* indiquent que les anticorps spécifiques dirigés contre le parasite peuvent avoir deux effets distincts : d'une part, ils peuvent neutraliser les mérozoïtes, et d'autre part, ils peuvent entraver l'infection des érythrocytes par ces derniers¹¹⁹. La clairance par phagocytose ou la destruction médiée par le complément sont les mécanismes connus à ce jour qui participent à l'élimination du parasite et des GRp^{120,121}. Ces premiers travaux ont permis de souligner le rôle critique des cellules B et de la production des Ac dans la régulation de l'infection à *Plasmodium*¹²². L'inefficacité des vaccins actuels est une preuve des lacunes dans notre compréhension de la réponse immune humorale dans l'interaction hôte-parasite. Les infections causées par *Plasmodium* sont associées à une perturbation de l'activation, de la différenciation et de la fonction des cellules B, ce qui est en corrélation avec une acquisition inefficace de l'immunité humorale contre le paludisme¹²³.

L'initiation des réponses immunitaires humores débute lorsque des lymphocytes B non activés, présents dans des organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques et les amygdales, sont stimulés après la liaison et l'internalisation de l'antigène parasitaire¹²⁴. Lorsque le récepteur des cellules B reconnaît l'antigène protéique, cela déclenche une série d'événements de signalisation et de modifications dans l'expression des gènes qui favorisent la migration des cellules B, la présentation de l'antigène, ainsi que les interactions avec les lymphocytes T folliculaires « helper » CD4+ (Tfh)¹²⁵. Leurs interactions avec les Tfh, les molécules de costimulation et les cytokines détermineront l'orientation et la fonction des lymphocytes B activées. Soit ils se différencient en plasmablastes (PB) qui sont

responsables de la production d'Ac Immunoglobuline M (IgM) de faible affinité et de courte demi-vie. Sinon, ils s'engagent dans la voie des lymphocytes B du centre germinatif au sein duquel ils se différencient en cellules B mémoire ou en plasmocytes à longue vie sécrétant des Ac de haute affinité (Figure 11)¹¹³.

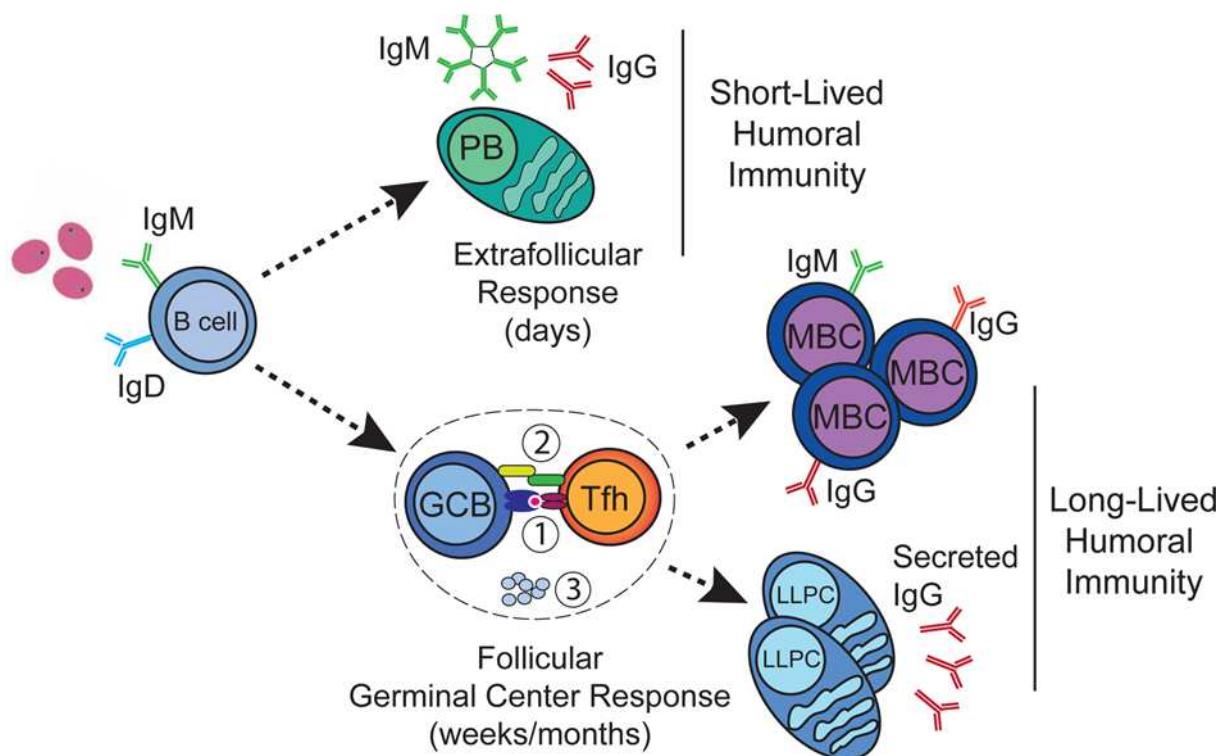


Figure 11 : Polarisation des cellules B dans la mise en place d'une immunité humorale¹¹³.

Au cours d'une infection palustre, les plasmoblastes sont mis en place précocement, prolifèrent rapidement et permettent une sécrétion d'Ac rapide afin d'inhiber la croissance parasitaire. La mise en place d'une réponse Ac plus affine et de plus longue durée nécessite des semaines voire des mois ^{126,127}. Chez des individus infectés par *Plasmodium falciparum* (*Pf*) la réponse des cellules Tfh est altérée. En effet, chez des enfants infectés par *Pf*, les sous

populations de Tfh présentent un enrichissement en Tfh CXCR3⁺ de type « TH1-like » dans des situations pro-inflammatoires induites par les lymphocytes TH1 et l'IFN- γ ¹²⁸. Des travaux ont permis de démontrer que les Tfh (« TH1-like ») induits par l'infection plasmodiale semblent moins compétents pour stimuler les cellules B dans les centres germinatifs. Ils favorisent la formation de PB contrairement à leurs homologues Tfh CXCR3⁻ de type TH2 qui sont associés à la production de plasmocytes à longue durée de vie (LLPC) et à la production d'anticorps antiparasitaires fonctionnels. Il est notable que seuls quelques plasmoblastes, soit environ 1 % d'entre eux, engendrent des Ac spécifiques d'antigènes parasite. Cela indique qu'une réponse plasmoblastique excessive est préjudiciable et n'apporte aucun bénéfice fonctionnel à la réponse immunitaire de l'hôte, car au contraire, la sévérité du paludisme est corrélée positivement à l'expansion des PB^{129,130}. L'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-6 qui sont des cytokines fortement exprimées chez les patients développant un neuropaludisme favorisent la formation de PB¹³¹⁻¹³³. Ces observations constituent une première étape vers la compréhension des raisons sous-jacentes aux défis rencontrés dans l'établissement d'une immunité durable contre le paludisme^{134,135}. Toutefois, la fonction des Tfh semble ambiguë, car dans un contexte d'infection par le virus de l'hépatite C ou d'immunodéficience simienne, les Tfh peuvent favoriser ou limiter l'immunité humorale chez l'homme^{75,136}. Des études récentes démontrent que les populations de Treg sont capables d'orienter le phénotype des Tfh et ainsi diriger l'immunodominance par l'intermédiaire de la Protéines Associées aux Lymphocytes T Cytotoxiques 4 (CTLA-4) ou la production d'IL-10. Les patients impaludés présentent une expression accrue du CTLA-4 par les Treg sériques et des études en modèles murins ont démontré que ces Treg altèrent les interactions dans le centre germinatif et

réduisent la costimulation des Tfh via les CTLA-4. In fine, ces mécanismes aboutissent à réduire la capacité des Tfh à induire la différenciation des cellules B en LLPC¹³⁷. En parallèle, des travaux cliniques ont démontré l'existence de cellules B mémoires atypiques (aMBC) fonctionnellement différentes des cellules B mémoires conventionnelles (MBC) chez des patients infectés par *Plasmodium*, et la présence de ces aMBC est positivement corrélée à la présence d'auto-anticorps (aAC) et à l'intensité de l'infection^{138,139}. Mais les mécanismes qui favorisent la formation des aMBC, la production d'auto-anticorps et leurs rôles dans l'immunité antipaludique restent à approfondir^{140,141}.

Bien que la littérature abonde en rapports concernant la détection d'auto-anticorps dans les infections à *Plasmodium*, le rôle de ces molécules produit par les plasmablastes reste ambigu. Certains auteurs ont établi un lien entre ces réponses auto-immunes et la gravité de la maladie, tandis que d'autres ont évoqué une possible contribution à la protection contre le paludisme^{140,141}. En outre, le rôle des aAC dans le contexte du neuropaludisme reste un sujet encore très peu exploré. A ce jour nous savons que chez l'homme, des anticorps auto réactifs lors de l'infection palustre sont capables d'interagir avec de nombreuses cibles, dont des molécules du cerveau^{39,140,142,143}. Mais la communauté scientifique hésite encore à déterminer si ces aAC sont produits par le développement du neuropaludisme ou s'ils sont un facteur d'aggravation. Les travaux de *Lang et al* ont démontré une augmentation d'aAC actifs contre les canaux calciques voltage dépendants chez les enfants kenyans atteints de NP, contrairement aux enfants ne développant pas la complication sévère ou n'étant pas infectés¹⁴⁴. Ces canaux calciques sont impliqués dans la régulation du flux calcique dans les cellules de Purkinje et les cellules granuleuses, qui sont associées à certaines maladies auto-

immunes. Ces observations sont renforcées par les travaux de *Gallien et al* sur une cohorte de patients thaïlandais infectés par *Pf*. Il a démontré que les patients NP avaient des taux d'aAC contre les dendrites plus importants que les patients développant un paludisme simple¹⁴⁵. De la même manière, Il a été observé que les séra d'enfants gabonais développant des infections graves à *Pf* possédaient une plus grande diversité d'auto AC dirigés contre des antigènes cérébraux comparativement à ceux des enfants non infectés. Certains de ces auto-anticorps montrent une réactivité envers les spectrines alpha non érythroïdes. Ces protéines structurelles, présentes dans le cytoplasme de diverses cellules cérébrales, jouent un rôle essentiel dans la structure et l'intégrité membranaire. La BHE étant perturbée durant un NP, il est probable que certaines cellules cérébrales endommagées présentent les spectrines alpha non érythroïdes, contribuant ainsi à l'aggravation des dommages neuronaux¹⁴⁰. Les aAC agissent également sur d'autres protéines du cytosquelette, abondantes dans le système nerveux, comme la beta-tubuline III, considérée comme un biomarqueur de la neuropathologie³⁹. Les patients NP ont un taux plus élevé d'aAC anti-beta-tubuline-III et leurs interactions engendrent une fragmentation des microtubules en petites unités et perturbent le guidage axonal¹⁴⁶.

Les processus par lesquels une infection pourrait déclencher des réponses auto-immunes restent encore peu clairs. Le mimétisme moléculaire et l'activation polyclonale des cellules B sont les mécanismes inducteurs d'aAc les mieux décrits à ce jour. Le mimétisme moléculaire se réfère à la présence d'antigènes ayant une structure similaire partagée entre les composants du parasite et de l'hôte¹⁴⁷. Dans le cadre du paludisme, de nombreuses protéines

parasitaires partagent des motifs avec des protéines de l'hôte. Les similitudes structurelles entre les antigènes du parasite et ceux de l'hôte peuvent conduire à l'activation de lymphocytes auto réactifs, entraînant ainsi des perturbations dans le fonctionnement du système immunitaire. Lorsque les récepteurs des cellules T ou B reconnaissent un épitope parasitaire qui présente une ressemblance significative avec une structure propre à l'organisme, cela peut déclencher une réponse auto-immune. En conséquence, non seulement des cellules ou des tissus peuvent être détruits, mais d'autres composants du système immunitaire peuvent également être activés¹⁴⁸. L'activation polyclonale des cellules B au cours d'une infection palustre a été démontré *in vitro* et *in vivo*¹⁴⁹. Le surnageant de culture de GRi par *Pf* contenant des produits dérivés du parasite a été en mesure d'induire l'activation polyclonale de cellules B et la synthèse d'Ig. Parmi les Ac sécrétés, seulement une très faible proportion était spécifique de l'antigène parasitaire tandis que la majorité était non spécifique et pouvait réagir avec des antigènes de l'hôte¹⁴⁹. Ainsi, lors d'une infection palustre, un large spectre d'Ac sont produits par des aMBC. Bien qu'ils participent à l'élimination du parasite et au contrôle de la maladie, certains Ac produits reconnaissent les propres composants de l'hôte et peuvent favoriser la pathologie¹⁵⁰⁻¹⁵².

Néanmoins, il subsiste un débat sur le rôle véritable de ces auto-anticorps : sont-ils impliqués dans la neuropathogénèse, pourraient-ils servir de marqueurs pour identifier des atteintes neurologiques ? Même si l'on admet que l'altération de la BHE est une condition nécessaire pour permettre aux anticorps d'atteindre le cerveau¹⁵³, des études menées sur des tissus cérébraux post-mortem d'enfants malawites décédés des suites d'un NP ont révélé qu'il n'y avait pas de fuite significative de protéines plasmatiques, malgré la dégradation de la BHE¹⁵⁴.

Par conséquent, les mécanismes qui permettent aux immunoglobulines d'accéder au tissu cérébral intrigue la communauté scientifique. Quelques pistes mécanistiques sont connues à ce jour, telles que le passage à travers le plexus choroïde (une région cérébrale où la BHE est plus perméable), le transport d'IgG le long des axones sensoriels sortant de la muqueuse olfactive, le transport médié par les récepteurs de la fraction constante des Ac présents sur les cellules endothéliales de la BHE¹⁵⁵. A cela s'ajoute les facteurs environnementaux capables d'influer ces mécanismes. En effet, le microbiome intestinal de l'hôte a un impact significatif à la fois sur les niveaux d'anticorps spécifiques dirigés contre le *Plasmodium*, ainsi que sur l'étendue et la diversité des réponses immunitaires humores antipaludiques, comme en témoigne l'étude menée par *Waide ML et al*¹⁵⁶.

Les cellules tueuses naturelles (Natural Killer)

Les Natural Killer sont des cellules de l'immunité innée dotées de propriétés cytotoxiques. Ces lymphocytes granulaires de grande taille jouent un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire, constituant ainsi la première ligne de défense contre les infections. En plus de leur capacité à détruire les cellules infectées, les NK activées produisent plusieurs cytokines régulatrices telles que l'IL-3, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), le TNF, le facteur de croissance transformant (TGF) et l'IFN- γ . Ces cytokines peuvent influencer l'immunité adaptative en modulant l'activité des cellules dendritiques et en favorisant l'orientation vers la voie TH1.

Le complexe NK (NKC), comprenant plusieurs *locus* déterminant les caractéristiques des NK, joue un rôle crucial dans le contrôle de la sensibilité et la résistance aux infections. Le NKC est un déterminant génétique de la pathogénèse du NP comme le démontre les travaux de transfert de NKT entre souris sensibles et résistantes au NP menés par *Hansen Diana*¹⁵⁷. La déplétion des cellules NK a également permis de démontrer que ces cellules interviennent dans l'immunité adaptative, notamment dans le recrutement des lymphocytes T dans les cerveaux des souris développant un NP. En effet, au cours d'un NPE, les NK spléniques migrent et infiltrant le cerveau où ils modulent l'expression de CXCR3 des lymphocytes T via l'expression d'IFN- γ ¹⁰⁰. Ainsi les NK jouent un rôle bivalent, leur présence est essentielle pour l'élimination du parasite ou tout du moins contrôler l'infection mais leur activité pro-inflammatoire contribue au développement du neuropaludisme.

LE MICROBIOTE INTESTINAL

“Toute maladie commence dans l’intestin.”

Hippocrate (460-370 AJC)

L’impact de l’infection plasmodiale sur le tractus digestif

Dans les selles des patients infectés, il a été détecté des saignements et des traces d’ADN parasitaire^{158–160}. Comme décrit précédemment, le parasite infecte les GR qui peuvent ensuite être séquestrés dans le cerveau mais également au niveau de l’intestin, où il peut causer des dommages tissulaires. La séquestration s’effectue principalement au niveau de l’estomac, du jéjunum, de l’iléon et du colon des patients neuropaludeens¹⁶¹. L’hémolyse et la séquestration des GRp perturbent la barrière intestinale, notamment au niveau des jonctions serrées et via la production de TNF- α produit par les cellules endothéliales (CE)^{159,162}. L’activation des CE induit le recrutement et l’activation des mastocytes qui produisent de l’histamine que l’on peut retrouver dans l’iléon et le plasma. Cela favorise le recrutement de leucocytes et la production de cytokines sur le site de séquestration des GRp^{163,164}. Lors d’une infection à *P. yoelii*, on observe également un afflux de monocytes et de neutrophiles dans la *lamina propria* du petit et du gros intestin¹⁶⁵. Néanmoins, plus la parasitémie est importante plus l’activation des mastocytes et le recrutement des leucocytes s’amplifient, ce qui crée des lésions vasculaires, perturbent la barrière intestinale et favorisent la translocation

bactérienne¹⁶⁶. Cette inflammation s'observe au niveau macroscopique par la mise en évidence d'un raccourcissement de l'intestin du duodénum jusqu'au colon chez des souris infectées par *P. berghei* ANKA. Par contre, au niveau microscopique on observe un raccourcissement des vili, une augmentation de la profondeur des cryptes et un épaissement de la couche de mucus¹⁵⁸.

Les personnes susceptibles de développer un neuropaludisme sont les enfants de moins de 5 ans en zone d'endémie. Leur microbiote intestinal (MI) est en cours de développement et l'infection plasmodiale provoque une inflammation qui peut perturber l'intégrité intestinale et l'équilibre de l'ensemble des micro-organismes qui le constitue¹⁶⁷. Ceci suggère que la qualité de la réponse immune adaptative durant l'infection palustre et la protection face au paludisme grave pourraient être influencées par le microbiote intestinal. D'autant plus que le rôle immunomodulateur dans le SNC du MI est connu à l'état homéostatique mais également durant des maladies neurodégénératives et neuro-inflammatoires¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Cette interaction entre le microbiote intestinal et le cerveau, est plus communément appelé « axe intestin-cerveau »¹⁷². Cependant, nous n'avons aucune idée sur la contribution du microbiote intestinal dans le cadre des maladies *neuro-inflammatoires* d'origine infectieuse.

Généralités sur le microbiote intestinal

Le microbiote est un terme regroupant l'ensemble des microorganismes vivant au sein de notre organisme et se compose de bactéries, virus, champignons, archées ou encore certains parasites¹⁷³. Parmi les différents microbiotes que nous hébergeons, le microbiote intestinal

(MI) est historiquement le plus étudié et le mieux caractérisé de nos niches bio-anatomiques microbiennes, notamment par l'étude des populations bactériennes qui le composent. Environ 10^{14} bactéries composeraient notre microbiote. Soit un ratio de 1 cellule humaine pour 1,3 cellules bactériennes représentant jusqu'à 100 fois plus de contenu génomique bactérien que le génome humain^{174,175}. Ces chiffres fascinants regroupant notre microbiome et nos propres cellules, nous ont d'ailleurs conféré dans les années 1970, le statut de « super organisme »¹⁷⁶.

Le tractus gastro-intestinal humain représente l'une des plus grandes interfaces (jusqu'à 400 m²) entre l'hôte et les microorganismes dans le corps humain¹⁷⁷. La majorité des bactéries (95 %) le composant peut être répartie en 5 phyla majeurs. Les *Bacillota* (anciennement dénommés *Firmicutes*), les *Bacteroidota* (Bacteroidetes), les *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), les *Actinomycetota* (*Actinobacteria*) et les *Verrucomicrobiota* (*Verrucomicrobia*). Ces bactéries ont habité la terre pendant des centaines de millions d'années de plus que l'homme, et sont capables de s'adapter à des environnements extrêmement hostiles, tel que notre organisme¹⁷⁸. Nous avons ainsi co-évolué pendant des milliers d'années pour former une relation complexe mutuellement bénéfique avec ces colocataires microscopiques qui constituent de nos jours ce que l'on nomme, notre microbiote¹⁷⁹.

Évolution du microbiote intestinal au cours de la vie

La diversité de notre microbiote intestinal se met en place dès la naissance et évolue tout au long de notre vie (Figure 12). Ainsi, les enfants nés par césarienne ont un microbiote

intestinal appauvri et peu similaire à celui de leur mère comparé à ceux nés par voie basse¹⁸⁰⁻¹⁸². Certains auteurs suggèrent que le MI se construit plus précocement, notamment au stade *in utero*, où il a été identifié la présence d'un microbiome placentaire^{183,184}. Durant les premiers stades de développement on retrouve principalement des bactéries appartenant majoritairement à 2 phyla bactériens, les *Actinomycetota* et les *Pseudomonadota*¹⁸⁴. Le microbiote intestinal va subir des changements drastiques en fonction de l'alimentation, de la situation géographique, des challenges immunitaires ou encore la prise de traitements pour aboutir à l'âge de 5 ans, à un microbiote intestinal dit « adulte »^{185,186}. Pendant l'âge adulte et jusqu'à environ 65 ans, la composition du MI varie peu sauf en cas d'évènements perturbateurs importants^{187,188}.

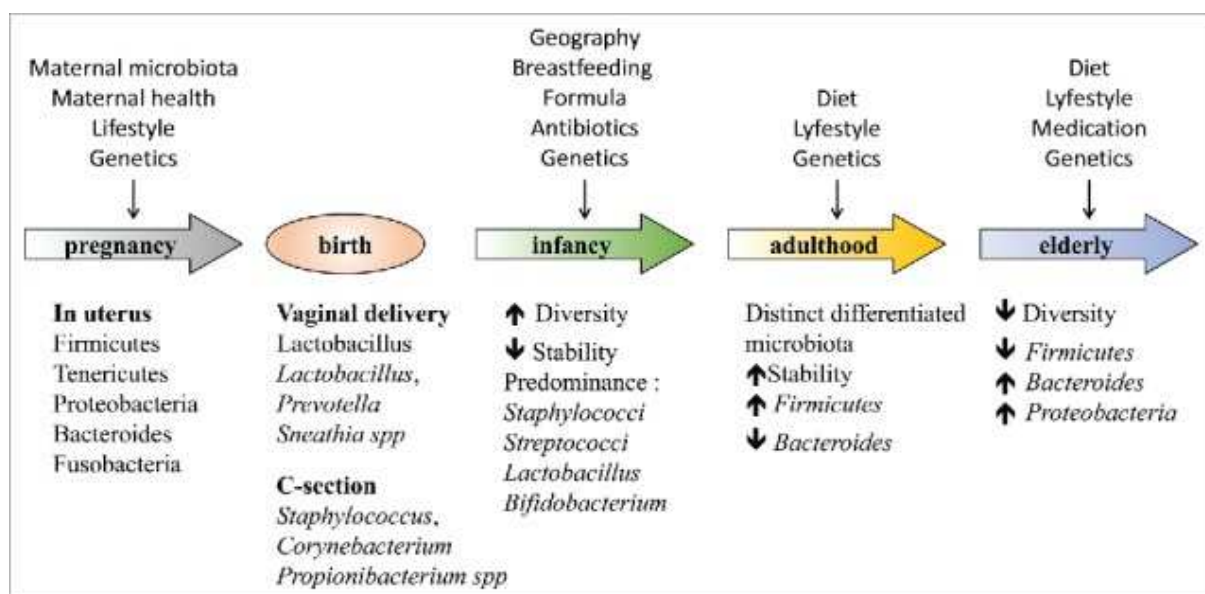


Figure 12 : Modification du microbiote humain au cours de la vie¹⁸⁹.

La distribution du microbiote intestinal dans le tractus digestif

La répartition microbienne le long du tube digestif se justifie par des gradients chimiques, nutritionnels et immunologiques (Figure 13). Dans l'intestin la présence de niches biochimiques propices aux bactéries est relativement faible comparée à d'autres interfaces du corps humain. Les microbes intestinaux doivent donc s'adapter à différents modes de vie et sont limités à leurs caractères phénotypiques¹⁹⁰. Dans l'intestin grêle, la croissance bactérienne est limitée par les niveaux d'acidité, le taux d'oxygène et de peptides antimicrobiens. Ce milieu est propice au développement des *Lactobacilles*, des bactéries anaérobies facultatives avec un fort pouvoir d'adhésion à l'épithélium/mucus de l'intestin¹⁹¹. Tandis que dans le colon, les conditions permettent le développement dense et diversifié de bactéries principalement anaérobies capables de digérer les aliments non assimilables par l'hôte, telles que des fibres¹⁹². Certaines bactéries sont également capables de digérer le mucus produit par l'hôte qui est riche en résidus glycosylés¹⁹³. En contrepartie l'hôte peut spécifiquement moduler cette glycosylation pour sélectionner les espèces bactériennes les plus optimales favorisant sa santé¹⁹⁴.

Il est donc important de souligner que selon la partie du tube digestif, l'analyse de la composition du microbiote intestinal varie énormément. A cela s'ajoute les variations inter-individuelles de la diversité du microbiote intestinal. A l'heure actuelle, l'ensemble de ces observations nous confirme la difficulté de définir un profil de microbiote intestinal « sain »,

Des études établissant des profils d'entérotypes se basant sur l'aspect fonctionnel plutôt que sur l'aspect génomique, proposent un système de classification controversé et un peu simpliste¹⁹⁵. Malgré ces efforts, déterminer la causalité entre les pathologies et les variations du microbiote intestinal reste une tâche complexe.

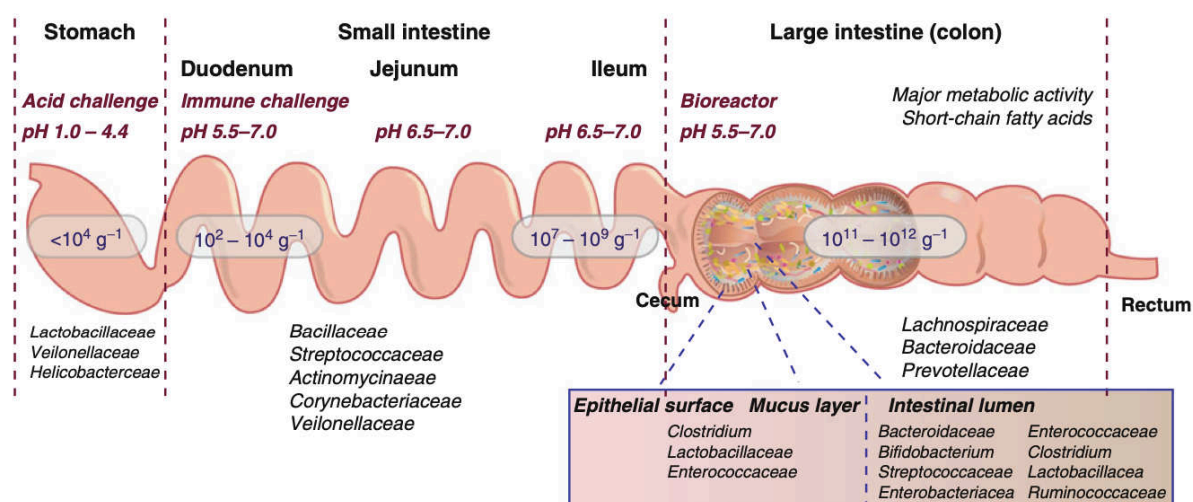


Figure 13 : Répartition du microbiote intestinal dans le tube digestif¹⁹⁶.

La composition du microbiote intestinal

Même si les techniques de culture de bactéries (culturomics) évoluent, un faible pourcentage de bactéries présentes chez l'homme peuvent être isolées et cultivées en laboratoire¹⁹⁷. Néanmoins, l'étude de la composition du microbiote intestinal s'est grandement améliorée grâce au séquençage à haut débit du gène de l'ARN ribosomique 16S des bactéries¹⁹⁸. En effet, à partir d'un échantillon de fèces, environ 76% des séquences d'ARNr obtenues appartenaient à des espèces nouvelles et non caractérisées¹⁹⁹. L'identification de l'ensemble des espèces bactériennes présentes chez l'homme a été

effectuée grâce à des projets internationaux, tel que *MetaHit* et *Microbiome Humain* lancé en 2007 par l'institut national de santé des États-Unis.^{200,201}. Ainsi, il a pu être observé que le microbiote intestinal humain possède plus de 2000 espèces de bactéries réparties en 12 phyla bactériens différents^{198,201}. La majorité (93,5%) des bactéries appartiennent aux *Bacillota*, aux *Bacteroidota*, aux *Actinomycetota* et aux *Pseudomonadota* ce qui en font les phyla dominants du microbiote intestinal humain. Cependant, il est à noter que le phylum des *Verrucomicrobiota* est, selon nos connaissances, représenté par une seule espèce bactérienne, *Akkermansia muciniphila*. Le microbiote intestinal murin présente 90% de similitudes avec le MI humain²⁰² (Figure 14). Toutefois, des différences existent au niveau de la structure de l'intestin mais également au niveau microbien. L'anatomie générale du tractus gastro-intestinal chez la souris présente une surface de colon et de caecum proportionnellement plus importante ainsi que des villosités plus hautes, favorisant l'absorption de nutriments et la création d'une niche microbienne plus importante²⁰³. Des écarts clefs dans la signature microbienne existent entre l'homme et la souris. Les humains ont un rapport *Bacillota/Bacteroidota* plus élevé comparé à la souris. La composition et l'abondance varient également entre l'homme et la souris. Par exemple, le phylum des *Bacteroidota* chez l'homme est principalement composé de *Bacteroidaceae* ou de *Prevotellaceae* tandis que chez la souris, on retrouve majoritairement la famille *S24-7*. Les variations sont donc principalement associées à l'abondance de genre bactériens, même si certaines bactéries sont exclusives à l'homme ou à la souris, comme *Faecalibacterium* et *Mucispirillum* respectivement^{202,204}.

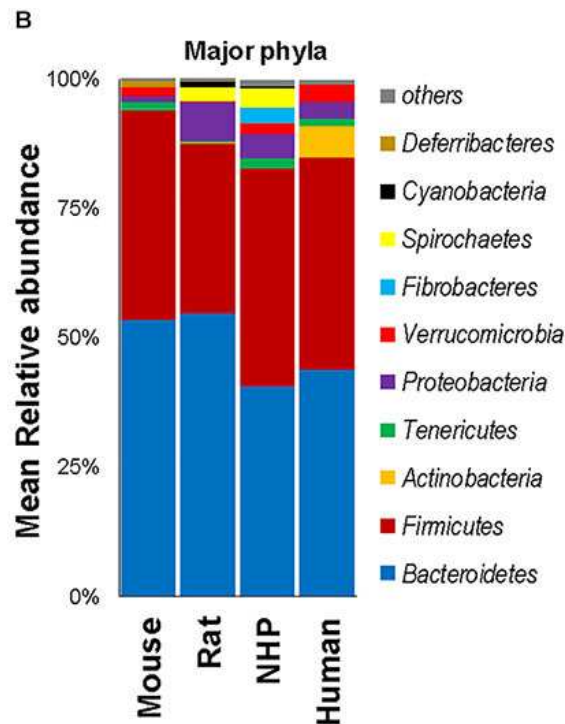


Figure 14 : Répartition des phyla bactériens fécaux chez la souris, le rat, le singe et l'homme²⁰⁴.

Les facteurs modulateurs du microbiote intestinal

Le MI est considéré comme un véritable organe et sa composition microbienne est modulable par de nombreux facteurs intra/extrinsèques comme la génétique de l'hôte, l'âge, l'alimentation, les infections, la pollution ou encore la prise de médicaments. Ces modulations microbiennes peuvent être définitives si elles outrepassent la capacité de résilience (capacité à retourner à son état « normal » après quelques semaines ou mois) du MI. Un exemple d'agent modulateur du MI est l'alimentation. Le véganisme ou le carnivorisme sont des régimes alimentaires exclusivement végétal ou animal qui ont de lourdes répercussions sur la composition et la diversité microbienne²⁰⁵.

Les fonctions du microbiote intestinal et son rôle dans la régulation de l'immunité de l'hôte

Ce n'est qu'au cours de ces deux dernières décennies que nous nous sommes aperçus de l'impact important du microbiome intestinal dans notre vie quotidienne grâce aux approches génomiques couplées à la bio-informatique. Actuellement, il est clairement établi que le microbiote intestinal est un composant essentiel dans la physiologie de l'hôte, que ce soit pour renforcer l'intégrité de la barrière intestinale et hématoencéphalique²⁰⁶, le développement de notre système nerveux central^{207,208}, la protection contre des agents pathogènes^{209,210} ou encore la régulation de l'immunité de l'hôte^{211,212}. Cependant, ces processus physiologiques peuvent être altérés lorsque la composition du microbiote intestinal est perturbée, on parle alors de dysbiose.

Le MI joue un rôle crucial dans le développement de l'intestin et est nécessaire pour le développement d'un système immunitaire entièrement fonctionnel. En 1903 *Elie Metchnikoff*, discutait déjà de l'aspect essentiel des microbes sur la santé de l'hôte et son rôle dans l'espérance de vie²¹³. Notre immunité est le fruit d'une coévolution de plusieurs milliers d'années avec le microbiote intestinal^{214,215}. Le système immunitaire a développé de nombreuses armes de défense car « il est constamment confronté à des antigènes de la lumière intestinale et doit donc pouvoir distinguer quels antigènes doivent être tolérés ou non

(auto-antigènes, nourriture, microbes symbiotiques, microbes pathogènes, toxines...) ». Les premiers travaux démontrant le côté primordial du MI ont été effectués à l'aide de souris axéniques, dépourvues de microbiote. L'absence de microbiote diminue le développement et la régulation de l'immunité des muqueuses intestinales caractérisée par des organes lymphoïdes plus petits et non structurés et une réduction du nombre de cellules immunes comme les plasmocytes et les cellules T^{189,216-218}. Cependant, la reconstitution du MI des souris axéniques avec un cocktail de bactéries (flore de *Schaedler* contenant notamment des *Clostridium spp*, *Bacteroides fragilis*) a permis de restaurer certains sous-type de lymphocytes comme les Treg exprimant de l'IL10 dans le colon de ces animaux²¹⁹. De la même manière, la supplémentation par des bactéries filamenteuses segmentées chez la souris, permet d'induire la production d'IL17 et d'IL22 favorisant la génération de cellules TH17²²⁰. A l'inverse, l'utilisation d'antibiotiques sur des souriceaux perturbe le MI, favorisant la polarisation des cellules immunes vers une réponse pro-inflammatoire et un risque accru de maladies inflammatoires²²¹. Ces anomalies immunitaires liées à la dysbiose intestinale peuvent être réversibles si l'on rétablit la flore intestinale. Mais la fenêtre de traitement est limitée car il semble nécessaire de restaurer le MI le plus tôt possible, c'est-à-dire au stade de nouveau-nés²²².

De nombreuses études se sont attachées à comprendre les mécanismes de modulation du système immunitaire par le microbiote intestinal. Les micro-organismes sont réputés pour produire une très grande variété de métabolites immunomodulateurs à partir de la fermentation de certains composants nutritifs, notamment des fibres²²³. Parmi ces métabolites se trouvent les Acides Gras à Chaines Courtes (AGCC) qui regroupent entre autres

le propionate, le butyrate et l'acétate dans une proportion de 1 :1 :3 dans le tractus gastro-intestinal²²⁴. Dans l'intestin humain, le propionate est principalement produit par les *Bacteroidota* tandis que le butyrate est régulé par les *Bacillota*²²⁵. Ainsi, la composition microbienne et la disponibilité des fibres conditionnent la production d'AGCC qui interviennent dans de nombreux processus comme l'expression des gènes impliqués dans l'immunité, la différenciation, la migration des leucocytes, l'expression de molécules d'adhésion et la régulation de l'inflammation^{223,226,227}. Les AGCC agissent comme des inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) et ont plutôt des propriétés anti-inflammatoires. Par exemple, *in vitro et in vivo*, le butyrate et le propionate permettent de réguler positivement la différenciation des cellules TCD4+ naïves en Treg grâce à une acétylation accrue de l'histone H3 dans la lysine 27 du promoteur FoxP3²²⁸. Le butyrate peut également influencer la différenciation des macrophages et des cellules dendritiques en boostant leur capacité de captation des antigènes²²⁶. Chez l'homme, les études sur des populations d'enfants africains ayant un régime alimentaire varié ont démontré une concentration d'AGCC anti-inflammatoire élevée comparée à ceux ayant un régime alimentaire appauvri²²⁹. « Le MI est capable non seulement de réguler l'immunité locale mais aussi d'influer sur les fonctions immunitaires sur des sites éloignés par la libération d'un réseau complexe de métabolites circulants dans l'ensemble du corps»²³⁰.

Rôle du microbiote intestinal dans les infections parasitaires

Les infections qu'elles soient virales, bactériennes ou parasitaires entraînent également des modifications du microbiote intestinal et cette flore peut également influencer le développement et l'établissement du pathogène. Nous nous focaliserons ici sur l'impact des infections parasitaires causant des troubles du SNC. Une relation tri-directionnelle se met en place entre l'hôte, le parasite et le microbiote intestinal. Les mauvaises conditions sanitaires des zones d'endémie palustres sont également propices au polyparasitisme²³¹. Ces pathogènes vont entrer en compétition nutritive ou territoriale avec le microbiote intestinal. L'une comme l'autre peuvent également manipuler le système immunitaire de l'hôte contre son parasite, causant une perturbation de la réponse immune, de la malnutrition et des dommages sur la physiologie de l'hôte^{232,233}. Par exemple, une infection par *Toxoplasma Gondii* engendre une réponse immune riche en IFN- γ et en oxyde nitrique, ce qui provoque la perte des cellules de Paneth et par conséquent une réduction de la production des peptides antimicrobiens^{234–236}. Les parasites semblent agir comme des architectes de l'écosystème du MI. Des études sur les infections aux protozoaires et aux helminthes démontrent que les molécules qu'ils sécrètent modulent l'environnement intestinal²³⁷. Les helminthes, à l'inverse de certains protozoaires, sont capables de renforcer l'intégrité de la barrière intestinale et restreindre la translocation bactérienne, entraînant des modifications du MI^{238,239}. Cette dysfonction intestinale associée à la dysbiose peut parfois être maintenue même après la disparition de l'infection, c'est le cas des infections par *Giardia*²⁴⁰. Les parasites ont un impact

si important sur le système immunitaire et le microbiote intestinal que certains d'entre eux sont utilisés à des fins médicinales^{241,242}.

Le MI peut altérer la survie, la prolifération, la reproduction et la virulence des parasites tout comme ces derniers peuvent moduler la répartition bactérienne intestinale^{237,243,244}. Lors d'une infection parasitaire et plus particulièrement lors d'une infection paludique, le parasite a besoin de l'hôte pour survivre. Il est donc inévitable qu'il interagisse de manière directe ou indirecte avec le MI, comme résumé dans le tableau 2²³⁸. Ainsi, le MI est capable de moduler la réponse immune et faire varier la sensibilité de l'hôte aux agents pathogènes infectieux^{245,246}. Le MI peut enclencher une réponse immune dépendant des TLR ou produire des métabolites activateurs de l'inflammasome créant un environnement pro-inflammatoire²⁴⁷. Cet environnement permet de contribuer à l'élimination des protozoaires et ainsi moduler la sensibilité à l'infection par *T.gondii*²⁴⁸. Le MI peut également produire un environnement anti-inflammatoire par l'induction d'une réponse Treg ou l'inhibition de la réponse Th2, pouvant favoriser la persistance et la survie des parasites^{249,250}.

Dans le cadre du paludisme, l'équipe de *Villarino et al* a démontré que la variation du MI de souris C57BL/6 issues de différents fournisseurs impactait de manière significative la sévérité de l'infection via l'augmentation de LTCD4 anti-*P.yoelii*, de LT folliculaires helper et de cellules B du centre germinatif²⁵¹. Chez l'homme et la souris, il a été constaté également que le microbiote intestinal module le risque d'infection à *Plasmodium*. Chez l'homme, les personnes

à faible risque infectieux ont un MI riche en *Bifidobacteries*, *Streptocoques*, *Escherichia* et en *Lactobacillus*, tandis que chez la souris, la sensibilité aux infections palustres est associée à un microbiote caecal riche en *Bacteroides* et en *Proteobacteries*^{167,252}. Les zones d'endémies du NP sont des régions où l'on observe un régime alimentaire riche en amidon, les fibres et les polysaccharides végétaux ou une sous-alimentation chez le nourrisson qui est associée à des dysbioses caractérisées par une forte proportions d'*Enterobacterie*, d'*Actinobacteries* et de *Bacteroidetes* contrairement aux enfants européens^{223,253,254}. Ces régions sont également impactées par une lourde médication aux antibiotiques, modifiant le MI et sa régénération d'un individu à l'autre^{188,255}. En outre, les recherches menées par Smith *et al*, ont permis de démontrer que la transplantation de matières fécales (TMF) permettait de moduler la sensibilité et le devenir de la grossesse dans un modèle murin mimant les grossesses à risque lors d'infection paludéenne²⁵⁶. Ces observations conduisent à des perspectives excitantes où la composition du microbiote intestinal pourrait contribuer à moduler la sévérité des infections parasitaires.

Mechanism category	Host factors involved	Effect direction	Mechanism description	(Potential) Consequences	Examples showing both mechanism and consequence
INDIRECT INTERACTIONS (INVOLVING THE HOST)					
Physical changes to the gut	Intestinal mucus	P > M	Helminths, and some protozoa, increase mucus production	Increases mucolytic bacteria and bacteria capable of using mucins as a carbon source	<i>T. suis</i> (Li et al., 2012); <i>T. muris</i> (Holm et al., 2015; Houlden et al., 2015; Ramanan et al., 2016); <i>Eimeria</i> (Collier et al., 2008)
			Parasites alter mucus composition and structure	Reduces bacteria attachment to the gut epithelium Alters food availability, attachment sites, gut flow rates, and access to the epithelium for gut microbes	<i>T. trichiura</i> (Broadhurst et al., 2012) <i>T. muris</i> (Hasnain et al., 2011); <i>N. brasiliensis</i> (Tsubokawa et al., 2015); <i>E. histolytica</i> (Hicks et al., 2000); <i>T. gondii</i> (Kim and Khan, 2013; Trevizan et al., 2016); <i>Giardia</i> (Kim and Khan, 2013)
		M > P	Microbiota affects mucus synthesis	Impacts expulsion rate of parasites	
	Epithelial barrier	P > M	Parasites damage epithelial tight junctions	Allows for microbial translocation across the gut epithelium	<i>H. polygyrus</i> (Chen et al., 2005); <i>T. spiralis</i> (McDermott et al., 2003); <i>S. venezuelensis</i> (Farid et al., 2007); <i>N. brasiliensis</i> (Hyoh et al., 1999); <i>T. gondii</i> (Heimesaat et al., 2006; Hand et al., 2012; Cohen and Denkers, 2014); <i>Giardia</i> (Chen et al., 2013; Halliez, 2014)
		M > P	Microbiota strengthens and shapes permeability of mucus barrier	Alters the degree of mucosal damage and bacterial translocation that occurs after parasite infection	
	Epithelial cell turnover	P > M	Helminths increase epithelial cell turnover	Selects for microbes capable of replicating at a high rate	
	M > P	Microbiota mediate cell turnover via SCFAs	Impacts parasite colonization and expulsion		
Innate immunity	Toll-like receptors	P > M	Helminths increase expression of TLRs	Increases activation of responses against microbiota	<i>H. polygyrus</i> (Ince et al., 2008; Friberg et al., 2013); <i>H. diminuta</i> (Kosik-Bogacka et al., 2012)
		M > P	Microbiota can prime protective immune responses through TLRs	Protects against parasite infection through primed innate immune responses	<i>T. gondii</i> (Benson et al., 2009)
	Antimicrobial peptides	P > M	Helminths secrete antimicrobial peptides	Protects against harmful immune responses elicited by microbial contact	
	Inflammasomes	P > M	Parasites alter inflammasome activation	Alters pro-inflammatory cytokine secretion and microbial dysbiosis	<i>T. musculus</i> (Chudnovskiy et al., 2016)
		M > P	Microbiota-derived metabolites activate inflammasomes	Creates a pro-inflammatory environment that may aid protozoa clearance, but also increased helminth chronicity	
	Adaptive immunity	Th2 cells	P > M	Helminths increase Th2 responses	Alters mucosal barrier function and impairs TH1 responses leading to an inability to control bacterial replication
M > P			Gut microbes inhibit or enhance Th2 responses	Alters parasite survival	<i>T. muris</i> (Dea-Ayuela et al., 2008)
Treg cells		P > M	Helminths increase Treg responses	Downregulates inflammatory responses against microbiota Promotes Treg-inducing species	<i>H. polygyrus</i> (Reynolds et al., 2014)
			Helminths secrete TGF- β mimics to induce Foxp3+ Tregs	Downregulates inflammatory responses against microbiota	<i>H. polygyrus</i> and <i>T. circumcincta</i> (Grainger et al., 2010)
		M > P	Gut microbes induce Treg responses	Impacts parasite persistence and survival	<i>H. polygyrus</i> (Reynolds et al., 2014; Ohnmacht et al., 2015)
DIRECT INTERACTIONS (NOT INVOLVING THE HOST)					
Physical attachment	n/a	M > P	Helminth egg hatching require/is enhanced by bacteria attachment	Increases helminth colonization	<i>T. muris</i> (Hayes et al., 2010); <i>T. suis</i> (Veizagic et al., 2015)
Heterophagy	n/a	M > P	Pathogenic bacteria phagocytosed by parasite induces virulence	Increases parasite virulence	<i>E. histolytica</i> (Galván-Moroyoqui et al., 2008)
Endosymbiosis	n/a	M > P	Enteric bacteria engulfed by parasite, but not ingested	Alters host-parasite immune interaction	<i>Giardia</i> (El-Shewy and Eid, 2004)
Secretions	n/a	P > M	Helminth body fluids/secretions have antibacterial and bacteriolytic properties	Disrupts microbiota	
		M > P	Gut microbes secrete molecules that inhibit invading parasites	Decreases parasite infections	<i>Cryptosporidium</i> (Deng et al., 2001; Foster et al., 2003; Glass et al., 2004); <i>Giardia</i> (Pérez et al., 2001); <i>E. tenella</i> (Tierney et al., 2004)
Ingestion	n/a	P > M	Helminths ingest bacteria from their gut environment	Restructures microbiota communities	<i>T. muris</i> (White et al., 2018)
P > M: parasite effects on microbiota; M > P: microbiota effects on parasite.					

Tableau 3 : Effets de la relation bidirectionnelle entre les parasites et le microbiote intestinal²³⁸

L'impact du microbiote intestinal sur la barrière hémato-encéphalique et les cellules du système nerveux central

Le concept d'axe microbiote-intestin-cerveau, bien que relativement récent, est de plus en plus décrit dans la littérature. Des approches variées mais complémentaires visant à modifier le MI ont été menées pour déterminer son rôle dans les maladies *neuro-inflammatoires*¹⁷². Que ce soit l'utilisation de souris axéniques, la déplétion par traitement antibiotique ou l'enrichissement par traitement probiotique ou TMF, toutes ces approches démontrent un effet du microbiote intestinal sur le SNC²⁵⁷⁻²⁵⁹. Les bactéries commensales peuvent interagir avec le SNC soit par contact physique direct (cas particulier) soit de manière indirecte par la sécrétion de nombreux métabolites tels que les neuromédiateurs, les bactériocines ou encore les AGCC. Des preuves croissantes démontrent que ces métabolites infiltrent la circulation sanguine, lymphatique, le liquide céphalo-rachidien et le parenchyme et induisent la libération de cytokines, chimiokines, neurotransmetteurs ou signaux neuronaux pour communiquer constamment avec le cerveau^{172,260}. Le cerveau est protégé par la BHE, composée de cellules endothéliales reliées entre-elles par des jonctions serrées, par des astrocytes et des péricytes. Un déficit de l'une de ces cellules peut aboutir à une altération de la fonction de la BHE et compromettre le SNC²⁶¹. Le MI est capable de moduler l'intégrité de la perméabilité de la barrière intestinale et de la BHE en régulant l'expression des molécules des jonctions serrées telles que les claudines et les occludines^{225,262}. En effet, des souris axéniques présentent une diminution des jonctions serrées et une perméabilité de la

BHE accrue qui peut être restaurée lors d'ajouts d'AGCC ou de bactéries productrices d'AGCC²⁶².

En plus de son rôle sur la BHE, le MI est également capable de moduler la neuro-inflammation et l'activité des cellules du SNC. L'administration de butyrate associée à un régime riche en fibres a des effets bénéfiques chez la souris âgée en diminuant l'inflammation cérébrale²⁶³. Ces données sont encourageantes et peuvent avoir des applications pour améliorer la santé des personnes âgées, qui pour la plupart présentent une dysbiose du MI du fait d'une alimentation carencée en fibres. Leur niveau de butyrate est également réduit, ce qui pourrait être contrebalancé par un apport en inuline et/ou probiotiques²⁶³. Récemment, l'interaction microbiote-microglie a suscité beaucoup d'intérêt. Des travaux fascinants ont démontré que leur maintien et leur maturation sont dépendants de la diversité du MI²⁶⁴. Le modèle de souris axénique est un outil de choix dans la compréhension de nombreux mécanismes mais présente aussi des limites dans la physiologie neurologique et immunitaire pour établir un parallèle chez l'homme. Toutefois, chez les souris axéniques, la microglie défectueuse dans sa maturation, son activation, sa différenciation, sa morphologie, est incapable de mettre en place une réponse immune efficace face à une infection bactérienne ou virale²⁶⁴. Une recolonisation du MI des souris axéniques a été effectuée en utilisant le comportement coprophage des souris. Ainsi la cohabitation des souris axéniques avec des souris témoin a permis de restaurer un phénotype microglial fonctionnel^{265,266}. De même, la modulation du MI par traitement probiotique a régulé la production de TNF- α des microglies et influencé le recrutement de monocytes périphériques, essentiels aux réponses immunes et à l'élimination des débris cérébraux^{267,268}. Par ailleurs, les AGCC ont un impact sur les astrocytes et plus

particulièrement l'acétate qui réduit la signalisation de l'inflammation²⁶⁹. L'hypothèse mécanistique associée serait une interaction des AGCC produit par le MI avec les microglies et les astrocytes. Les AGCC sont des ligands naturels au Récepteur des Acides Gras Libres (FFARs) qui ont été identifiés sur les populations immunes telles que les lymphocytes, les astrocytes et les microglies^{264,270,271}. En l'absence d'un microbiote complexe, la ligation des AGCC sur leurs récepteurs engendre une inversion des effets délétères sur la densité, la morphologie et la maturité des microglies²⁶⁴ (Figure 15).

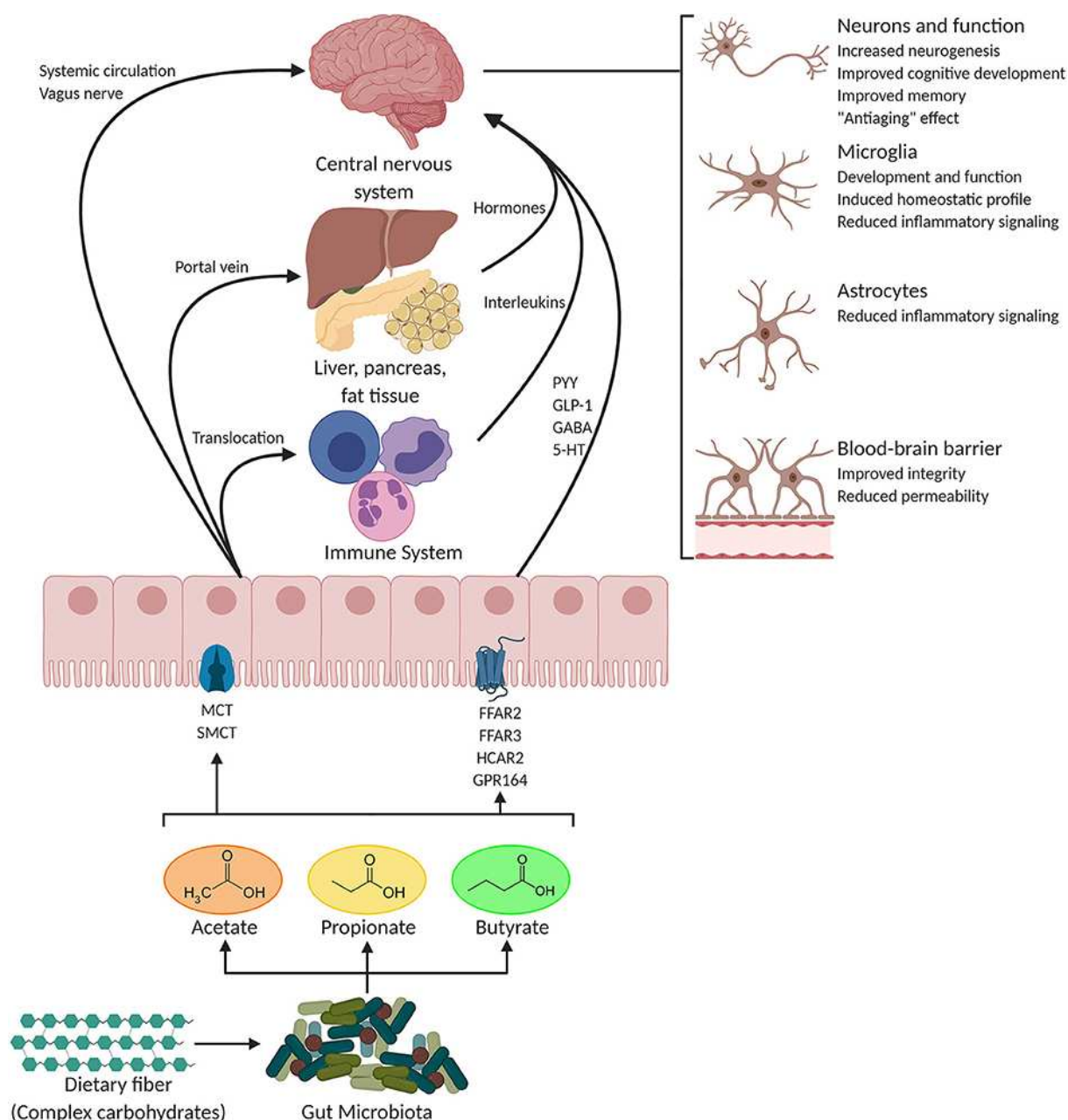


Figure 15 : Impact des AGCC sur la physiologie de l'hôte²⁶⁰.

En plus des AGCC, le MI peut métaboliser d'autres neuromédiateurs comme le tryptophane et ses dérivés²⁷². *Clostridium perfringens*, une bactérie que l'on retrouve dans le microbiote murin et humain, régule la biodisponibilité du tryptophane intestinal et contribue à la résistance à l'inflammation et à la protection des neurones²⁷³. Ces molécules sont connues

pour agir sur l'intégrité de la barrière intestinale et de la BHE mais également sur les cellules gliales. Une supplémentation en métabolites du tryptophane a permis de réduire l'expression de molécules pro-inflammatoires comme CCL2 et l'oxyde nitrique synthase 2 chez les astrocytes. Cette observation a été possible grâce à la découverte des récepteurs d'hydrocarbures aryles (AHR) présent sur les astrocytes et les microglies²⁷⁴. La fixation du ligand sur les AHR induit une diminution de l'activité inflammatoire et du recrutement de cellules immunes par les cellules gliales^{275,276}. *Lactobacillus reuteri* produit de l'indole qui est capable de se fixer sur les AHR des cellules gliales limitant la translocation de NFκB, et ainsi limiter l'activité pro-inflammatoire et leur capacité à répondre aux stimuli bactériens²⁷⁷. Dès lors, la question se pose, dans un contexte de neuropaludisme ou de maladies neuro-inflammatoires infectieuses en général, est-il possible de manipuler le microbiote intestinal à des fins thérapeutiques^{278,279} ?

AXE INTESTIN-CERVEAU

Les différentes voies de communication entre le microbiote intestinal et le système nerveux central

L'intestin est considéré comme notre deuxième cerveau du fait de sa forte innervation. De nombreuses voies de communications potentielles existent entre notre cerveau primaire (celui du SNC) et secondaire (celui du MI). Des voies neuronales, aux messagers du système neuroendocrinien ou encore en passant par le système immunitaire, un véritable dialogue bidirectionnel s'établi entre notre microbiote intestinal et notre cerveau. Définir le lien causal de l'interaction entre le MI et le SNC est un vrai questionnement pour la communauté scientifique, car ils se confrontent au paradoxe de l'œuf et de la poule. Est-ce la dysbiose du MI qui altère le SNC ou l'altération du SNC qui entraîne une dysbiose ?

La communication via le système nerveux

Les bactéries du microbiote intestinal produisent des métabolites neuromodulateurs tels que le tryptophane, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), la sérotonine et les catécholamines. Ces molécules sont nécessaires dans la communication inter-bactérienne mais agissent également avec les cellules de l'hôte, comme les cellules entérochromaffines et celles du système nerveux entérique²⁸⁰. Une composition altérée du microbiote intestinal est souvent associée à des troubles du comportement²⁸⁰. Chez ces individus, une

neurophysiologie perturbée qui se traduit par des troubles du transit, de la motilité et de la sécrétion gastro-intestinale est observé²⁸¹. Ces atteintes ont été associées à un dysfonctionnement de l'innervation sympathique qui cause des variations en termes de taille et de qualité du mucus intestinal qui peuvent influencer l'homéostasie de la flore intestinale²⁸². En parallèle, une étude récente a démontré que la sérotonine et le butyrate bactérien perturbent l'activité du système nerveux entérique en régulant la neurogénèse et les fonctions neurologiques^{172,283}. Le langage neurochimique partagé entre l'hôte et le MI est aussi complexe et subtil qu'un dialogue entre humains. Le principal neurotransmetteur doté d'une activité inhibitrice sur le système cérébral est le GABA. L'homme tout comme la bactérie en produit²⁸⁴. Le GABA est capable d'agir sur la virulence de certaines bactéries et les bactéries modulent notre activité neuronale grâce à ce neurotransmetteur²⁸⁵. Le MI induit des changements neuroplastiques mais le degré d'intensité et la durée de ces changements dans l'intestin et le cerveau restent encore indéterminés et peu étudiés.

La communication via le système immunitaire

Les récepteurs à la sérotonine sont présents sur la plupart des cellules immunes et lors d'une neuro-inflammation, la sérotonine produite par le microbiote influence l'immunité innée et adaptative²⁸⁶. La sérotonine est capable de réduire la production d'IFN- γ et d'IL-17 produites par les lymphocytes T tout en réduisant leur prolifération dans un modèle murin de sclérose en plaques et d'études *in vitro*²⁸⁷. Chez les patients atteints de sclérose multiple, une augmentation du récepteur à la sérotonine a été observée sur les TCD4²⁸⁸. La sérotonine agit

également sur les monocytes afin de diriger leur polarisation vers un profil de macrophage de type M2²⁸⁹. La stimulation d'astrocytes *in vitro* par de la sérotonine aboutit à une inhibition de la production du CMH-II et des molécules co-stimulatrices induites par l'IFN- γ ²⁹⁰. Ces évidences qui proviennent d'études sur les animaux et l'homme révèlent l'influence du MI sur l'inflammation et les maladies neuro-immunologiques. Cependant certaines questions demeurent encore sans réponse, par exemple, la sérotonine microbienne a-t-elle besoin d'un transporteur pour passer la BHE, dont aucun n'a encore été identifié ? Les mécanismes de modulation de la sérotonine du SNC seraient-ils associés au tryptophane microbien qui peut être métabolisé en sérotonine par les cellules du SNC ? Ainsi, les effets de la sérotonine incitent à cibler sa biodisponibilité dans le MI comme traitement potentiel des troubles neuro-inflammatoires²⁹¹.

La communication via le système neuroendocrine

Le tryptophane, la sérotonine, le GABA, la dopamine ou encore l'histamine sont des métabolites bactériens intestinaux diffusés dans l'hôte via la circulation sanguine, essentiels à l'activation du système immunitaire, au maintien de la BHE et du SNC^{275,283,292,293,294}. En plus des neuropeptides, le propionate, le butyrate et l'acétate produits par le MI jouent un rôle dans la régulation de la BHE, dans la plasticité synaptique, dans l'immunotolérance et ont des propriétés anti-inflammatoires sur les neurones et les cellules gliales du SNC (Figure 16)^{295,296}. Cependant, certaines bactéries du MI sécrètent de nombreuses molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques comme le lipopolysaccharide (LPS), un motif moléculaire bactérien reconnu

par notre système immunitaire, y compris les cellules gliales du SNC. La neuro-inflammation induite par les astrocytes et les microglies cause des troubles dans les structures synaptiques du SNC et dans la neurotransmission^{297,298}. Il a été observé que l'administration de probiotiques permet de réduire la concentration de LPS, l'activation de la voie NFκb et *in fine* la neuro-inflammation^{299,300}.

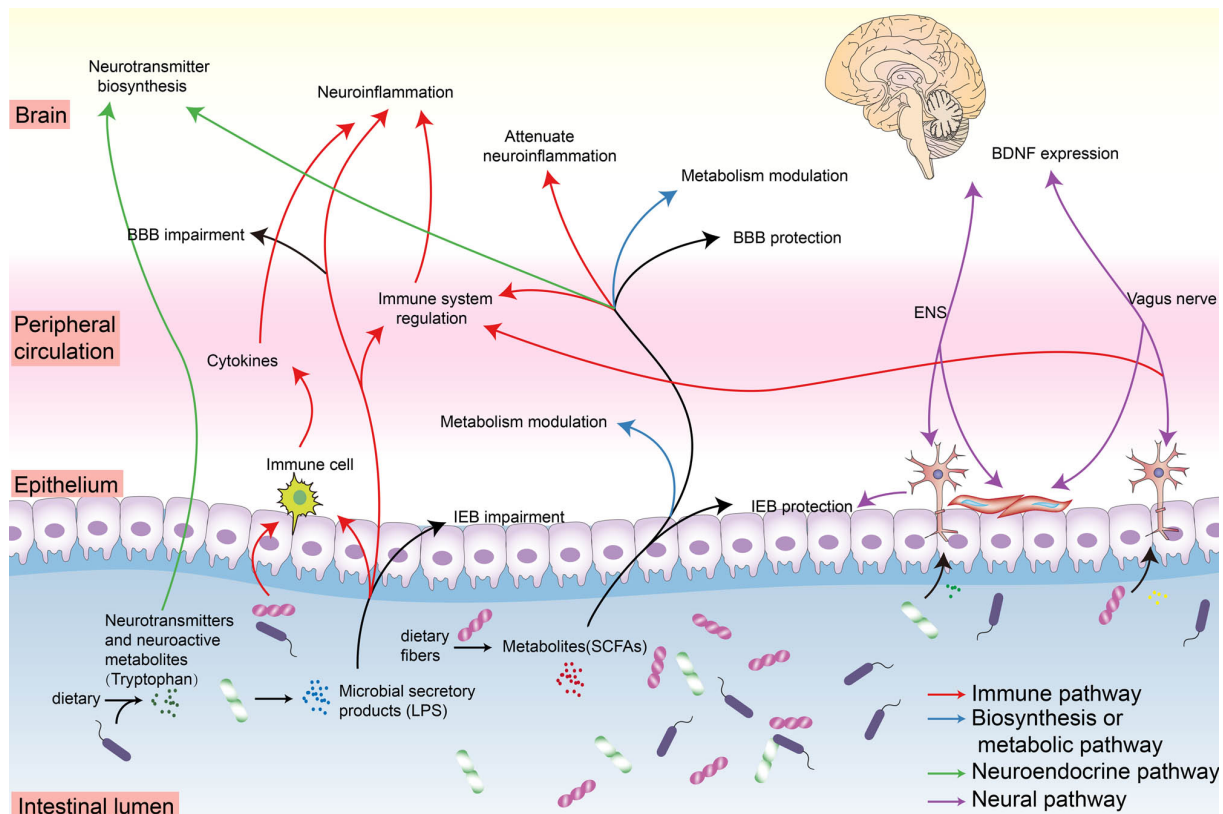


Figure 16 : Les différentes voies de communication connues de l'axe intestin-cerveau³⁰¹.

Impact de la dysbiose intestinal dans les processus *neuro-inflammatoires*

Le MI participe à l'homéostasie du SNC et son altération est associée au développement de neuropathologies³⁰². Les preuves de l'implication du MI dans des maladies neuro-

inflammatoires d'origine infectieuse comme le neuropaludisme commencent à peine à émerger. Il est dans ce cadre intéressant d'effectuer une analogie avec d'autres maladies neuro-inflammatoires d'origine auto-immune ou autre présentant des similitudes pour lesquelles l'implication du MI a été démontré, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore de la sclérose en plaques^{110,171,303,304}. Dans ces différentes pathologies, les astrocytes, les microglies, les Ac et les lymphocytes B ou T participent au processus de neuro-inflammation. Une perturbation de l'un de ces acteurs aboutit à des désordres neuro-inflammatoires plus ou moins graves.

Dysbiose et astrocytes

Le microbiote intestinal est capable de moduler le phénotype et le comportement des astrocytes par les différentes voies de communication que nous avons citées précédemment. Les métabolites bactériens sont des messagers vitaux pour le dialogue entre l'intestin et le cerveau. Certains agissent sur la BHE, sur le microenvironnement neuronal tandis que d'autres peuvent stimuler l'immunité périphérique et la neuroglie³⁰⁵. La présence de PRR sur les astrocytes est un indicateur de la capacité de ces cellules à interagir avec des modèles moléculaires associés aux microbes et initier des réponses immunes innées³⁰⁶. Ces indices ont conduit la communauté scientifique sur la piste des interactions possibles entre les bactéries du MI et les astrocytes. Une modification du MI par traitement antibiotique ou par TMF a permis d'inhiber l'activité inflammatoire des astrocytes médiée par la voie TLR4/NFκB/TNF-α et de soulager la neuro-inflammation^{170,307}. Une étude a démontré que le MI peut agir de

manière indirecte sur les cellules gliales, notamment en régulant l'expression de l'IFN- γ par les NK des méninges. L'inhibition de la production d'IFN- γ conduit à la polarisation des astrocytes vers un phénotype LAMP1+ TRAIL+ ce qui permet l'induction de l'apoptose des cellules T envahissant le SNC et limiter ainsi l'inflammation cérébrale³⁰⁸.

Des produits microbiens comme les AGCC, le tryptophane et le N-oxyde triméthylamine (TMAO) ont été les premiers suspects de la modulation de l'activité des astrocytes par le MI (Figure 17). Un bouleversement dans la balance des profils en AGCC dans un modèle murin mimant la maladie d'Alzheimer a été observé. Le rapport anormal entre le propionate et le butyrate a conduit à une altération de l'activité inflammatoire des astrocytes qui a pu être rétablie lors d'un changement alimentaire des souris par un régime riche en fibres végétales solubles³⁰⁹. Le sodium butyrate agit sur le métabolisme des astrocytes favorisant leur polarisation vers un phénotype anti-inflammatoire de type A2³¹⁰. Tandis que le propionate agirait sur le dialogue entre les astrocytes et les microglies en augmentant l'activité astrocytaire et en restaurant l'intégrité de la BHE comme en témoignent l'augmentation de GFAP et l'augmentation de *Zonula Occludens-1* (Figure 17)³¹¹.

Le microbiote intestinal est capable de métaboliser la choline, la carnitine et la bétaine en triméthylamine qui sera ensuite converti en TMAO par le foie. Cette molécule est déjà connue pour son impact sur les fonctions cognitives et sur la diversité du microbiote intestinal^{312,313}. Des taux élevés de TMAO plasmatique et cérébrale provoquent une activité pro-inflammatoire médiée par les astrocytes et les microglies. Une étude *in vitro* démontre que le

TMAO agit directement sur les cellules gliales induisant leur activation, leur prolifération et également une hypertrophie astrocytaire (Figure 17)³¹⁴. Le TMAO favorise également l'inflammation médiée par les cellules gliales et exacerbe les lésions nerveuses ischémiques dans un modèle d'hémorragie intracérébrale³¹⁵. Toutefois, le TMAO semble jouer un rôle bivalent dépendant de sa concentration. Une exposition chronique à faible dose avec du TMAO a permis de renforcer l'intégrité de la BHE, de préparer les astrocytes et les microglies à un challenge antigénique et préserver les fonctions cognitives²⁹³.

Les astrocytes et les microglies possèdent des AHR qui leurs permettent de capter le tryptophane et ses dérivés produits par le MI. L'interaction ligand-récepteur affecte l'inflammation du SNC. En effet, lorsque les microglies captent le tryptophane elles produisent du TGF- α et du Facteur de croissance endothéliale vasculaire β qui permettront de réguler l'activité transcriptionnelle des astrocytes et favoriser la neuroprotection (Figure 17). En parallèle, la stimulation des astrocytes par le tryptophane permet de moduler la signalisation de l'IFN de type I favorisant une réponse anti-inflammatoire et la neuro-régénération²⁷⁵.

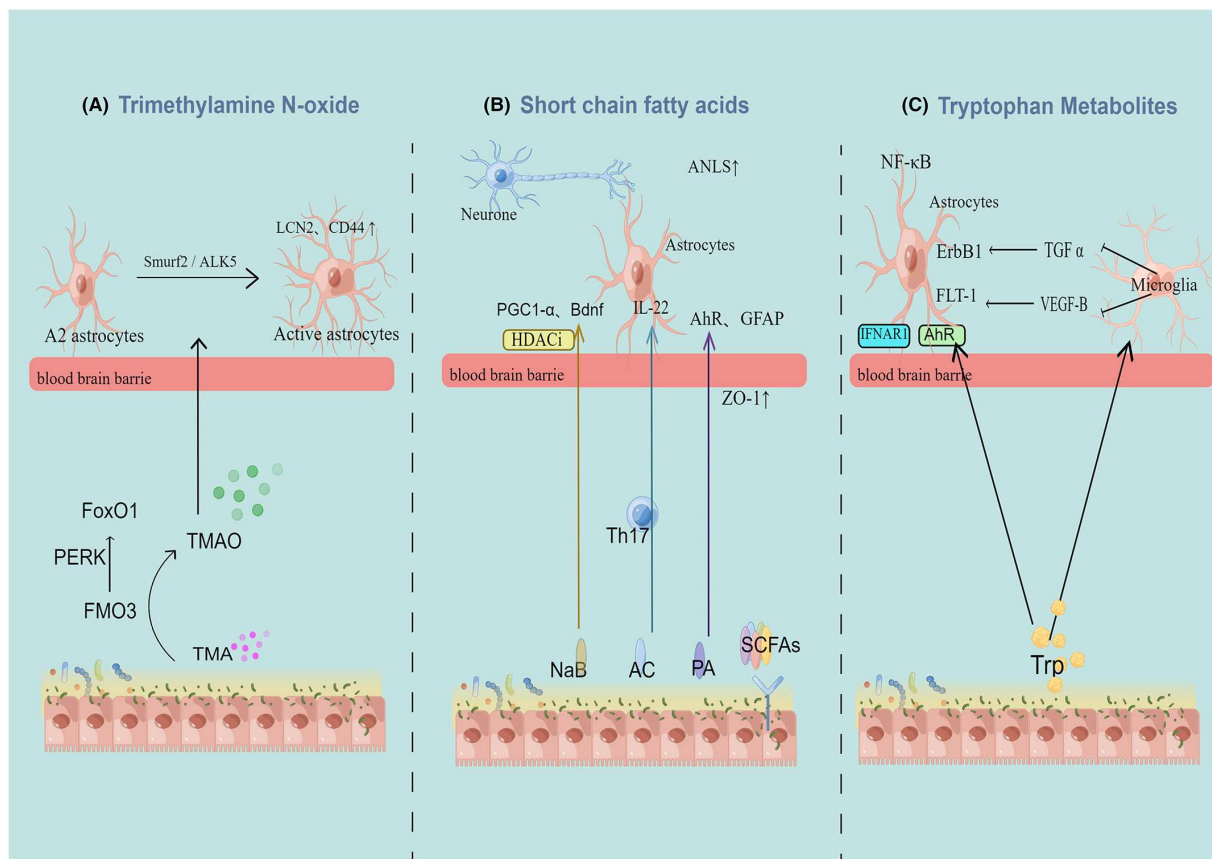


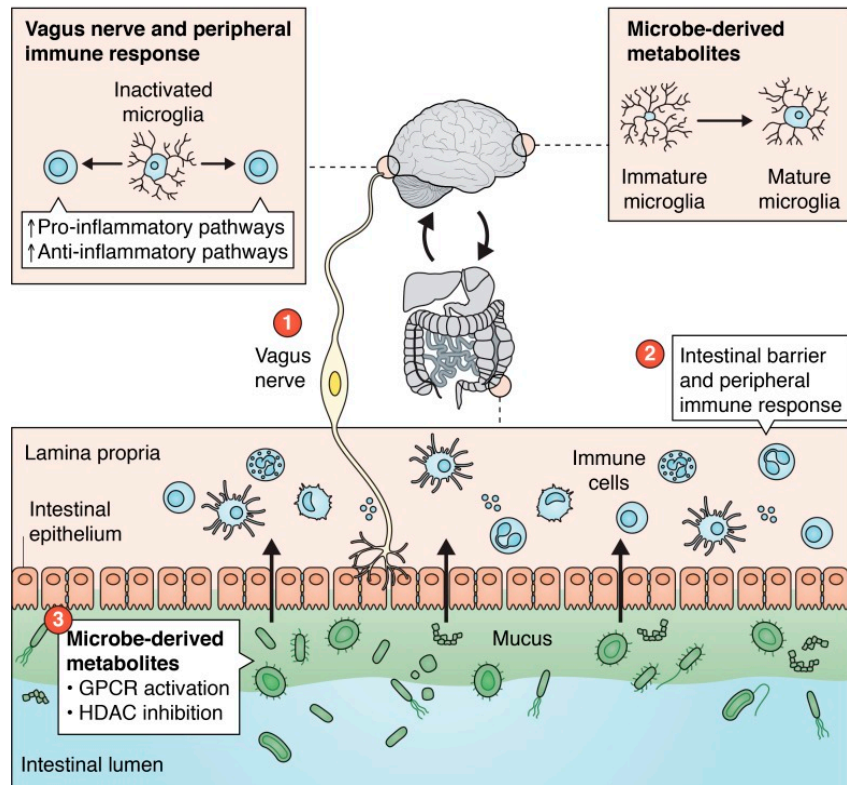
Figure 17 : Axe microbiote intestinal-astrocytes³⁰⁵.

Dysbiose et microglies

Les microglies ou macrophages résidents du SNC ont fait l'objet de nombreuses études de par leur fonction de sentinelles du SNC, leur sensibilité aux métabolites bactériens et de leur fonction immunitaire³¹⁶. Les microglies présentent des spectres de profils transcriptionnels extrêmement variables selon les stimuli de leurs environnements, démontrant ainsi leur plasticité et adaptabilité³¹⁷. Elles participent à nombreux processus vitaux du SNC comme la maturation synaptique, la phagocytose des débris cellulaires ou encore l'angiogenèse³¹⁸. Une

dysfonction de ces cellules est caractéristique dans de nombreux troubles du SNC comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de la sclérose en plaques et même les troubles neuropsychiatriques (Figure 18)³¹⁹. Ce n'est qu'au cours de ces 10 dernières années que nous commençons à entrevoir le dialogue entre le microbiote intestinal et les microglies. En effet, les premières observations de ces interactions ont été observées dans un modèle de souris GF présentant des aberrations microgliales (immaturité, non fonctionnelles, morphologies disproportionnées) qui étaient restaurées lors d'une supplémentation en AGCC (Figure 18)²⁶⁴. Une déficience en récepteurs des FFAR2, des souris avec une flore *Schaedler* ou un MI altéré par un traitement aux antibiotiques présentent également des déformations phénotypiques et fonctionnelles des microglies²⁶⁴. Le maintien de l'homéostasie microgliale semble donc être dépendant d'un type de microbiote intestinal particulier et d'un dialogue constant entre les deux parties. L'hypothèse mécanistique mis en avant par *Thion et al* suite à leurs observations de la chromatine entre des souris axéniques et conventionnelles serait que le MI agirait sur l'accessibilité à la chromatine²⁶⁵. Ce qui fait écho avec la capacité des AGCC à moduler l'activité des HDAC.

A SPF mice



B GF mice

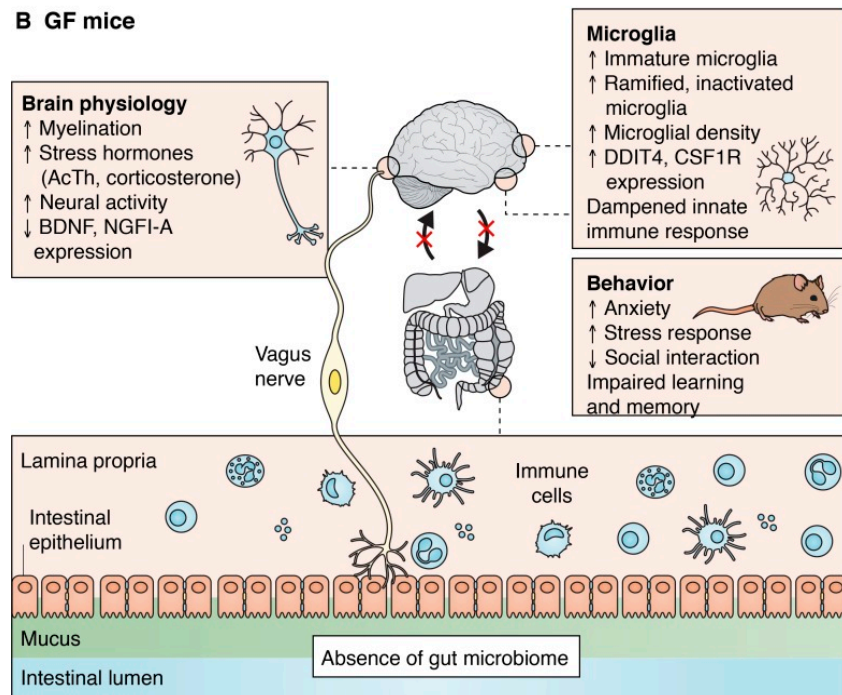


Figure 18 : Impact du microbiote intestinal sur la microglie dans différents contextes

*pathologiques*³²⁰

Même si dans les maladies neurodégénératives, l'impact du MI sur les astrocytes et la microglie est de mieux en mieux appréhendé, nous manquons cruellement d'informations sur le rôle du MI dans le contexte des maladies neuro-inflammatoires induites par les infections parasitaires. C'est pourquoi, nous avons effectué une revue de la littérature pour trouver des traces de l'implication du MI dans des parasitoses pouvant engendrer des neuro-inflammations cérébrales. Ces investigations nous ont permis de pointer du doigt un secteur de recherche encore mal compris grâce à la publication d'une revue dans le journal « Frontiers Immunology » en 2022.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Joseli Lannes-Vieira,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

REVIEWED BY

Tatiana Maron-Gutierrez,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil
Erkin Seker,
University of California, Davis,
United States

*CORRESPONDENCE

Sylviane Pied
sylviane.pied@pasteur-lille.fr

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Parasite Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 22 August 2022

ACCEPTED 21 November 2022

PUBLISHED 08 December 2022

CITATION

Alloo J, Leleu I, Grangette C and
Pied S (2022) Parasite infections,
neuroinflammation, and potential
contributions of gut microbiota.
Front. Immunol. 13:1024998.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1024998

COPYRIGHT

© 2022 Alloo, Leleu, Grangette and
Pied. This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Parasite infections, neuroinflammation, and potential contributions of gut microbiota

Jérémy Alloo, Ines Leleu, Corinne Grangette
and Sylviane Pied*

Center for Infection and Immunity of Lille-CIIL, Centre National de la Recherche Scientifique-CNRS
UMR 9017-Institut National de la Recherche Scientifique et Médicale-Inserm U1019, Institut Pasteur
de Lille, Univ. Lille, Lille, France

Many parasitic diseases (including cerebral malaria, human African trypanosomiasis, cerebral toxoplasmosis, neurocysticercosis and neuroschistosomiasis) feature acute or chronic brain inflammation processes, which are often associated with deregulation of glial cell activity and disruption of the brain blood barrier's intactness. The inflammatory responses of astrocytes and microglia during parasite infection are strongly influenced by a variety of environmental factors. Although it has recently been shown that the gut microbiota influences the physiology and immunomodulation of the central nervous system in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease and Parkinson's, the putative link in parasite-induced neuroinflammatory diseases has not been well characterized. Likewise, the central nervous system can influence the gut microbiota. In parasite infections, the gut microbiota is strongly perturbed and might influence the severity of the central nervous system inflammation response through changes in the production of bacterial metabolites. Here, we review the roles of astrocytes and microglial cells in the neuropathophysiological processes induced by parasite infections and their possible regulation by the gut microbiota.

KEYWORDS

parasitic disease, brain-inflammation, immunopathophysiology, astrocytes, microglia, gut microbiota, immunoregulation

Introduction

Many of the protozoans and metazoans associated with high-mortality, high-morbidity diseases (such as *Plasmodium* (P.) *falciparum*, *Toxoplasma* (T.) *gondii* and *Trypanosoma* (T.) *brucei*, *Taenia* (T.) *solium*, and *Schistosoma* (S.) *mansoni*) can invade the brain and induce neuropathological disorders (1, 2). The latter are often associated with systemic or

local, acute or chronic neuroinflammatory processes with a variety of clinical outcomes (Supplementary Tables 1, 2). Parasite-induced brain inflammatory disorders mostly damage the central nervous system (CNS), with life-threatening consequences (3–5). In most cases, the causative neuroinflammatory mechanisms have yet to be determined. However, the pro-inflammatory cytokines and chemokines released by activated states of astrocytes and microglial cells have been identified as key factors in these neuropathophysiological processes.

Astrocytes and microglial cells are major components of the CNS, where they help to regulate homeostasis and maintain the intactness of the blood-brain barrier (BBB) (6–9). They serve as the CNS's resident immune cells and so have a major role in the local innate immune response and inflammatory processes – particularly during pathogen invasion or tissue damage (7, 10–12). Astrocytes and microglia also function as antigen-presenting cells (13).

Deregulation of glial cell activity is commonly observed in CNS inflammatory parasitic diseases. This deregulation is often associated with the cytotoxic effects of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory mediators. Nevertheless, deregulation can also be associated with a neuroprotective response (7). In fact, astrocytes secrete neuroactive molecules (including nerve growth factor, glioma-derived growth factor, ciliary neurotrophic factor, and neurotrophic factors [like leukemia inhibitory factor]) that have an important role not only in neuroregeneration but also in the attenuation of neurotoxic phenomena (13, 14). Furthermore, microglial cells can adopt an alternative anti-inflammatory phenotype characterized by the production of cytokines/chemokines that protect neurons (10) and also regulate the level of fatty acids and neurotrophic or angiogenic factors (15). Accordingly, glial cells are key regulators of pro/anti-inflammatory responses induced in the brain during parasitic diseases. These inflammatory responses are dependent on numerous parameters associated to the parasite specie, their life cycle and biology, the targeted cells, induced-immune responses, antigenic variation and immune escape strategy elicited by the parasite (16). Here, we review the various response patterns associated with acute or chronic parasite-induced brain inflammation.

During a host-parasite interaction, the inflammatory response of astrocytes and glial cells is strongly influenced by various environmental factors, including host genetic factors, immune experience, and the intestinal microbiota (11, 17). The gut microbiota (GM) is known to have a major role in the immunomodulation of the CNS in general and during neuroinflammatory and neurodegenerative diseases (such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, depression, and multiple sclerosis) in particular (17–21). We shall also review (i) the roles of astrocyte and microglial cells in the neuropathophysiological processes induced by parasite infections and (ii) how these roles are possibly influenced by the GM (12).

Parasites that trigger acute neuroinflammation

Cerebral malaria

Cerebral malaria (CM) is the deadliest complication of *Plasmodium falciparum* infection and causes approximately 500,000 deaths per year worldwide (2). Patients with CM generally develop acute neurologic manifestations: a combination of diffuse encephalopathy and decreased consciousness progresses to deep coma, seizures and, in some cases, death (22). Children who survive CM show transient or permanent neurologic sequelae and cognitive impairments (23). Along with parasite sequestration within the brain microvessels, CM is associated with an impaired immune response and excessive, uncontrolled neuroinflammation resulting from the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines by activated astrocytes and microglial cells (3, 24, 25). We recently reported that this pro-inflammatory response is promoted by (i) the phagocytosis of infected red blood cells by microglial cells and (ii) the transfer of parasite microvesicles to astrocytes via microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-dependent autophagy. The LC3-associated phagocytosis results in the production of high levels of chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interferon gamma (IFN- γ) known to be involved in the pathogenesis of CM (26, 27). As shown in Figures 1, 2, these cytokines and chemokines promote disruption of the BBB and the brain infiltration of pathological $\alpha\beta$ CD8⁺ T lymphocytes expressing chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3), leading to neuronal damage (25, 28–32).

Human African trypanosomiasis

Human African trypanosomiasis (HAT) results from infection by either *T. brucei* (*T.b.*), *T. gambiense*, or *T. brucei rhodesiense*. Infection by *T. brucei* starts with a hemolymphatic phase and ends with a meningoencephalitic stage. The neuropathology affected approximately 3000 people in Africa in 2015 (5) and is characterized by headaches, psychological changes, sleep disturbances, sensorimotor problems, psychiatric disturbances, and (in some cases) death (33). The parasite colonizes the brain parenchyma in several steps (34). HAT is an immune process that results from the excessive activation of perivascular macrophages, astrocytes, and microglia cells (35, 36). For example, the formation of microglial nodules and astrocytic hypertrophy has been observed in *T.b.*-infected brains (10, 11). Some parasites are phagocytosed by innate immune system cells (such as perivascular macrophages) but most escape immune clearance by expressing a new variant surface glycoprotein during each humoral immune system attack (37).

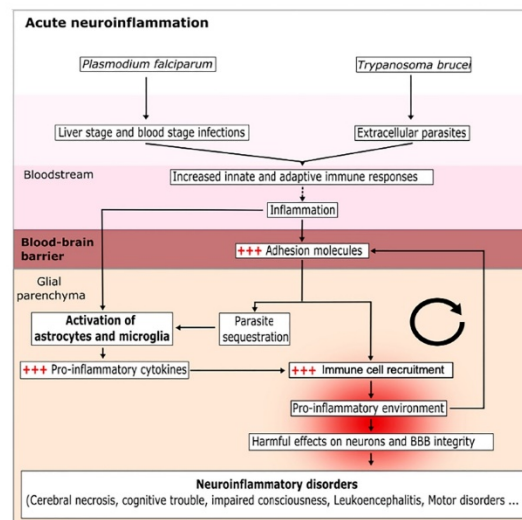


FIGURE 1

Mechanisms of the acute CNS inflammation induced by a protozoan parasite infection. The parasites *P. falciparum* and *T. brucei* enter the blood and then infect various cell types, in order to escape the immune system and splenic clearance. During this phase, the parasites activate circulating immune cells; in turn, this induces inflammation and favors the expression of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) by endothelial cells and the activation of glial cells (astrocytes and microglia). This results in a vicious circle because the inflammation makes it easier for parasites to enter and accumulate in the glial parenchyma. The sensing of parasites by the glial cells induces the production of pro-inflammatory cytokines, allows the recruitment of immune cells and creates a pro-inflammatory environment. The brain inflammation disturbs the BBB and helps the parasite to invade the glial parenchyma. The accumulation of parasites exacerbates the activation of astrocytes and microglia cells and leads to a harmful, pro-inflammatory environment.

Activation of glial cells in the brain promotes the production of pro-inflammatory factors (TNF- α , IFN- γ , CXCL10, and CXCL9), which is associated with local functional disturbance. In *Trypanosoma*-infected brains, macrophage activation via the toll-like receptor 9 (TLR9) pathway and the MyD88 innate immune signal transduction adaptor (Myd88) leads to the release of TNF- α , IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ and interleukin (IL)-1 β (38). These inflammatory mediators promote the endothelial expression of intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1). Limited production of CXCL10 by astrocytes has also been observed but is enough to trigger the recruitment of T lymphocytes and then their infiltration into the CNS parenchyma (11). The recruited T lymphocytes are sensitized by *Trypanosoma* antigen presented by macrophages. Further massive T lymphocyte recruitment is triggered by the CXCL10 produced by activated astrocytes. In turn, this promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP2/9), which are involved in loss of the BBB's integrity and thus create a gateway for parasite dissemination (11) (Figures 1, 2).

In both CM and trypanosomiasis, the elevated production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (by astrocytes) and the subsequent T lymphocyte recruitment are harmful. It is noteworthy that CXCL10 (produced mainly by astrocytes) might have a major neuropathogenic role; for example, CXCL10 $^{-/-}$ and CXCR3 $^{-/-}$ mice challenged with *P.berghei* ANKA or *T.brucei*

control the infection more readily and are resistant to the neurologic disorder (11).

Parasites that drive chronic neuroinflammatory processes

Neurotoxoplasmosis

Neurotoxoplasmosis is caused by the protozoan parasite *T. gondii*. The disease is contracted by ingestion of either excreted oocysts or cysts located in the muscle and nervous tissues of infected mammals (39). Toxoplasmosis is one of the world's major food-borne diseases and is widespread in a third of the world's population (12). Primary infection with *T. gondii* is asymptomatic in most hosts but tends to be symptomatic in immunocompromised individuals and pregnant women. *T. gondii* can replicate within a wide variety of cell types, including brain cells (40). *T. gondii* can persist throughout the host's lifetime in the brain as cysts, which are located principally in neurons and glial cells (39). The parasite's initial contact with the host cells engages cell surface molecules, such as surface antigen-1, laminin, ICAM1, VCAM1, and activated leukocyte cell adhesion molecule (41, 42). The effectiveness of the human immune response to *T. gondii* is evidenced by low incidence of

symptomatic disease, despite an overall seroprevalence of about 30%. It is clear that T cell trafficking and migration into the infected brain are critical factors in damage to the CNS. The crosstalk between *T. gondii* and the host involves a wide range of proteins and signaling networks. If an individual becomes immunocompromised, *T. gondii* cysts in the brain can reactivate and produce potentially lethal neurotoxoplasmosis. Activation of glial cells by interaction with *T. gondii* favors the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 α , IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, and IFN- γ (39, 43). Astrocytes that lack the IL-6 receptor or glial fibrillary acidic protein lose their ability to control the parasite. As a result, the inflammation spreads throughout the brain and can be fatal (44) (Figures 2, 3). Excessive brain inflammation and neuronal damage are prevented by the autoregulation of astrocytes and neurons via the secretion of anti-inflammatory cytokines, such

as IL-27 and transforming growth factor beta (TGF- β); these cytokines have immunosuppressive activity and influence T cell functions (11, 39, 43, 45).

Neurocysticercosis

Neurocysticercosis (NCC) is a CNS disease caused by *T. solium*. It was responsible for around 28,000 deaths in 2010. NCC is a neglected tropical disease and is mainly found in countries with ineffective healthcare systems (46). The clinical manifestations associated with NCC include seizures, epilepsy, focal neurologic impairments, elevated intracranial pressure, and cognitive decline. The disease manifestations depend on the number and size of the cysticercus or the parasitic stage development (47). NCC is thought to result from the neuroimmune processes induced by the parasite's eggs,

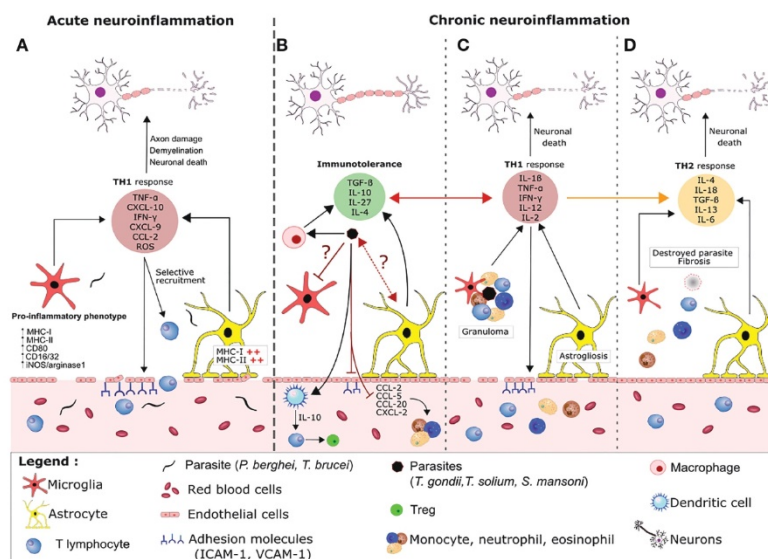


FIGURE 2

Host regulation of neuroimmune processes during acute versus chronic parasite infection. (A) During an acute parasite infection (e.g. by *P. falciparum* or *T. brucei*), parasites cross the BBB and activate astrocytes, which produce large amounts of pro-inflammatory cytokine/chemokines (e.g. CXCL-10) that recruit T lymphocytes. Together, CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes favor a pro-inflammatory environment by releasing molecules like perforin, granzyme, reactive oxygen species and IFN- γ . This release leads to disruption of the BBB, which favors parasite entry, aggravates the brain inflammation, and causes collateral damage to neurons. (B) In contrast, immune tolerance and pro-inflammatory responses are balanced during a chronic parasite infection. The cysts release compounds that inhibit granuloma formation and the activation of resident glial cells. For example, the parasites polarize pro-inflammatory macrophages into anti-inflammatory macrophages, which suppress the production of adhesion molecules and the local TH1 response via TGF- β and IL-10 production. Other cyst-derived compounds polarize CD4⁺ cells into regulatory T cells (Tregs) by modulating the maturation of dendritic cells and preventing the infiltration and migration of neutrophils, eosinophils and monocytes from the peripheral system into the brain via the production of immunomodulatory cytokines and the blockade of chemokines and adhesion molecules. Through an as-yet unknown mechanism, the parasite also inhibits the activation of microglia and astrocytes. Nevertheless, some of the material released by the cysts elicits an inflammatory reaction (mainly characterized by the secretion of IFN- γ and TNF- α by the activated glial cells and leukocytes). The chemoattractants lead to the recruitment of neutrophils, eosinophils and monocytes, which form a granuloma. Formation of a granuloma limits the collateral damage caused by the TH1 response and enables the parasite to be contained and destroyed. The astrocytes and microglia become activated and the BBB is damaged (C). Progressively, the TH1 response is replaced by a TH2 response and fibrosis occurs where the cyst was located. This fibrosis is associated with neuronal damage (D).

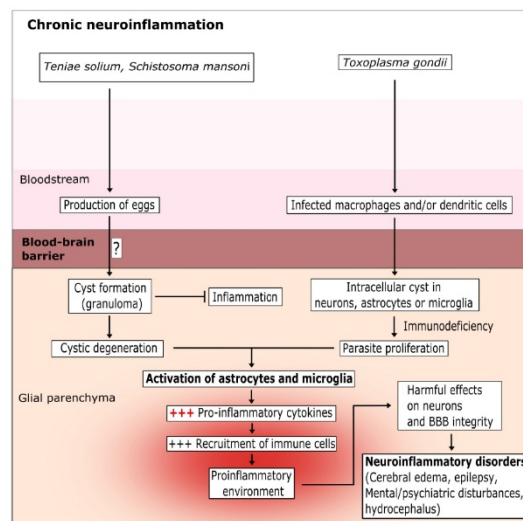


FIGURE 3

The chronic latent brain inflammation induced by parasite infection. *T. solium* and *S. mansoni* are intestinal parasites. Their eggs pass into the blood and then cross the BBB via as-yet unknown mechanisms. *T. gondii* infects leukocytes and crosses the BBB via a “trojan horse” mechanism or via a paracellular or transcellular route. Once inside the glial parenchyma, the parasites form extracellular cysts (for *T. solium* and *S. mansoni*) or intracellular cysts (for *T. gondii*) in neurons and microglia cells. The cysts can survive for several years and induce a low-level pro-inflammatory response. However, after few years or in an immunocompromised state, the cysts degenerate (for *T. solium* and *S. mansoni*) or proliferate (for *T. gondii*) and strongly activate astrocytes and microglia cells. In turn, this excessive activation creates a pro-inflammatory environment that damages neurons and the BBB.

which are produced in the intestine. Once the eggs have entered the bloodstream, they disseminate to various tissues - including the brain. After crossing the BBB, *T. solium* forms a cyst within the brain and can persist for several month or years - probably through active evasion and immunosuppression (47–49). After 3 to 10 years, the larvae degenerate (via as-yet unknown mechanisms) and lose their ability to control the CNS inflammation (47, 50). A TH1 pro-inflammatory response is then engaged; the TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-18, and IL12 released by microglia and macrophages trigger the expression of the adhesion molecules ICAM1 and VCAM1 and the chemoattractants and chemokines CXCL2, CXCL8, CCL5, CCL2, and CCL20 by astrocytes and endothelial cells. This damages the BBB and leads to cerebrospinal fluid leakage, greater leukocyte migration, and granuloma formation in the CNS (47, 50). The granulomas primarily comprise multinucleated giant cells, macrophages, T and B lymphocytes, plasma cells, neutrophils, eosinophils, and microglia around a degenerated cyst. The TH1 response is counterbalanced by a TH2 response characterized by IFN- γ , IL-18, IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- β production and that leads to progressive fibrosis (47, 49, 51). Neuroinflammation and granuloma in NCC constitute a “double-edged sword”: the granuloma protects the adjacent CNS tissue from the parasite but leads to damaging fibrosis and seizures (52) (Figures 2, 3).

Neuroschistomiasis

Neuroschistomiasis (NS) is a poorly characterized neuroinflammatory disease remaining caused by *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. haematobium*. The prevalence of NS has not been reliably determined, although at least 600 million people in at least 79 countries are thought to be at risk of infection (53). About 2 to 4% of individuals infected by *S. japonicum* develop neurological manifestations (54). Patients suffering from NS generally have headaches, visual disturbances, delirium, seizures, motor impairments, ataxia, and encephalopathy (55). NS results from an immune process associated with the ectopic deposition of eggs in the leptomeninges and the cerebral cortex, via as-yet unknown mechanisms (53). By analogy with NCC, it has been suggested that eggs in the brain escape the immune response and survive there for weeks. However, larval degeneration triggers the release of antigens and a TH1 pro-inflammatory response favoring (i) the recruitment of CD4⁺ T cells, eosinophils, macrophages and monocytes, and (ii) granuloma formation, leading to brain tissue necrosis (53). In fact, the TH1 response (characterized by IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 production) is gradually replaced by a TH2 anti-inflammatory response with overproduction of IL-10 (limiting the degree of neurologic damage) (54) (Figures 1, 2). However, many questions

remain with regard to the pathophysiological mechanisms associated with NS, including how the parasite interacts with glial cells, how it crosses the BBB, and how it survives in the brain.

Indeed, the current lack of effective treatments and the emergence of resistant parasites highlight the urgent need for novel biomarkers and potentially curative therapeutics for these neuroinflammatory diseases. Targeting the GM (in order to reduce the glial cells' pro-inflammatory activity and thus counteract the brain inflammation) is an interesting strategy, as already demonstrated for Alzheimer's disease, Parkinson's disease or multiple sclerosis (17, 19, 20). However, researchers are only now starting to investigate the GM's effect on parasite-induced neuroinflammatory diseases and to develop prebiotics, probiotics or fecal transplantation techniques for preventing and dampening the disease process (56–58).

Involvement of the GM in parasite-driven CNS inflammation

The host's microbiota is a consortium of bacteria, viruses, fungi, archaea, and protozoa. These microorganisms co-evolved with the host and colonize the skin and the respiratory, urogenital and gastrointestinal tracts (59). Commensal communities are essential for the body's development and functioning. The GM harbors trillions of microbes (mostly bacteria); an adult human harbors around 200 to 300 different bacterial species, most of which are located in the ileum and the colon (60) and interact with each other (61). Whereas the human genome contains about 23,000 genes, the GM provides up to 10 million genes in total (62) and about 600,000 in a given individual (63). Even though the GM is highly resilient, its composition changes and can be modulated by factors like diet, age, sex, geographic location, ethnicity, exercise, and drug intake (63). The GM's crucial role in human health comes through a variety of physiological mechanisms: modulation of the gut barrier and the host's metabolism (64, 65), local and systemic immune regulation (66, 67), neural development, and emotional development (65, 68–70). Abnormal changes in the GM's composition or activity – a so-called state of dysbiosis – are thought to be involved in the development of many diseases. It has recently been shown that dysbiosis contributes to extra-intestinal diseases and notably those affecting the CNS (71). Dysbiosis is involved in the development of the brain (68) but also in mental illnesses, such as eating disorders (72), autism (73), schizophrenia, anxiety disorders, mood disorders (74), and neurodegenerative diseases associated with neuroinflammation (such as Alzheimer's and Parkinson's diseases) (21, 75–79). In patients suffering from neurodegenerative diseases, a growing body of evidence indicates an association between GM dysbiosis and leakage of the intestinal barrier. This leakage favors inflammatory responses

and the release of compounds into the systemic circulation, which worsens the brain inflammatory process (21, 80, 81).

A link between the GM and the brain has been evidenced by experiments in germ-free mice, in which damage to the BBB can be partially restored by fecal transplants (82, 83). Microglia from germ-free mice or mice treated with an antibiotic presented an immature profile and an impaired immune response. This defect of the GM is associated with changes in microglial mRNA profiles in the germ-free mice: genes involved in cell activation, pathogen recognition, and host defense were downregulated in the animals' microglia, whereas genes encoding survival factors (which are usually suppressed in conventional animals) were upregulated (84, 85). Furthermore, other experiments in animal models showed that antibiotic-associated dysbiosis reduced neurogenesis in the hippocampus and thereby induced memory loss (83, 86). On the same lines, many research studies have highlighted the GM's impact on the BBB's integrity and the activity of CNS cells – either by modulating metabolites produced by bacterial species (82, 87–91), modulating the immune response (86, 92–96) or even by influencing the activity of the vagal nerve (97).

Even if *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Schistosoma* are all known to disturb the GM, a link with brain inflammation resulting from infection is not clearly established (56, 98–101). However, modification of the GM's composition has been described during toxoplasmosis since gram-negative bacteria like the enterobacteria aggravated the ileitis induced by *T. gondii* infection by perturbing tryptophan metabolism, dopamine level and decreasing Treg counts (66, 102, 103). Ileitis in *T. gondii*-infected mice was associated with elevated intestinal permeability, greater bacterial translocation, mild-to-moderate meningitis, behavior and cognitive disorder in wild-type mice (relative to germ-free mice) (102, 104–107).

GM dysbiosis has also been observed in *P. yoelii*- and *P. berghei* ANKA-infected C57BL/6 mice. Dysbiosis was generally associated with a low *Firmicutes* count and elevated *Proteobacteria* and *Verrucomicrobiae* counts (98, 108). These preclinical results were confirmed in a study of *P. falciparum*-infected children living in a rural village in Mali: the GM was enriched in *Bacteroidetes* and depleted in *Firmicutes*, relative to the GM in European children. We are investigating the possible association between the development of cerebral malaria and the composition of the GM. Our preliminary results suggest a role for GM dysbiosis in the brain inflammatory process leading to cerebral malaria in C57BL/6 susceptible mice infected with *P. berghei* ANKA by modifying the pro-inflammatory response of glial cells. Moreover, dysbiosis induced by antibiotics or probiotics protect against cerebral malaria. These data corroborate previous published work showing that the *P. berghei* ANKA infection induced changes in the GM which in turn impact malaria severity (56, 98). GM dysbiosis has also been observed during

cerebral trypanosomiasis gut microbiota in mice and human (101). GM dysbiosis was associated with alterations in fatty acids and bile acids metabolism in infected mice (109). In addition, it has been recently described that the increase of BBB permeability correlates with increased levels of IL-17, IL-22 and brain infiltration by bacterial metabolites, notably butyrate (110). This results in a rise in glutamate, excitotoxicity and cell death in the brain parenchyma (111). In neuroschistosomiasis, a recent study has shown that CNS macrophages including microglia play a role in forming granulomas around the parasite eggs (55). Indeed, in mice infected with *S. japonicum* it has been recently shown alterations in the intestinal barrier and GM composition upon infection with a possible link to microglial cells phenotype (112, 113).

The consequences of GM modification by a parasite infection

Parasite infections can induce dysbiosis and thus impact the host's inflammatory response and susceptibility to infection (114). Indeed, it has been demonstrated that the GM influences the pathogenicity of certain parasites or helminths directly (through bacteria-parasite interactions) or indirectly (by providing essential metabolites and therefore a more conducive environment for parasite proliferation and growth) (88). Of note, *in vivo* imaging of *P. berghei*-expressing luciferase has shown high amount of parasites in the mesentery and intestinal lumen which perturbed GM by favouring interactions and nutritional competition with gut bacteria (98, 115–119). Parasites can also modulate the GM composition indirectly through immunoregulatory factors. It is the case for *T. gondii*, IFN- γ and NO released during infection can cause the loss of Paneth cell and inhibit the production of antimicrobial peptides (116–119).

In some cases, the GM is enriched in certain bacterial phyla that reduce the severity of the disease associated with protozoan, fungal, helminth or bacterial infections (103). This is the case for *P. berghei* ANKA infections: the GM of "resistant" mice had a higher proportion of *Firmicutes* (56). It has also been shown that mice experimentally colonized with the α -galactosyl-expressing intestinal pathobiont *E. coli* O86: B7 produced anti- α -galactosyl antibodies, which prevent invasion of the liver by sporozoites (120).

Could modulation of the GM help to prevent the neuroinflammation induced by parasite infections?

It has been suggested that a eubiotic GM helps to maintain and/or restore homeostasis of the BBB and to prevent inflammatory processes in the brain. Various signaling molecules

produced by the GM enable microbes to communicate with the host's neuro-immune system, and cytokines are produced by the host in response to microbes (121). Most of these molecules act on glial cells (Figures 4, 5) and might modulate inflammation. Indeed, short-chain fatty acids (SCFAs) can influence the gut-brain axis *via* various mechanisms, including epigenetic modifications. SCFAs can inhibit the TLR4/TBK1/NF- κ B/TNF- α pathway in astrocytes and microglial cells by inhibiting histone deacetylase, which results in downregulation of pro-inflammatory cytokine/chemokines production (20, 115, 124–127). Acetate can cross the BBB, and butyrate can restore the barrier's intactness. SCFAs can also reverse dysfunctional microglial phenotypes in GF mice (82). Interestingly, aryl hydrocarbon receptor agonists inhibit VEGF- β production and stimulate TGF- α production by the microglia and thereby limit the astrocyte's inflammatory response, disturbance of the BBB, and the infiltration of leukocytes into the CNS (116, 117) (Figure 5).

Furthermore, many researchers have reported on the GM's influence through the synthesis of various neurotransmitters and neuromodulators with crucial roles in gut-brain communication (Figure 5). Indeed, some bacteria are able to produce amino acids like gamma-aminobutyric acid (the main inhibitory neurotransmitter in the CNS). The GM can also regulate the level of serotonin, which has central roles in anxiety and depression and mediates changes in hippocampal levels of 5-hydroxyindoleacetic acid and brain-derived neurotrophic factor and plasma levels of tryptophan (118). The GM can notably control neurotransmitter production through the regulation of glutamate, which can be neurotoxic at high levels (119, 128, 129). Recently, bacterial-surface-derived compounds like peptidoglycans have emerged as potential key regulators of GM-brain interactions (130).

Several strategies can be used to restore the GM, such as (i) the administration of specific nutrients that promote the growth of certain bacterial species (i.e. prebiotics), (ii) the introduction or expansion of "beneficial" bacteria species (i.e. probiotics), and (iii) the wholesale or selective transplantation of a donor GM (i.e. fecal transplantation) (57). Many probiotics reportedly exhibit anti-inflammatory properties, notably in the context of inflammatory bowel diseases (122, 131). Several probiotics have been shown to communicate with the brain and influence behavior through vagal nerve signaling. Promising results have also been reported in the context of autoimmune neurodegenerative diseases like Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Lactobacillus reuteri* is able to metabolize tryptophan into indoles, which bind to the aryl hydrocarbon receptor expressed by astrocytes and microglia; this modulates the production of pro-inflammatory chemokine/cytokines and the cells' ability to respond to lipopolysaccharide by limiting NF κ B translocation (90, 117, 132–134) (Figure 4). Probiotics might also interact with enteroendocrine cells, i.e. sensory cells that form synapses with vagal afferents (neuropodia) (135). Lastly, we have shown that some probiotics

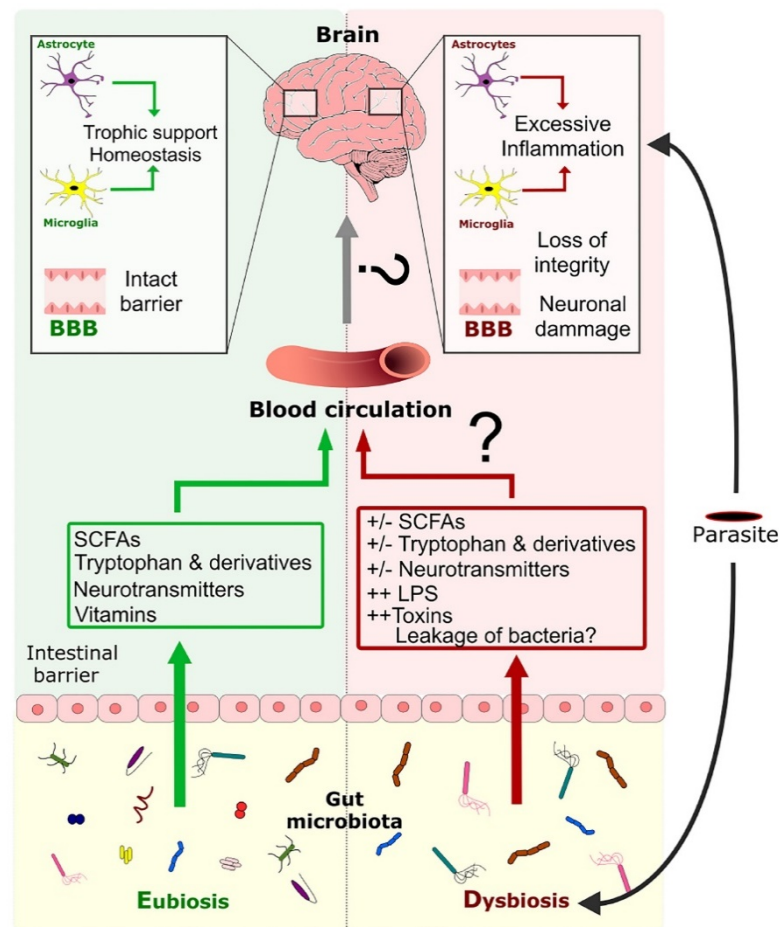


FIGURE 4

Modulation of the CNS inflammation response by the GM during a parasite infection. Eubiosis of GM favors the maintenance of the gut barrier's intactness (122, 123). Moreover, the GM can produce metabolites like SCFAs, tryptophan, tryptophan derivatives, neurotransmitters, and vitamins, which are disseminated through the host's circulation. These metabolites are known to have an impact on the BBB's intactness and on CNS cells like astrocytes and microglia. Infection by a parasite induces dysbiosis of the GM directly or indirectly, which perturbs metabolite production, impairs gut barrier intactness and allows the possible translocation of bacteria throughout the organism. Dysbiosis is associated with an impairment of glial cell activity and loss of the BBB's intactness. Dysbiosis might also favor the excessive pro-inflammatory response of glial cells induced by the parasite and that leads to neuronal damage.

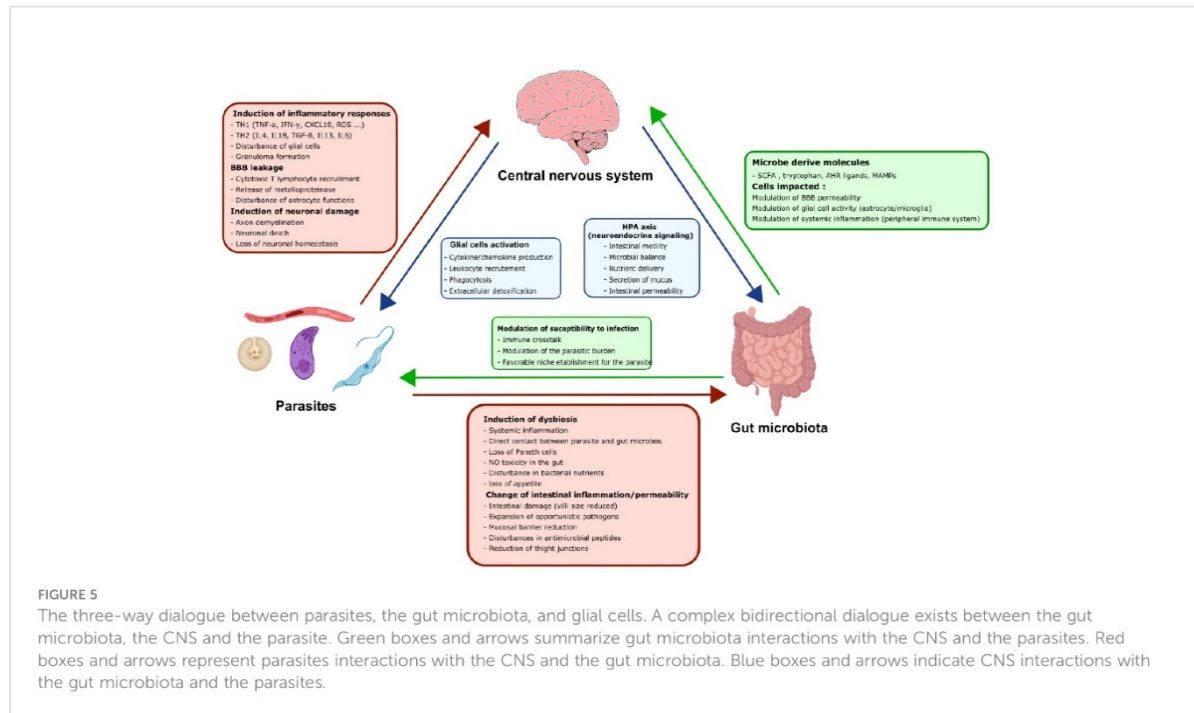
exhibit anti-inflammatory properties *via* the interaction between peptidoglycan and NOD2 (136). We speculate that probiotic-derived peptidoglycans might constitute a novel means of treating neuro-inflammation.

Along with antiparasitic drugs, the value of fecal transplants and probiotics was recently evaluated in the context of infections by protozoans (such as *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella*) and nematodes (such as *Toxocara canis* and *Strongyloides venezuelensis*) (58). Fecal transplantation appears to be the most effective way of restoring the GM and combating neuroinflammatory diseases but is used on critical cases only. A better understanding of the molecular crosstalk

between the GM and the brain should lead to the development of novel therapies for CNS inflammation caused by parasite infections.

Conclusion

The brain inflammation processes induced during parasite infections are not well understood and cannot easily be treated. Therefore, any treatment that can reduce this neuroinflammation will have a considerable public health impact. In this context, strategies that target the GM (notably



by the development of food supplements able to regulate acute, harmful inflammation in particular and/or neuroinflammatory diseases in general) should be taken into consideration, along with antiparasite drugs.

de France, University of Lille. We also thank Mr David FRASER at Biotech Communication SARL for language editing.

Author contributions

SP designed, revised and supervised the work. JA reviewed the literature, created the figures, and wrote the manuscript. IL and CG participated to the analysis, drafting and revising the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by REGION HAUTS-DE-FRANCE, Innovation program START AIRR “PROMAL” and LabEx PARAFRAP ANR-11-LABX-0024i.

Acknowledgments

We wish to thank all the authors who have participated in this Research Topic and the reviewers for their insightful comments and suggestions. AJ was funded by the College Doctoral Nord Lille

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1024998/full#supplementary-material>

References

1. Casadevall A, Pirofski L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* (2003) 1:17–24. doi: 10.1038/nrmicro732
2. Organisation mondiale de la santé. *World malaria report 2018*. (Geneva: World Health Organization) (2018).
3. Mung'Ala-Odera V, Snow RW, Newton CRJC. The burden of the neurocognitive impairment associated with plasmodium falciparum malaria in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* (2004) 71:64–70. doi: 10.4269/ajtmh.2004.71.64
4. Lundkvist GB, Kristensson K, Bentivoglio M. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* (2004) 19:198–206. doi: 10.1152/physiol.00006.2004
5. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet* (2017) 390:2397–409. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31510-6
6. Subhramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* (2019) 94:112–20. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.05.004
7. Jha MK, Jo M, Kim J-H, Suk K. Microglia-astrocyte crosstalk: An intimate molecular conversation. *Neurosci* (2019) 25:227–40. doi: 10.1177/1073858418783959
8. Yang Q, Zhou J. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* (2019) 67:1017–35. doi: 10.1002/glia.23571
9. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron* (2020) 108:608–22. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.012
10. Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G. Neuroinflammation and brain infections: Historical context and current perspectives. *Brain Res Rev* (2011) 66:152–73. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.09.008
11. Masocha W, Kristensson K. Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence* (2012) 3:202–12. doi: 10.4161/viru.19178
12. Mallewa M, Wilmshurst JM. Overview of the effect and epidemiology of parasitic central nervous system infections in African children. *Semin Pediatr Neurol* (2014) 21:19–25. doi: 10.1016/j.jspen.2014.02.003
13. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C, et al. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* (2002) 202:13–23. doi: 10.1016/S0022-510X(02)00207-1
14. Escartin C, Pierre K, Colin A, Brouillet E, Delzescaux T, Guillemer M, et al. Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults. *J Neurosci* (2007) 27:7094–104. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007
15. Singhal G, Baune BT. Microglia: An interface between the loss of neuroplasticity and depression. *Front Cell Neurosci* (2017) 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00270
16. Luis Muñoz-Carrillo J, Contreras-Cordero JF, Gutiérrez-Coronado O, Villalobos-Gutiérrez Trinidad P, Ramos-Gracia LG, Hernández-Reyes VE. Cytokine profiling plays a crucial role in activating immune system to clear infectious pathogens. In: Tyagi RK, Bisen PS, editors. *Immune response activation and immunomodulation*. (London: IntechOpen) (2019).
17. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* (2017) 20:145–55. doi: 10.1038/nn.4476
18. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci* (2017) 114:10713–8. doi: 10.1073/pnas.1711235114
19. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S, et al. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci* (2017) 74:3769–87. doi: 10.1007/s00018-017-2550-9
20. Sun M-F, Zhu YL, Zhou ZL, Jia XB, Xu YD, Yang Q, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav Immun* (2018) 74:48–60. doi: 10.1016/j.bbi.2018.02.005
21. Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota axis in alzheimer's disease. *J Neurogastroenterol Motil* (2019) 25:48–60. doi: 10.5056/jnm18087
22. Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR. Cerebral malaria in mouse and man. *Front Immunol* (2018) 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.02016
23. Schiess N, Villabona-Rueda A, Cottier KE, Huether K, Chipeta J, Stins MF, et al. Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. *Malar J* (2020) 19:266. doi: 10.1186/s12936-020-03336-z
24. Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* (2006) 36:569–82. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.016
25. Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigario AM, et al. Accumulation of *Plasmodium berghei* -infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun* (2010) 78:4033–9. doi: 10.1128/IAI.00079-10
26. Shrivastava SK, Dalko E, Delcroix-Genete D, Herbert F, Cazenave P-A, Pied S, et al. Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria. *Plasmodium Interact Glial Cells Glia* (2017) 65:75–92. doi: 10.1002/glia.23075
27. Leleu I, Genete D, Desnoulès SS, Saidi N, Brodin P, Lafont F, et al. A noncanonical autophagy is involved in the transfer of *Plasmodium* -microvesicles to astrocytes. *Autophagy* (2021) 18(7):1583–98. doi: 10.1080/15548627.2021.1993704
28. Mazier D, Nitcheu J, Idrissa-Boubou M. Cerebral malaria and immunogenetics. *Parasit Immunol* (2000) 22:613–23. doi: 10.1046/j.1365-3024.2000.00342.x
29. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin J-C, Rooijen van N, M, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* (2002) 169:6369–75. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6369
30. Bagot S, Idrissa Boubou M, Campino S, Behrschmidt C, Gorgette O, Guénet JL, et al. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infect Immun* (2002) 70:2049–56. doi: 10.1128/IAI.70.4.2049-2056.2002
31. Bagot S, Nogueira F, Collette A, do Rosario V, Lemonnier F, Cazenave PA, 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) 72:2817–26. doi: 10.1128/IAI.72.5.2817-2826.2004
32. Campanella GSV, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abraszinski TA, Manice LA, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci* (2008) 105:4814–9. doi: 10.1073/pnas.0801544105
33. World Health Organization and WHO Expert Committee on the Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis. *Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee*. (Geneva, Switzerland: World Health Organization) (2013). Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95732>
34. Kristensson K, Nygård M, Bertini G, Bentivoglio M. African Trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog Neurobiol* (2010) 91:152–71. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.001
35. Sharafeldin A, Eltayeb R, Pashenkov M, Bakht M. Chemokines are produced in the brain early during the course of experimental African trypanosomiasis. *J Neuroimmunol* (2000) 103:165–70. doi: 10.1016/S0165-5728(99)00238-6
36. Kennedy PGE. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J Clin Invest* (2004) 113:496–504. doi: 10.1172/JCI200421052
37. Moreno C, Temporal A, Torres T, Sousa Silva M. Trypanosoma brucei interaction with host: Mechanism of VSG release as target for drug discovery for African trypanosomiasis. *Int J Mol Sci* (2019) 20:1484. doi: 10.3390/ijms20061484
38. Rodgers J, Steiner I, Kennedy PGE. Generation of neuroinflammation in human African trypanosomiasis. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflamm* (2019) 6:e610. doi: 10.1212/NXI.0000000000000610
39. Schlüter D, Barragan A. Advances and challenges in understanding cerebral toxoplasmosis. *Front Immunol* (2019) 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00242
40. Persson CM, Lambert H, Vutova PP, Dellacasa-Lindberg I, Norderby J, Yagita H, et al. Transmission of *Toxoplasma gondii* from infected dendritic cells to natural killer cells. *Infect Immun* (2009) 77:970–6. doi: 10.1128/IAI.00833-08
41. Mineo JR, Kasper LH. Attachment of toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P-30). *Exp Parasitol* (1994) 79:11–20. doi: 10.1006/expr.1994.1054
42. Silva NM, Manzan RM, Carneiro WP, Milanezi CM, Silva JS, Ferro Vieira EA, et al. Toxoplasma gondii: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. *Exp Parasitol* (2010) 126:167–77. doi: 10.1016/j.exppara.2010.04.019
43. Elsheikha HM, Marra CM, Zhu X-Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* (2020) 34:e00115-19. doi: 10.1128/CMR.00115-19
44. Drögemüller K, Helmuth U, Brunn A, Sakowicz-Burkiewicz M, Gutmann DH, Mueller W, et al. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis. *J Immunol* (2008) 181:2683–93. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2683

45. Cekanaviciute E, Dietrich HK, Axtell RC, Williams AM, Egusquiza R, Wai KM, et al. Astrocytic TGF- β signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system. *Toxoplasma Infect J Immunol* (2014) 193:139–49. doi: 10.4049/jimmunol.1303284
46. Mewara A, Goyal K, Sehgal R. Neurocysticercosis: A disease of neglect. *Trop Parasitol* (2013) 3:106–13. doi: 10.4103/2229-5070.122111
47. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. Immunopathology in. *Taenia solium neurocysticercosis Parasit Immunol* (2016) 38:147–57. doi: 10.1111/pim.12299
48. Adalid-Peralta L, Arce-Sillas A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova-Hernández D, et al. Cysticerci drive dendritic cells to promote *In vitro* and *In vivo* tregs differentiation. *Clin Dev Immunol* (2013) 2013:1–9. doi: 10.1155/2013/981468
49. Garcia HH, O'Neal SE, Noh J, Handali S. The Cysticercosis Working Group in Peru. Laboratory diagnosis of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *J Clin Microbiol* (2018) 56:e00424–18. doi: 10.1128/JCM.00424-18
50. Prodiginoth UF, Lema J, Lacordia M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *Taenia solium* neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) 14:e0008005. doi: 10.1371/journal.pntd.0008005
51. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* (2001) 69:4554–60. doi: 10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001
52. Giorgio S, Gallo-Francisco PH, Roque GAS, Flóres e Silva M. Granulomas in parasitic diseases: the good and the bad. *Parasitol Res* (2020) 119:3165–80. doi: 10.1007/s00436-020-06841-x
53. Carod-Artal FJ. Neurological complications of schistosoma infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2008) 102:107–16. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.08.004
54. Ferrari TCA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis mansonii. *Acta Trop* (2008) 108:83–8. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.02.010
55. Tan Z, Lei Z, Zhang Z, Zhang H, Shu K, Hu F, et al. Identification and characterization of microglia/macrophages in the granuloma microenvironment of encephalic schistosomiasis japonicum. *BMC Infect Dis* (2019) 19:1088. doi: 10.1186/s12879-019-4725-5
56. Villarino NF, LeClerc GR, Denny JE, Dearth SP, Harding CL, Sloan SS, et al. Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Natl Acad Sci* (2016) 113:2235–40. doi: 10.1073/pnas.1504887113
57. Hyland N, Stanton C. *The gut-brain axis: dietary, probiotic, and prebiotic interventions on the microbiota*. (Amsterdam: Elsevier/Academic Press) (2016).
58. Ribeiro CdM, Zorzi NE, Meireles LR, Garcia JL, de Andrade Junior HF. CD19 LYMPHOCYTE PROLIFERATION INDUCED BY bifidobacterium animalis subsp. lactis IN C57BL/6 MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH toxoplasma gondii. *Rev Inst Med Trop São Paulo* (2016) 58:26. doi: 10.1590/S1678-9946201658026
59. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* (2016) 164:337–40. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013
60. MetaHIT Consortium, Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* (2010) 464:59–65. doi: 10.1038/nature08821
61. Gerhardt S, Mohajeri M. Changes of colonic bacterial composition in parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Nutrients* (2018) 10:708. doi: 10.3390/nu10060708
62. MetaHIT Consortium, Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* (2014) 32:834–41. doi: 10.1038/nbt.2942
63. Dogra SK, Doré J, Damak S. Gut microbiota resilience: Definition, link to health and strategies for intervention. *Front Microbiol* (2020) 11:572921. doi: 10.3389/fmicb.2020.572921
64. LeBlanc JG, Milani C, Giori GS, Sesma F, Sinderen van D, Ventura M, et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* (2013) 24:160–8. doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005
65. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2012) 9:577–89. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156
66. Dodd D, Spitzer MH, Treuren Van W, Merrill BD, Hryckowian AJ, Higginbottom SK, Le A, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* (2017) 551:648–52. doi: 10.1038/nature24661
67. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, Ng DCK, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* (2011) 34:794–806. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.021
68. Cox LM, Weiner HL. Microbiota signaling pathways that influence neurologic disease. *Neurotherapeutics* (2018) 15:135–45. doi: 10.1007/s13311-017-0598-8
69. Denny JE, Powers JB, Castro HF, Zhang J, Joshi-Barve S, Campagna SR, et al. Differential sensitivity to plasmodium yoelii infection in C57BL/6 mice impacts gut-liver axis homeostasis. *Sci Rep* (2019) 9:3472. doi: 10.1038/s41598-019-40266-6
70. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* (2015) 125:926–38. doi: 10.1172/JCI76304
71. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The gut-brain axis: How microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. *Front Immunol* (2020) 11:604179. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179
72. Kleiman SC, Watson HJ, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tarantino LM, Bulik CM, et al. The intestinal microbiota in acute anorexia nervosa and during re-nourishment: Relationship to depression, anxiety, and eating disorder psychopathology. *Psychosom Med* (2015) 77:969–81. doi: 10.1097/PSY.0000000000000247
73. Kang D-W, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, LaBaer J, Adams JB, et al. Reduced incidence of prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One* (2013) 8:e68322. doi: 10.1371/journal.pone.0068322
74. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* (2015) 48:186–94. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016
75. Roy Sarkar S, Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol* (2019) 328:98–104. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.01.004
76. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in meissner's and auerbach's plexuses in cases staged for parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* (2006) 396:67–72. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012
77. Kiebert K, Wunderle KB. Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors: Evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* (2013) 28:1–13. doi: 10.1002/mds.25150
78. Savica R, Carlin JM, Grossardt BR, Bower JH, Ahlsgog JE, Maraganore DM, et al. Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology* (2009) 73:1752–8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c34af5
79. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor parkinson's disease? evidence from 3 cases: Is alpha-synuclein a biomarker for premotor PD? *Mov Disord* (2012) 27:716–9. doi: 10.1002/mds.25020
80. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in parkinson's disease: COLONIC MICROBIOTA IN PARKINSON'S DISEASE. *Mov Disord* (2015) 30:1351–60. doi: 10.1002/mds.26307
81. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, et al. Gut microbiome alterations in alzheimer's disease. *Sci Rep* (2017) 7:13537. doi: 10.1038/s41598-017-13601-y
82. Braniste V, Al-Aasmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* (2014) 6:263ra158. doi: 10.1126/scitranslmed.3009759
83. Luczynski P, Neufeld KAM, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF, et al. Growing up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* (2016) 19:pyw020. doi: 10.1093/ijnp/pyw020
84. Khosravi A, Yañez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* (2014) 15:374–81. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.006
85. Megur A, Baltruikienė D, Bukelienė V, Burokas A. The microbiota–Gut–Brain axis and alzheimer's disease: Neuroinflammation is to blame? *Nutrients* (2020) 13:37. doi: 10.3390/nu13010037
86. Parker A, Fonseca S, Carding SR. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes* (2020) 11:135–57. doi: 10.1080/19490976.2019.1638722
87. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* (2013) 74:720–6. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.05.001
88. Giau V, Wu SY, Jamerlan A, An SSA, Kim SY, Hulme J, et al. Gut microbiota and their neuroinflammatory implications in alzheimer's disease. *Nutrients* (2018) 10:1765. doi: 10.3390/nu10111765
89. Matt SM, Allen JM, Lawson MA, Mailing LJ, Woods JA, Johnson RW, et al. Butyrate and dietary soluble fiber improve neuroinflammation associated with aging in mice. *Front Immunol* (2018) 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01832
90. Rothhammer V, Maccanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate

astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* (2016) 22:586–97. doi: 10.1038/nm.4106

91. Stone TW, Darlington LG. The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders: Kynurenines and CNS disorders. *Br J Pharmacol* (2013) 169:1211–27. doi: 10.1111/bph.12230

92. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* (2006) 444:1022–3. doi: 10.1038/4441022a

93. Lin P, Ding B, Feng C, Yin S, Zhang T, Qi X, et al. Prevotella and klebsiella proportions in fecal microbial communities are potential characteristic parameters for patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* (2017) 207:300–4. doi: 10.1016/j.jad.2016.09.051

94. O'Brien SM, Scott LV, Dinan TG. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* (2004) 19:397–403. doi: 10.1002/hup.609

95. Di Meo F, Donato S, Pardo Di A, Maglione V, Filosa S, Crispi S, et al. New therapeutic drugs from bioactive natural molecules: The role of gut microbiota metabolism in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Metab* (2018) 19:478–89. doi: 10.2174/1389200219666180404094147

96. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* (2014) 34:15490–6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014

97. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-Brain-Gut axis communication. In: Lyte M, Cryan JF, editors. *Microbial endocrinology: The microbiota-Gut-Brain axis in health and disease*. (New York, NY: Springer) (2014) 817:115–33.

98. Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, et al. Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. *Sci Rep* (2015) 5:15699. doi: 10.1038/srep15699

99. Jenkins TP, Peachey LE, Ajami NJ, MacDonald AS, Hsieh MH, Brindley PJ, et al. Schistosoma mansoni infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. *Sci Rep* (2018) 8:12072. doi: 10.1038/s41598-018-30412-x

100. Floudas A, Aviello G, Schwartz C, Jeffery IB, PW, Fallon PG. Schistosoma mansoni worm infection regulates the intestinal microbiota and susceptibility to colitis. *Infect Immun* (2019) 87:e00275–19. doi: 10.1128/IAI.00275-19

101. Duarte-Silva E, Morais LH, Clarke G, Savino W, Peixoto C. Targeting the gut microbiota in chagas disease: What do we know so far? *Front Microbiol* (2020) 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.585857

102. Nascimento BB, Cartelle CT, Novello MdL, Pinheiro BV, Vitor Almeida RW, Souza DdG, et al. Influence of indigenous microbiota on experimental toxoplasmosis in conventional and germ-free mice. *Int J Exp Pathol* (2017) 98:191–202. doi: 10.1111/iep.12236

103. Santos LM, Commodaro AG, Vasquez ARR, Kohlhoff M, Guerra Paula DA, Coimbra RS, et al. Intestinal microbiota regulates tryptophan metabolism following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasit Immunol* (2020) 42:e12720. doi: 10.1111/pim.12720

104. Bereswill S, Kühl AA, Alutis M, Fischer A, Möhle L, Struck D, et al. The impact of toll-like-receptor-9 on intestinal microbiota composition and extra-intestinal sequelae in experimental toxoplasma gondii induced ileitis. *Gut Pathog* (2014) 6:19. doi: 10.1186/1757-4749-6-19

105. Craven M, Egan CE, Dowd SE, McDonough SP, Dogan B, Denkers EY, et al. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal crohn's disease. *PloS One* (2012) 7:e41594.

106. Haag L-M, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kühl AA, Göbel UB, et al. Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal escherichia coli loads abrogate colonization resistance against campylobacter jejuni in mice. *PloS One* (2012) 7:e35988. doi: 10.1371/journal.pone.0035988

107. Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol* (2012) 90:668–75. doi: 10.1038/icb.2011.93

108. Mooney JP, Lokken KL, Byndloss MX, George MD, Velazquez EM, Faber F, et al. Inflammation-associated alterations to the intestinal microbiota reduce colonization resistance against non-typhoidal salmonella during concurrent malaria parasite infection. *Sci Rep* (2015) 5:14603. doi: 10.1038/srep14603

109. McCall L-I, Tripathi A, Vargas F, Knight R, Dorrestein PC, Siqueira-Neto JL, et al. Experimental chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. *PloS Negl Trop Dis* (2018) 12:e0006344. doi: 10.1371/journal.pntd.0006344

110. Luu M, Weigand K, Wedi F, Breidenbend C, Leister H, Pautz S, et al. Regulation of the effector function of CD8+ T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Sci Rep* (2018) 8:14430. doi: 10.1038/s41598-018-32860-x

111. Duarte-Silva E, Maes M, Macedo D, Savino W, Peixoto CA. Shared neuroimmune and oxidative pathways underpinning chagas disease and major

depressive disorder. *Transl Psychiatry* (2020) 10:419. doi: 10.1038/s41398-020-01105-9

112. Zhao Y, Yang S, Li B, Li W, Wang J, Chen Z, et al. Alterations of the mice gut microbiome via schistosoma japonicum ova-induced granuloma. *Front Microbiol* (2019) 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00352

113. Mossad O, Erny D. The microbiota-microglia axis in central nervous system disorders. *Brain Pathol* (2020) 30:1159–77. doi: 10.1111/bpa.12908

114. Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection: Intestinal microbiota and enteric infections. *J Physiol* (2009) 587:4159–67. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172742

115. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, et al. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res* (2018) 1680:13–38. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004

116. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-a drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest* (2012) 122:2454–68. doi: 10.1172/JCI60842

117. Wang Y, Wang Z, Wang Y, Li F, Jia J, Song X, et al. The gut-microglia connection: Implications for central nervous system diseases. *Front Immunol* (2018) 9:2325. doi: 10.3389/fimmu.2018.02325

118. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* (2013) 18:666–73. doi: 10.1038/mp.2012.77

119. Haroon E, Miller AH, Sanacora G. Inflammation, glutamate, and glia: A trio of trouble in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* (2017) 42:193–215. doi: 10.1038/npp.2016.199

120. Yilmaz B, Portugal S, Tran TM, Gozzelino R, Ramos S, Gomes J, et al. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell* (2014) 159:1277–89. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.053

121. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M, et al. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* (2011) 25:397–407. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.023

122. Zaylaa M, Kassaa AI, Alard J, Peucelle V, Boutilier D, Desramaut J, et al. Probiotics in IBD: Combining *in vitro* and *in vivo* models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *J Funct Foods* (2018) 47:304–15. doi: 10.1016/j.jff.2018.05.029

123. Al-Rashidi HE. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi J Biol Sci* (2022) 29:1628–43. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.10.068

124. Erny D, Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. neurosci.* (2015) 18:965–77. doi: 10.1038/nn.4030

125. Reddy DS, Wu X, Golub VM, Dashwood WM, Dashwood RH. Measuring histone deacetylase inhibition in the brain. *Curr Protoc Pharmacol* (2018) 81:e41. doi: 10.1002/cpph.41

126. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front Endocrinol* (2020) 11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025

127. Soliman ML, Puig KL, Combs CK, Rosenberger TA. Acetate reduces microglia inflammatory signaling. *in vitro J Neurochem* (2012) 123:555–67. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07955.x

128. Taylor DL. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor -induced neurotoxicity in concert with microglial-derived fas ligand. *J Neurosci* (2005) 25:2952–64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4456-04.2005

129. Matute C, Domercq M, Sánchez-Gómez M-V. Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance. *Glia* (2006) 53:212–24. doi: 10.1002/glia.20275

130. Gonzalez-Santana A, Diaz Heijtz R. Bacterial peptidoglycans from microbiota in neurodevelopment and behavior. *Trends Mol Med* (2020) 26:729–43. doi: 10.1016/j.molmed.2020.05.003

131. Alard J, Peucelle V, Boutilier D, Breton J, Kuyle S, Pot B, et al. New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. *Benef Microbes* (2018) 9:317–31. doi: 10.3920/BM2017.0097

132. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, Luca De A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* (2013) 39:372–85. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003

133. Liu T, Li J, Liu Y, Xiao N, Suo H, Xie K, et al. Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B pathway in RAW264.7 cells. *Inflammation* (2012) 35:1676–84. doi: 10.1007/s10753-012-9484-z

134. Lee Y-J, Park CE, Kim JH, Sohn HJ, Lee J, Jung SY, et al. *Naegleria fowleri* lysate induces strong cytopathic effects and pro-inflammatory cytokine release in rat microglial cells. *Korean J Parasitol* (2011) 49:285. doi: 10.3347/kjp.2011.49.3.285

135. Kaelberer MM, Rupprecht LE, Liu WW, Weng P, Bohórquez DV. Neuropod cells: The emerging biology of gut-brain sensory transduction. *Annu Rev Neurosci* (2020) 43:337–53. doi: 10.1146/annurev-neuro-091619-022657

136. Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, et al. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* (2011) 60:1050–9. doi: 10.1136/gut.2010.232918

Partie II : TRAVAUX DE RECHERCHE

« Les conceptions les plus hardies, les spéculations les plus légitimes, ne prennent un corps et une âme que le jour où elles sont consacrées par l'observation et l'expérience » Louis Pasteur (1868)

STRATÉGIES

La première partie de cette thèse a permis de souligner l'interaction entre Plasmodium, le microbiote intestinal et la réponse immune de l'hôte. Mais la contribution du microbiote intestinal dans la pathogénèse du neuropaludisme reste encore à déterminer. C'est pourquoi, la seconde partie se subdivisera en 3 chapitres correspondant à mes travaux de recherche. Ces derniers ont pour objectif de déterminer si le microbiote intestinal est capable de moduler le développement du neuropaludisme, d'identifier les bactéries potentiellement capables d'influencer la neuro-inflammation induite par l'infection et préciser les mécanismes d'action du MI dans le neuropaludisme. Pour cela nous nous sommes concentrés sur l'étude de la réponse neuro-inflammatoire dans des modèles de souris sensibles (C57BL/6) (article 1) et résistantes au neuropaludisme (B6.WLA.Berr2) (article 2) chez lesquelles nous avons induit une modification du microbiote intestinal par utilisation d'un cocktail d'antibiotiques avant infection comme preuve de concept. De cette preuve nous avons ensuite étudié l'effet d'un renforcement du microbiote intestinal par l'utilisation de bactéries potentiellement probiotiques sur le développement du neuropaludisme (projet PROMAL). Ce projet a permis d'aboutir à une déclaration d'invention sur l'utilisation de ces bactéries dans les troubles neuro-inflammatoires d'origine infectieuses et/ou auto-immunes (SATT Nord). Ce implique donc une certaine confidentialité sur l'ensemble des données soumis à une clause de confidentialité.

Les résultats obtenus de ces études permettront de mieux comprendre les liens entre les maladies infectieuses, le MI et la neuro-inflammation. Par ailleurs, l'identification de souches potentiellement probiotiques ouvrira la voie à de nouvelles options de traitement et/ou de prévention, en complément de drogues antipaludiques existantes. Plus généralement, ces résultats pourront servir de base pour des études plus approfondies pour une utilisation des probiotiques à action anti-inflammatoire identifiée contre les troubles neuro-inflammatoires. Nous espérons à terme, proposer un complément thérapeutique sans risque et peu coûteux à combiner avec les drogues antipaludiques dans la prise en charge et le traitement des patients.

Impact du microbiote intestinal sur le développement du neuropaludisme (Article 1)

Contexte du travail

Cette étude s'intéresse à l'interaction tripartite entre le cerveau, le parasite *Plasmodium* et le microbiote intestinal au cours du neuropaludisme expérimental. En se basant sur les données de la littérature concernant l'axe intestin-cerveau dans les maladies neuro-inflammatoires, nous avons émis l'hypothèse qu'une modification du microbiote intestinal pourrait contribuer à l'inflammation cérébrale exacerbée suite à l'activation des cellules gliales et le recrutement de lymphocytes T dans le SNC lors d'un NPE. La stratégie de cette étude repose sur la modification du microbiote intestinal par traitement antibiotique avant infection par *PbA* dans un modèle murin sensible au neuropaludisme (C57BL/6). L'objectif est de déterminer si cette modification agira sur les processus inflammatoires associés au neuropaludisme. Le second objectif est de déterminer les liens entre la diversité microbienne et l'inflammation cérébrale et identifier la ou les bactéries impliquées dans physiopathologie. Des travaux sur le rôle du microbiote intestinal dans les maladies neurodégénératives ont permis de faciliter le diagnostic ou d'apporter de nouvelles pistes préventives et/ou thérapeutiques. Notre étude permettra de démontrer que ces observations peuvent s'appliquer également dans le contexte des parasitoses inductrices de neuro-inflammation. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article soumis dans le journal Gut

microbes, en 2023. 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.

Modified gut microbiota regulates neuro-inflammation and controls cerebral malaria

Jérémy Allo¹, Inès Leleu¹, Kévin Néron¹, Rajeev K. Tyagi⁴, Corinne Grangette², Nicolas Tchitchek³ and Sylviane Pied^{1#}

^{1,2} Univ. Lille, CNRS UMR 9017-INSERM U1019, Center for Infection and Immunity of Lille-CIIL, Institut Pasteur de Lille, F-59019 Lille, France

³Sorbonne Université, INSERM, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (i3), Paris, France.

⁴Division of Cell Biology and Immunology, Biomedical Parasitology and Translational-immunology Lab, CSIR-Institute of Microbial Technology (IMTECH), Chandigarh, India.

* Corresponding author: sylviane.pied@pasteur-lille.fr (SP); CIIL, Team TBIP, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille cedex, France.

Running Title: CM is controlled by gut microbiota

Keywords:

Cerebral malaria, gut microbiota, dysbiosis, astrocytes, microglia, *Plasmodium berghei* ANKA, neuroinflammation

6340 words including introduction, material & methods, results & discussion.

Abbreviations	
ABX	Antibiotics
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
BBB	Blood brain barrier
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
cDNA	Complementary DNA
CFUs	Bacterial colonies forming units
CM	Cerebral malaria
CNS	Central nervous system
CTRL	Control
dpi	Day post infection
ECM	Experimental cerebral malaria
FCS	Fetal calf plasma
HDAC	Histone deacetylases
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
iRBC	Infected red blood cells
LDA	Linear discriminant analysis
<i>PbA</i>	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
pCD8 T cells	Pathological CD8 T lymphocytes
PCoA	Principal Coordinate Analysis
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfEMP-1</i>	<i>Pf</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
RBC	Red blood cells
SCFA	Short chain fatty acids
SD	Standard deviation
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

Abstract (295 words)

Cerebral malaria (CM) is a parasitic neuroinflammatory disease caused by *Plasmodium falciparum* infection. The neuropathophysiological process is mainly associated with the sequestration of parasitized erythrocytes in brain microvessels and the activation of pro-inflammatory astrocytes and microglial cells. This creates a neurotoxic environment through the production of inflammatory mediators and the local recruitment of pathological CD8⁺ T lymphocytes. The critical role of the gut-brain axis highlighted the importance of the gut microbiota in modulating the brain inflammation in different neuro-inflammatory settings such as Alzheimer's disease or multiple sclerosis. These diseases share inflammatory mechanisms similar to that seen in CM. Using a mouse model of experimental CM (ECM), we showed modifications in the composition of the gut microbiota with greater abundance of *Alistipes* and *Ligilactobacillus* and lower level of *Akkermansia* in ECM⁺ mice. These gut dysbiosis promotes the inflammatory response of astrocytes and microglial cells and the development of CM. Conversely, the administration of an antibiotic cocktail modified the composition of the microbiome evaluated by 16S rRNA sequencing and protected mice from CM. Notably a predominance of *Enterococcus faecalis* was observed in protected mice, which was correlated with an increased plasma level of acetic acid and a decrease of propionic acid. In addition, changes in the gut microbiota restored the integrity of brain and intestinal barriers and led to a marked reduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the brain of infected mice. The flow cytometry analysis of astrocytes and microglia confirmed the reduced inflammatory phenotype in the antibiotics-treated and infected mice. This allowed the protection against ECM development. The anti-inflammatory responses observed in the later, were associated with an increased level of *Burkholderia*, *Enterococcus faecalis* in the gut microbiome. Overall, the gut microbiota can control the brain inflammation by modulating the glial cells activity during CM.

Introduction

Cerebral malaria (CM) is one of the deadliest complications of *Plasmodium falciparum* (*Pf*) infection. Nearly 627,000 deaths were reported mainly in Africa due to CM in 2020¹. Pregnant women and children under five-years old were the most affected¹. CM patients develop paralysis, diffuse encephalopathy, and unconsciousness that progressed to coma and death in 10-15% of severe malaria cases². Untreated patients infected with the drugs resistant-*Pf* who progress to CM have an almost exclusively fatal outcome. Twenty five percent of children who survived CM developed transient or permanent neurological sequelae³.

CM is a multisystemic and complex neuropathophysiology characterized by an exacerbated inflammation depending on two major events taking place in human and in experimental models, i) the cerebral sequestration of infected red blood cells (iRBC) in brain microvessels and ii) the activation of inflammatory phenotype and functions of astrocytes and microglial cells leading to a systemic response during the infection⁴. Parasite sequestration is associated with the adhesion of iRBC to endothelial cells notably via the *Pf* Erythrocyte Membrane Protein 1 (*Pf*EMP-1) expressed on parasitized RBCs. The latter is known to interact with CD36, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)⁵. These factors favor the iRBC's aggregation and local obstruction of brain microvessels which promote the reduction of blood flow, hypoxia and metabolic failure. Besides, mentioned cellular events contribute to breaching the blood brain barrier (BBB)².

Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system (CNS) and are key players in maintaining the integrity of the BBB, regulating brain immune response and establishing the immune-homeostasis (survival, differentiation, synaptogenesis,...) mediated by the neurotrophic factors⁶. Microglia represents 10% of the brain cells and are involved in the immune surveillance, matrix detoxification and sculpting of neuronal synapses by the secretion of soluble factors, neurotrophic factors and chemoattractants⁷. The astrocytes and microglia are instrumental in the

internalization of *Plasmodium* microvesicles or in the phagocytosis of iRBCs during ECM in C57BL/6 (B6) mice infected with *P. berghei* ANKA (*PbA*)⁸. Their activation contributes to the local secretion of pro-inflammatory cytokines (INF- γ , CCL-2, TNF- α) and chemokines, notably CXCL-10, a biomarker of Human CM⁹. The latter plays a key role in the recruitment and selective migration of pathological CD8⁺ T lymphocytes into the brain parenchyma^{10,11}. CD8⁺ C-X-C motif chemokine receptor 3⁺ (CXCR3⁺) T cells participate in the pathological mechanism contributing to ECM by the secretion of granzyme and perforin and/or by the production of INF- γ and TNF- α ¹². Release of pro-inflammatory factors by the glial cells and the recruitment of T cells in the brain creates a neurotoxic environment for the neurons and break the BBB. Controlled brain resident innate immune cells during infection lead to protection against the locally triggered pro-inflammatory response induced during ECM^{8,10}.

The gut microbiota reportedly modulates the BBB integrity as well as the activity of brain cells in several neuroinflammatory diseases¹³. It is a consortium of microorganisms mainly composed of bacteria¹⁴. Although the gut bacteria are not in direct contact with the glial cells, they can modulate their activity by secreting a variety of metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA), tryptophan derivatives and neuromodulators as it has been shown in certain pathological conditions^{15,16}. These metabolites can cross the BBB and impact glial cells activity to mount the neuroinflammation^{17,18}. The SCFA, acetate, propionate and butyrate are known to exhibit anti-inflammatory effects and to maintain the integrity of BBB^{18,19}. Also, these SCFA and other metabolites modulate CNS cell activity to limit or reduce the brain inflammation^{18,19}. Notably, these metabolites inhibit histone deacetylases (HDAC) that reduce the pro-inflammatory activity of astrocytes and microglia cells^{20,21}.

Recent reports suggest a role of the gut microbiota in the modulation of inflammatory processes mounted during neurological diseases. For example, alteration in the composition of gut microbiota is associated with the pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's disease or multiple sclerosis in mice and in human²²⁻²⁴. Hence, the administration of SCFA, tryptophan derivatives or the fecal microbiota

transplantation (FMT) has been shown to reverse the pathology as well as to confer protection against neuroinflammatory diseases^{22–24}. The close association between the gut microbiota and *Pf* infection in children or *PbA* infection in mice has been reported^{25–27}. The healthy gut microbiota can restrain the parasite growth in human and mice by modulating the immune response²⁵. Therefore, it is imperative to better understand the interactions between the gut microbiome and the immune responses in the local environment of brain during the malaria-associated neuropathogenesis. In the present work, we reported for the first time the impact of the gut microbiota on ECM pathology. We highlighted alterations in the composition of gut microbiota and their impact on neuroinflammation elicited during ECM. Our work showed that manipulating the gut microbiome through the use of antibiotics (ABX) conferred protection to ECM in the susceptible C57BL/6 mice infected with *PbA*²¹. Moreover, this protection was associated with an increased abundance of *Burkholderia* and *Verrucomicrobia* bacteria and a higher systemic level of acetate. Finally, these changes reduce the inflammatory response of astrocytes and microglial cells, and brain infiltration by pathological CD8⁺CXCR3⁺ T cells.

Materials and methods

Mice

6-8 weeks old male and female C57BL/6 mice (Janvier laboratories, C57BL/6JR) were kept in standard conditions in the animal facility of the Pasteur Institute of Lille. All animal experiments were performed following institutional guidelines for animal care and use. This study was approved by the French Animal Health Committee “Ministère de l'Agriculture et de la Pêche” no. 75485 for carrying out animal experiments in accordance with French (Decree 87–848 of 19/10/1987) and European (Directive 86/609/EEC) regulations on the care and protection of laboratory animals (APAFIS#22021-2019091715283871v4).

Parasite and infection

Mice were given the infectious challenge with 10^6 RBCs infected with clone 1.49L of the *PbA* parasite (from Dr. D. Walliker, Institute of Genetics, Edinburgh, UK) through the intraperitoneal route of administration. Uninfected mice were used as negative controls. C57BL/6 infected mice developed neurological symptoms 6 to 10 days post-infection (ECM⁺) unlike mice which did not develop cerebral symptoms that died later from hyperparasitemia. Following the infection, mice were monitored twice daily and parasitemia levels were determined by the percentage of iRBCs on giemsa (Sigma Aldrich, USA)-stained blood smears from the tail vein every three days interval. For clinical monitoring, regular observations of morbidity and clinical symptoms of ECM (atony, hemi-tetraplegia, head deviation, lack of self-preservation reflex, bristle hair, convulsion) and hyperparasitemia were performed. All mice were euthanized between 6- and 8-days post-infection.

Modification of the gut microbiota by antibiotics treatment

For treatment with antibiotics, mice were orally (in drinking water) treated *ad libitum* during 3 weeks with a cocktail of antibiotics ampicillin (1 g/L) (Sigma Aldrich, A1593, USA), neomycin sulfate (1 g/L) (Euromedex, UN1015-B, Germany) and metronidazole (1 g/L) (Acros Organics, 210340050,

China) and glucose (5 g/L) (Sigma, A1593, USA) (**Figure 1A**). The water bottles containing the antibiotic cocktail were shaken once every day and changed each week.

Assessment of brain permeability

BBB permeability was assessed at day 7 following *PbA* infection for each experimental group (n=8-14) using the Evan's blue assay. Briefly, mice were intravenously injected with 100 μ L of 2% Evans blue (Sigma, E2129-100G, USA) in 1X PBS. After 1 hour, brains were surgically removed, weighted, and placed in 2mL of 100% formamide (Merck, Germany) for 48 hours at 37°C to extract the Evans blue dye and the absorbance was measured at 620nm. Experiments were carried out in triplicates. Evans blue concentration per gram of brain tissue was calculated from a standard curve ((0 μ g/mL to 500 μ g/mL).

Assessment of gut permeability

6-8 week-old mice were fasted for 6 hours and 4-kDa FITC dextran (600 mg/kg body weight) (Sigma-Aldrich, USA) was applied by gavage at a single dose. After 1 hour, blood was collected into heparinized tubes and plasma collected after centrifugation for 3 minutes at 4°C, 12000g, and diluted 1:2 in 1X PBS. Fluorescence was measured by spectrophotometry (Spark 10M multimode microplate reader, Tecan, Austria) in 96-well plates (excitation: 485nm; emission: 535nm), and a standard curve was defined by the serial dilution of FITC-Dextran in plasma ranging from 0 μ g/mL to 500 μ g/mL.

Anaerobic culture of bacteria and quantification

Feces from control and infected mice were collected before and after the antibiotic treatment as well as after the infection and stored at -80°C. Each stool was weighed, homogenized and serially diluted in thioglycolate medium (Sigma Aldrich, USA) before culture on Petri dishes in thioglycolate medium containing agar (BD, Bacto Agar, USA). Petri dishes were then placed in anaerobic conditions at 37°C for two nights prior to the counting of bacterial colonies forming units (CFUs).

Gut microbiota profiling

Four group of mice were constituted (n=5 per group); uninfected and untreated control mice (CTRL), antibiotics-treated uninfected mice (ABX), *PbA* infected mice (*PbA*), and antibiotics-treated and infected mice (ABX+*PbA*). Fecal samples were collected from each group at 5, 6 and 7 days post infection. Fecal samples were then flash frozen in nitrogen liquid and stored at -80°C until use. The gut microbiota composition was then analyzed by Biomnigene, Besancon, France). DNA extraction of fecal samples was performed using the E.Z.N.A stool DNA kit (Omega Bio-tek, D4015-02, USA). The DNA quantity and quality were checked by Nano spectrophotometry (Implen NP80, Thermo Fischer, France). PCR amplification and sequencing were carried out using 6 primers forward and 7 primers reverse (**Supplementary Table 1**). The PCR was performed with the AccuStart™ II PCR SuperMix (VWR, USA), followed the thermal cycling protocol : an initial denaturation step at 95°C for 10 min, 37 cycles at 95°C for 20s, 55°C for 20s and 70°C for 1min; and a terminal elongation at 70°C for 1min. The final amplified PCR products were analyzed on Quiaxcel (Quiagen, USA) with a high-resolution cartridge (Quiaxcel DNA High Resolution Cartridge, 1050450, USA) and then purified by electrophoresis on PippinHT (SageScience, USA) on 1.5% agarose gel (SageScience, 9789221832, USA). The library quality was assessed on the Qubit4.0 Fluorometer (Thermo Scientific, France). Finally, the sequencing libraries were generated using the MiSeq Reagent kit v2 (Illumina, MS-102-1003, USA) on MiSeq (Illumina), and 251pb paired-end reads were generated (average of 134 Gbp (322 160 reads) per sample).

16S data processing and analysis

Paired end reads were assigned to biological samples based on their unique barcode and truncated on 3' to suppressed bases beyond 236pb. Filtering of the tags was performed with QIIME2 according to their quality (raw with 2 or more sequencing errors predicted on their q-score are removed). Denoising and suppression of chimeric sequences with a parameter of p-min-fold-parent-over-abundance equal to 3 was done. Then, reads with a minimum of 5pb overlapping were assembled. OTU abundance

information was normalized using a standard sequence number corresponding to the sample with the less sequences. Subsequent analyses of alpha diversity (Shannon index) and beta diversity (weighted UNIFRAC analysis) were performed based on these normalized data. Beta diversity analysis was used to evaluate the differences of the samples in terms of species complexity.

SCFA dosage

The SCFA dosage was done in caecum and plasma by the Metatoul lipidomic platform (INRA, UEPSD, France). Briefly, feces samples were resuspended in 500 μ L of autoclaved distilled water and Ethanol-OH mix (1:1), stored at 4°C for 2 hours. After centrifugation (15 min, 5000 rpm at 4°C) the supernatants were filtered (5 min, 15000 rpm, 4°C). Plasma were diluted in cold methanol (1:1) and stored on ice 10 min before to be centrifuged (5 min, 5000 rpm, 4°C). Then an internal standard was added to the plasma and caecum supernatants before performing the analysis according to the standard protocol of the platform by gas chromatography (Parkin Elmer autosystem, Switzerland) equipped with a Polyethylene Glycol Nukol Column (15mmX0.53mmX0.5 μ m, Supelco, Germany). SCFA quantification were done by an internal calibration with the 2 ethyl-butyrate (Supelco, Germany) and expressed as nmol/mg or nmol/ μ L sample.

Cytokines/chemokines quantification

LEGENDplex Mouse cytokine array (BioLegend, #741024, France) was used to define cytokines and chemokines profiles in the plasma of all experimental mouse groups (ECM CTRL, ABX, *PbA* and *ABX+PbA*). Levels of IFN- γ , IL-10, IFN- α , CXCL-10, TNF- α , IL-6, CCL-2, were quantified by flow cytometry on beads. The cytokine analysis was repeated in duplicate according to the manufacturer's instructions, and results were compared to a standardized concentration curve that allows the absolute cytokine quantification.

RNA extraction, quantification and RT-qPCR

Whole-brain and spleen samples from all mouse groups were first homogenized in RLT Lysis Buffer (Quiagen, France) using a Polytron homogenizer. Further, total RNA was isolated using the Nucleospin RNA kit (Machery Nagel, 740,955.250, France) and processed for complementary DNA (cDNA) synthesis using the SuperScript Vilo system (Invitrogen, 11,754,250, France) and the thermocycler C1000 (BioRad, France) run steps : 10 min at 25°C, 60 min at 42°C and 5 min at 85°C. RT-qPCR was done on 2,5ng of cDNA mix with primers (**Supplementary Table 2**) and Syber Green Master Mix (ThermoFischer Scientific, 4,385,612, France), using the Quantstudio™12KFlex Real-time PCR system (ThermoFischer Scientific, France), for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1min at 60°C. Expression of *Ccl-2*, *Cxcl-10*, *Tnf-α*, *Ifn-γ*, *Ifn-α*, *Il-10* and *Il-6* genes were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 gene (HPRT1) was used as a housekeeping gene.

Real-time PCR based array

A RT² Profiler™ PCR Array (PAMM-150Z, Qiagen, 330231, USA) was used on RNA purified from sorted astrocytes to screen a panel of 86 pro/anti-inflammatory cytokines and chemokines genes. RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above. The qPCR was performed on an Applied Biosystems Quantstudio (ABI, USA), according to the RT² Profiler PCR Array instructions, under the following conditions: 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Each array contained five separate housekeeping genes (*Adipoq*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp6* and *Bmp7*) that were used to normalize the data by calculating the ΔC_t for each gene of interest.

Brain and splenic cells isolation

Brain cells were isolated by mechanic dissociation using the trypsin-based neural tissue dissociation kit (Miltenyi Biotec, France), as described by Keswani et al. Cells were then purified using a 30% Percoll gradient. RBCs were removed with Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) lysis buffer containing 0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃ and 0.1mM EDTA-Na₂. Cells were then washed in 1X PBS

with 10% fetal bovine serum (FBS) (Merck, Germany) before staining. Alive cells were estimated by microscopy using trypan blue (Merck, Germany). Spleens from each group of mice were collected at 6.5 days post-infection and then mechanically dissociated and filtered. Then the spleen cells were washed by centrifugation at 1600 rpm for 5 min at 4°C. RBC were lysed using ACK lysis buffer, and cells were resuspended in PBS-10% FCS before counting live cells using trypan blue.

Cells staining, flow cytometry analysis and astrocyte sorting

The splenic and brain cells were distributed on a 96-well plate and stained at 4°C in 1X PBS-10%FCS by adding a mixture of monoclonal antibodies against various extracellular lineage markers, as indicated in the **Supplementary Table 3**. For fixation and permeabilization, cells were incubated for 30 min at 4°C in Cytofix/cytoperm buffer (BD Cytofix/Cytoperm, 554514, USA). For intracellular staining, cells were incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies (**Supplementary Table 3**) in 1X PBS-10% FBS during. Cell pellets were resuspended in 1X PBS-10% FCS before the acquisition on LSR Fortessa (Becton Dickinson, USA) with a stopping gate at 2×10^5 to 1×10^6 events. The results were analyzed using the FlowJo software (version 10.9). For astrocyte sorting, brain cells were stained with anti-GLAST-APC antibody (Miltenyi Biotech, #130-0955-814, France) and at least 2×10^6 astrocytes cells per sample were sorted using the FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson, USA). Gating strategy is indicated on **Supplementary Figure 1**.

Statistical analysis

Wilcoxon-Mann-Whitney test, analyses of variance (one-way ANOVA), followed by -Tukey's multiple comparison test were performed using GraphPad Prism (Version 9, GraphPad software, Inc.). Comparisons of survival curves were done using the Log-Rank (Mantel Cox) test. Data were expressed as a mean or median $\pm$ standard deviation (SD). The *P* values indicate statistical significance as **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001.

Results

Antibiotics treatment altered gut microbiota and conferred protection to ECM

The experimental alterations in the gut microbiota composition were made by the antibiotics (ABX) treatment to the C57BL/6 (B6) mice for 3 weeks before animals receiving the infectious challenge with *PbA*-iRBCs (ABX+*PbA*) (**Figure 1A**). A significant percentage (50%) of mice from ABX+*PbA* group survived whereas 90% of *PbA* infected and untreated mice (*PbA* group) developed the neurological syndrome (ECM⁺) and died between 6.5 to 10 days post-infection (**Figure 1B**). Our data did not show a significant difference in the parasite growth (% parasitemia) between the infected groups (**Figure 1C**). Also, the morbidity was marked by a similar loss in weights of animals (**Figure 1D**). A robust increase in the permeability of BBB was seen in the mice developing ECM⁺ as compared to control mice (**** $p < 0.0001$). On the contrary, the permeability of BBB was less pronounced in the ABX+*PbA* mice not developing ECM compared to CTRL (* $p < 0.05$) or ABX mice (* $p < 0.05$). This finding was further confirmed by the higher quantity of Evans blue present in the brains of perfused mice (**Figure 1E**). Moreover, the increased intestinal permeability in the mice with ECM⁺ (*PbA*) was characterized by a higher plasma level of FITC-dextran compared to that seen with the CTRL group. Whereas no permeability was detected in ABX+*PbA* group only in mice not developing ECM. ECM⁺ mice exhibited significantly (** $p < 0.01$) lower FITC-dextran levels as compared to *PbA* (**Figure 1F**). Our data highlighted that those changes made to the gut microbiome by ABX treatment prior to the infection refrained mice from developing ECM without affecting the parasite burden.

Protection against ECM is associated with alterations in the gut microbiota composition

We next compared the fecal bacterial composition in the different groups of mice to identify signatures in the gut microbiota that could promote lethal neuroinflammatory or protective responses in *PbA*-infected B6 mice.

A decreased fecal bacterial abundance was seen in ECM⁺ (*PbA*) *versus* CTRL mice. A significant drop in the bacterial abundance was also observed in ABX treated mice (**Figure 2A**). We then analyzed the diversity of the microbiome by 16S rRNA sequencing. The analysis of the alpha-diversity (based on the Shannon index, a parameter that measures the overall community heterogeneity) showed lower species diversity in ABX+*PbA* *versus* *PbA* (*****p*<0.0001) and *versus* ABX (*****p*<0.0001) (**Figure 2B**). In addition, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) representing the beta-diversity demonstrated that ECM⁺ mice segregated distinctly from CTRL and ABX+*PbA* group (**Figure 2C**). Hence, our data highlights the specific changes made to the gut microbiota composition by either *PbA* infection or ABX before infection with *PbA*.

We next quantified the relative abundance of the different bacteria taxa to identify the main families and genera in different conditions. The gut microbiota of *PbA* infected mice was enriched in *Muribaculaceae* (12.20%) and depleted in *Akkermansia* (0.056%). The loss of bacteria in ABX-treated animals was associated with a greater abundance of *Lachnospiraceae* (5.33%) and UBA7173 (2.47%) *versus* CTRL (**Figure 2D**).

Our investigation suggests that the gut microbiota composition in ABX+*PbA* group was heterogeneous. However, the protection against ECM seems to be associated with the predominance of bacteria from the *Enterococcus* genus (Bacillota/Firmicutes) and, more precisely *Enterococcus faecalis* (73.44%), *Burkholderia* (Gammaproteobacteria) (91.11%) and unidentified bacteria (77.75%) not present in ECM⁺ mice (**Figure 2D**).

Discrimination of the different bacteria genera affected by the infection and/or the antibiotics treatment

To discriminate the bacteria genera that significantly differ in each group, we performed a LEFSE analysis coupled with taxonomic abundance heatmaps. The comparative analyses was made between CTRL *versus* ABX, CTRL *versus* *PbA*, and *PbA* *versus* ABX+*PbA* only. We observed that the

development of ECM is associated with the increase of *Ligilactobacillus* and *Alistipes* in *PbA* versus CTRL (**Figure 3A and 3B**). When compared with the CTRL mice, the ABX treatment abrogated the total bacteria number and favored the persistence of *Corynebacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Alkalibacterium*, *Facklamia* and *Sporosarcina* species (**Figure 3C and 3D**). No increase in *Ligilactobacillus* and *Alistipes* was observed in the ABX+*PbA* mice versus ECM⁺ mice (4 to 5 log 10 abundance) (**Figure 3E and 3F**). *Burkholderia* was the most discriminant taxa in the ABX+*PbA* versus *PbA* comparison.

Modified gut microbiota in ABX-treated and infected mice lead to a change in the SCFA profiles

The bacteria families of the gut microbiota produce a large panel of metabolites including short chain fatty acids (SCFAs) with immunomodulatory activities^{15,18}. Caecum and plasma levels of SCFAs were determined in different groups of mice. We observed a significant reduction in the concentrations of acetate, butyrate and propionate in the caecum of ABX and *PbA* versus CTRL (**Figure 4A**). Moreover, acetate (*p<0.05), butyrate (**p<0.001) and propionate (*p<0.05) levels were significantly lower in the caecum of ABX+*PbA* versus *PbA* (**Figure 4A**). The decreased concentration of SCFA seen in the caecum of ECM⁺ versus CTRL mice were corroborated by their low levels in plasma levels, while acetate was greater in ABX+*PbA*-protected mice, and no reduction in butyrate was observed (**Figure 4B**). Collectively, our data suggest that disturbance of the gut microbiota induced by *PbA* infection could be partly implicated in ECM pathogenesis through the production of SCFA and is partially restored by ABX treatment.

Impact of the gut microbiota modification on the inflammatory response of astrocytes and microglial cells in *PbA* infected mice

We next analyzed the impact of manipulating the gut microbiota through ABX treatment on the phenotype and function of astrocytes and microglia, two major populations of glial cells involved in the production of pro-inflammatory factors in the brain during ECM. We performed a flow cytometry analysis on astrocytes and microglial cells isolated from CTRL, *PbA*, ABX, and ABX+*PbA* groups. As expected, we observed a more significant number of activated astrocytes (GLAST⁺GFAP⁺) in *PbA* group *versus* CTRL, whereas no change was noticed in ABX+*PbA* (**Figure 5A**). A significant drop in the number of GLAST⁺GFAP⁺ astrocytes expressing MHC-I and II molecules was observed in ABX+*PbA* *versus* *PbA* (**Figure 5B**). The total number of microglial cells (CD11b⁺CD45^{Low} CD16/32⁺, MHC-I⁺, MHC-II⁺) was greater in *PbA* *versus* CTRL and remained at the level of *PbA* in the ABX+*PbA* (**Figure 5C, 5D**).

We next analyzed the inflammatory response of astrocytes and microglial cells in the different groups of mice by quantifying the number of activated cells producing IFN- γ , TNF- α , CXCL-10 and CCL-2. A significant loss of the number of activated astrocytes producing CXCL-10, CCL-2 or TNF- α was seen in ABX+*PbA* *versus* *PbA*. However, no changes in the astrocyte population secreting IFN- γ was observed (**Figure 5E**). As for astrocytes, ABX treatment prior to infection led to a decrease of microglial cells producing CXCL-10 and CCL-2 (**Figure 5F**).

We then confirmed the decrease of the pro-inflammatory cytokines in astrocytes sorted from brains of CTRL, *PbA* and ABX+*PbA* groups of mice using RT² Profiler PCR Array. Indeed, our data showed the induction of *Ccl22*, *Ccl12* and *Cxcl12* chemokines with *Tgfb*, *Il15*, *Il4*, *Il27* cytokines and *Ltb*, *Lif* and *Bmp4* in ABX+*PbA* *versus* *PbA* (**Figure 6A, 6B**).

We next determined whether altered astrocyte activity may inhibit the pro-inflammatory cytokine environment locally (brain) and systemically (plasma). Hence, we quantified the expressions of *Ccl2*,

Cxcl10, *Ifna*, *Ifny*, *Il10*, *Il6* and *Tnfa* by qPCR in brain and the corresponding protein levels by flow cytometry in plasma. The heatmap analysis for each cytokine suggested that the pro-inflammatory response was significantly lowered in the brain and plasma of ABX+*PbA* mice compared to *PbA* group (**Figure 7**). Indeed, we observed a significant decrease in *Ccl2*, *Cxcl10*, *Ifny*, *Il10*, *Il6* and *Tnfa* expression in the brain of ABX+*PbA* versus *PbA* (**Figure 7A**). Moreover, the plasmatic levels of these pro-inflammatory factors were also reduced in the ABX+*PbA* for CXCL-10 (***p*=0.001), IFN- γ (*****p*=0.0001), IL-6 (***p*=0.017) CCL-2 (***p*=0.0069) when compared with *PbA* group (**Figure 7B**). Altogether these data showed that manipulating the gut microbiota conferred protection against ECM by hindering the activation of inflammatory function of astrocytes and inhibiting the proliferation of M1 microglial cells.

The anti-inflammatory response driven by the modified gut microbiome inhibits CD8⁺ T cells accumulation in the brain of *PbA* infected mice

ECM manifestation is associated with the recruitment in the brain of CD8⁺ and CD4⁺ T cells expressing CXCR3 which is promoted by the secretion of CXCL-10 by astrocytes and microglial cells. Hence, we assessed the T cell subpopulations recruited in the brain of ECM⁺ compared with ABX+*PbA* mice. A slight but significantly lower number of CD3⁺ T cells was observed in ABX+*PbA* versus *PbA*. Moreover, in *PbA* and ABX+*PbA* mice nearly 95% of brain T cells expressed CXCR3⁺. A significant reduction of CD8⁺CXCR3⁺ T cells (***p*<0.01) and CD4⁺CXCR3⁺ T cells (**p*<0.05) was seen in brain of ABX+*PbA* versus *PbA* group at 6.5 days post-infection (**Figure 8**). The pathological CD8⁺CXCR3⁺ T cells are known to migrate from spleen to brain during ECM²⁸. Therefore, we investigated the splenic T cell subpopulations in all groups of mice (CTRL, *PbA*, ABX, ABX+*PbA*). Our data showed a significant reduction of the total number of splenic CD4⁺ (****p*<0.001), CD8⁺ (*****p*<0.0001) and CXCR3⁺CD8⁺ T cells (****p*<0.001) in ABX+*PbA* versus *PbA* (**Supplementary Figure 2**). Therefore, modification of the gut microbiota prior to the infection leads to the decreased activation and/or

expansion of splenic T cells and their ability to migrate to the brain. Overall, these observations suggest that protection against ECM induced by the antibiotic treatment is associated with the controlled pro-inflammatory response of glial cells, particularly in the number of astrocytes producing IFN- γ , CXCL-10, CCL-2 and TNF- α .

Correlation between gut microbiome, metabolites and inflammatory processes in *PbA* infection outcome

Using PCA, we conducted a correlation analysis between discriminative bacterial genera, metabolites and neuroinflammatory factors at the systemic level, in plasma (**Figure 9**). The PCA analysis showed a clear discrimination of each group of mice. PC1 (57.47% variables) discriminated *PbA* and ABX+*PbA* groups while PC2 (12.81%) segregated CTRL and ABX groups (**Figure 9A**). SCFA levels in caecum (acetate, valerate, butyrate, propionate ...) were the main contributor of PC1. However, brain expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and CXCL-10 contributed to the PC2 and clearly characterize ECM⁺ mice (**Figure 9A**). Since bacteria (*Ligilactobacillus* and *Alistipes*) and SCFA (valerate and octanoate) contributed to ECM (PC1: 53.22%), this furthered the hypothesis that altered abundance of bacteria species and plasma level of SCFA may contribute together to ECM-induced inflammation (**Figure 9B**). In contrast, PC2 (15.06%) clearly differentiated ABX+*PbA* from CTRL and ABX mice (**Figure 9B**). Together, our data highlighted that the changes seen in the specific bacteria and SCFA could drive the inhibition of the neuroinflammatory response induced during *PbA* infection and promote protection against ECM.

Discussion

The gut microbiota has been shown to be involved in the signalling/communication between the gut and the brain and referred as the microbiota-gut-brain axis. This has been implicated in several neurological disorders associated with neuroinflammation. However, no study has so far reported the role of residing gut bacteria in the susceptibility to CM. In this study, we report alterations in the gut microbiota composition in C57BL/6 mice infected with *PbA* developing CM. Notably, an increase of *Alistipes* and *Ligilactobacillus* and a decreased abundance of *Akkermansia* was observed in CM⁺ mice. Further, these changes were also associated with a decreased level of acetate and an increased level of valerate and propionate in the plasma whereas the concentration of acetate, butyrate and propionate were significantly reduced in the caecum. The altered levels of SCFA production during CM were associated with an activation of inflammatory astrocytes (GLAST⁺ GFAP⁺ MHC-I⁺) and microglial cells (CD11b⁺ CD45^{low} MHC-I⁺ or MHC-II⁺) that significantly secreted more CXCL-10, CCL2, IFN- γ and TNF- α . The inflammatory response of glial cells was corroborated by the increased expression of genes encoding CXCL-10, CCL-2, IFN- γ , IL-6 and IL-10 in the brain and the spleen as well as higher plasma levels of these cytokines and chemokines. Also, disturbance in SCFA profiles was associated with an increased permeability of both intestinal and brain barriers. We believe that the disturbance in SCFA profile could be implicated in the excessive production of pro-inflammatory factors by activated glial cells that promoted the recruitment of infiltrating T cells in the brain. This, in turn, leads to the development of CM²⁹. Therefore, changes in the gut microbiota composition may be predictive of the development of CM.

Most neurological disorders including autism, schizophrenia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and depression are associated with a leaky gut, hyper-activated microglial cells and neuro-inflammation¹³. The gut microbiota and metabolites have been shown to be important contributors in these neuro-inflammatory disorders³⁰. Notably, bacteria with pro-inflammatory properties (*Alistipes*, *Eggerthella*, *Flavonifractor*) were found in higher abundances, whereas lower abundances of bacteria

with well-known anti-inflammatory properties such as *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Roseburia*) were observed³¹. Recently, *Alistipes*, a genus member of the *Bacteroidetes* phylum, was shown to play an instrumental role in patients with intestinal inflammation as well as with neuro-inflammatory brain disorders such as depression and autism. This bacterium was also shown to control the mechanism associated with pathophysiology in the brain³². In contrast, *Ligilactobacillus*, a genus of lactic acid bacteria including the well-known *L. salivarius* strains, are more recognized as anti-inflammatory bacteria. These bacteria however have been underexplored in context to neuro-inflammations. Of note, *L. salivarius* has been recently shown to protect mice from hepatic encephalopathy, by shaping the gut microbiota, improving cognitive function, neuro-inflammation and increasing the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression³³. The administration of a probiotic *Lactobacillus* strain to mice led to reduced anxiety and depression-like behaviour. Lactobacilli also influenced behavioural, neural, and microbiome composition in healthy volunteers⁴⁴. However, their role needs to be explored further to understand whether they may improve the neurocognitive functions or be involved in the development of neuro-inflammation. Indeed, we may speculate that the increased abundance of *Ligilactobacillus* could be a compensatory response from the gut microbiota to limit the inflammation during the development of CM. This phenomenon was already observed in Parkinson's disease advocating for the use of *Ligilactobacillus* as probiotic in neurodegenerative issues^{34,35}. The decreased abundance of *Akkermansia* observed in *PbA*-infected mice, could also be involved in the development of CM. This mucin-degrading bacterium, notably the single species *A. muciniphila*, is largely recognized as a marker of healthy gut, exhibiting positive systemic effects by improving immunological and metabolic functions. *Akkermansia* is therefore considered as a promising next generation probiotic³⁶. However, a significant increase of *Verrucomicrobia*/ *Akkermansia* in the gut microbiota has been observed in experimental model of Parkinson's disease. Moreover, fecal microbiota transplantation which remarkably reduced their abundance could protect mice from rotenone-induced Parkinson's disease

by suppressing the inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway³⁷. *Akkermansia* has also been reported to increase the susceptibility of the gut to pathogens by degrading the intestinal mucus barrier leading to local inflammation suggesting a dual role of this bacterium^{38,39}. We therefore opine that the role of bacteria from the *Akkermansia* genus in neurological disorders, including CM, needs to be investigated.

Our findings also highlighted that antibiotic treatment prior to *PbA* infection protected the mice from CM without affecting the parasite burden. This protection was associated with changes in the gut microbiota composition. As expected, antibiotic eliminated a large spectrum of gut bacteria, confirming that gut microbiota plays a crucial role in the development of the neuro-inflammatory process associated with CM. The protection was associated with a predominance of Gram-positive *Enterococcus* more precisely *Enterococcus faecalis* and Gram-negative *Enterobacteriaceae* family, which is correlated with an increased plasma level of acetate and a decreased level of propionate. *Enterococcus faecalis* is a commensal bacterium of the human microbiota⁴⁰. These bacteria are essential for nutrient metabolism, the control of gut pH and the synthesis of metabolites with immunomodulatory functions. In contrast to *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis* is involved in the control of gastrointestinal inflammation and leaky gut process by clearing pathogenic bacteria or intestinal parasites including *Trichinella spiralis*⁴⁰. However, the interaction between *E. faecalis* and *Plasmodium* has not been described⁴¹. For instance, by producing high levels of the inhibitory neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, *E. faecalis* modulates the neurologic reflexes. Indeed, *E. faecalis* could exhibit a dual role, since they are also implicated during urinary tract infection, in endocarditis or in nosocomial infection. Nevertheless, *E. faecalis* can be used as probiotic (Symbiofor1) to modulate the CD4 and CD8 T lymphocytes activity during infection or inflammation⁴².

The protection against CM was also associated with an enrichment of *Burkholderia* in ABX + *PbA* mice. Interestingly, *B. pseudomallei* can invade the CNS by infecting olfactory unsheathing cells and

trigeminal Schwann cells, leading to formation of multinucleated giant cells in response to both infection and injury⁴³. *Burkholderia pseudomallei* invades the olfactory nerve and bulb after epithelial injury in mice and causes the formation of multinucleated giant glial cells *in vitro*. *B. pseudomallei* has been implicated in neurologic melioidosis occurring in both human and animals by driving LPS-mediated disruption of the BBB⁴⁴. Therefore, it is imperative to better understand the role of these bacteria in the protective effect observed after ABX treatment. However, changes of the gut microbiota composition following the antibiotic treatment before infection dampened the inflammatory response of microglia and astrocytes towards an anti-inflammatory phenotype. Consequently, the number of pathological CD8 T cells infiltrating the brain as well as the associated systemic inflammation was seen reduced. Furthermore, protection against CM in ABX-treated mice could also be achieved by the modulation of the expression of tight junction molecules such as claudine, occludine or zonula occludens on endothelial cell surface of both the intestine and blood brain barriers⁴⁵. Our findings suggested that *Plasmodium* infection, by affecting the gut microbiota may lead to a reduced production of SCFA that, in turn modulate the inflammatory activity of glial cells. We indeed observed a reduction of most SCFA following the infection, as well as ABX treatment in the caecal contents. Interestingly, level of acetate was also reduced significantly in infected mice and restored in the infected and ABX-treated mice. The acetate, propionate and butyrate can act as HDAC inhibitors and control the transcription of genes involved in the NF- κ B pathway. These metabolites inhibited the activation of glial cells and hence limited the production of pro-inflammatory factors. The increased plasma levels of acetate in the CM-protected mice suggest that SCFA may be crucial to modulate and/or moderate the pathological effects in the mouse model of experimental CM. Also, the reduced inflammation was correlated with caecum levels of SCFA. Further, valerate, propionate and butyrate fecal levels were positively associated with the gene expression of *Il6* and *Ifn α* in the brain. The decreased inflammation together with the reduced gut permeability may attenuate the translocation of intestinal bacteria in the blood stream and inhibit systemic and brain inflammation. This was corroborated by the lesser number

of activated astrocytes and microglial cells exhibiting inflammatory functions observed in ABX treated and protected mice. The anti-inflammatory response observed in these protected mice were confirmed by a differential transcriptomic analysis of 86 pro-inflammatory factors expressed by astrocytes isolated from ABX, *PbA* and ABX+*PbA* mice. Indeed, protection against CM was correlated with 3 clusters of genes that were increased in ABX +*PbA* compared to the *PbA* group and higher expression of *Il4*, *Lif*, *Il15*, *Tgfb*, *Il27* and *Ccl22*. Most of these factors exhibit anti-inflammatory/immunosuppressive functions on cells of the innate (CCL22, IL-7...) and adaptive (IL-4, IL-15, TGF- β ...) immune responses⁴⁶. For instance, we previously observed a significantly different *in vivo* *Lif* expression in the brain of CM⁻ *PbA* infected compared to CM⁺ mice as well as higher levels of *Lif* mRNA produced by astrocytes stimulated with *PbA*-iRBCs *in vitro*. LIF is known to exert a neuroprotective effect in neuro-inflammatory disorders and favor the axonal regeneration. The administration of LIF prevents multiple sclerosis in mice⁴⁷. Therefore, similar to the Alzheimer or Parkinson's diseases, our findings suggested that the increased plasmatic level of acetate and potentially other bacteria metabolites may lead to the reduced inflammation in the CM protected mice. This is crucial for the neuronal survival and regeneration and may exert an immune regulatory effect on astrocytes by inhibiting the GFAP expression (inhibitor of maturation/activation of astrocytes)⁴⁸. Moreover, CCL-5 is crucial in neuroprotection by counterbalancing the glutamate toxicity response and favoring the polarization of microglial cells towards the M2 phenotype⁴⁹. The enriched (with *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia* and *Lactobacillus*) gut microbiota was observed in the less susceptible (to *Pf* infection) individuals²⁷. In addition, the susceptibility to *P. berghei* infection was previously shown to be associated with *Bacteroidota* and *Pseudomonadota* enriched gut microbiota^{27,50}. Our result emphasized an association with the increase of *Muribaculum* and the decrease of *Akkermansia* and the disease susceptibility in CM⁺ mice. These bacteria are well-known to produce SCFA and impact the gut permeability. These metabolites regulate the systemic and local (brain) inflammation in various pathologies such as Alzheimer, Parkinson or multiple sclerosis^{51,52}. In

addition, our findings suggested that *Plasmodium* infection may lead to a reduced production of SCFA production by the modified gut microbiota that may modulate the inflammatory activity of glial cells. The acetate, propionate and butyrate can act as HDAC inhibitors and control the transcription of genes involved in the NF- κ B pathway. The highest plasma levels of acetate observed in the ABX +*PbA* protected from CM suggests that SCFA may be crucial to modulate and/or moderate the pathological effects of *PbA* in the experimental CM. The reduced inflammation was also correlated with caecum levels of AGCC. Interestingly, acetate and butyrate were shown to be present in systemic (blood) and local (cerebrospinal fluid) body fluids of patients with cervical myelopathy and lumbar radiculopathy⁵³. Therefore, similar to the Alzheimer or Parkinson's diseases, our findings suggested that augmentation of the plasma acetate concentration (and potentially other bacteria compounds) could reduce the inflammation in the CM protected mice. Finally, we highlighted that a specific signature of the gut microbiota components may promote the lethal neuroinflammation driven by the malaria infection. Therefore, gut microbiota enriched with the anti-inflammatory bacteria may reverse the CM pathology and make antimalarial drug therapy effective to clear the infection. The modifications to the gut microbiota composition has been shown to confer protection to malaria in the pregnant mice receiving the fecal material from healthy mice (obtained from Jackson laboratory)⁵⁴. Our finding raises the hope to manipulate this complex ecosystem for clinical application. The use of traditional probiotics (such as *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *Parabacteroides disatoni*...) in the treatment of neuro-inflammatory disease like Parkinson, Alzheimer and multiple sclerosis are already approved⁵⁵⁻⁵⁸. Beneficial effect of probiotics in modulating neuro-inflammation may suggests an innovative tool to address complex neurological diseases. We could also select specific bacteria highlighted in the present work to be used as next generation probiotics or live biotherapeutic products.

Références

1. World malaria report 2022. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (2023).
2. Ghazanfari, N., Mueller, S. N. & Heath, W. R. Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Front Immunol* **9**, 2016 (2018).
3. Andoh, N. E. & Gyan, B. A. The Potential Roles of Glial Cells in the Neuropathogenesis of Cerebral Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, (2021).
4. Hunt, N. H. *et al.* Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* **36**, 569–582 (2006).
5. Claessens, A. *et al.* A subset of group A-like *var* genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, (2012).
6. Linnerbauer, M., Wheeler, M. A. & Quintana, F. J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron* **108**, 608–622 (2020).
7. Kwon, H. S. & Koh, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* **9**, 42 (2020).
8. Leleu, I. *et al.* A noncanonical autophagy is involved in the transfer of Plasmodium-microvesicles to astrocytes. *Autophagy* **18**, 1583–1598 (2022).
9. Jain, V. *et al.* Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malar J* **7**, 83 (2008).
10. Shrivastava, S. K. *et al.* Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria. *Glia* **65**, 75–92 (2017).
11. Belnoue, E. *et al.* On the Pathogenic Role of Brain-Sequestered $\alpha\beta$ CD8+ T Cells in Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology* **169**, 6369–6375 (2002).
12. Villegas-Mendez, A. *et al.* IFN- γ producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* **189**, 968–979 (2012).
13. Rutsch, A., Kantsjö, J. B. & Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol* **11**, 604179 (2020).
14. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* **164**, 337–340 (2016).
15. O’Riordan, K. J. *et al.* Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **546**, 111572 (2022).
16. Rothhammer, V. *et al.* Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* **557**, 724–728 (2018).
17. Erny, D. *et al.* Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* **18**, 965–977 (2015).
18. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* **11**, (2020).
19. Natrus, L. V. *et al.* Effect of Propionic Acid on Diabetes-Induced Impairment of Unfolded Protein Response Signaling and Astrocyte/Microglia Crosstalk in Rat Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus. *Neural Plast* **2022**, 6404964 (2022).
20. Rothhammer, V. *et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med.* **22**, 586–597 (2016).
21. Keswani, T. *et al.* Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. *Genes Immun* **21**, 45–62 (2020).
22. Duscha, A. *et al.* Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* **180**, 1067-1080.e16 (2020).
23. Scheperjans, F. *et al.* Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical

- phenotype. *Mov Disord* **30**, 350–358 (2015).
24. Unger, M. M. *et al.* Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* **32**, 66–72 (2016).
 25. Villarino, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2235–2240 (2016).
 26. Taniguchi, T. *et al.* *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. *Sci Rep* **5**, 15699 (2015).
 27. Yooseph, S. *et al.* Stool microbiota composition is associated with the prospective risk of *Plasmodium falciparum* infection. *BMC Genomics* **16**, 631 (2015).
 28. Keswani, T. *et al.* Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. *Genes Immun.* **21**, 45–62 (2020).
 29. Dalko, E. *et al.* Heme dampens T-cell sequestration by modulating glial cell responses during rodent cerebral malaria. *Brain Behav. Immun.* **58**, 280–290 (2016).
 30. O'Riordan, K. J. *et al.* Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **546**, 111572 (2022).
 31. Eicher, T. P. & Mohajeri, M. H. Overlapping Mechanisms of Action of Brain-Active Bacteria and Bacterial Metabolites in the Pathogenesis of Common Brain Diseases. *Nutrients* **14**, 2661 (2022).
 32. Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M. & Rodriguez-Palacios, A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front. Immunol.* **11**, 906 (2020).
 33. Yang, L. *et al.* Protective effect of *Lactobacillus salivarius* Li01 on thioacetamide-induced acute liver injury and hyperammonaemia. *Microbial Biotechnology* **13**, 1860–1876 (2020).
 34. Rutsch, A., Kantsjö, J. B. & Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front. Immunol.* **11**, 604179 (2020).
 35. Aghamohammad, S., Hafezi, A. & Rohani, M. Probiotics as functional foods: How probiotics can alleviate the symptoms of neurological disabilities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **163**, 114816 (2023).
 36. Xu, R. *et al.* The role of the probiotic *Akkermansia muciniphila* in brain functions: insights underpinning therapeutic potential. *Critical Reviews in Microbiology* **49**, 151–176 (2023).
 37. Zhao, Z. *et al.* Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis. *Microbiome* **9**, 226 (2021).
 38. Desai, M. S. *et al.* A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **167**, 1339-1353.e21 (2016).
 39. Seregin, S. S. *et al.* NLRP6 Protects Il10 Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Reports* **19**, 733–745 (2017).
 40. Murray, B. E. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* **3**, 46–65 (1990).
 41. Im, E. J., Lee, H. H.-Y., Kim, M. & Kim, M.-K. Evaluation of Enterococcal Probiotic Usage and Review of Potential Health Benefits, Safety, and Risk of Antibiotic-Resistant Strain Emergence. *Antibiotics* **12**, 1327 (2023).
 42. Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M. & Michalik, M. The Many Faces of Enterococcus spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms* **9**, 1900 (2021).
 43. Walkden, H. *et al.* *Burkholderia pseudomallei* invades the olfactory nerve and bulb after epithelial injury in mice and causes the formation of multinucleated giant glial cells in vitro. *PLoS Negl Trop Dis* **14**, e0008017 (2020).
 44. Hsueh, P.-T. *et al.* *Burkholderia pseudomallei*-loaded cells act as a Trojan horse to invade the brain during endotoxemia. *Sci Rep* **8**, 13632 (2018).
 45. Braniste, V. *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* **6**, 263ra158 (2014).

46. Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M. & Flavell, R. A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 447–453 (2009).
47. Slaets, H. *et al.* CNS-targeted LIF Expression Improves Therapeutic Efficacy and Limits Autoimmune-mediated Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis. *Molecular Therapy* **18**, 684–691 (2010).
48. Pöyhönen, S., Er, S., Domanskyi, A. & Airavaara, M. Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. *Front. Physiol.* **10**, 486 (2019).
49. Lanfranco, M. F., Mocchetti, I., Burns, M. P. & Villapol, S. Glial- and Neuronal-Specific Expression of CCL5 mRNA in the Rat Brain. *Front. Neuroanat.* **11**, 137 (2018).
50. Ippolito, M. M., Denny, J. E., Langelier, C., Sears, C. L. & Schmidt, N. W. Malaria and the Microbiome: A Systematic Review. *Clin Infect Dis* **67**, 1831–1839 (2018).
51. Lei, W. *et al.* Akkermansia muciniphila in neuropsychiatric disorders: friend or foe? *Front Cell Infect Microbiol* **13**, 1224155 (2023).
52. Cui, Y. *et al.* Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. *FEMS Microbiology Letters* **369**, fnac072 (2022).
53. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221–1227 (1987).
54. Morffy Smith, C. D. *et al.* Composition of the gut microbiota transcends genetic determinants of malaria infection severity and influences pregnancy outcome. *EBioMedicine* **44**, 639–655 (2019).
55. Sun, H. *et al.* Probiotics synergized with conventional regimen in managing Parkinson's disease. *npj Parkinsons Dis.* **8**, 62 (2022).
56. Naomi, R. *et al.* Probiotics for Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Nutrients* **14**, 20 (2021).
57. Sun, M.-F. *et al.* Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav. Immun.* **70**, 48–60 (2018).
58. Jiang, J. *et al.* Efficacy of probiotics in multiple sclerosis: a systematic review of preclinical trials and meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Funct.* **12**, 2354–2377 (2021).

Fundings

This work was supported by ARCir “Dynamique” Région Nord-Pas de Calais and the LabEx PARAFRAP: ANR-11-LABX-0024 and by REGION HAUTS-DE-FRANCE START AIRR program PROMAL N° DOS0149442/00. JA was recipient of a doctoral fellowship from Lille 1 University - INSERM, and KN from French Guiana University-CNES.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr.Fabrice Bouilloux from BIOMNIGENE for the analysis of gut microbiota, the engineer Anaëlle Durbec from Genotoul Metatoul-lipidomique (Inserm U1048; I2MC) for the SCFA dosage, Dr.Olivier Molendi-Coste and Dr. Hélène Bauderlique from BiCel platform for technical assistance in flow cytometry and cell sorting. The PLETHA platform of Pasteur Institute of Lille for assistance and animal maintenance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contribution

SP designed the project, participated to the analysis, supervised the work, and write the manuscript. AJ performed the experiments, analyzed the data and write the manuscript. IL participated in the experiment and revise the manuscript. KN and NT participated in the statistical analysis and revised the manuscript. CG and RT participated to the analysis and revising the manuscript. All Authors have revised the manuscript.

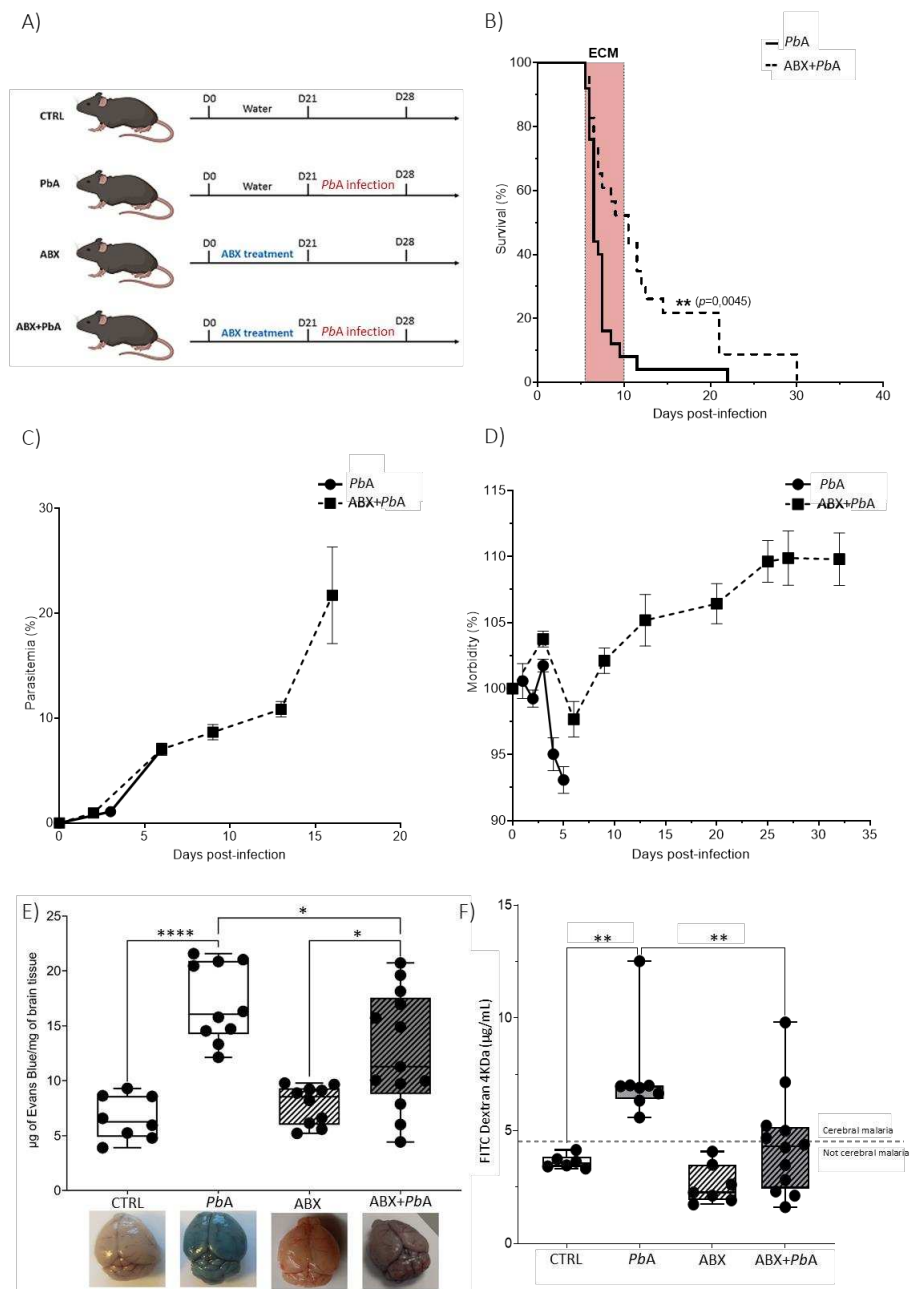


Figure 1. The antibiotics treatment prior to infection with *PbA* improves the brain barrier and prevents the development of ECM. (A) B6 mice treated or not with ABX and infected with *PbA*-iRBCs. (B) Percentage of animal survival. Statistical difference was determined by the log-rank (Mantel-Cox) test. (C) Percentage parasitemia determined on thin blood smear every 2-3 days post-infection interval. (D) Percentage of weight loss (morbidity) following infection. Data were analyzed by Wilcoxon-Mann-Whitney test. (E) BBB permeability defined by the amounts of Evans Blue expressed per mg of brain tissue. Data was by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. (F) Intestinal permeability measured by FITC-dextran concentration in plasma, in each mouse group. Each symbol indicates an individual mouse. Data are means $\pm$ SD from 3 independent experiments (n=5-6 mice per group), intergroup comparison was done by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

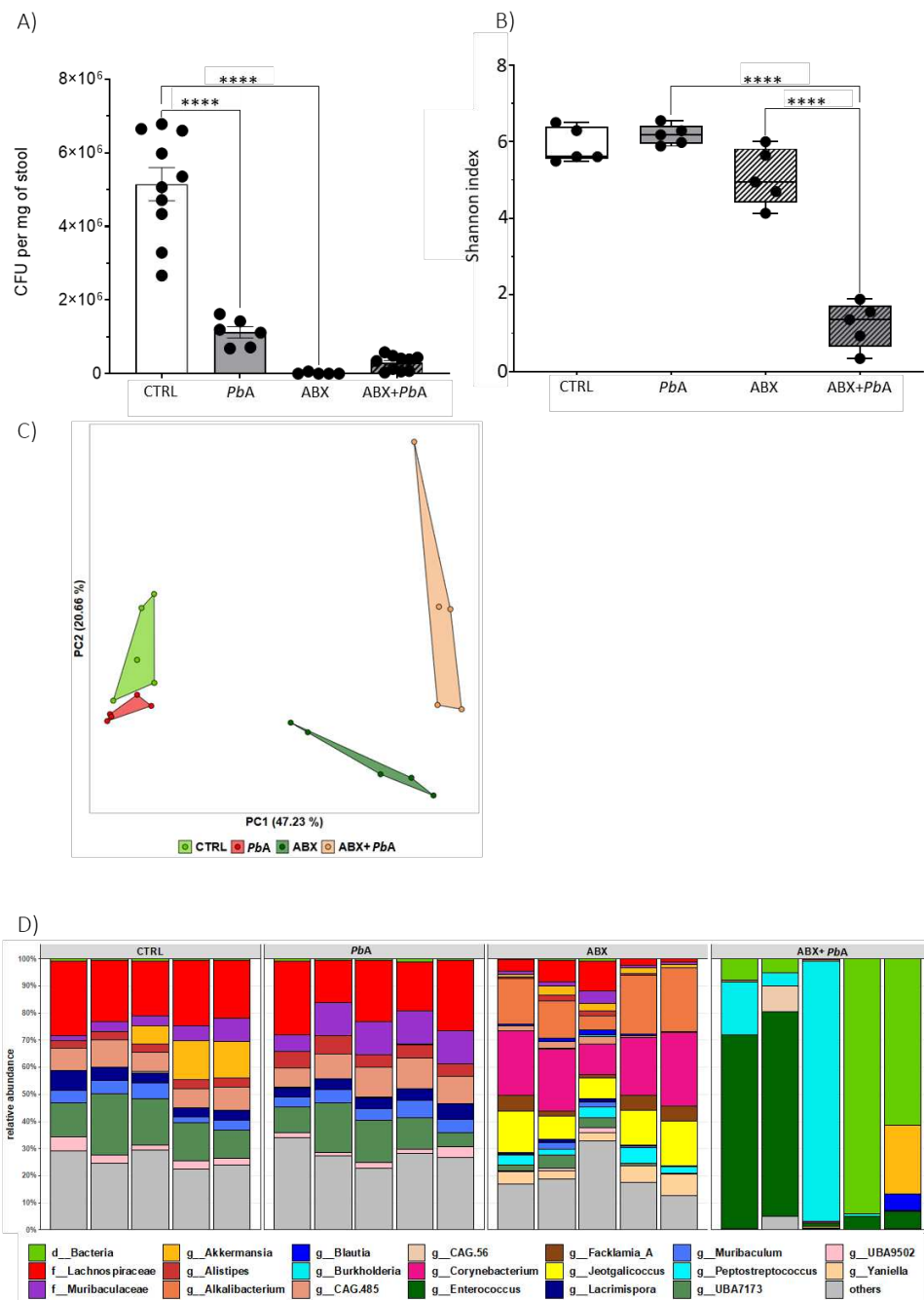


Figure 2. *PbA* infection and ABX treatment results in specific structural changes of gut microbiota. (A) The total number of fecal bacteria was quantified and was represented as the mean of number of CFU of anaerobic bacteria per mg of feces of treated and/or infected B6. Then, the composition of fecal bacteria was analyzed using 16S rRNA gene sequencing in mice before and after treatment and infection by *PbA* (n=5/group). (B) Alpha diversity was determined using the Shannon diversity index. The significance level was denoted as : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. (C) PCA analysis using Weighted UNIFRAC distance reveals the separation between the different groups. Each dot represents one mouse gut microbiome profile. (D) Relative abundance of the average microbiome composition was determined at the genus level for each group of mice. Each column represents one mouse.

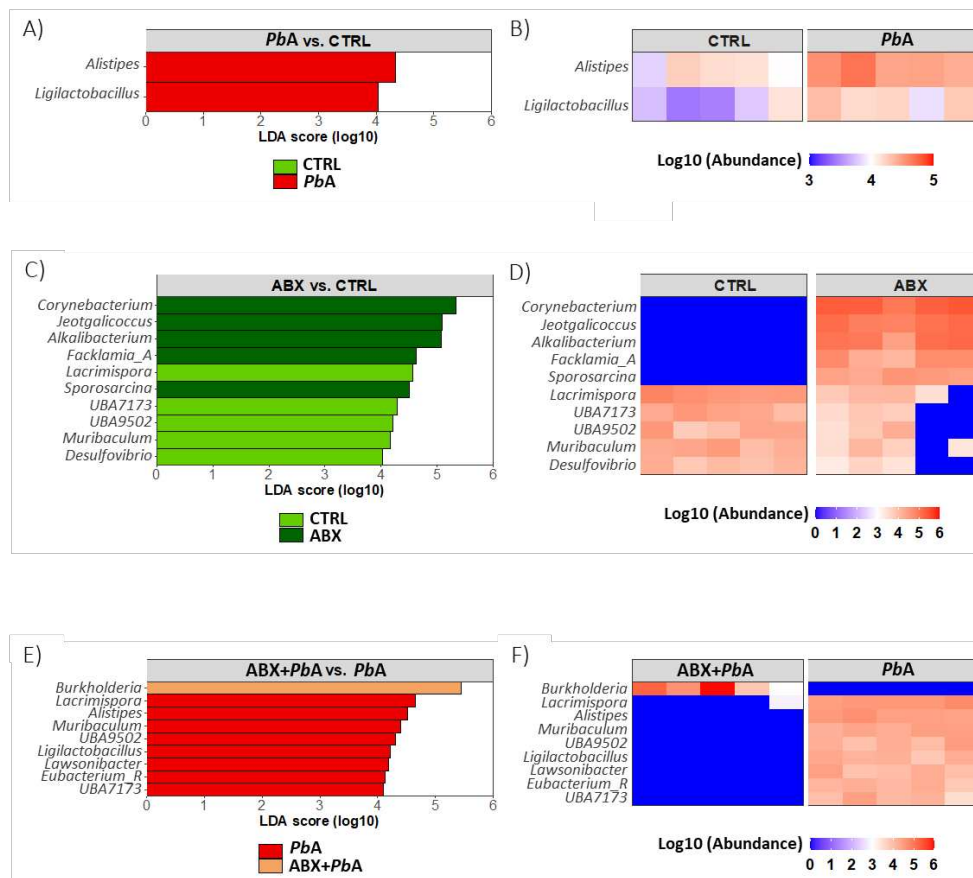


Figure 3. Discrimination of the different bacteria genera affected by the *PbA* infection and/or the ABX treatment potentially associated with the development/protection of ECM. (A, C, E) LEFSE identified the bacterial taxa that significantly differentiated in each group of mice represented by a histogram of the linear discriminant analysis (LDA) scores distribution. Only taxa with an LDA score higher than 4 are represented. (B, D, F) Taxonomic abundance heatmaps at the genus level representing the relative abundance of diversified genera affected in the CTRL, ABX, *PbA* and ABX+*PbA* groups of B6 mice. Each column represents a taxa.

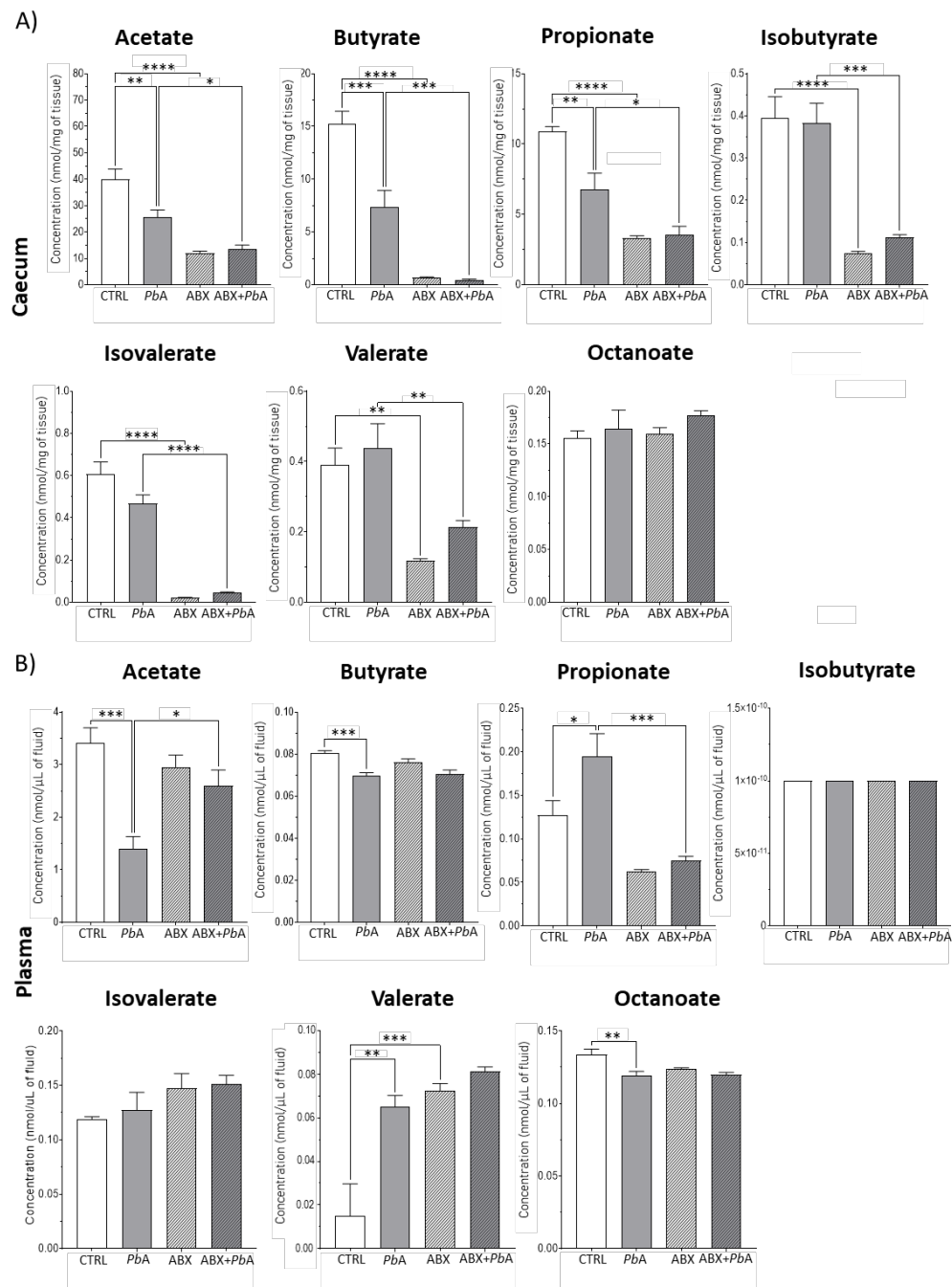


Figure 4. Changes in the gut microbiota composition modulates fecal and plasmatic Short Chain Fatty Acids (SCFA) profiles. (A) Concentration of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, valerate and octanoate in the caecum and (B) plasma of each group of mice quantified by Gas-Liquid Chromatography. Data are fold mean $\pm$ SD representative of 1 experiment (n=5 mice per condition) intergroups were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

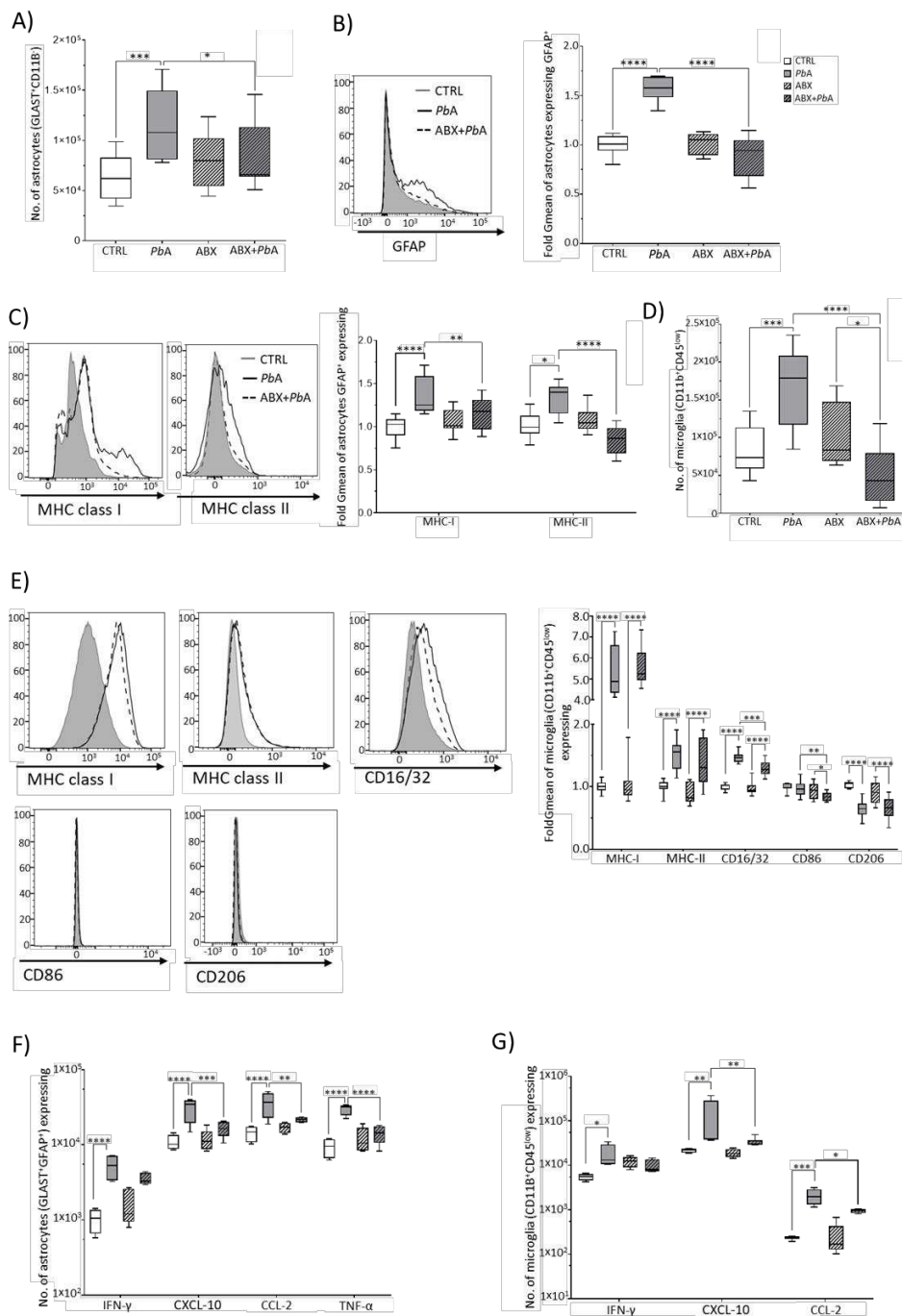


Figure 5. Antibiotic-mediated changes to the gut microbiota diminished the pro-inflammatory status of glial cells. Flow cytometry analysis of the glial cells in the brain of B6 mice which received or not the ABX treatment and the *PbA* infection, at 6.5 dpi. (A) Number of astrocytes (GLAST⁺CD11b) and (B) fold geometric mean (Gmean) of astrocytes expressing GFAP. (C) Fold Gmean of MHC-I, and MHC-II expression among the activated astrocytes (GLAST⁺GFAP⁺) in brain. (F) Number of activated astrocytes expressing cytokines and chemokines (D). Number of total microglia (CD11b⁺CD45^{low}) and (E) number of microglia expressing MHC-I, MHC-II, CD16/32, CD86 and CD206 in the brain of ECM⁺ and ABX treated mice. (F) Number of astrocytes and (G) microglia expressing cytokines (IFN- γ , TNF- α) and chemokines (CXCL-10, CCL-2). Data represented means $\pm$ SD and are representative of 3 experiments (n= 4-5 mice/group). Values were compared to their respective control group using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

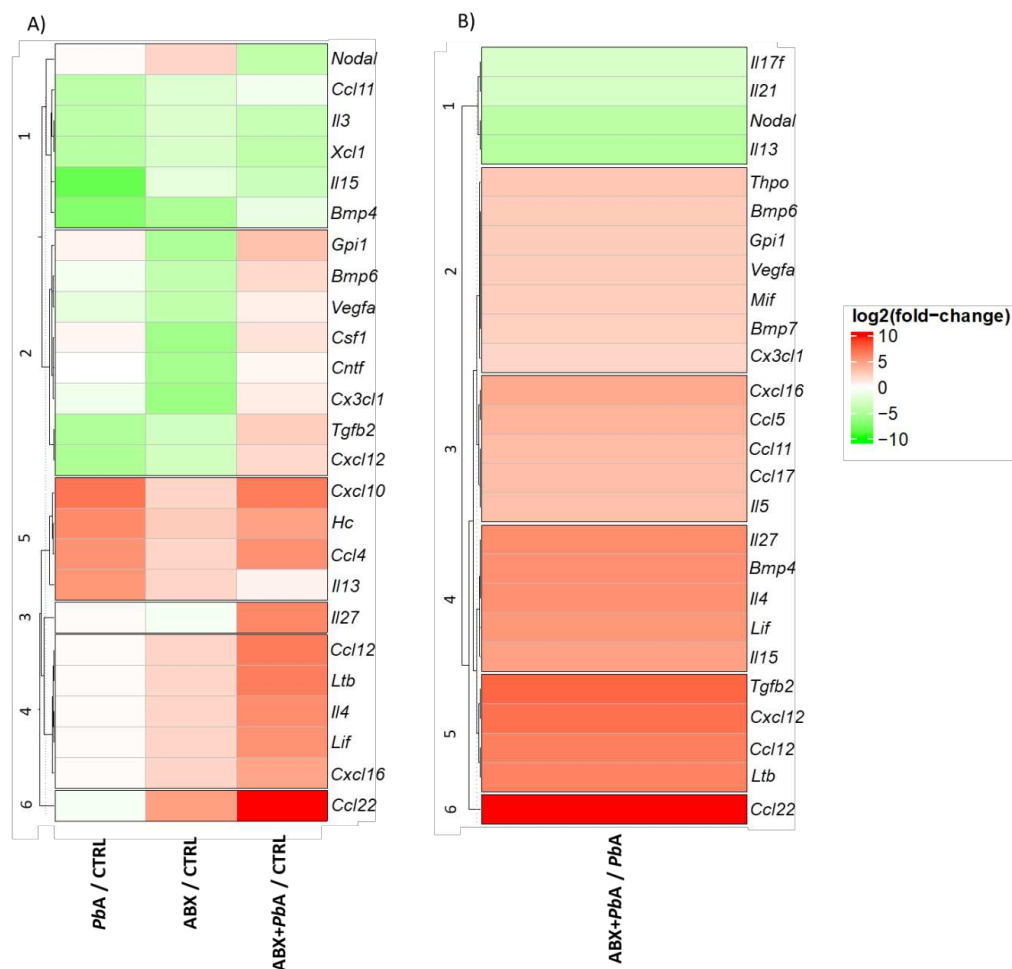


Figure 6. Antibiotic-mediated change of the gut microbiota modulates the inflammatory response of astrocytes. Cytokines and chemokines gene expressions were quantified on isolated astrocytes from *PbA* and *ABX+PbA* infected groups of mice at ECM onset. Heatmaps of fold change expression of most impacted inflammatory genes were represented. mRNA expression levels were assessed by RT-qPCR using *Gapdh*, $\beta 2m$, *Actb*, *Gusb*, *Hsp90ab1* as reference genes. A) Relative mRNA levels in *ABX*, *PbA* and *ABX+PbA* were normalized to the CTRL group B) Relative mRNA levels in *ABX+PbA* group were normalized to the *PbA* group. Data are representative of one experiment (pool of three brains by sample). Expression is displayed as log2 fold change, the downregulation and upregulation are shown in green and red, respectively.

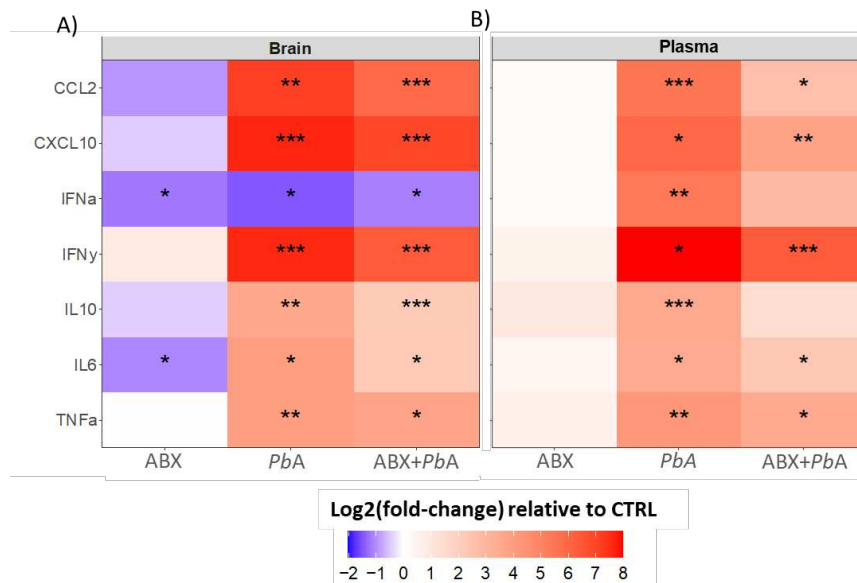


Figure 7. Antibiotic-mediated change of the gut microbiota prevents brain and systemic inflammation. Cytokines and chemokines gene expressions were quantified in brain and proteins in plasma respectively in the different groups of mice at ECM onset (CTRL, ABX, PbA and ABX+PbA). Heatmaps representation of fold change: A) expression of *Il10*, *Il6*, *Tnfa*, *Ifn γ* , *Ifna*, *Cxcl10* and *Ccl2* in brain. mRNA expression levels were assessed by RT-qPCR with *Hprt1* as internal reference. Relative mRNA levels in each group were normalized to the CTRL group. B) Fold changes of plasmatic levels of the same cytokines/chemokines measured by flow cytometry using a standard curve as internal reference. Data represent fold means $\pm$ SD representative of 1 experiment (n=5 mice per condition). Data were compared to their respective control group using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Expression is displayed as log2 fold change, the downregulation and upregulation are shown in blue and red, respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

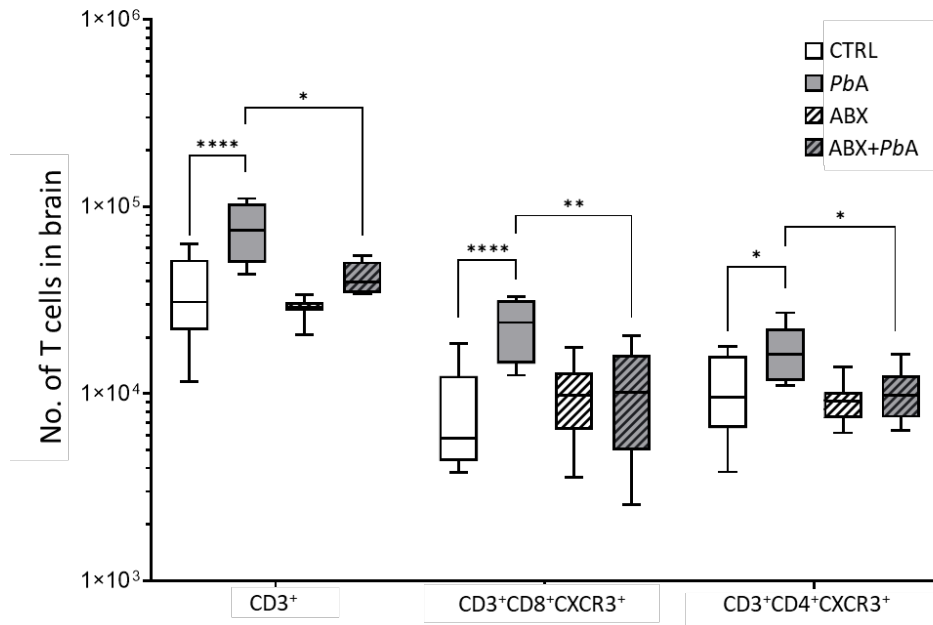
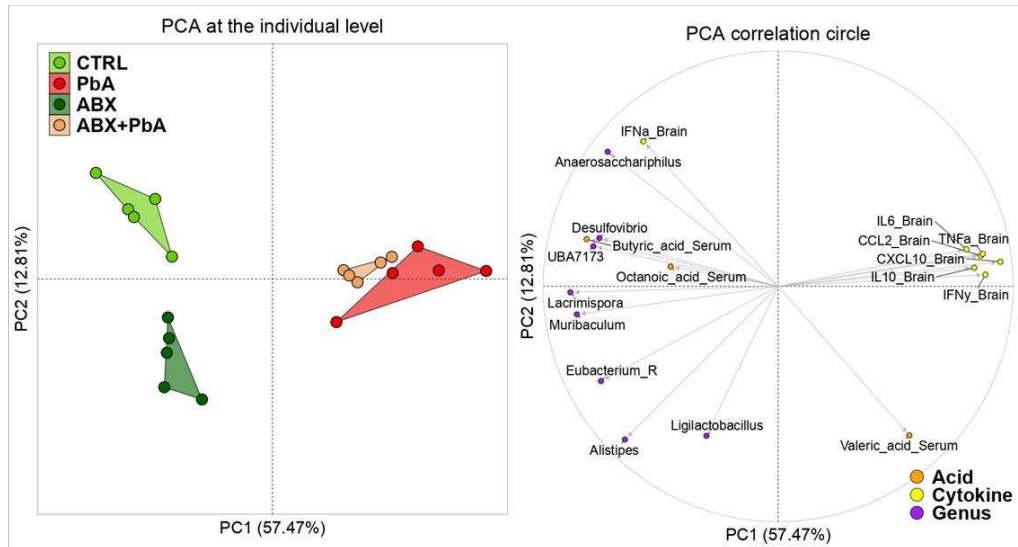


Figure 8. Antibiotic-mediated changes to gut microbiota diminished the $CD8^+$ T cell infiltration in brain. Flow cytometry analysis of the T cells in the brain of CTRL, ABX, *PbA* and ABX+*PbA* groups of mice at 6.5 dpi. Total number of $CD3^+$ T cells and the number of $CD4^+CXCR3^+$ and $CD8^+CXCR3^+$ T cells infiltrate the brain. Data are the means $\pm$ SD of n=5 mice per group and are representative of 3 experiments. Values were compared to their respective control group using one-way ANOVA test and Tukey's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

A)



B)

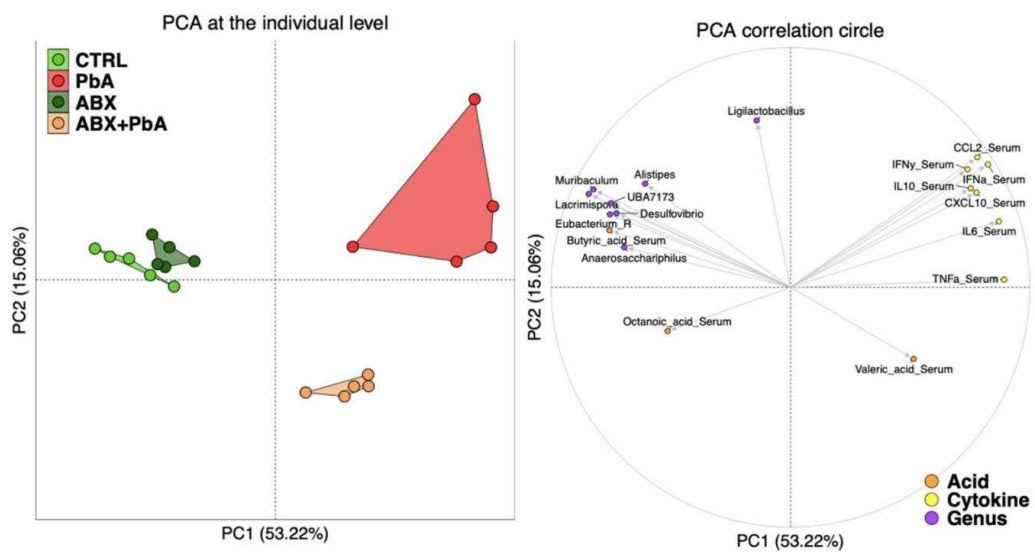
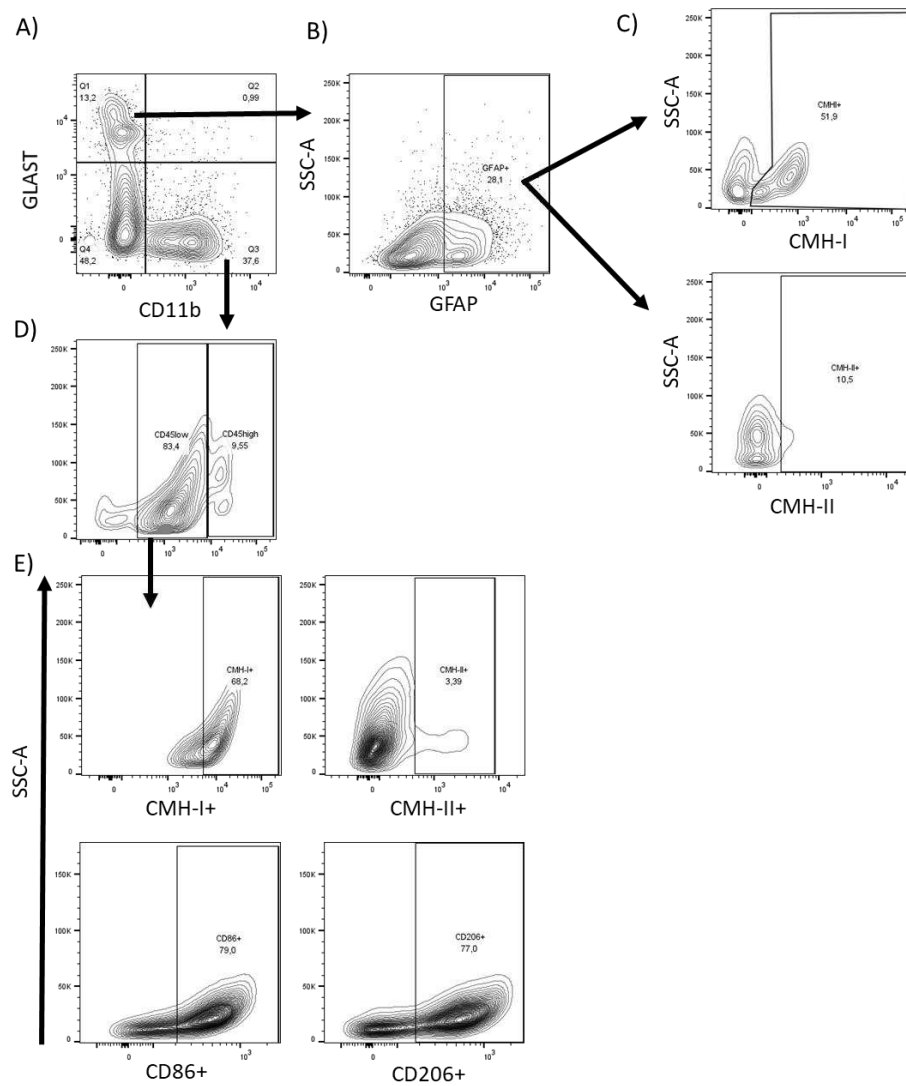
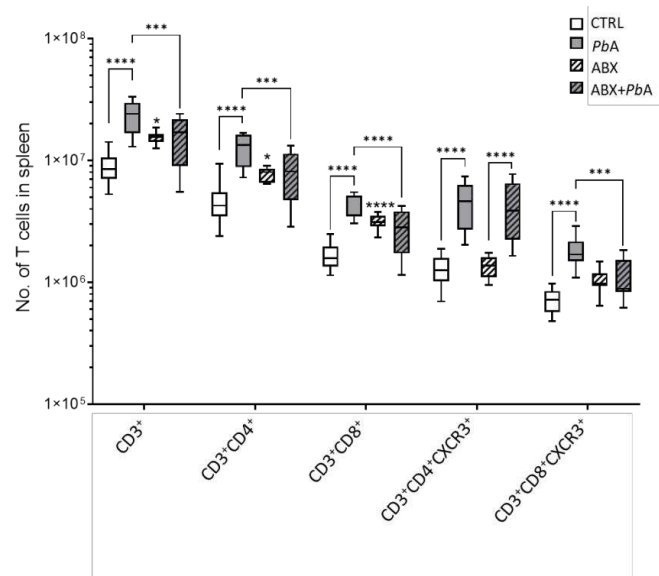


Figure 9. Correlation between gut bacteria, SCFA levels and inflammatory response. (A) Brain: (left panel), principal component analysis of gut microbiota composition, SCFA in the caecum and brain inflammatory cytokines in each group of mice. (Right panel) Variable correlation plot for the first two principal components. (B) Plasma: (left panel) principal component analysis of gut microbiota composition, SCFA and inflammatory cytokines in each group of mice. (Right panel) Variable correlation plot for the first two principal components.



Supplementary Figure 1. Gating strategy for astrocytes and microglial cells analysis. Cells were isolated from brain of CTRL, ABX, *PbA* and ABX+*PbA* mice. First doublet was excluded from live gate based on SSC-A, SSC-H and FSC-A, FSC-W. (A) Then astrocytes were gated based on GLAST and CD11b expression. (B) Activated astrocytes were discriminated by their GFAP expression. (C) MHC-I and II positive cells were distinguished among activated astrocytes. (D) The microglia were determined by their CD11b and CD45 expression. (E) Then their activation was measured by their expression of MHC-I, MHC-II, CD86 and CD206.



Supplementary Figure 2. Antibiotic-mediated changes to gut microbiota disturbed the chemotaxis ability of CD8⁺ T cells. Flow cytometry analysis of T cells in spleen from CTRL, ABX, PbA, ABX+ PbA groups of mice at 6.5 dpi. Total number of CD3⁺ T cells, CD3⁺CD4⁺ T cells, and CD3⁺CD8⁺ T cells expressing or not the CXCR3 receptor. Data represented means $\pm$ SD and are representative of 3 experiments (n= 4-5 mice/group). Values were compared to their respective control group using one-way ANOVA test and Tukey's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

	Name	Sequence
Forward primer	16SV3F341-G	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGAGGAGACTACCTACGGGNGGCWGCAG
	16SV3F341-H	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGAGTCGCTCGCCTACGGGNGGCWGCAG
	16SV3F341-J	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGATAGCAGACCTACGGGNGGCWGCAG
	16SV1F27-K	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGATCATAGACCTACGGGNGGCWGCAG
	16SV3F341-M	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAAAGTCGAGCCTACGGGNGGCWGCAG
	16SV3F341-N	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAAACTTCGCCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse primer	16SV4R806-9	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTACTATAGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-10	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATACGTTACTAGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-11	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATAAGAGTCACGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-12	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATATACGAGACGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-13	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTCAACGCTCGGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-14	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTATCGACGAGGACTACHVGGGTWCTAAT
	16SV4R806-15	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTCAGATCGTGTGGACTACHVGGGTWCTAAT

Supplementary Table 1. Microbial 16sRNA forward and reverse primers sequences

Primer name	Forward sequence	Reverse sequence
HPRT1	TCC-TCC-TCA-GAC-CGC-TTT-T	CCT-GGT-TCA-TCA-TCG-CTA-ATC
CCL2	GAT-CAT-CTT-GCT-GGT-GAA-TGA-GT	CAT-CCA-CGT-GTT-GGC-TCA
CXCL10	GCT-GCC-GTC-ATT-TTC-TGC	TCT-CAC-TGG-CCC-GTC-ATC
TNFa	TTG-AGA-TCC-ATG-CCG-TTG	CTG-TAG-CCC-ACG-TCG-TAG-C
IFNy	GCT-TTG-CAG-CTC-TTC-CTC-AT	CCA-GTT-CCT-CCA-GAT-ATC-CAA-G
IL10	ACC-CCC-ATC-ACA-GCA-CGT-T	CTG-CTT-GCT-GCC-TTC-AGA-CT
IFNa	GGA-CTT-TGG-ATT-CCC-GCA-GGA-GAA-G	GCT-GCA-TCA-GAC-AGC-CTT-GCA-GGT-C
IL6	CCA-GGT-AGC-TAT-GGT-ACT-CCA-GAA	GCT-ACC-AAA-CTG-GAT-ATA-ATC-AGG-A

Supplementary Table 2. Sequences of primers

Target	Specificity	Clone	Fluorochrome	Supplier	Reference
Lymphocytes	CD25	PC61	BV785	Biolegend	102051
	CD8a	53-6.7	Pacificblue	Biolegend	100725
	CD4	RM4-5	FITC	BDPharmingen	553046
	CD69	H1.2F3	APCCy7	Biolegend	104512
	CXCR3	CXCR3-173	Pe	Biolegend	126506
	CD3e	145-2C11	APC	Biolegend	100312
Astrocyte and microglia	GLAST	ACSA-1	APC	Miltenyi Biotec	130-095-814
	GFAP	GA5	FITC	Invitrogen	53-9892-82
	CD11b	M1/70	Pacific blue	Biolegend	101224
	CD45	30-F11	PeCy7	Biolegend	103114
	CD16/32	93	APC-Cy7	Biolegend	101328
	H2Db	28-14-8	FITC	BDPharmingen	553573
	H2Db	28-14-8	Pe	Invitrogen	12-5999-81
	CD86	GL-1	BV605	Biolegend	105037
	CD206	MR6F3	APC	Invitrogen	17-2061-82
	CD206	C068C2	PerCP-Cy5.5	Biolegend	141715
	IA-IE	M5/114.15.2	AF700	Biolegend	107622
	IFN- γ	XMG1.2	BV510	Biolegend	505841
Cytokines and chemokines	TNF- α	MP6-XT22	PeCy7	BDPharmingen	561041
	TNF- α	MP6-XT22	BV650	Biolegend	506333
	TGF- β	1.D11.16.8	biotin	Novus	NBP2-45137B
	CCL2	2D8	PerCP-Cy5.5	Novus	NBP-22115PCP
	CXCL-10		Pe	BIOSSUSA	bs-1502R-A555
	ARG1	A1exF5	BV805	Invitrogen	368-3697-82
	Streptavidine	-	BV711	Biolegend	405241
	CCL-2	2D8	PerCP	Novus	NBP2-22115PCP

Supplementary Table 3. Listing of antibodies used for flow cytometry experiments.

Conclusion

Le NP résulte de la réponse inflammatoire exacerbée des cellules gliales (astrocyte et microglie) activées par les érythrocytes infectés séquestrés dans les microvaisseaux cérébraux. Nous avons montré une implication directe du microbiote dans la prédisposition au NP. En effet, une analyse métagénomique du MI a permis de discriminer les *Ligilactobacillus* et les *Alistipes* comme étant associées au développement du NP. L'administration d'antibiotiques à large spectre protège du NP. Cette protection est corrélée avec un enrichissement en bactérie appartenant au *Verrucomicrobiota* (*Akkermansia*), aux *Protéobactéries* (*Entreobacteriaceae*/ *Enterococcaceae*) en concomitance avec l'augmentation d'acétate sérique. L'effet protecteur est conféré par une réduction de la réponse inflammatoire des cellules gliales, par le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, une inhibition de l'infiltration des lymphocytes T CD8 pathologiques dans le cerveau ainsi qu'une inhibition de l'inflammation systémique des souris infectées protégées.

La mortalité par septicémie bactérienne pendant le paludisme est associée à la dysbiose du microbiote intestinal (Article 2)

Contexte du travail

Les résultats de nos travaux précédents nous ont amené à nous interroger sur le rôle du microbiote intestinal et l'impact de sa modification chez des souris résistantes au neuropaludisme (B6.WLA.Berr2). Cette lignée de souris est une recombinante consanguine issue de croisements successifs de souris C57BL/6 avec une souris F1 WLA (NP^R) x C57BL/6 (NP^S) ayant intégré le locus Berr 2 de WLA sur le chromosome 11 de WLA conférant la résistance au neuropaludisme. Ces deux modèles permettent de distinguer les deux phénotypes associés à la mort : 1) le neuropaludisme qui se manifeste entre les jours 6,5 à 10 après l'inoculation des parasites, souris B6 (NP^S) et 2) les souris B6.WLA.Berr2 (NP^R) qui ne développent pas de NP mais meurent d'hyperparasitémie environ 21 à 30 jours après l'infection par 10⁶ globules rouges parasités par PbA^{321,322}. Ces souris résistantes ont-elles un microbiote intestinal différent des souris sensibles ? La résistance des souris B6.WLA.Berr2 serait-elle en partie dû à son microbiote intestinal et est-il possible de reverser cette résistance au neuropaludisme murin.

La stratégie de cette étude à consister à modifier le microbiote intestinal des souris résistantes avant l'infection par un traitement antibiotique et déterminer son impact sur le développement de la pathologie. Ces travaux permettent d'améliorer notre compréhension de l'interaction hôte-parasite lors d'une infection à *Plasmodium* et d'identifier les bactéries

qui participent à la sévérité de l'infection. Cela pourrait permettre de développer de nouvelles pistes préventives ou thérapeutiques dans la lutte contre le paludisme. Les résultats obtenus feront l'objet d'un article en cours de rédaction. 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.

Les références citées dans l'article 2 ont été incluses à la fin du manuscrit. Les matériels et méthodes de cette étude sont similaire à celui de l'article 1, hormis quelques exceptions qui ont été incorporés dans la partie : Matériels et méthodes complémentaire de l'article 2 ci-dessous.

Matériel et méthodes complémentaires à l'article 2

Souris

Des souris C57BL/6 (laboratoires Janvier, C57BL/6JR) et B6.WLA.Berr2, mâles et femelles, âgées de 6 à 8 semaines, ont été élevées dans des conditions standard au sein de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille. Toutes les expériences sur souris ont été réalisées en suivant les directives institutionnelles pour les soins et l'utilisation des animaux. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique (APAFIS#22021-20190715283871v4) pour la réalisation d'expériences animales conformément aux règlements français (décret 87-848 du 19/10/1987) et européens (directive 86/609/CEE) sur le soin et la protection des animaux de laboratoire.

Parasite et infection

Les souris (n=5/groupe) ont été infectées par voie intrapéritonéale avec 10^6 globules rouges infectés par un clone de 1,49L du parasite *PbA* (Dr D.Walliker, Institute of Genetics, Édimbourg, Royaume-Uni). Les souris non infectées du même âge ont été utilisées comme témoins négatifs. Les souris ont été suivies deux fois par jour après l'infection. La parasitémie a été évaluée en déterminant le pourcentage de globules rouges parasités sur des frottis sanguins colorés au Giemsa (Sigma Aldrich, USA) à intervalles réguliers du 3^{ème} au 30^{ème} jour suivant l'infection. Un minimum de 10 x 100 champs de grossissement par échantillon ont été évalués et les globules rouges totaux et parasités ont été comptés dans chaque champ. Pour le suivi clinique, des observations régulières de morbidité et de symptômes cliniques (atonie, hémi-tétraplégie, déviation de la tête, absence de réflexe d'autoconservation, poils, convulsion) ont été réalisées. Entre 6 et 10 jours après l'infection, les souris C57BL/6 infectées par *PbA* ont développé des symptômes neurologiques contrairement au souris B6.WLA-Berr2 qui meurent plus tard d'hyperparasitémie. Les souris C57BL/6 ont été euthanasiées au moment de l'apparition des symptômes du neuropaludisme, soit entre les jours 6 et 10 après infection. Des échantillons de cerveaux, de rate et de sérums ont été prélevés, traités et stockés pour les analyses détaillées ci-dessous.

Dosage de la Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)

Le dosage du LBP a été effectué en utilisant le kit ELISA Mouse Lipopolysaccharide Binding Protein (Thermofischer Scientific, #EL115) sur le plasma de chaque groupe de souris selon les instructions du fabricant. Le dosage a été effectué en double. La quantité de LBP a été mesurée dans un lecteur de photométrie avec une absorbance à 450nm. La valeur est représentée en ng/ml de plasma.

La mortalité par sepsis bactérien durant le paludisme est associée à une dysbiose du microbiote intestinal

Introduction

Les patients atteints de paludisme présentent un risque accru de développer une septicémie bactérienne concomitante qui participe à l'augmentation de la mortalité. Dans les zones d'endémie palustre 4 à 23% des enfants présentent une septicémie concomitante à un paludisme sévère^{323–325}. Bien que le paludisme est une cause rare de sepsis bactérien chez les patients adultes, il reste considérable, avec une incidence signalée de 13% en Afrique³²⁶. Le sepsis associé au paludisme est significativement plus fréquent chez les femmes comparées aux hommes³²⁷. Cependant, le chevauchement simultané du paludisme et l'élévation de la bactériémie limite notre capacité à déterminer l'étiologie du sepsis³²⁸. Par ailleurs, la plupart des zones endémiques du paludisme ont en général peu de ressources pour réaliser les diagnostics d'infections bactériennes invasives³²⁹. C'est pourquoi les grandes instances

recommandent la combinaison d'antibiotiques aux traitement antipaludiques afin d'éliminer entre autres les bactéries Gram négatives souvent impliquées dans les cas de septicémie associé au paludisme^{330,331}.

Depuis plusieurs décennies la dysbiose du microbiote intestinal est associée au développement de sepsis car dans la plupart des cas une translocation accrue des bactéries de l'intestin vers la circulation sanguine est observée³³². Lors de l'infection à *PbA*, une séquestration des GRp dans la vascularisation de l'intestin et des traces d'ADN parasitaires dans les selles des patients ont été détectées suggérant une interaction entre le parasite et le microbiote intestinal comme facteur causal du développement d'un sepsis^{324,332}. Plusieurs travaux de recherche dont les nôtres démontrent également que l'infection plasmodiale affecte l'intégrité intestinal et l'écosystème microbien^{110,158}. Dans ce sens des études de séquençage ont démontré que le microbiote intestinal est non seulement affecté par le sepsis mais participe également dans sa physiopathologie en régulant la fonction de la barrière intestinale et l'immunité innée et adaptative³³³.

Des altérations de la composition du microbiote intestinal peuvent être liées à une sensibilité accrue au sepsis, il est essentiel d'approfondir l'exploration des interventions ciblées sur le microbiote intestinal lors de maladies graves. Notre but a donc été d'étudier l'impact de la modification du microbiote intestinal sur la réponse inflammatoire de l'hôte chez une lignée de souris «génétiquement» résistantes au neuropaludisme (B6.WLA.Berr2)³³⁴. Nous émettons l'hypothèse que le microbiote intestinal de ces souris participe aux mécanismes de résistance face à la neuropathologie mais qu'en cas de dysbiose intestinale excessive il serait inducteur d'un choc septique. Dans un premier temps, nous avons modifié la composition du microbiote

intestinal avec des antibiotiques et montré que la dysbiose déclenche une réaction inflammatoire létale après infection par *PbA*. Nous avons identifié les bactéries du genre *Akkermansia* et *Blautia*, connues pour leur capacité à produire des acides gras chaîne courte (AGCC) comme étant associées à la dérégulation de la réponse immunitaire systémique qui pourrait entraîner un choc septique. Ces données ont montré que le microbiote intestinal joue un rôle régulateur dans la pathogenèse du paludisme en modulant la réponse inflammatoire de l'hôte.

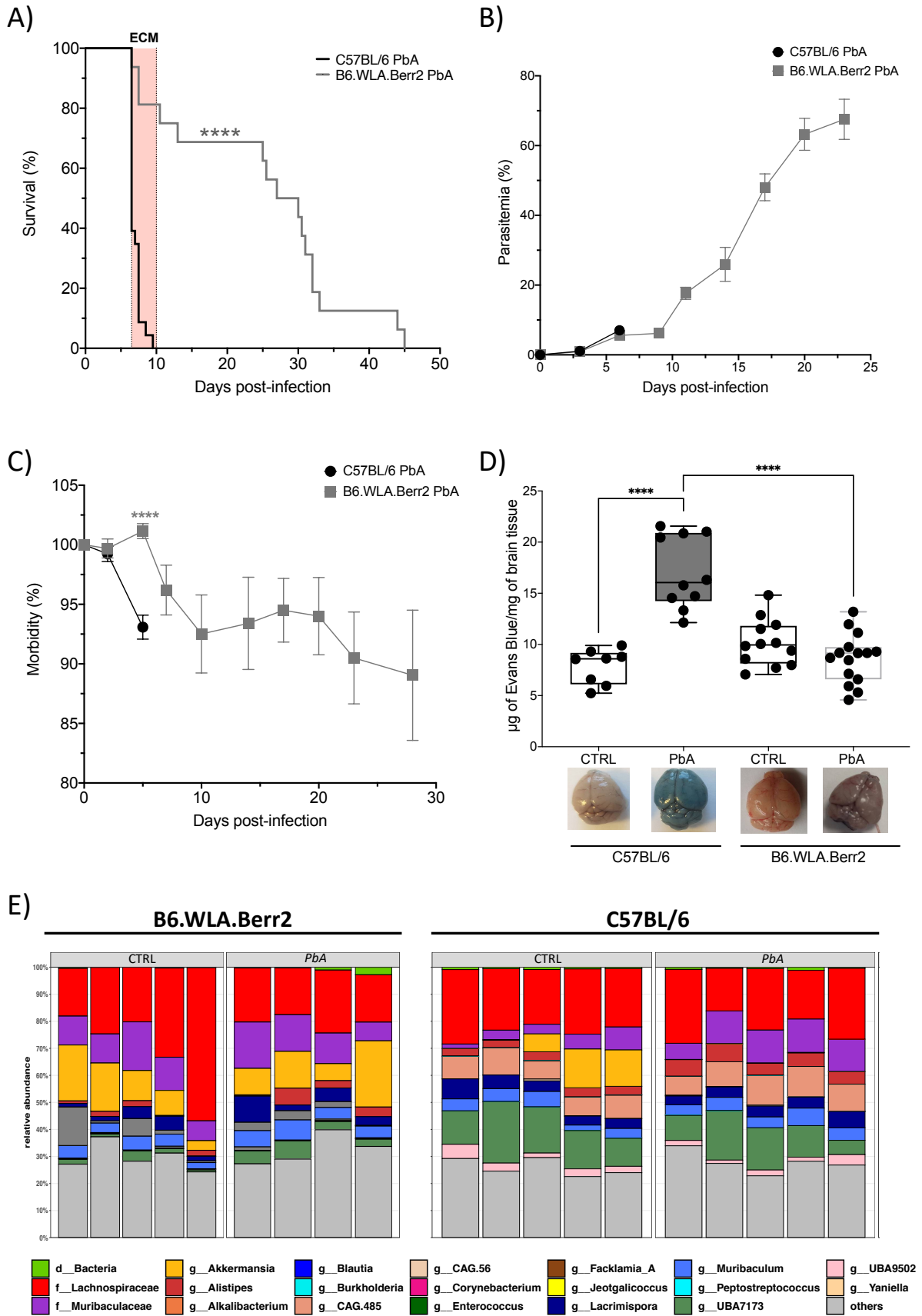
1) Modification de la composition du microbiote intestinal chez les souris NP^R et NP^S après infection par *PbA*

Une lignée de souris congéniques a été générée en transférant le loci WLA. Berr2 situé sur le chromosome 11, conférant le phénotype NP^R, sur le fond C57BL/6JR³³⁴. Nous supposons que cette variation génétique induit des changements dans la composition du microbiote intestinal contribuant au phénotype résistant des souris B6.WLA.Berr2. Les souris C57BL/6 (NP^S) et B6.WLA.Berr2 (NP^R) ont été infectées par des GRp par *PbA*. La majorité (70%) des souris B6.WLA.Berr2 sont NP^R ($p < 0,0001$) et meurent à 60-70% d'hyperparasitémie entre 25 et 35 jours post-infection, tandis que la totalité (100%) des souris C57BL/6 sont mortes de neuropaludisme entre 6 et 10 jours post-infection avec une cinétique de parasitémie similaire (Figure 1A, B). La cinétique de morbidité (perte de poids) suite de l'infection par *PbA* chez les souris NP^S est significativement plus prononcée ($p < 0,0001$) notamment au 5ème jour post-infection comparée aux souris NP^R. Le phénotype NP^S observé chez les souris C57BL/6 est caractérisé par des troubles physiologiques observés lors de l'apparition d'un NPE telle que la

rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) ($p < 0,0001$) (Figure 1D). Les souris B6.WLA-Berr2 ne présentaient pas de symptômes neurologiques ou de perturbation de la BHE ($p < 0,0001$) comparé aux souris C57BL/6 infectées (Figure 1D).

Nous avons ensuite caractérisé la composition du microbiote intestinal des souris NP^R et NP^S avant et après infection afin de déterminer des signatures microbiennes qui pourrait participer dans les mécanismes de résistances au neuropaludisme ou au contraire dans la neuropathologie. Ceci a été réalisé par séquençage NGS de l'ARNr 16S à partir de 20 échantillons de matière fécale. Une moyenne de 62 Giga-paire de bases (161 080 lectures) par échantillon a été générée afin de quantifier l'abondance relative des différents genres de bactéries. Nous observons que le microbiote intestinal des souris B6.WLA.Berr2 NP^R présente un microbiote intestinal proche des souris C57BL/6 NP^S, principalement composé de *Lachnospiraceae* (30,38%), *Muribaculaceae* (11,84%) et *Akkermansia* (12,47%) (Figure 1E). Toutefois nous constatons des différences de composition microbienne entre les deux souches de souris à l'état basal. En effet les souris C57BL/6 arborent d'avantage d'*Alistipes* (3,09%), de *CAG-485* (8,24%), d'*UBA-7173* (15,35%) et d'*UBA-9502* (3%) et moins de *Muribaculaceae* (6,27%) comparé aux souris NP^R (Figure 1E). L'infection à *PbA* chez les souris NP^R provoque une diminution des *Lachnospiraceae* (19,45%) par rapport aux souris CTRL mais n'affecte pas la proportion d'*Akkermansia* (13,51%), contrairement aux souris NP^S (Figure 1E). Afin de visualiser des différences de diversité microbienne nous avons réalisé une analyse UNIFRAC pondérée de la bêta-diversité représentée sous forme de PCA dont l'axe 1 et 2 recouvrent 47,23% et 20,66% de la variabilité respectivement (Figure 1F). Les souris NP^R et NP^S à l'état basal présentent une diversité de bactéries intestinales significativement différente (Figure 1F). L'infection à *PbA* chez les souris NP^R n'a pas induit de changement significatif de la diversité bactérienne comparé aux souris CTRL tandis que l'infection chez les

souris NP^S semble impacter la diversité de l'écosystème microbien (Figure 1F). Ces résultats suggèrent donc que le microbiote intestinal des souris NP^R et NP^S pourrait respectivement limiter ou au contraire prédisposer au développement du neuropaludisme.



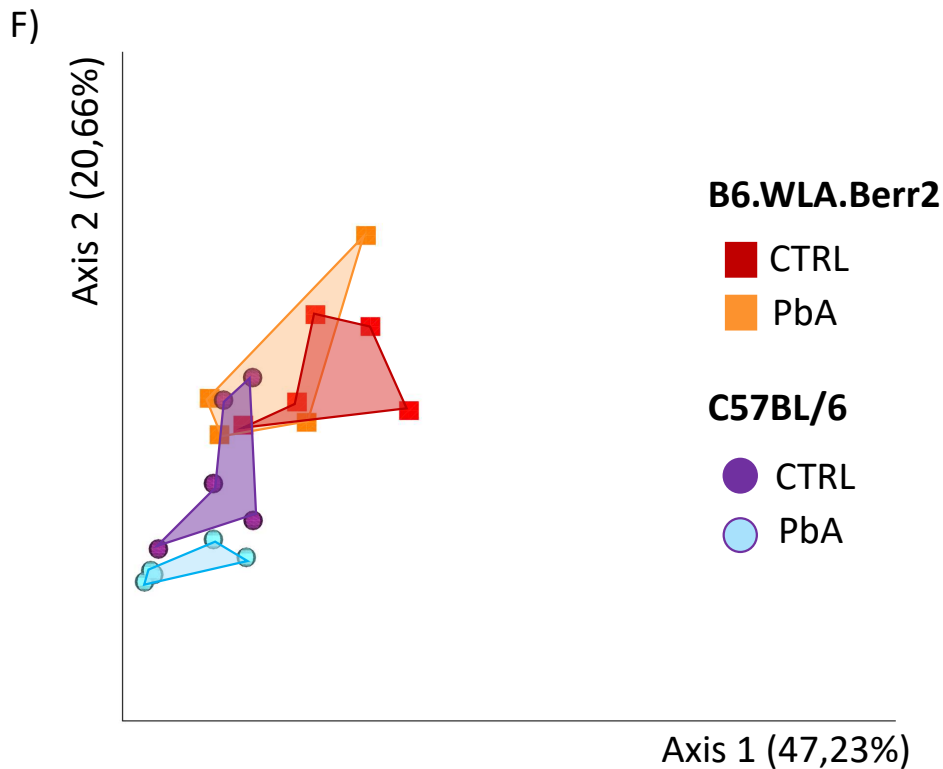


Figure 1 : Différence de composition du microbiote intestinal chez les souris NP^R et NP^S et protection contre le neuropaludisme. Des souris B6.WLA.Berr2 (NP^R) et C57BL/6 (NP^S) ont été infectées par des GRp par *PbA*. (A) Survie des souris après infection. Les courbes de survie ont été analysées avec le test de Mantel-Cox. (B) La parasitémie a été évaluée par frottis sanguin tous les 2 ou 3 jours après l'infection. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. (C) Pourcentage de perte de poids (morbidité) après infection. Les données ont été analysées par un test Mann Whitney. (D) Des souris ont reçu une injection du colorant de bleu d'Evans (BE) 7 jours après l'infection. Des souris sensibles et résistantes non infectées ont été utilisées comme témoins. Les quantités de BE par mg de tissu cérébral sont indiquées en µg/mg de tissu cérébrale. La composition des bactéries fécales a été analysée à l'aide du séquençage du gène de l'ARNr 16S chez des souris résistantes et sensibles avant et après l'infection à *PbA* (n=5/condition). (E) Abondance relative de la composition du microbiome intestinal déterminée au niveau des genres bactériens pour chaque groupe de souris. Chaque colonne représente un individu. (F) Analyse PCA de la beta-diversité du microbiote intestinal des différents groupes de souris basée sur la distance Unifrac pondérée entre les différents groupes. Chaque symbole représente une souris correspondant à la lignée et chaque groupe de souris est indiqué par une couleur différente. Une analyse de variance multivariée permutative (PERMANOVA) a été utilisée. Les données ont été analysées par une one-way-ANOVA. Les données sont représentées sous forme de moyennes avec écart-type. *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001.

2) Une dysbiose induite par un traitement antibiotique entraîne la mort des souris NP^R infectées par *PbA*

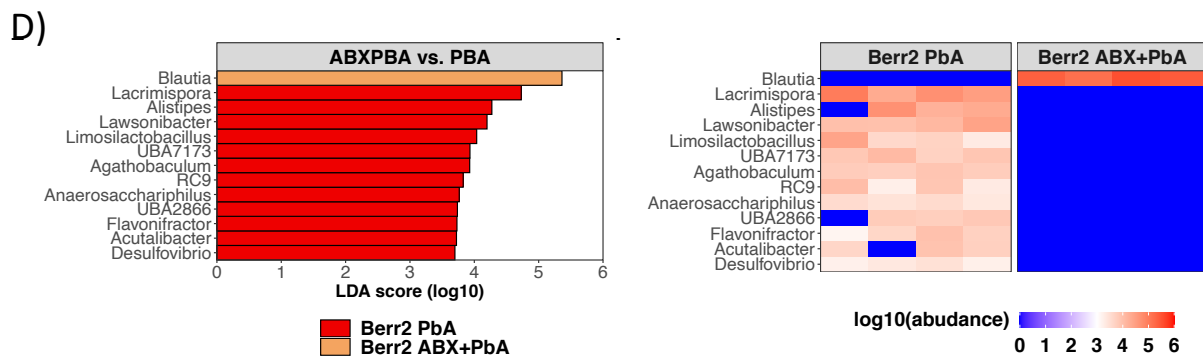
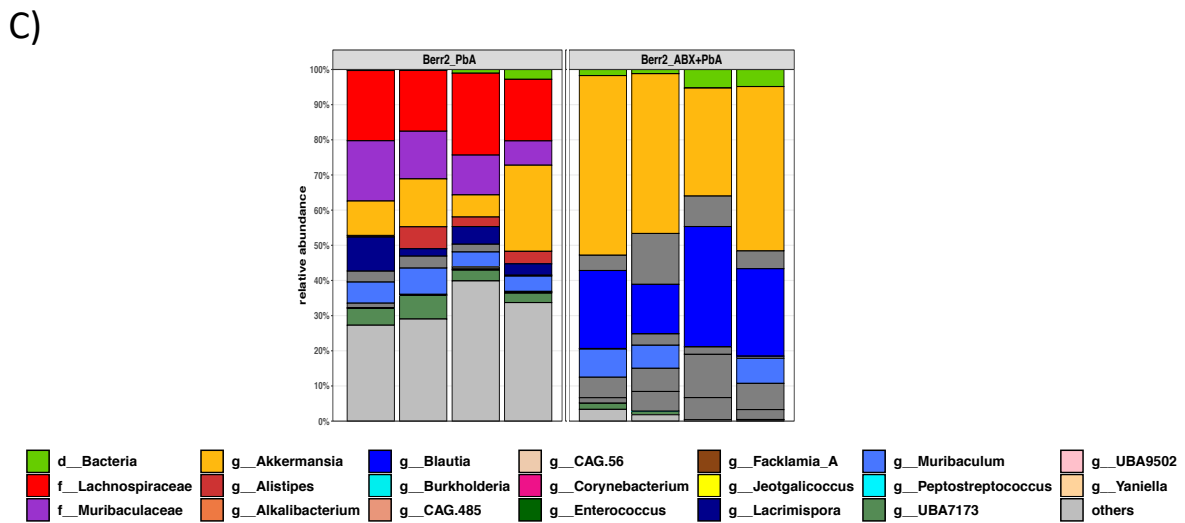
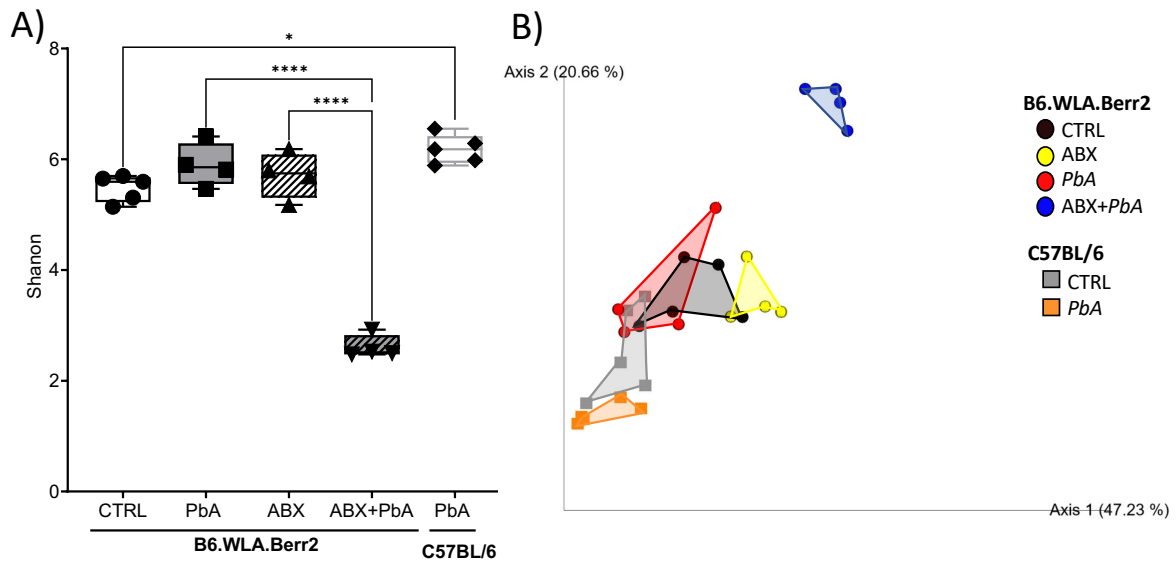
La résistance des souris au neuropaludisme (NP^R) semble être en partie liée à son microbiote intestinal. Mais que se passerait-il si l'on induisait une dysbiose du microbiote intestinal avant l'infection à *PbA* chez ces souris ? Pour répondre à cette question, nous avons induit une dysbiose du microbiote intestinal chez les souris B6.WLA.Berr2 à l'aide d'un traitement antibiotique pendant 21 jours avant de les infectées par *PbA*. L'impact de ce traitement combiné à l'infection sur la composition microbienne a été déterminé par séquençage de l'ARNr 16S à partir d'échantillons de selles et a été corrélé à la survie des souris. Une diminution significative de la diversité alpha (un paramètre qui mesure l'hétérogénéité globale des communautés) a été observée uniquement chez les souris NP^R traitées plus infectées par rapport aux souris NP^R et NP^S uniquement infectées ($p < 0,0001$) (Figure 2A).

L'analyse de la bêta-diversité par analyse UNIFRAC pondérée a permis d'observer une ségrégation significative pour les souris NP^R ABX et ABX+*PbA* par rapport aux souris NP^R CTRL ($p = 0,007$) et *PbA* ($p = 0,03$) (Fig. 2B). Ces variations de diversité nous ont amené à analyser l'abondance relative des genres bactériens. Chez les souris NP^R ABX+*PbA*, nous avons observé une nette augmentation des *Akkermansia* (43,46%) et des *Blautia* (23,78%) comparé aux souris NP^R uniquement infectées par *PbA* (Figure 2C).

L'analyse LEFSE couplée à une carte thermique de l'abondance relative des genres bactériens a été réalisée afin d'avoir une meilleure discrimination des bactéries significativement affectées par l'infection et le traitement ABX. Cette analyse a été réalisée en comparant les souris *PbA* versus ABX+*PbA* NP^R, seules les variations significatives ($p < 0,05$) et avec un score de LDA supérieur à 3 a été représenté dans la Figure 2D. Les souris NP^R traitées et infectées comparées aux souris uniquement infectées présentent une augmentation significative des

Blautia et une réduction d'un ensemble de bactéries tels que *Lacrimospora*, *Alistipes*, *Lawsonibacter*, *Limosilactobacillus*, *UBA7173*, *Agathobaculum*, *RC9*, *Anaerosaccariphilus*, *UBA2886*, *Flavonifractor*, *Acutalibacter* et *Desufovibrio* (Figure 2D).

Ce chamboulement de la composition du microbiote intestinal par le traitement ABX et l'infection plasmodiale a eu de lourde conséquence sur la survie des souris NP^R. En effet, au 10^{ème} jour post infection, environ 80% des souris NP^R survivent de l'infection à *PbA* tandis que seulement 30% des souris NP^R traitées et infectées ont survécu (Figure 2E). Nous n'avons pas constaté d'effet direct de la dysbiose intestinale sur le fitness du parasite, sur la morbidité associée à l'infection ou sur l'intégrité de la barrière intestinale chez les souris NP^R traitées et infectées comparé aux souris NP^R infectées uniquement (Figure supplémentaire 1A, B et C). En revanche, la dysbiose du microbiote intestinal chez les souris NP^R ABX+*PbA* a perturbé significativement ($p < 0,0001$) l'intégrité de leur BHE (Figure 2F). Ensemble ces résultats suggèrent qu'une proportion excessive d'*Akkermansia* et de *Blautia* seraient associée à la mortalité précoce des souris NP^R traitées et infectées.



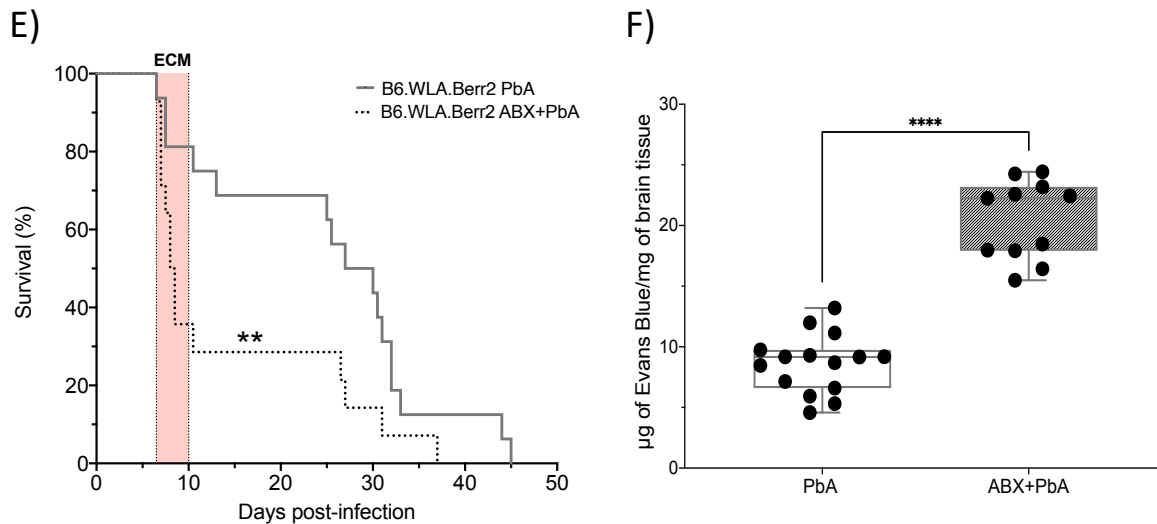


Figure 2 : L'induction d'une dysbiose du microbiote intestinal par traitement antibiotique suivie par une infection à *PbA* induit une létalité prématurée des souris NP^R. La composition des bactéries fécales a été analysée à l'aide du séquençage du gène de l'ARNr 16S chez des souris résistantes et sensibles avant et après le traitement ABX et l'infection par *PbA* (n = 5/groupe). (A) La diversité alpha a été déterminée à l'aide de l'indice de diversité de Shannon et analysée par un test one-way ANOVA. (B) Analyse PCA de la beta-diversité du microbiote intestinal des différents groupes de souris basé sur la distance Unifrac pondérée entre les différents groupes. Une analyse de variance multivariée permutationnelle (PERMANOVA) a été utilisée. (C) Abondance relative de la composition du microbiome intestinal déterminée au niveau des genres bactériens pour les souris NP^R infectées et traitées plus infectées. Chaque colonne représente un individu. (D) L'analyse LEFSE a été réalisée pour identifier les taxons bactériens qui se différencient significativement dans chaque groupe de souris représenté par un histogramme de la distribution des scores de l'analyse discriminante linéaire (LDA). Seuls les taxons présentant des différences statistiques (un seuil de signification LDA >4) entre les groupes sont affichés dans la figure. Carte thermique représentant l'abondance relative des genres bactériens les plus impactés entre les souris NP^R *PbA* et ABX+*PbA* discriminés par le LEFSE. Chaque colonne représente un sujet unique. Les données sont représentatives de 1 expérience (n = 4-5 souris par groupe) sous forme de moyennes avec écart-type. *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001. (E) Survie des souris B6.WLA.Berr2 (NP^R) traitées ou non par antibiotiques et infectées par des GRp par *PbA*. Les courbes de survie ont été analysées par le test Mantel-Cox. (F) L'intégrité de la BHE a été mesurée chez les souris NP^R par la mesure de BE exprimé en µg/mg de tissus cérébraux. Les données sont issues de 3 expérience indépendantes (n = 4-5 souris par groupe) et sont représentées sous forme de moyennes avec écart-type. *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001.

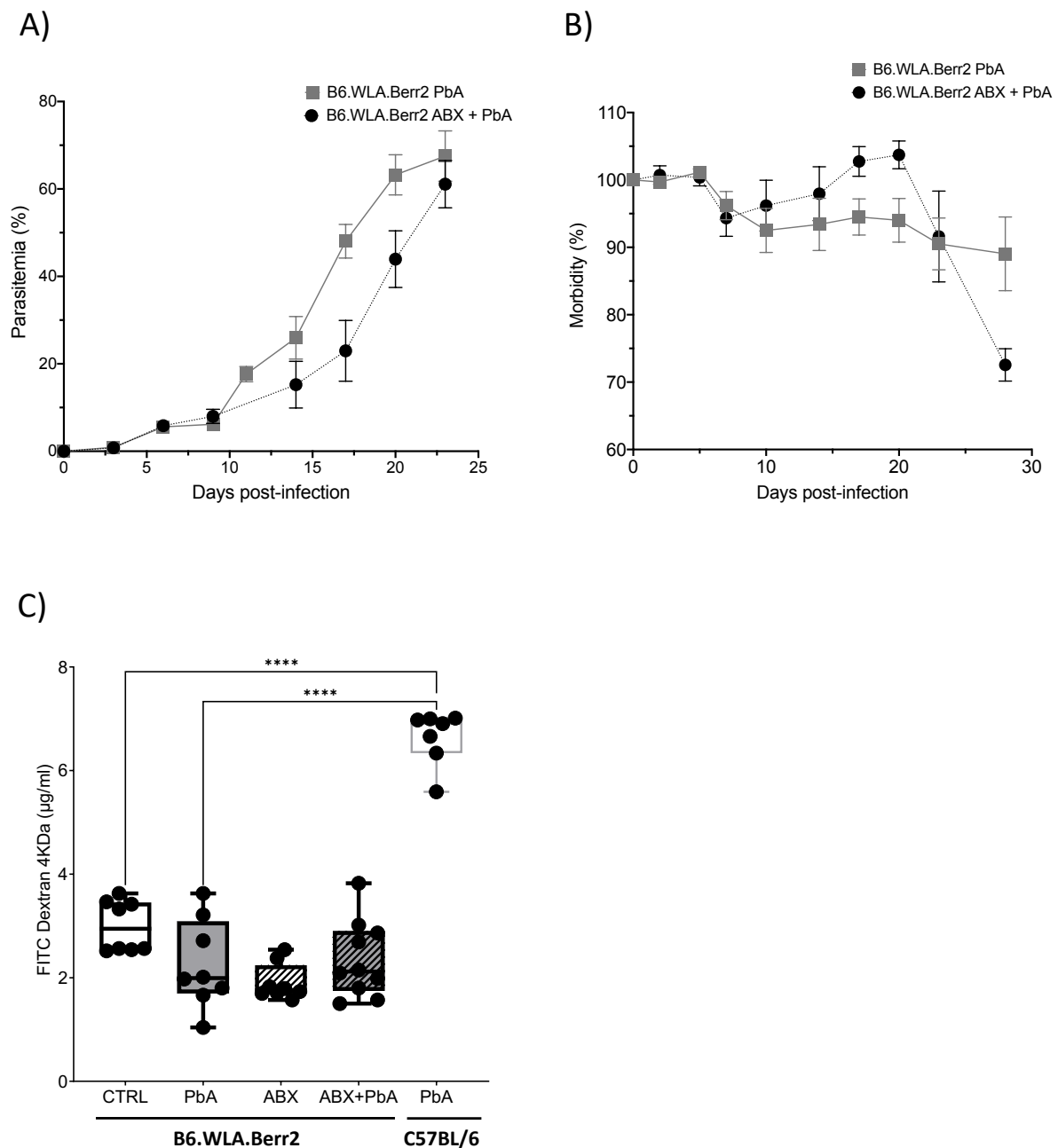


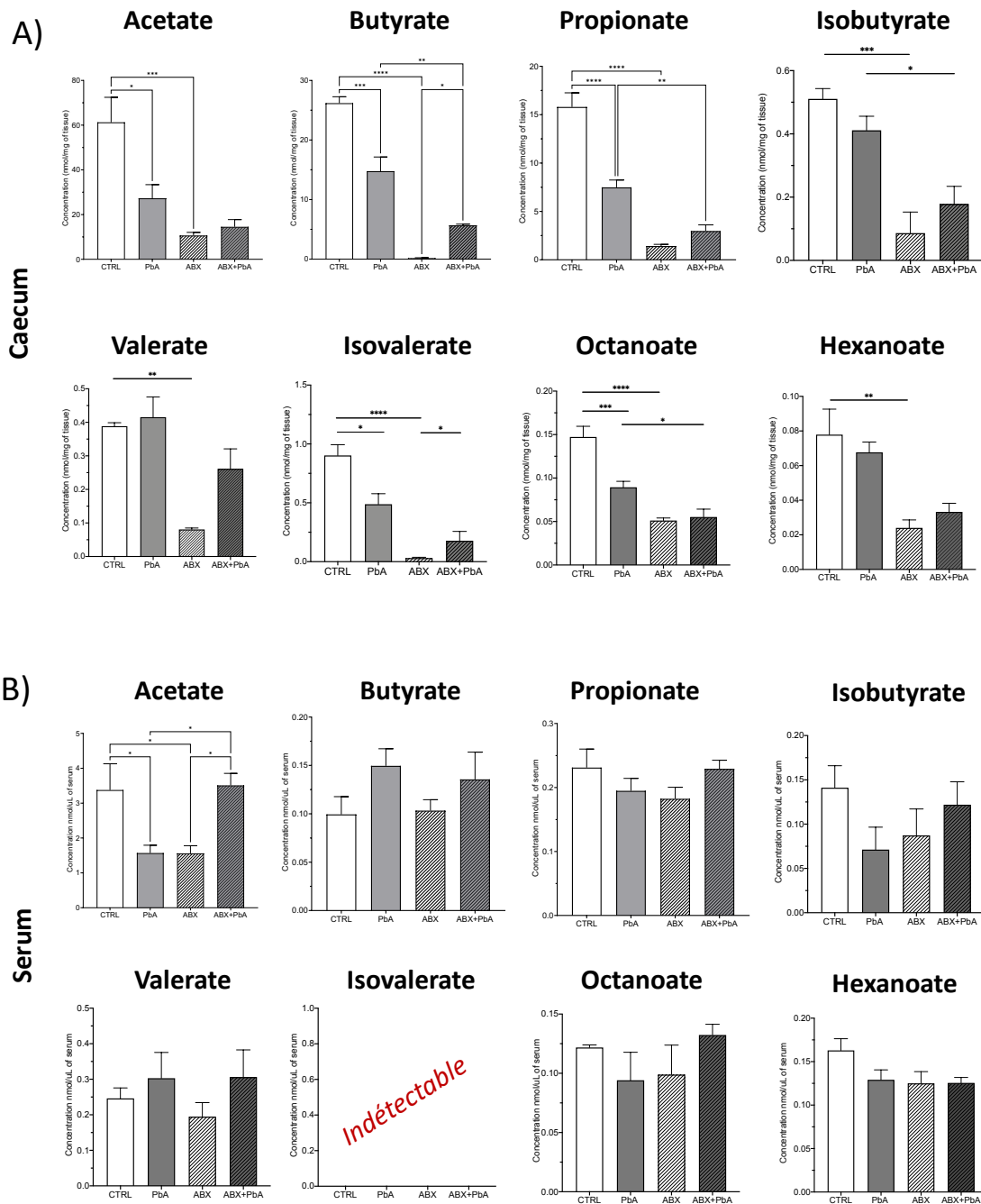
Figure supplémentaire 1 : La modification du microbiote intestinal par le traitement ABX avant l'infection par *PbA* n'a pas eu d'impact sur la parasitémie et l'intégrité intestinale. Des souris B6.WLA.Berr2 ont été infectées ou traitées plus infectées par *PbA*. (A) La parasitémie a été évaluée par des frottis sanguin tous les 2-3 jours après l'infection. Les données ont été analysées par le test Mann Whitney. (B) Pourcentage de perte de poids (morbidity) après infection. Les données ont été analysées par le test de Mann Whitney. (C) La concentration de FITC-dextran dans le plasma a été mesurée chez des souris B6.WLA.Berr2 traitées et/ou infectées et des C57BL/6 infectées. Les données sont des moyennes plus Ecart-type de 3 expériences indépendantes (n=5-6 souris par groupe). *P < 0,05 ; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

3) La dysbiose intestinale chez les souris NP^R module la distribution de métabolites inflammatoires bactériens dans l'hôte et favorise l'inflammation systémique

Certaines bactéries peuvent produire des AGCC, des molécules aux propriétés immunomodulatrices. Ces produits microbiens peuvent traverser la barrière intestinale et agir sur les cellules immunitaires circulantes, la barrière hémato-encéphalique et le microbiote intestinal. Pour déterminer si le traitement par ABX et l'infection par *PbA* ont un impact sur la production d'AGCC chez les souris NP^R, nous avons quantifié les niveaux d'AGCC dans le plasma et le caecum. Nos résultats montrent que le traitement ABX réduit significativement les concentrations de l'ensemble des AGCC au niveau caecal, alors que l'infection à *PbA* a réduit significativement les concentrations d'acétate ($p < 0,05$), de butyrate ($p < 0,001$), de propionate ($p < 0,0001$), d'isovalérate ($p = 0,0110$) et d'octanoate ($p = 0,0009$) (Figure 3A). Nous avons également constaté que les souris NP^R ABX+*PbA* ont des taux significativement plus faibles de butyrate ($p = 0,0023$), de propionate ($p = 0,0069$), d'isobutyrate ($p = 0,0257$) et d'octanoate ($p = 0,0357$) dans le caecum comparé aux souris infectées uniquement (Figure 3A). Au niveau plasmatique, l'acétate semble être le seul AGCC impacté. En effet, les souris NP^R *PbA* ($p = 0,0370$) et ABX ($p = 0,480$) présentent significativement moins d'acétate que les souris CTRL (Figure 3B). Tandis que les souris NP^R ABX+*PbA* ont des taux sériques d'acétate équivalents à ceux des souris CTRL et donc supérieurs à ceux des souris infectées uniquement ($p = 0,0244$) (Figure 3B).

Afin de déterminer si le déséquilibre des concentrations d'AGCC a eu un impact sur la réponse inflammatoire chez les souris NP^R, nous avons mesuré l'expression génique par qRT-PCR d'un ensemble de cytokines/chimiokines impliquées dans l'inflammation au niveau du cerveau (Figure supplémentaire 2) et leur dosage protéique au niveau du plasma (Figure 3), 7 jours

après infection. L'analyse des données dans chaque groupe de souris NP^R et NP^S à travers des cartes thermiques nous ont permis de distinguer uniquement une perturbation de la réponse inflammatoire systémique au sein des souris NP^R ABX+*PbA*. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *Cxcl10* ($p=0,0281$), *Il-10* ($p<0,0001$), *Ifn α* ($p=0,0108$) et une diminution de *Ccl2* ($p=0,0005$) et *Ifn- γ* ($p=0,0277$) par rapport aux souris NP^R *PbA* (Figure 3C). Le profil d'expression des cytokines des souris NP^R ABX+*PbA* ressemble à celui des souris NP^S. Ces résultats suggèrent que la dysbiose induite par le traitement ABX avant l'infection par *PbA* engendre un désordre dans la distribution des AGCC dans l'organisme favorisant l'inflammation systémique.



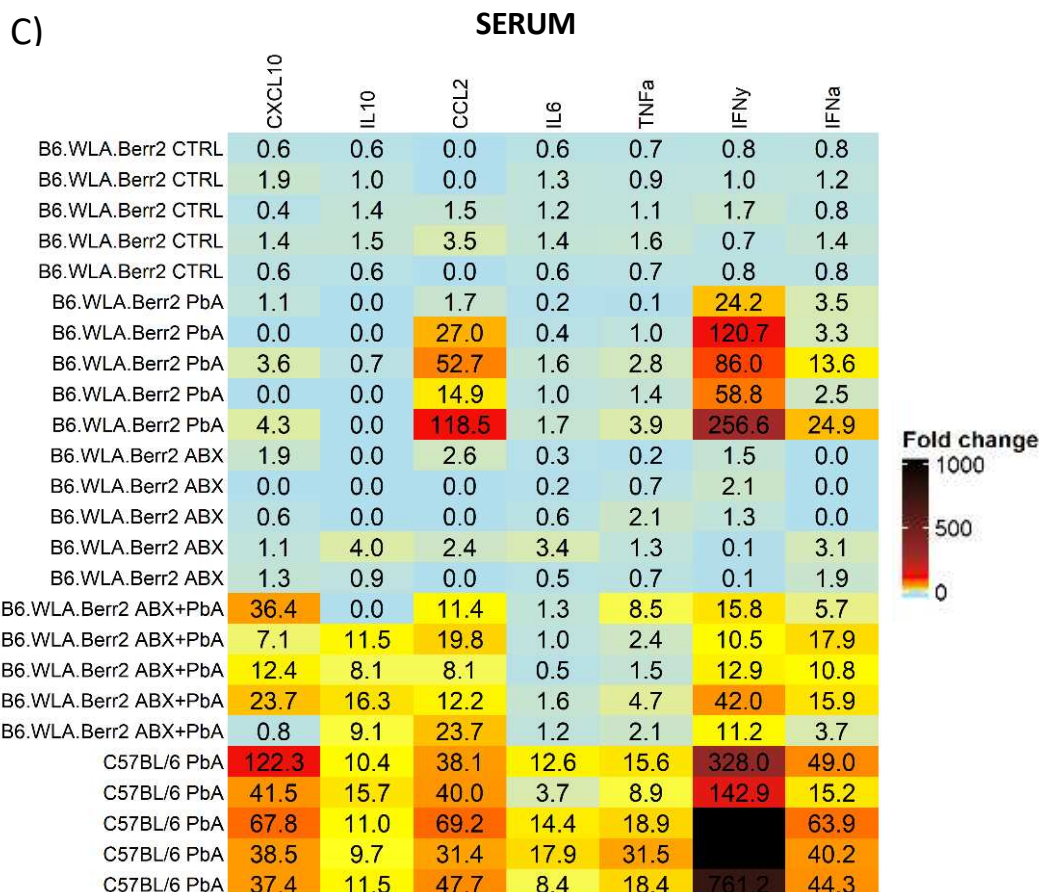


Figure 3 : La dysbiose intestinale chez les souris NP^R module la distribution de métabolites inflammatoires bactériens dans l'hôte et favorise l'inflammation systémique. (A) La concentration d'acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate, l'isobutyrate, l'isovalérate, l'octanoate et l'hexanoate dans le caecum et (B) dans le serum des souris NP^R a été quantifiée par chromatographie en phase gazeuse-liquide. Les données ont été analysées par un one-way-ANOVA. (C) Carte thermique des niveaux d'expression *Il-10*, *Il-6*, *Tnfa*, *Ifn γ* , *Ifna*, *Cxcl10* et *Ccl2* dans le plasma de souris B6.WLA.Berr2 et C57BL/6 ont été représentées. Les niveaux d'expression des cytokines sériques ont été quantifiées par cytométrie en flux. Les niveaux relatifs de protéines dans chaque groupe ont été normalisés avec le groupe CTRL. Chaque ligne représente un individu et les données sont représentative d'une expérience (n = 5 souris par condition). La diminution et l'augmentation des niveaux d'expression protéiques sont affichées en bleu et rouge, respectivement. Un test one-way-ANOVA a été utilisé pour chaque cytokine séparément. *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001.

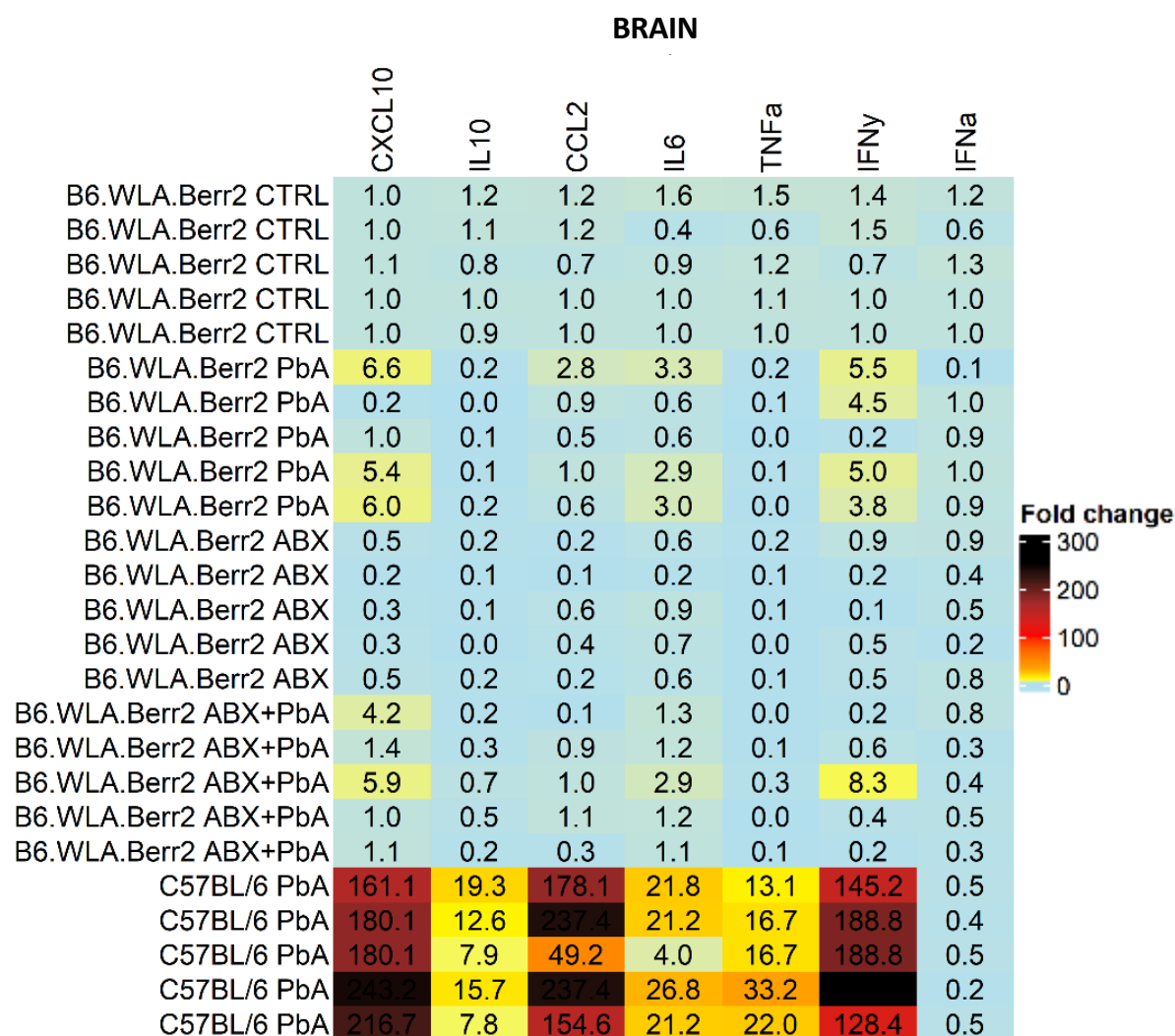


Figure supplémentaire 2 : La dysbiose intestinale chez les souris NP^R n'impacte pas l'inflammation cérébrale. Carte thermique des niveaux d'expressions d'*Il-10*, d'*Il-6*, de *Tnfa*, d'*Ifny*, d'*Ifna*, de *Cxcl10* et de *Ccl2* dans le cerveau des souris B6.WLA.Berr2 et C57BL/6 ont été représentées. Les niveaux d'expression ont été évalués par RT-qPCR avec HPRT comme référence interne. Les niveaux d'ARNm et de protéines relatifs dans chaque groupe ont été normalisés avec le groupe CTRL. Les données sont affichées sous la forme de moyenne représentative d'une expérience (n = 5 souris par condition). L'augmentation relative de l'expression est calculée (« fold change »), la diminution et l'augmentation sont représentées en bleu et en rouge, respectivement. Un test one-way-ANOVA a été utilisé pour chaque cytokine séparément. *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

4) La dysbiose intestinale induit un choc septique chez les souris NP^R traitées et infectées avec *PbA*

Les produits bactériens pro-inflammatoires et les infections parasitaires peuvent potentialiser des réactions inflammatoires augmentant la susceptibilité de l'hôte au choc septique avec des dommages multi-organes augmentant la mortalité. Pour analyser si la dysbiose intestinale est associée à une septicémie qui pourrait expliquer la mortalité précoce observée dans le groupe NP^R ABX+*PbA*, nous avons quantifié dans le plasma le « Lipopolysaccharide Binding Protein » (LBP), un facteur clé impliqué dans le déclenchement de la réponse pro-inflammatoire induite par les lipopolysaccharides (LPS) libérés par certaines bactéries. Nous avons observé que le traitement ABX seul n'affecte pas le niveau de LBP dans le plasma des souris NP^R (Figure 4A). Cependant, l'infection à *PbA* induit une augmentation significative ($p=0,0009$) du LBP sérique par rapport aux souris CTRL NP^R. En revanche, les souris NP^R ABX+*PbA* ont un niveau plus faible du LBP que les souris NP^R *PbA* dans le plasma ($p = 0,0152$) suggérant un passage de LPS dans le système circulatoire qui n'est plus régulé par la LBP et pourrait être corrélé à l'augmentation de l'inflammation systémique chez les souris NP^R ABX+*PbA* (Figure 4A).

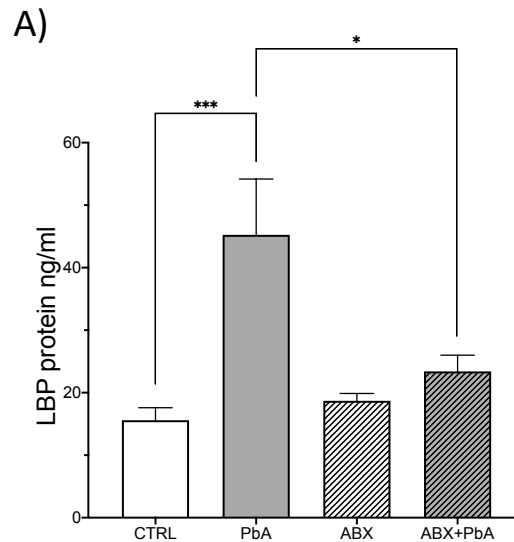


Figure 4 : La dysbiose intestinale induit un choc septique chez les souris NP^R traitées et infectées avec *PbA*. (A) Niveau de LBP dans le plasma des souris B6.WLA.Berr2 CTRL, *PbA*, ABX et ABX+*PbA*. (n=10 souris par condition) Les données sont la moyenne avec écart-type d'une expérience et ont été analysées par un le test one-way-ANOVA. La significativité a été représentée par *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001. (B)

Discussion

Nos travaux montrent que la dysbiose du microbiote intestinal induite par un traitement antibiotique est capable de moduler la sévérité de l'infection chez les souris B6.WLA.Berr2, résistantes au neuropaludisme. La particularité de ce modèle est qu'il a le même fond génétique que la souris C57BL/6 à l'exception d'un allèle sur chromosome 11 qui correspond au locus Berr2, locus associé à la résistance au NP^{334,335}. Ainsi, lors d'une infection à *PbA*, les souris B6.WLA.Berr2 ne développent pas de NPE contrairement aux souris C57BL/6, qui est un modèle de choix pour analyser les réponses immunitaires dans la physiopathologie de l'infection à *PbA*.

Nos expériences ont montré que l'utilisation d'antibiotiques avant infection chez les souris résistantes, provoque une mortalité précoce accompagnée d'une rupture de la perméabilité de la BHE alors qu'aucun dommage n'est observé sur le « fitness » du parasite ou sur l'intégrité de la barrière intestinale. Le fait que la barrière intestinale ne semble pas être perturbée par le traitement antibiotique est paradoxale car de nombreux travaux démontrent que la plupart des

traitements antibiotiques favorisent la dysbiose intestinal, diminue la production de jonction serrées de la barrière intestinal conduisant à des troubles inflammatoires intestinaux³³⁶. Cependant, ces effets sur l'intégrité intestinale sont variables selon le type, la durée, la concentration et le mode d'administration des antibiotiques³³⁷. À cela s'ajoute la composante génétique qui varie d'un modèle murin à un autre, or de nombreux facteurs génétiques interagissent avec la restitution épithéliale, la défense microbienne, la régulation de l'immunité innée, l'apoptose/nécroptose cellulaire, le stress oxydatif et la fonction de barrière intestinal participant ainsi dans la protection ou la prédisposition à la rupture de l'intégrité intestinale³³⁸.

La détérioration de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est souvent associée à des troubles neuro-inflammatoires comme observé chez les souris C57BL/6 qui développent un NPE. Hors les souris B6.WLA.Berr2 traitées et infectées ne présentaient pas d'inflammation cérébrale^{339,340}. D'autre part, même si l'intégrité intestinale ne semble pas être perturbée par l'infection et le traitement ABX, les souris B6.WLA.Berr2 traitées et infectées ont présenté un microbiote intestinal dont la diversité et la quantité ont été réduites et la composition microbienne altérée. De nombreuses études montrent que le microbiote intestinal intervient dans la modulation de l'expression des protéines de jonctions serrées au niveau de la barrière intestinale et cérébrale^{262,341}. En effet, les travaux d'*Alexandro et al* montrent que la diminution de certaines bactéries ou la diversité du microbiote intestinal est positivement corrélée à l'intégrité de BHE³⁴²⁻³⁴⁴. Il est probable que dans notre étude, l'expansion excessive d'*Akkermansia* au détriment de *Lachnospiraceae* est à l'origine de la perturbation de l'intégrité de la BHE. En effet le déséquilibre du microbiote a provoqué la diminution d'acétate, de butyrate et de propionate, qui sont des molécules produites par certaines bactéries de la flore intestinale et qui participent au renforcement de la BHE^{345,346}.

Cependant, la dysbiose induite par le traitement antibiotique et l'infection plasmodiale n'a pas eu le même impact sur la barrière intestinale et cérébrale des souris B6.WLA.Berr2. Les barrières hémato-encéphalique et intestinale présentent des différences de composition cellulaire et de micro-environnement qui peuvent expliquer les effets fluctuants du microbiote intestinal sur l'intégrité de ces barrières³⁴¹. La barrière intestinale est constamment confrontée à des agents exogènes (bactéries, champignons, virus, etc.), et possède une couche de mucus. À l'inverse, la BHE est rarement exposée à des bactéries qui plus est à des pathogènes^{347,348}. De plus, la répartition et la proportion des jonctions serrées et adhérentes diffèrent entre les deux barrières. Une plus grande expression de claudine 5 et d'occludine mais pas de claudine 15 est observée au niveau de la barrière cérébrale contrairement à la barrière intestinale³⁴⁹.

Nos résultats montrent une mortalité précoce des souris B6.WLA.Berr2 ABX+*PbA* entre le 6ème et le 10ème jour après l'infection avec une faible parasitémie, des symptômes de poils hérissés, une certaine forme d'ataxie, une absence d'inflammation cérébrale mais des niveaux de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines élevées dans le plasma. En outre, l'observation de la réduction d'un spectre d'AGCC immunorégulateur et du LBP Nous ont conduit à supposer que ces souris soient mortes d'un choc septique. La septicémie est souvent associée à un dysfonctionnement multi-organique potentiellement mortel lié à un syndrome inflammatoire systémique qui est dérégulée dans le cadre d'une infection³⁵⁰.

Le niveau inférieur de LBP a été détecté dans le plasma des souris ABX + *PbA* NP^R. La LBP est une protéine qui fixe le LPS pour le transférer à la voie TLR4-CD14 et réguler l'inflammation³⁵¹.

Une augmentation du LPS, des bactéries à Gram négatif ou des agents non infectieux dans le système circulatoire induit en réponse une élévation du LBP pour limiter l'inflammation³⁵².

Les patients présentant un sepsis sévère ont une production de LBP compromise, comme le démontre la diminution de concentration sérique de LBP souvent associé à un état

d'inflammation systémique critique³⁵¹. Ceci suggère que la dysbiose intestinale associée à l'infection *PbA* a permis la translocation de bactéries ou de facteurs bactériens tel que le LPS qui n'est pas contrebalancée par la LBP. La LBP est une protéine de phase aiguë dont les niveaux peuvent être augmentés dans toutes situations d'inflammation, et ne suffit donc pas à apprécier une quantité de bactéries, ni à affirmer qu'elle correspond à un sepsis. Il reste donc à confirmer cette hypothèse en dosant les niveaux de LPS plasmatique ainsi que les niveaux de CD14 membranaire et soluble. En outre la réduction significative des niveaux d'AGCC sériques chez les souris B6.WLA.Berr2 ABX+*PbA* pourrait être également corrélée à l'inflammation systémique lors du sepsis. En effet, les travaux réalisés par *O'Keefe et al* démontrent une diminution significative des AGCC corrélée avec l'immunité systémique observée chez les patients atteints d'inflammation critique^{353,354}. En outre, des travaux visant à étudier l'impact de probiotiques, de transplantation de matière fécale ou d'administration d'AGCC ont montré des effets bénéfiques sur le microbiote intestinal permettant de limiter voire empêcher le développement du sepsis^{355,356}. Même si la perméabilité intestinale ne semble pas compromise dans notre contexte, il existe différents mécanismes par lesquels les bactéries (ou leurs métabolites) sont capables de passer de la lumière intestinale à la circulation sanguine, comme le passage transcellulaire, paracellulaire au niveau des jonctions serrées ou par le « cheval de Troie » en infectant les cellules immunitaires³⁴¹. En outre, l'une des failles de la barrière intestinale sont les cellules M qui sont des passerelles pour les bactéries capables de dégrader le mucus comme les bactéries du genre *Akkermensia* qui sont augmentées dans notre contexte³⁵⁷.

En plus de l'augmentation d'*Akkermensia*, il y a une nette élévation de l'abondance de *Blautia* chez les souris qui meurent précocement. Les bactéries du genre *Ruminococcus* et *Clostridium* ont récemment été reclassées dans le genre *Blautia* et peuvent participer à l'état inflammatoire dans de nombreux contextes pathologiques tels que la maladie de Crohn, le

lupus érythrocytaire, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et le choc septique^{358,359}. En effet, ces bactéries sont connues pour induire la production de TNF- α , d'IFN- γ et d'autres composés pro-inflammatoires par des cellules dendritiques^{358,360,361}. Certains *Clostridium* sécrètent des toxines A et B qui, même à de faibles concentrations dans la circulation sanguine, sont capables d'induire une inflammation délétère dans de nombreux organes³⁶². L'effet de ces toxines agit sur le recrutement des neutrophiles, l'activation des macrophages, des mastocytes et induit la libération de médiateurs inflammatoires par les leucocytes^{363,364}. Il est donc possible que dans la première phase, la dysbiose intestinale ait provoqué une inflammation locale qui s'est ensuite généralisée³⁶⁵. De nombreux essais expérimentaux ont montré que les souris axéniques ont une inflammation intestinale plus élevée lors d'un défi infectieux contrairement aux souris « sauvages »^{366,367}. *Mishima et al*, ont observé que les microorganismes intestinaux sont capables d'induire un terrain immunotolérologène en favorisant la production d'IL-10 par diverses cellules immunitaires, y compris les macrophages, les cellules B et les lymphocytes, favorisant ainsi l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Treg)^{368–370}. De plus, *Seekatz et al* ont suggéré que la réduction de certaines bactéries productrices d'acétate, de butyrate et de propionate favorisent l'inflammation^{371–374}. Ainsi, la diminution de la diversité, de la quantité microbienne, de l'expansion de *Blautia* couplée à la diminution d'acétate, de butyrate et de propionate dans le caecum et le sérum de souris résistantes traitées et infectées pourraient être associées à l'augmentation de CXCL10, d'IFN- α et de TNF- α dans le plasma provoquant un choc septique chez les souris résistantes traitées et infectées.

Conclusion

Nos résultats permettent de mieux comprendre l'impact du microbiote intestinal sur l'inflammation induite par une infection plasmodiale. Il souligne également que l'utilisation d'antibiotiques lors de la prise en charge des patients atteints de paludisme pourrait être contreproductive, car par l'induction d'une dysbiose intestinale, cela pourrait contribuer à la gravité de l'infection.

Projet PROMAL : La modification du microbiote intestinal par administration de probiotiques protège du neuropaludisme expérimental

Les références citées dans le projet ont été incluses à la fin du manuscrit. Ce projet n'aurait pas été réalisable sans la collaboration avec Saïdi Nasredinne (ingénieur d'étude) et Oulfata Mze (stagiaire de Master2).

INTRODUCTION

Les avancées récentes dans la compréhension du microbiote intestinal ont mis en lumière son rôle crucial dans la régulation de divers processus physiologiques, y compris ceux liés au système nerveux central³⁷⁵. Les composants du microbiome intestinal, le cerveau et l'intestin sont connectés via l'axe intestin-cerveau avec des interactions bidirectionnelles entre le système nerveux central, le système nerveux entérique et le tractus gastro-intestinal¹⁷². Ces interactions bidirectionnelles font intervenir trois principales voies d'interaction : 1) Le système neuroendocrinien, 2) Le système immunitaire et 3) le système neuronal. Ces interactions permettent une régulation de la fonction intestinale par le cerveau

et vice versa via des mécanismes directs et indirects¹⁶⁹. Des perturbations dans l'équilibre du microbiote, sont de plus en plus associées à diverses maladies, notamment celles caractérisées par des troubles neuro-inflammatoires^{171,257,376}. L'utilisation de probiotiques, bactéries ayant des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, est une approche novatrice pour rétablir l'équilibre du microbiote intestinal¹⁶⁹. Les probiotiques peuvent moduler la composition du microbiote, la production de cytokines inflammatoires et modifier la fonction des cellules du système immunitaire^{249,268,377}. Leur utilisation en vue du traitement des maladies neuro-inflammatoires présente donc une approche prometteuse dans ce domaine¹⁶⁹. Certaines études ont déjà démontré que l'administration de probiotiques composés de *Bacillota* ou d'*Actinomycetes* permet de réduire la gravité de certaines maladies neuroinflammatoires comme l'Alzheimer, le Parkinson ou encore la sclérose en plaques³⁷⁸⁻³⁸¹. Par ailleurs, les travaux de *Braniste et al* ont montré que l'administration d'AGCC ou de bactérie productrice d'AGCC comme *Clostridium tyrobutyricum* était également bénéfique pour restaurer l'intégrité de la BHE et limiter l'activité inflammatoire des cellules gliales et des autres cellules du SNC^{111,262,264}. Dans le contexte des maladies neuro-inflammatoires tel que le neuropaludisme, où une inflammation excessive serait responsable de la pathologie, l'effet régulateur des probiotiques sur le microbiote intestinal offre une perspective intéressante compte tenu de nos travaux précédents mettant en lumière le rôle du microbiote intestinal dans la neuropathologie associée à l'infection par *Plasmodium*.

Le projet PROMAL est une étude menée au laboratoire en collaboration avec l'équipe Influenza, Immunité et Métabolisme (I2M, CIIL-CNRS 9017-Inserm 1019-Institut Pasteur de Lille) et l'équipe Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine, Microbiote pré- et post-natal (PPPHM, UMR-INSERM S1139-Université Paris Cité). Cette étude a visé à :

- 1) identifier des probiotiques à partir d'un soucier de 40 bactéries de collection ou de

souches industrielles ayant des activités anti-inflammatoire sur les cellules gliales, 2) déterminer leur mécanisme d'action sur le MI et 3) tester leur activité protectrice *in vivo* contre le développement du NP dans un model expérimental murin.

Pour des raisons de confidentialité, un code a été attribué à chacune des bactéries car nous ne pouvons pas divulguer le nom des souches bactériennes utilisées.

1) Criblage des probiotiques à propriété anti-inflammatoire

Dans un premier temps, la sélection des probiotiques présentant des propriétés anti-inflammatoires a été réalisée en testant leur capacité à inhiber la réponse inflammatoire de primo-culture de cellules gliales murines induite par une stimulation avec du LPS ou des GRp-*PbA*. Pour ce faire, les cellules ont été mises en contact avec des suspensions de bactéries du soucier (40 bactéries testées individuellement), pendant 6h. La capacité anti-inflammatoire des probiotiques a été mesurée en suivant l'expression génique par RT-qPCR et un dosage protéique par imagerie confocale automatisé de cytokines pro-inflammatoire (CXCL10), et anti-inflammatoire (LIF, TGF- β , IL-10). Les bactéries capables de réduire l'inflammation des cellules gliales dans les deux conditions de stimulation *in vitro* ont ensuite été évaluées dans un modèle murin de neuropaludisme (souris C57BL/6 NP^S). La capacité des souches à moduler le microbiote intestinal (partie non abordée par soucis de confidentialité) et d'inhiber le développement du neuropaludisme a été suivie.

Une quarantaine de souches de probiotiques (principalement des *Actinobactéries* et des *Bacillota*) ont été sélectionnées par le Dr Corinne Grangette, sur la base de leurs propriétés

anti-inflammatoires notamment par leur capacité à induire de l'IL-10, après stimulation *in vitro* de cellules immunes isolées de sang humain (PBMCs) et pour certaines de protéger dans un modèle murin de colite³⁸². Leur capacité anti-inflammatoire sur des cellules gliales n'était pas connue. Comme attendu, le niveau de transcription de *Cxcl10* était augmenté de manière significative dans les cellules gliales après la stimulation par GRp-PbA ($p < 0,05$) ou par le LPS ($p < 0,0001$) (utilisés comme témoins positifs) mais aussi par certaines souches seules tels que les souches A3.5, A7.59 et A6.61. En revanche, le traitement par les souches A7.85, A7.72 et A.29 ont permis d'induire de manière significative une augmentation d'expression d'*Il10*, de *Tgfb* et de *Lif* (****P < 0,0001) (Figure 1A). Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'expression de *Cxcl10*, *Il10*, *Lif*, *Tgfb* dans les cellules stimulées pendant 6h avec des GRp-PbA ou du LPS puis incubées pendant 6h supplémentaire avec les probiotiques. Comme le montre les Figures 1B et 1C, l'expression du *Cxcl10* induit par PbA était significativement inhibée par la plupart des souches potentiellement probiotiques. Certaines souches comme A7.87, A7.99 ou A2.27 ont inhibé de 4 fois l'expression de *Cxcl10* dans les cellules stimulées au LPS (*P < 0,05) (Figure 1B). De plus, une grande partie des probiotiques ont induit de manière significative une forte expression d'*Il10* comme A2.29, A7.72, A7.31 et A7.59 qui ont multiplié par 3 l'expression de cette cytokine anti-inflammatoire (Figure 1B). En revanche, l'utilisation de bactéries potentiellement probiotiques sur des cellules gliales stimulées avec des GRp-PbA semble augmenter l'expression de *Cxcl10* (Figure 1C). Toutefois, certains probiotiques comme A7.85, A2.29 et A7.59 ont stimulé de manière significative l'expression d'*Il10*. Aucun changement pour le *Lif* et le *Tgfb* n'a été observé. L'ensemble de ces résultats suggère que les souches potentiellement probiotiques régulent différemment la réponse pro-inflammatoire des cellules gliales activées, soit par inhibition des facteurs pro-inflammatoires soit par induction de l'expression de facteurs anti-inflammatoires.

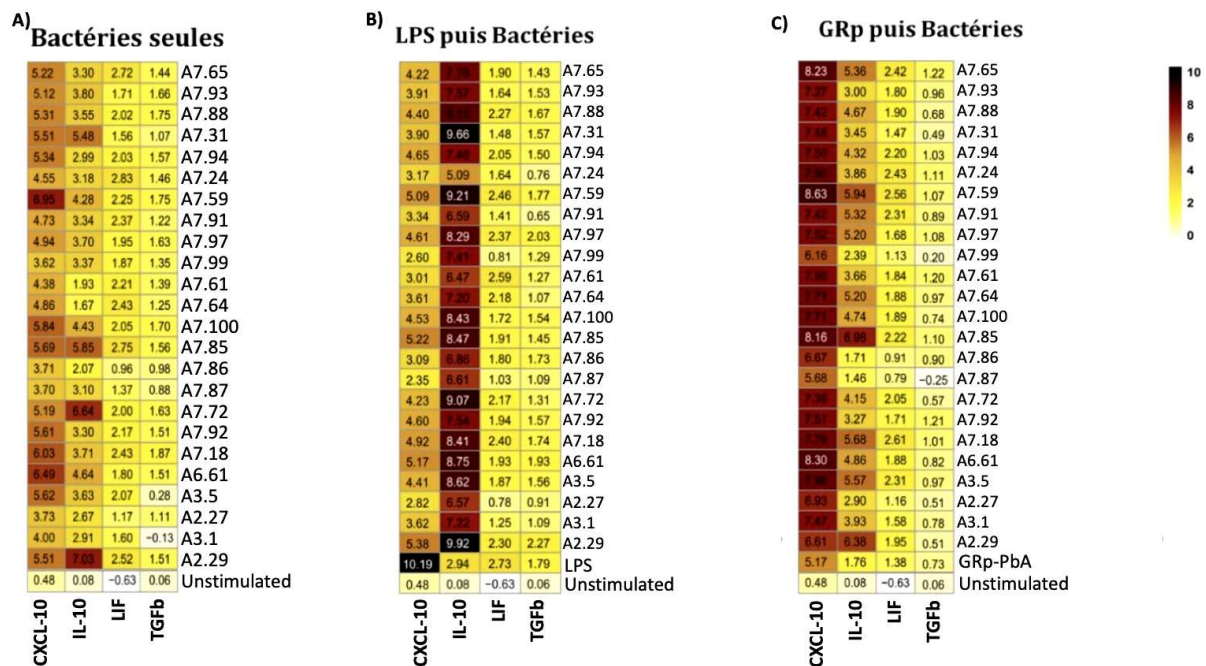


Figure 1 : Profil d'expression des cytokines/chimiokines des astrocytes-microglies avec/sans stimulation et effet des souches potentiellement probiotiques. A) Cytokines/chimiokines induites par les astrocytes-microglies stimulés uniquement avec des probiotiques dans un rapport 10:1 pendant 6h. Le taux d'expression des cytokines/chimiokines a été normalisé par rapport à la condition non traitée. Expression relative des gènes liés à l'inflammation, *Cxcl10*, *Il10*, *Tgfb* et *Lif* induite par les cellules gliales stimulées 6h par : B) le LPS puis les bactéries C) les GRp-*PbA* puis les bactéries par rapport à celle des cellules stimulées uniquement, évaluée par RT-qPCR. Les données représentent la moyenne $\pm$ erreur standard obtenue en triplicat. Les valeurs ont été comparées au groupe témoin non stimulé ou les groupes témoins stimulés au LPS/GRp-*PbA* à l'aide d'un test pairwise-t-student avec une significativité indiquée par * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$

2) Effet des souches bactériennes sur le développement du neuropaludisme expérimental

Des souris ont été traitées quotidiennement par gavage oral une semaine avant et pendant 14 jours PI (Figure 1) avec les bactéries préalablement sélectionnées pour leurs capacités anti-inflammatoires à une dose de 5×10^9 unité formant des colonies repris dans 200 μ L de solution de gavage (NaHCO_3). Les souches A7.59, A3.5, A7.100, A7.96, A7.95, A2.27, A7.61, A7.31 ont été testées dans ces 3 expériences (n=5-10 souris/groupe).

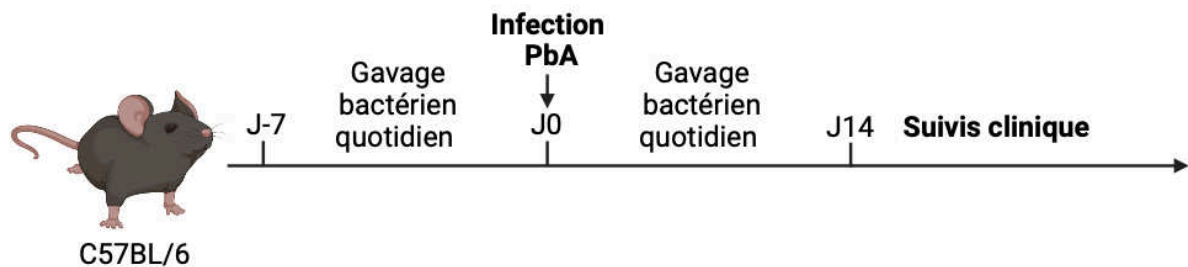


Schéma 1 : Stratégie expérimentale utilisée pour évaluer les capacités potentiellement protectrices des souches bactériennes contre le développement du neuropaludisme.

Un suivi de la mortalité et de la parasitémie a été réalisé (Figure 2 et 3). Le traitement des souris par les bactéries administrées seules n'a pas protégé les souris contre le NPE. Toutefois, les souris traitées par la souche A7.31 et A2.27 présentent une mortalité décalée d'un jour par rapport aux souris infectées non traitées, suggérant un effet protecteur potentiel, qui reste à optimiser en améliorant le protocole expérimental (Figure 2A). Par contre, nous avons remarqué que le traitement avec les bactéries a réduit les taux de parasitémie de manière significative ($p < 0,05$), comme observé pour les souris infectées et traitées par les souches A7.100, A7.31 et A2.27 (Figure 2B).

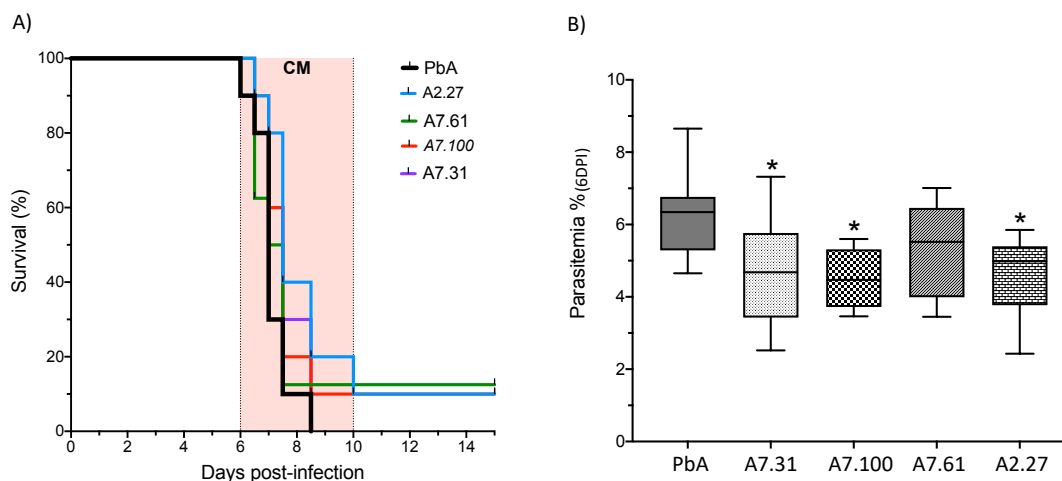


Figure 2 : Suivi de la mortalité et de la parasitémie chez les souris C57BL/6 traitées par des bactéries et infectées par *PbA*. Courbe de mortalité (A) et de parasitémie (B) des souris C57BL/6 traitées quotidiennement par gavage oral avec A2.27, A7.61, A7.100 et A7.31 une semaine avant et après infection à une concentration de 2×10^9 CFU (n=5-10 souris par condition). Le log Mantel-Cox test et un one WAY-ANOVA a été réalisé et la significativité est représentée sous la forme de : *p<0,05.

Afin d'optimiser le traitement avec les souches potentiellement probiotiques, nous avons augmenté la concentration (5×10^9 CFU) et la durée du traitement (10 jours avant et 14 jours après infection) permettant ainsi de couvrir l'ensemble de la fenêtre de développement du neuropaludisme. Contrairement au traitement avec les souches A7.100, A3.5 et A7.59, les souris ayant reçu les souches A7.96 et A7.95 ont été protégées de 20% (p<0,05) à 40 % (p<0,01) de la neuropathologie ayant survécus au-delà du 10ème jour post-infection soit après la fenêtre de mortalité du NPE (Figure 3A). En revanche ces bactéries n'ont pas eu d'effet significatif sur la parasitémie des souris à J6,5 post infection, ce qui corrèle avec les mortalités liées à l'hyperparasitémie, observées au 20ème jour post infection chez les souris protégées du neuropaludisme (Figure 3B). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la modification du microbiote intestinal par un traitement avec des bactéries potentiellement probiotiques pourrait contrôler le développement du neuropaludisme. Cependant, il est nécessaire d'améliorer le protocole de traitement pour améliorer l'efficacité et obtenir une bonne reproductibilité et peut-être tester d'autres souches bactériennes.

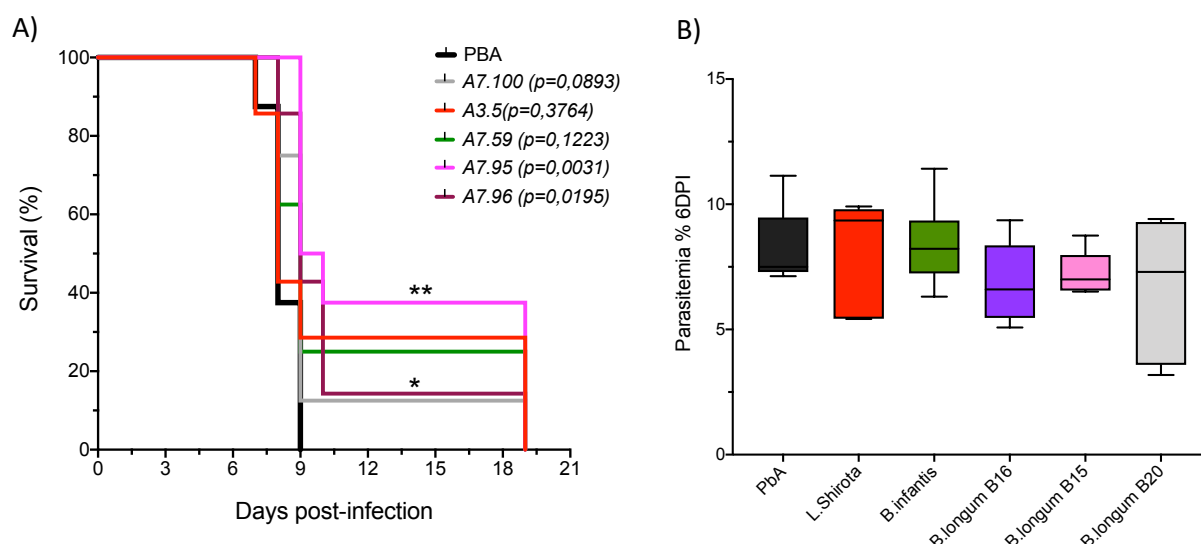


Figure 3: Suivi de la mortalité et de la parasitémie chez des souris C57BL/6 traitées par les bactéries et infectées par *PbA*. Courbe de mortalité (A) et de parasitémie (B) des souris C57BL/6 traitées quotidiennement par gavage oral avec A7.100, A3.5, A7.59, A7.95 et A7.96 10 jours avant et après infection à une concentration de 5×10^9 CFU ($n=5-10$ souris par condition). Le log Mantel-Cox test et un one WAY-ANOVA a été réalisé et la significativité est représentée sous la forme de : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DISCUSSION

Notre étude a permis de mettre en évidence que l'utilisation de bactéries potentiellement probiotiques et sélectionnées pour leurs capacités anti-inflammatoires était capable d'améliorer le taux de survie des souris dans un modèle de neuropaludisme expérimental. Cependant le mécanisme d'action est encore à définir. Il a été rapporté que certains probiotiques comme les *Lactobacilles* et les *Bifidobactéries* sont capables de moduler le « fitness » du parasite^{251,278}. D'autres études montrent que l'utilisation d'une bactérie recombinante exprimant un motif pathogénique similaire à celui des sporozoïtes était capable d'induire une réaction immune croisée et limiter l'infection au stade hépatique³⁸³. Ceci conforterait l'hypothèse que le microbiote intestinal prédisposerait à l'évolution de l'infection plasmodiale comme démontré chez l'homme par Yooseph et al¹⁶⁷. Un autre phénomène non

négligeable est la possible compétition de niche entre les parasites et le microbiote intestinal, car les travaux de *Taniguchi et al* démontrent la présence de GRp dans les microvaisseaux sanguins de l'intestin, conforté par les travaux de *Abkhallo et al* qui ont observé la présence d'ADN parasite dans les selles des patients¹⁶⁰. Ces interactions parasites-bactéries pourraient expliquer les variations de parasitémie et d'abondance microbienne durant le paludisme. D'une manière plus large, l'utilisation de probiotiques pourrait permettre de restaurer la BHE et limiter l'activité inflammatoire des cellules gliales dans des maladies neurodégénératives^{262,264,275}. Notre étude a mis en évidence les capacités potentiellement protectrices de deux souches d'*Actinobactéries* permettant d'accroître entre autres, l'abondance relative des *Akkermensia* dans le microbiote intestinal des souris protégées contre le neuropaludisme (résultats non présentés pour raison de confidentialité), confortant nos résultats de nos travaux précédents (Cf Article1). De nombreux essais cliniques et expérimentaux démontrent les capacités protectrices de certaines bactéries notamment dans le cas du syndrome du côlon irritable mais également dans les maladies neurologiques^{384–386}. Elles ont la particularité d'inhiber la voie NFkb, de sécréter de l'acétate, du butyrate et du propionate afin de maintenir la stabilité du microbiote intestinal et d'induire un terrain immunotolérologène en favorisant la formation de Treg³⁸⁷. En outre elles sont capables d'augmenter l'expression de facteurs neurotrophiques dans le SNC comme le BDNF, le GABA et la dopamine ainsi que de réguler les niveaux de tryptophane^{388,389}. L'effet de nos potentielles probiotiques sur la présence des *Akkermensia* dans le microbiote intestinal diminue lors de troubles neuro-inflammatoires comme dans la maladie d'Alzheimer ou à l'inverse est augmentée afin de promouvoir une réponse bénéfique dans la maladie de parkinson ou la sclérose en plaques^{390–392}. Nos recherches ont démontré que la diminution de l'abondance en *Akkermensia* chez les souris développant un NPE a été restaurée chez les souris traitées par les souches, ce qui les a probablement protégées du NPE. Les *Akkermensia*

sont des souches commensales du microbiote intestinales et peuvent être considérées comme des probiotiques de nouvelle génération dans les troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs³⁹³. Les stratégies permettant leurs expansion ont déjà fait l'objet de nombreuses études car, ces probiotiques sont des cibles d'intérêt pour lutter contre la neuro-inflammation induite lors du neuropaludisme et dans les troubles neuro-inflammatoires en général³⁹⁴.

Pour améliorer la robustesse et l'efficacité du traitement probiotique il serait nécessaire, à travers des optimisations de déterminer plus spécifiquement les bactéries "protectrices" ou d'éliminer les bactéries "néfastes" impliquées dans la modulation de la neuropathogénèse du NP. Nous pourrions envisager de modifier la durée, la concentration, le type et le mode de traitement. Ainsi l'utilisation de cocktails de probiotiques, l'administration d'AGCC, la transplantation de matière fécale ou un traitement avec des antibiotiques avant administration des probiotiques sont des pistes envisageables et qui ont déjà fait leur preuve dans d'autres contextes pathologiques comme les lésions cérébrales, les maladies d'Alzheimer et Parkinson³⁹⁵⁻³⁹⁸ ...

Conclusion

Cette étude suggère que certaines souches potentiellement probiotiques seraient capables de renforcer la croissance de bactéries appartenant à certains phylums telles que celles de l'espèce A.X et ainsi permettre la protection contre le NP en limitant l'inflammation cérébrale induite par les cellules gliales. Cela pourrait ouvrir la voie à de nouvelles pistes préventives comme la prophylaxie à base de probiotiques en complément des prophylaxies médicamenteuses déjà existantes pour limiter le développement du neuropaludisme.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'axe intestin-cerveau est un sujet d'étude en plein essor, notamment le rôle crucial que peut jouer le microbiote grâce aux innovations technologiques qui nous permettent de mieux appréhender le monde de la microbiologie. Ces nouvelles approches ont permis à la communauté scientifique d'associer des variations de populations microbiennes à la physiologie de nombreux troubles neuro-inflammatoires. Or la plupart des infections parasitaires inductrices de neuro-inflammation comme la neurohistosomiase, la neurotoxoplasmosse et le neuropaludisme engendrent des désordres dans le microbiote intestinal et provoquent des complications cérébrales¹¹⁰. Les patients souffrant de neuropaludisme ont des œdèmes cérébraux, des taux de kynurénate cérébraux anormaux, et de fort taux de cytokines pro-inflammatoires sérique et intracérébrale mais également un microbiote intestinal altéré¹¹⁰. Cette altération du MI est capable de moduler la sévérité de l'infection plasmodiale et moduler la réponse immune de l'hôte. De plus, le microbiote intestinal est capable de réguler l'homéostasie du SNC en modulant notamment l'intégrité de la BHE et l'activité des cellules gliales^{111,172}. L'ensemble de ces informations suggère que le microbiote intestinal puisse jouer un rôle dans le contrôle de la neuro-inflammation observé chez les souris NPE+.

Au cours de nos travaux nous avons montré que l'infection par *PbA* exacerbe l'activité des astrocytes et des microglies qui sont des cellules clef dans la pathogénèse du neuropaludisme. Les astrocytes sont capables d'internaliser des microvésicules parasitaires à la suite d'un contact avec des GRp *in vitro* et de les prendre en charge par un processus d'autophagie particulier qui s'appelle l'autophagie associée au LC3 (LAP)^{76,83}. Chez l'homme, une augmentation des microvésicules circulantes associée à la sévérité du paludisme chez les

patients infectées par *P.falciparum* est observée³⁹⁹. Il est donc probable que les pseudopodes émis par les astrocytes qui sont au contact de la BHE et de la circulation sanguine puissent rentrer en interaction avec des GRp séquestrés dans les micro-vaisseaux cérébraux^{400,401}. L'internalisation et la prise en charge de ces microvésicules parasitaires induisent chez les astrocytes, leur activation et une réponse pro-inflammatoire caractérisée principalement par une forte sécrétion de CXCL10, CCL2 et d'IFN- γ ^{76,83,402}. Ceci corroborerait la temporalité de l'activité inflammatoire des cellules gliales avec la séquestration des GRp et les hémorragies observées dans les cerveaux des patients NP+⁴⁰¹. La microglie quant à elle est capable d'internaliser les GRp par un mécanisme classique de phagocytose. Elle adopte alors une morphologie de microglie activé caractérisée par un stroma irrégulier, et un cytoplasme granuleux^{403,404}. Les microglies sont des cellules immunes innées du SNC et sont compétentes pour effectuer de la présentation antigénique à la suite de leurs activités phagocytaires et dialoguent intimement avec les astrocytes^{405,406}. De cette conversation entre cellules gliales, en ressort une inflammation cérébrale excessive permettant le recrutement sélectif et la migration massive de Lymphocytes T exprimant le CXCR3 dans le parenchyme cérébral. Cet infiltrat de lymphocytes contribue à l'exacerbation de la neuro-inflammation du fait de leurs activités cytotoxiques et pro-inflammatoires^{94,95,340}.

Par analogie avec les études menées sur l'influence du microbiote intestinal sur les maladies neurodégénératives, nous proposons que dans notre contexte infectieux, le microbiote intestinal est capable de moduler l'activité microgliale et astrocytaire via la production de différents métabolites comme les AGCC. En adéquation avec les travaux sur modèle murin menés par différentes équipes, nous observons que l'infection par *Plasmodium berghei* ANKA perturbe l'intégrité de l'intestin et le MI en favorisant l'expansion des *Bacillota* et des *Pseudomonadota* au détriment des *Verrucomicrobia* et des *Bacteroidota*^{158,407,408}. Par contre,

les travaux chez l'homme ont mis en exergue chez des enfants maliens résistants à l'infection palustre ont un microbiote intestinal enrichi en *Bifidobactéries* et en *Streptococcus*¹⁶⁷. Nos résultats ont permis de montrer que ces changements bactériens impactent les niveaux d'AGCC au niveau du caecum et du sérum, ce qui peut favoriser la rupture de la barrière intestinale et cérébrale. La dégradation de ces barrières permettrait le passage de molécules toxiques et exacerberait l'inflammation cérébrale et systémique observée chez les souris NPE+. De plus l'infection à *Plasmodium* réduit les quantités d'AGCC qui semblent limiter l'activité inflammatoire des cellules gliales. L'acétate, le propionate et le butyrate agissent comme des inhibiteurs des HDAC, et modulent la transcription de certains gènes dont ceux codant pour la voie NFκB^{226,227,260,271}. Nos observations montrant la diminution de l'expression des CMH, des marqueurs pro-inflammatoires et de l'expression des cytokines comme le CXCL10 par les cellules gliales ainsi que l'augmentation d'acétate et de propionate sérique chez les souris infectées mais protégées du neuropaludisme semblent conforter l'idée que les AGCC ont probablement diminué l'activité pro-inflammatoire des cellules gliales. Cette réduction de l'inflammation cérébrale a en effet été corrélée positivement avec les niveaux d'AGCC du caecum. Notamment les niveaux de valérate, de propionate et de butyrate fécal sont directement et positivement corrélés avec les niveaux d'expression d'*Il6* et de d'*Ifnα* cérébraux (Figure supplémentaire A). Nous émettons donc l'hypothèse que le traitement antibiotique et l'infection ont réduit drastiquement la charge bactérienne impactant directement la production d'AGCC mais aussi sa biodisponibilité dans l'organisme. En effet, certaines bactéries se nourrissent des AGCC produites par leurs homologues, par conséquent leur destruction par le traitement ABX expliquerait les concentrations d'acétate plus importante dans le sérum des souris traitées et infectées. Néanmoins, l'augmentation d'AGCC dans le sérum ne certifie pas qu'il s'est disséminé dans le SNC. Cependant des études chez l'homme ont démontré la présence d'AGCC dans le liquide céphalo-rachidien (acétate 0-

171µM, propionate 0-6µM et butyrate 0-2,8µM), qui même à une concentration relativement faible ils possèdent un fort pouvoir immunomodulateur⁴⁰⁹. Ainsi Le dosage des AGCC dans le cerveau des souris nous permettrait de confirmer cette hypothèse. Mais de nombreuses questions émergent : Est-ce que les AGCC agissent directement sur les cellules gliales ou agissent-elles sur d'autres cellules du SNC ? Quel sont les proportions d'AGCC nécessaires pour obtenir un effet sur les cellules gliales ? Module-t-elle l'activité des cellules immunes recrutées ? Quelle est l'étendue du terrain tolérogène que crée les AGCC ?

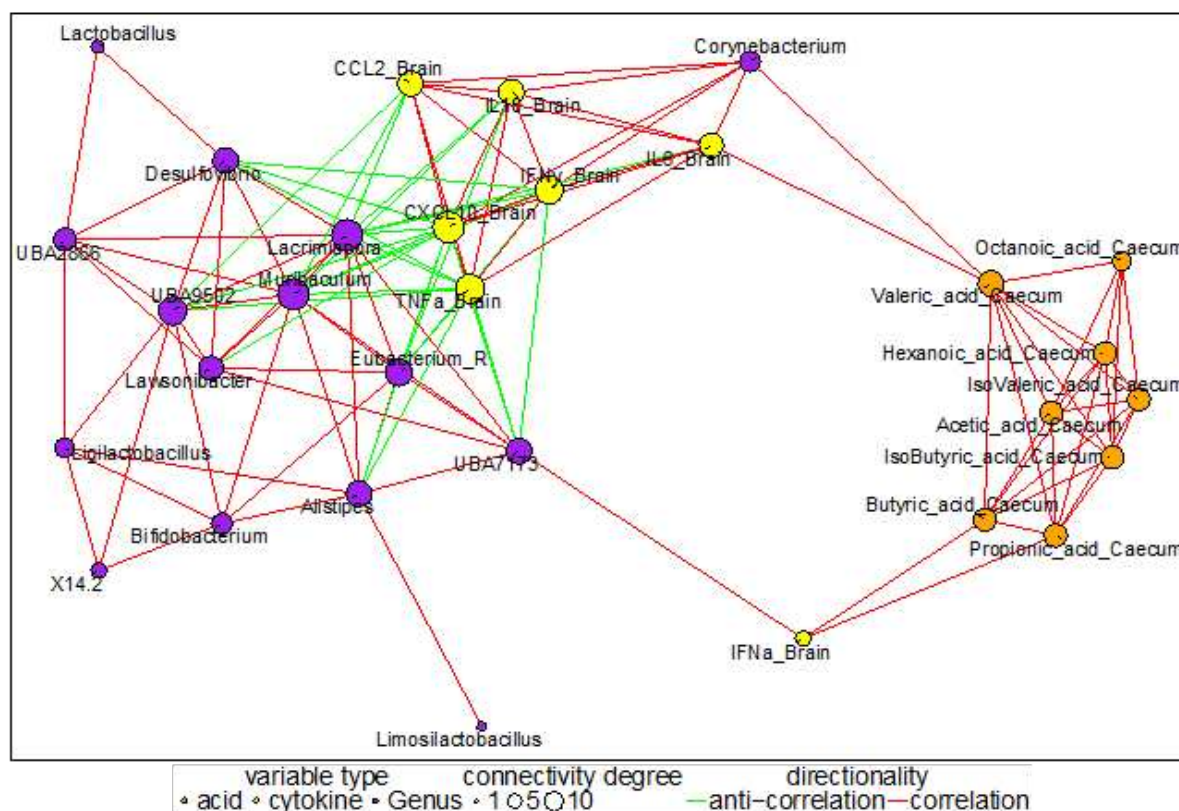


Figure supplémentaire A : réseau de corrélation des interactions entre les AGCC du caecum, la composition du microbiote intestinal et les niveaux d'expressions des cytokines/chimiokines cérébrales. Chaque variable est présentée sous forme de cercle et leurs associations sont présentées par des lignes. Uniquement les corrélations avec une p value < 0,05 sont présentées et la taille des cercles représente le degré de corrélation tandis que la couleur des lignes (vert = corrélation négative / rouge = corrélation positive) détermine le type de corrélation.

L'utilisation du modèle murin résistant (B6.WLA.Berr2) et sensible (C57BL/6) au neuropaludisme, est l'un des atouts de ce projet de recherche. Il nous a permis de dissocier l'impact du microbiote intestinal sur l'infection plasmodiale et la complication neurologique sévère induite par l'infection³⁴⁰. De manière étonnante, à l'état basal, les souris résistantes et sensibles possèdent un microbiote légèrement différent malgré des conditions d'hébergement identiques. Les souris sensibles ont d'avantages d'*UBA7173* (15,34%) et moins de *Muribaculaceace* (4,57%) contrairement aux souris résistantes 1,87% et 11,84% respectivement. Certaines bactéries sont même absentes selon la souche de souris, par exemple les souris sensibles présentent des *CAG_485* contrairement aux souris résistantes. Cette différence s'explique probablement par la différence génétique entre les deux souches de souris aussi minime qu'elle soit⁴¹⁰. Les souris résistantes ont un *locus* sur le chromosome 11 qui code pour un ensemble de gènes liés à l'inflammation qui est différent des souris C57BL/6, leurs conférant la résistance au NPE³⁴⁰. Les travaux de Montgomery et al ont permis de mieux comprendre les interactions entre la génétique de l'hôte et le microbiote intestinal. Il a notamment démontré des signatures microbiennes intestinales distinctes associées à la susceptibilité de développer la sclérose en plaque dans 29 génotypes différents de modèle murins élevés dans les mêmes conditions⁴¹¹. De manière intéressante les souris qui font une sclérose en plaque ou un neuropaludisme ont des mécanismes neuro-inflammatoire similaires avec une exacerbation de l'activité des cellules gliales et un recrutement de cellules T dans le cerveau^{412,413}. Ainsi, il est probable que le modèle murin B6.WLA.Berr2 doit sa résistance au neuropaludisme pas seulement à sa variation génétique mais également à son microbiote intestinal.

L'infection plasmodiale chez une souris sensible n'induit pas les mêmes variations de composition du microbiote intestinal que chez une souris résistante au NPE. En d'autres

termes, le neuropaludisme et le paludisme induisent des variations caractéristiques de la flore intestinale. Mieux encore, la composition du microbiote intestinal des souris C57BL/6 semblerait prédisposer au développement de la pathologie sévère. Cette affirmation pourrait être argumentée avec les travaux menés par *Taniguchi et al*, qui ont démontré ce phénomène dans des modèles murins de C57BL/6 et de BALB/C dont la génétique est totalement différente entre les deux types de souris¹⁵⁸. Nos résultats démontrent que les souris sensibles lors de l'infection présentent une diminution d'abondance en certains genres bactériens tel que *Akkermansia* et ont une expansion des *Ligilactobacillus* et des *Alistipes*. Tandis que les souris résistantes suites à l'infection conserve *Akkermansia* et ont d'avantages de *Flavonifractor*. Si l'on croise les données cela suggère que certaines bactéries seraient protectrices et à l'inverse d'autres pourraient être néfastes. Ceci est d'ailleurs conforté par le fait que nos expériences d'administration de bactéries potentiellement probiotiques lors de nos expériences est associée à une augmentation des *Akkermansia* chez les souris sensibles infectées ne développant plus la neuropathologie. Néanmoins, parmi les souris sensibles traitées aux antibiotiques et infectées, une seule souris sur cinq avait un microbiote intestinal enrichi en *Akkermansia*. Étant donné que 50% d'entre-elles ont survécu au NP, cela suggère qu'il n'y a pas qu'une seule signature microbienne qui diminue la complication sévère du paludisme, mais ouvre néanmoins des pistes thérapeutiques intéressantes. Afin de mieux déterminer le profil microbien pouvant protéger les souris du neuropaludisme, il serait intéressant d'effectuer des transplantations de microbiote fécal (TMF) des souris résistantes (C57BL/6 traitées aux ABX, C57BL/6 traitées aux probiotiques, B6.WLA.Berr2) vers des souris sensibles C57BL/6, cela étayerait d'autant plus le rôle du microbiote intestinal comme un facteur de risque ou de contrôle du développement du neuropaludisme. Ce type de stratégie a déjà prouvé son efficacité chez la souris et l'homme dans le cadre des parasitoses intestinales telles que les infections aux helminthes à *Blastocystis*^{414,415}. L'utilisation de la TMF

dans les troubles neurodégénératives type maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la sclérose en plaque chez l'homme est très récente et nous avons peu sur son efficacité⁴¹⁶. Cependant ces traitements semblent prometteurs car ils permettent d'améliorer les fonctions cognitives, la survie neuronale, limiter l'inflammation cérébrale et intestinale, renforcer l'intégrité de la BHE et de la barrière intestinale^{343,417-420}. Des chercheurs essaient déjà d'exploiter le microbiote intestinal comme un outils de diagnostic ou de thérapie pour prévenir des formes sévères contre les infections parasitaires⁴²¹⁻⁴²³. Il ne reste donc qu'un pas pour appliquer la TMF dans le cadre des parasitoses inductrices de neuro-inflammation afin de restaurer un MI sain et limiter l'aggravation des pathologies⁴²⁴.

La modulation du microbiote intestinal lors d'une infection palustre agit à tous les niveaux : intestinal, systémique, splénique et cérébrale. Pour la première fois, nos travaux ont démontré que le microbiote intestinal est capable de prévenir le développement du neuropaludisme en modulant l'activité des cellules gliales et le recrutement de cellules T dans le cerveau. En effet, nous avons remarqués que les souris sensibles protégées du NP présentaient des astrocytes et microglies avec un profil inflammatoire moins prononcé comparé aux souris développant un NP. Les cellules ont sécrété moins de cytokines pro-inflammatoires tel que CXCL10, permettant la réduction du nombre de cellules TCD8 CXCR3+ et TCD4 CXCR3+ infiltrant le cerveau. En outre, la modulation du microbiote intestinal a également été associée à une réduction du nombre de cellules T pathologiques (TCD8 CXCR3+) dans la rate qui sont cruciales dans le développement du NP. Les souris développant un NP contrairement à celles protégées ne présentent pas de *Burkholderia*. Or les travaux de Kasetthath et al démontre que ces bactéries réduisent le nombre de NKT, de NK et de cellules dendritiques dans la rate en inhibant la production d'IFN- γ et de TNF α grâce aux AGCC perturbant l'activation, la polarisation et la prolifération des cellules T helper^{425,426}. En outre

les recherches dans le cadre de la sclérose en plaques a permis de discerner que la diversité microbienne était corrélée à l'expression de cellules CXCR3⁺ au sein des populations spléniques de cellules TH1⁴²⁷. L'un des mécanismes de régulation des populations de cellules T spléniques par le microbiote intestinal se fait via la production de butyrate qui se fixe sur les récepteurs GPR41 et GPR43 des cellules T et permet l'induction d'une réponse effectrice, la polarisation en cellules T mémoire ou encore de favoriser leur survie⁴²⁸. Ainsi, en adéquation avec les travaux de *Bachem et al*, la diminution générale d'AGCC hormis l'acétate observé chez nos souris protégées du NPE pourrait être un facteur qui a permis de réduire le nombre, l'activité et la capacité de migration des cellules T⁴²⁸.

En plus d'une activité splénique réduite, nos souris sensibles traitées et infectées ont montré une diminution de l'inflammation systémique et cérébrale. L'un des mécanismes que nous supputons est que la balance d'AGCC modulée chez nos souris en serait la cause. En effet, les AGCC comme l'acétate, le propionate et le butyrate non assimilé par les cellules épithéliales intestinales de l'hôte se retrouve dans la circulation sanguine via la veine porte à des concentrations relativement faibles^{429,430,431}. Les AGCC participent dans la régulation immunitaire de nombreux organes^{429,432}. Mais les mécanismes par lesquels les AGCC modulent l'immunité innée et adaptative sont complexes car ils agissent à différents niveaux de signalisation tels que l'activation des récepteurs couplés aux protéines G, l'inhibition des histones désacétylases ou encore la production d'acétyl-CoA. Les AGCC ont une affinité spécifique envers leurs récepteurs couplés aux protéine G et ont une capacité différentielle à inhiber les HDAC⁴³³. L'une des conséquences de l'inhibition des HDAC est d'inhiber la voie de signalisation des NFκB et des MAPK qui interviennent dans la production de diverses cytokines/chimiokines pro-inflammatoires⁴³⁴⁻⁴³⁶. L'activité des cellules endothéliales vasculaires, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules mononucléées du sang périphérique peut être inhibé par les

AGCC notamment par une répression de l'activation de l'inflammasomes NLRP3^{437,438}. Les AGCC sont également capables de réguler l'immunité adaptative de manière directe ou indirecte, en favorisant notamment l'expansion de Treg et l'expression d'*IL10*⁴³⁹. Par exemple, le butyrate améliore l'acétylation de l'histone 3 au niveau du promoteur induisant l'expression de FoxP3 dans les cellules T du colon des souris⁴⁴⁰. En outre le butyrate peut agir sur les macrophages et les cellules dendritiques qui orienteront la polarisation des cellules T vers un phénotype Treg⁴⁴¹. Le butyrate et le propionate par inhibition des HDAC sont capables d'améliorer la réponse antibactérienne des macrophages en inhibant leurs polarisations vers un phénotype de type M2 anti-inflammatoire^{442,443}. Ces résultats font écho à nos travaux où nous apercevons une réduction des niveaux de butyrate dans le caecum et le sérum des souris protégées du neuropaludisme, associée à une diminution de l'inflammation périphérique et de l'état inflammatoire des microglies (« macrophage like »).

Un aspect que nous n'avons pas abordé lors du projet de thèse mais qui serait potentiellement impliqué dans la pathogénèse du neuropaludisme est l'impact du microbiote intestinal sur la production d'une réponse immune humorale favorisant la production d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cerveau. Les AGCC sont impliqués dans la sécrétion d'anticorps par les plasmocytes⁴⁴⁴. La différenciation et la production d'anticorps par les cellules B est extrêmement énergivore. Une supplémentation en probiotiques ou en AGCC permet de fournir un substrat convertible en AcetylCoA nécessaire à la formation d'ATP pour induire la différenciation et la production d'Ac par les cellules B^{445,446}. Non seulement les AGCC fournissent l'énergie nécessaire aux cellules B mais ils induisent également de manière directe leur différenciation en plasmocytes en inhibant l'activité des HDAC et leur signalisation médiée par les récepteurs couplés aux protéines G²²⁸. L'acétate peut également augmenter la

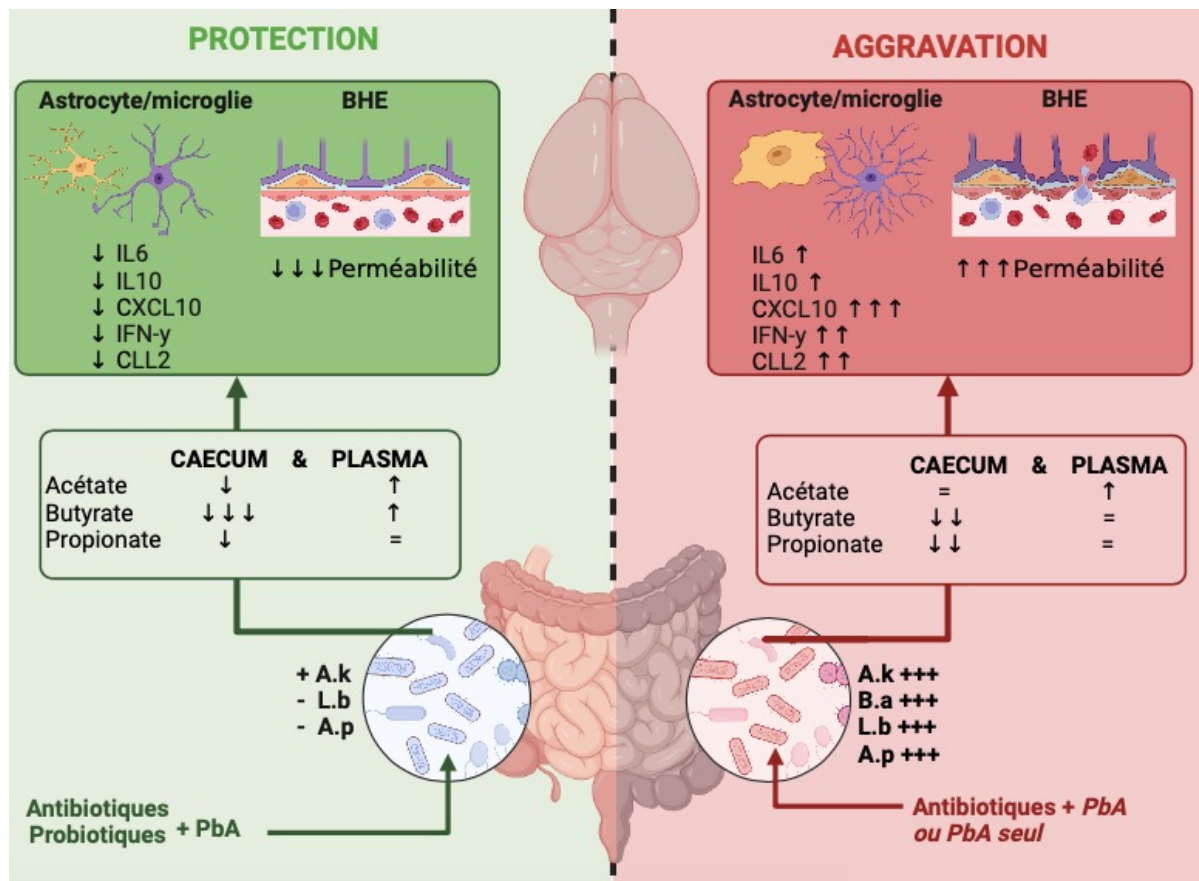
proportion de cellules B10, des cellules B régulatrices productrices d'IL10 intervenant dans l'homéostasie immunitaire⁴⁴⁷. Collectivement ces données suggèrent que dans notre contexte, l'augmentation d'Acétate plasmatique et la diminution de butyrate et de propionate au niveau du caecum aurai induit une réponse immuno-régulatrice qui a participé à contrebalancer l'inflammation induite par l'infection à *PbA*.

Néanmoins, il est nécessaire de nuancer l'action bénéfique des AGCC ou de certaines bactéries spécifiques. Par exemple *Akkermansia* chez des sujets sains représente 1-4% du microbiote intestinal. Bien que de nombreuses propriétés bénéfiques ont été attribuées à ces bactéries et qu'elles soient considérées comme un marqueur d'intestin en bonne santé (maintien de l'homéostasie intestinal, maintien de la barrière intestinale, stabilise le microbiote intestinal, favorise l'immuno-régulation ...), leur expansion excessive pourrait conduire à des troubles intestinaux et inflammatoires⁴⁴⁸. En effet, l'étude de *Chin-Hsien-Lin et al* a démontré que les patients atteints de Parkinson présentent une augmentation excessive d'*Akkermansia* corrélée à une augmentation d'IFN- γ et de TNF α dans le plasma aggravant la sévérité des troubles moteurs⁴⁴⁹. Dans notre étude, l'administration d'antibiotiques avant l'infection par *PbA* chez la souris résistante a conduit à un mécanisme similaire. Ces souris présentaient une augmentation excessive en *Akkermansia* et une augmentation de l'inflammation systémique (CXCL10, TNF α) causant leur mort prématurée. Une étude récente a démontré chez des patients Parkinsoniens a observé une réduction d'AGCC dans les selles et paradoxalement une augmentation de ces AGCC dans le plasma. En effet une diminution d'acétate, de propionate et de butyrate a été observée dans les fèces et une augmentation d'acétate et de propionate dans le sang des patients. Les AGCC fécaux étaient corrélés négativement tandis que l'acétate et le propionate plasmatique étaient corrélés positivement avec la sévérité de la pathologie⁴⁵⁰.

En outre, nous nous sommes focalisés exclusivement sur l'impact des variations bactériennes sur le neuropaludisme. Mais le microbiote intestinal héberge également des champignons, des virus et des parasites, on parle alors de mycobiome, virobiome et de parabioime⁴⁵¹. L'ensemble de ces constituants interagissent entre eux et peuvent agir de manière directe ou indirecte sur la réponse immune de l'hôte⁴⁵². Des extraits de champignons *Trichoderma stromaticum* dont l'éthanolate montrent des effets anti-inflammatoires et réduit la sévérité du neuropaludisme dans le modèle murin C57BL/6, tandis que les travaux de *Däbritz et al* ont mis en évidence qu'une infection fongique invasive à *Hyalohyphomycosis* complique l'infection à *Pf*^{453,454}. En parallèle, l'infection cause des troubles immunologiques qui peuvent favoriser la croissance et la dissémination néfaste de champignons dans l'organisme⁴⁵⁵. Comme les bactéries, les champignons sont également impliqués dans la modulation du SNC⁴⁵⁶. *Candida albicans* par exemple peut moduler l'intégrité de la BHE et induire une réponse pro-inflammatoire des microglies via la sécrétion de toxine comme la candidalysine^{456,457}. Aucune étude n'a encore été réalisée sur le virobiome intestinal et le neuropaludisme. En revanche, quelques études émergent sur l'impact des co-infections parasitaires sur le microbiote intestinal, le fitness des parasites et la régulation de la réponse immune notamment dans le cadre du paludisme⁴⁵⁸. Une mono-infection à *Plasmodium* comparé à une mono-infection à un helminthe intestinal ou à la co-infection engendre des variations du microbiote intestinal et des réponses inflammatoires distincts^{158,458,459}. Nos travaux ouvrent donc la voie à de futures investigations passionnantes avec des implications significatives pour la compréhension et la gestion de cette maladie complexe.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Grâce à nos différents modèles de souris résistantes (B6.WLA.Berr2) ou sensibles (C57BL/6), au NP, à l'impact du traitement par des bactéries potentiellement probiotiques ou d'antibiotiques nous avons démontré que le microbiote intestinal a un réel impact sur le développement du neuropaludisme et sur la croissance parasitaire au sein des globules rouges au cours de l'infection à *PbA*. Nous avons pu discriminer des signatures microbiennes qui pourraient contribuer à la protection ou à l'aggravation du neuropaludisme. L'infection à *PbA* a perturbé le microbiote intestinal de l'hôte en favorisant l'expansion des *Alistipes* et des *Ligilactobacillus* au détriment de certaines bactéries tel que *Akkermansia* et *Parabacteroidetes* favorisant potentiellement le développement du neuropaludisme. À l'inverse, les souris sensibles traitées avec des bactéries potentiellement probiotiques ou avec des antibiotiques, et les souris résistantes infectées présente un microbiote intestinal enrichi en *Akkermansia*. Il en résulte une modification des profils d'AGCC sériques et caeaux qui sont associées aux variations du microbiote intestinal. En outre nous avons confirmé que l'exacerbation de l'activité inflammatoire des cellules gliales (astrocytes et microglies) lors d'un NP a été régulée négativement probablement grâce à l'augmentation d'acétate sérique produit par certaines bactéries. Nous avons également observé que le microbiote intestinal a influencé la réponse immune adaptative en modulant l'expression du CXCR3+ au niveau des cellules T de la rate pouvant bloquer leurs transits vers le SNC. Ce processus anti-inflammatoire induit par le microbiote intestinal et les AGCC produits a été corrélé avec la diminution de l'inflammation à tous les niveaux : cérébrale, systémique et splénique (résumé graphique).



Résumé graphique : Impact du microbiote intestinal sur le développement du neuropaludisme.

Ce travail confirme l'importance de l'axe intestin-cerveau dans le contrôle du développement du neuropaludisme et pourrait s'étendre aux troubles neuro-inflammatoires en général. Il est de plus en plus clair que le microbiote intestinal peut agir comme un régulateur clé de la réponse immunitaire de l'hôte avec une implication directe ou indirecte des métabolites bactériens comme les AGCC. L'utilisation de bactéries potentiellement probiotiques ou d'AGCC pourrait devenir d'intéressants outils pour mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies ou être utilisés pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Peu d'études ont pour le moment évalué l'impact de probiotiques dans les parasitoses inductrices ou non de neuro-inflammation ou non, leurs effets sur le long terme et leur efficacité/innocuité restent donc à déterminer. Mais les études de manipulation du microbiote intestinal dans le cadre de maladies neurodégénératives sont encourageantes.

et nous laisse espérer qu'un jour nous puissions renforcer le microbiote intestinal à l'aide de pré ou probiotiques dans les zones d'endémie du paludisme afin de limiter l'infection et le développement des formes sévères pour sauver des milliers de vies.

RÉFÉRENCES

1. Poinar, G., Jr. What Fossils Reveal About the Protozoa Progenitors, Geographic Provinces, and Early Hosts of Malarial Organisms. *American Entomologist* **62**, 22–25 (2016).
2. Otto, T. D. *et al.* Genomes of all known members of a Plasmodium subgenus reveal paths to virulent human malaria. *Nat Microbiol* **3**, 687–697 (2018).
3. Despommier, D. D., Gwadz, R. W. & Hotez, P. J. Malaria: Plasmodium falciparum (Welch 1898), Plasmodium vivax (Grassi and Filetti 1889), Plasmodium ovale (Stephens 1922), Plasmodium malariae (Laveran 1881). in *Parasitic Diseases* (eds. Despommier, D. D., Gwadz, R. W. & Hotez, P. J.) 174–189 (Springer, New York, NY, 1995). doi:10.1007/978-1-4612-2476-1_29.
4. Miller, L. H., Good, M. F. & Milon, G. Malaria pathogenesis. *Science* **264**, 1878–1883 (1994).
5. Cunha, C. B. & Cunha, B. A. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* **45**, 194–199 (2008).
6. Laveran, A. (1845-1922) A. du texte. *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme : description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre / par A. Laveran,...* (1881).
7. Ross, R. On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br Med J* **2**, 1786–1788 (1897).
8. Schaffner, F. *et al.* Anopheles plumbeus (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? *Malar J* **11**, 393 (2012).
9. le-paludisme-l'histoire-190.html. *Corpus 2014* <https://www.reseau-canope.fr/corpus/video/le-paludisme-l%E2%80%99histoire-190.html>.
10. Venkatesan, P. The 2023 WHO World malaria report. *The Lancet Microbe* S2666524724000168 (2024) doi:10.1016/S2666-5247(24)00016-8.
11. World malaria report 2022. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>.
12. Idro, R., Jenkins, N. E. & Newton, C. R. J. C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* **4**, 827–840 (2005).
13. Boivin, M. J. *et al.* Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* **119**, e360-366 (2007).
14. Oluwayemi, I. O., Brown, B. J., Oyediji, O. A. & Oluwayemi, M. A. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr Med J* **15**, 88 (2013).
15. Song, X. *et al.* Cerebral malaria induced by plasmodium falciparum: clinical features, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, (2022).
16. Mon carnet de vaccination numérique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès. *Mon carnet de vaccination numérique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès* <https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/528-mosquirix>.
17. CDC - Parasites - About Parasites. <https://www.cdc.gov/parasites/about.html> (2022).
18. White, N. J. *et al.* Malaria. *The Lancet* **383**, 723–735 (2014).
19. Claessens, A. *et al.* A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E1772-1781 (2012).
20. Neveu, G. & Lavazec, C. Erythrocyte Membrane Makeover by Plasmodium falciparum Gametocytes. *Front. Microbiol.* **10**, 2652 (2019).
21. Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria.

Nature **415**, 673–679 (2002).

22. Luzolo, A. L. & Ngoyi, D. M. Cerebral malaria. *Brain Res Bull* **145**, 53–58 (2019).
23. Lou, J., Lucas, R. & Grau, G. E. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 810–820 (2001).
24. Ponsford, M. J. *et al.* Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis* **205**, 663–671 (2012).
25. Cox, D. & McConkey, S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* **67**, 557–568 (2010).
26. Pain, A. *et al.* Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1805–1810 (2001).
27. Medana, I. M. & Turner, G. D. H. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* **36**, 555–568 (2006).
28. Beare, N. A. V., Harding, S. P., Taylor, T. E., Lewallen, S. & Molyneux, M. E. Perfusion Abnormalities in Children with Cerebral Malaria and Malarial Retinopathy. *J Infect Dis* **199**, 263–271 (2009).
29. Moxon, C. A. *et al.* Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood* **122**, 842–851 (2013).
30. Gowda, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* **23**, 596–604 (2007).
31. Krishnegowda, G. *et al.* Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* **280**, 8606–8616 (2005).
32. Dunst, J., Kamena, F. & Matuschewski, K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 324 (2017).
33. Wu, X., Gowda, N. M. & Gowda, D. C. Phagosomal Acidification Prevents Macrophage Inflammatory Cytokine Production to Malaria, and Dendritic Cells Are the Major Source at the Early Stages of Infection: IMPLICATION FOR MALARIA PROTECTIVE IMMUNITY DEVELOPMENT. *J Biol Chem* **290**, 23135–23147 (2015).
34. Gillrie, M. R. *et al.* *Plasmodium falciparum* histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. *Am J Pathol* **180**, 1028–1039 (2012).
35. Howland, S. W., Claser, C., Poh, C. M., Gun, S. Y. & Rénia, L. Pathogenic CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol* **37**, 221–231 (2015).
36. MacPherson, G. G., Warrell, M. J., White, N. J., Looareesuwan, S. & Warrell, D. A. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* **119**, 385–401 (1985).
37. Hawkes, M., Elphinstone, R. E., Conroy, A. L. & Kain, K. C. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier. *Virulence* **4**, 543–555 (2013).
38. Medana, I. M., Chaudhri, G., Chan-Ling, T. & Hunt, N. H. Central nervous system in cerebral malaria: ‘Innocent bystander’ or active participant in the induction of immunopathology? *Immunol Cell Biol* **79**, 101–120 (2001).
39. Bansal, D. *et al.* IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PLoS One* **4**, e8245 (2009).
40. Medana, I. M. *et al.* Axonal injury in cerebral malaria. *Am J Pathol* **160**, 655–666 (2002).
41. Ghazanfari, N., Mueller, S. N. & Heath, W. R. Cerebral Malaria in Mouse and Man.

Front Immunol **9**, 2016 (2018).

42. Verkhatsky, A. & Nedergaard, M. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews* **98**, 239–389 (2018).
43. Fan, Y.-Y. & Huo, J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry International* **148**, 105080 (2021).
44. Allen, N. J. & Eroglu, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* **96**, 697–708 (2017).
45. Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V. & Liddelow, S. A. Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity* **54**, 211–224 (2021).
46. Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C. & Ottersen, O. P. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* **58**, 1094–1103 (2010).
47. Batiuk, M. Y. *et al.* Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun* **11**, 1220 (2020).
48. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7–35 (2010).
49. Andoh, N. E. & Gyan, B. A. The Potential Roles of Glial Cells in the Neuropathogenesis of Cerebral Malaria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 741370 (2021).
50. Kang, W. & Hébert, J. M. Signaling Pathways in Reactive Astrocytes, a Genetic Perspective. *Mol Neurobiol* **43**, 147–154 (2011).
51. Pekny, M. & Nilsson, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**, 427–434 (2005).
52. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
53. Zou, L.-H. *et al.* Effects of FGF2/FGFR1 Pathway on Expression of A1 Astrocytes After Infrasound Exposure. *Front. Neurosci.* **13**, 429 (2019).
54. Zamanian, J. L. *et al.* Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *J. Neurosci.* **32**, 6391–6410 (2012).
55. Neal, M. *et al.* Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *Glia* **66**, 2137–2157 (2018).
56. Liddelow, S. A., Marsh, S. E. & Stevens, B. Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? *Trends in Immunology* **41**, 820–835 (2020).
57. Bohlen, C. J. *et al.* Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* **94**, 759–773.e8 (2017).
58. Li, Q. *et al.* Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron* **101**, 207–223.e10 (2019).
59. Li, D., Chen, M., Meng, T. & Fei, J. Hippocampal microglial activation triggers a neurotoxic-specific astrocyte response and mediates etomidate-induced long-term synaptic inhibition. *J Neuroinflammation* **17**, 109 (2020).
60. Arcuri, C., Mecca, C., Bianchi, R., Giambanco, I. & Donato, R. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Front Mol Neurosci* **10**, 191 (2017).
61. Mendes, M. S. & Majewska, A. K. An overview of microglia ontogeny and maturation in the homeostatic and pathological brain. *Eur J Neurosci* **53**, 3525–3547 (2021).
62. Xiong, X.-Y., Liu, L. & Yang, Q.-W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Progress in Neurobiology* **142**, 23–44 (2016).
63. Young, K. & Morrison, H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *JoVE* 57648 (2018)

doi:10.3791/57648.

64. Wang, J., He, W. & Zhang, J. A richer and more diverse future for microglia phenotypes. *Heliyon* **9**, e14713 (2023).
65. Colonna, M. & Butovsky, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* **35**, 441–468 (2017).
66. Guo, S., Wang, H. & Yin, Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* **14**, 815347 (2022).
67. Voet, S., Prinz, M. & Van Loo, G. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends in Molecular Medicine* **25**, 112–123 (2019).
68. Xu, L., He, D. & Bai, Y. Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol Neurobiol* **53**, 6709–6715 (2016).
69. Figarella, K., Wolburg, H., Garaschuk, O. & Duzsenko, M. Microglia in neuropathology caused by protozoan parasites. *Biol Rev Camb Philos Soc* **95**, 333–349 (2020).
70. Zhou, D., Ji, L. & Chen, Y. TSPO Modulates IL-4-Induced Microglia/Macrophage M2 Polarization via PPAR- γ Pathway. *J Mol Neurosci* **70**, 542–549 (2020).
71. Chu, X. *et al.* Hydrogen-rich saline promotes microglia M2 polarization and complement-mediated synapse loss to restore behavioral deficits following hypoxia-ischemic in neonatal mice via AMPK activation. *J Neuroinflammation* **16**, 104 (2019).
72. Kisucká, A., Bimbová, K., Bačová, M., Gálik, J. & Lukáčová, N. Activation of Neuroprotective Microglia and Astrocytes at the Lesion Site and in the Adjacent Segments Is Crucial for Spontaneous Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *Cells* **10**, 1943 (2021).
73. Kalkman, H. & Feuerbach, D. Microglia M2A Polarization as Potential Link between Food Allergy and Autism Spectrum Disorders. *Pharmaceuticals* **10**, 95 (2017).
74. Subedi, L., Lee, J., Yumnam, S., Ji, E. & Kim, S. Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- κ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells* **8**, 194 (2019).
75. Zhang, J. *et al.* Circulating CXCR3⁺ Tfh cells positively correlate with neutralizing antibody responses in HCV-infected patients. *Sci Rep* **9**, 10090 (2019).
76. Shrivastava, S. K. *et al.* Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria. *Glia* **65**, 75–92 (2017).
77. Dorovini-Zis, K. *et al.* The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol* **178**, 2146–2158 (2011).
78. Medana, I. M., Hunt, N. H. & Chan-Ling, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. *Glia* **19**, 91–103 (1997).
79. Talavera-López, C., Capuccini, B., Mitter, R., Lin, J.-W. & Langhorne, J. Transcriptomes of microglia in experimental cerebral malaria in mice in the presence and absence of Type I Interferon signaling. *BMC Res Notes* **11**, 913 (2018).
80. Schluesener, H. J., Kremsner, P. G. & Meyermann, R. Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells. *Acta Neuropathol* **96**, 575–580 (1998).
81. Andoh, N. E. & Gyan, B. A. The Potential Roles of Glial Cells in the Neuropathogenesis of Cerebral Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, (2021).
82. Hong, Y. *et al.* High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves functional recovery by inhibiting neurotoxic polarization of astrocytes in ischemic rats. *J Neuroinflammation* **17**, 150 (2020).
83. Leleu, I. *et al.* A noncanonical autophagy is involved in the transfer of Plasmodium-microvesicles to astrocytes. *Autophagy* **18**, 1583–1598 (2022).
84. Jain, V. *et al.* Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal

cerebral malaria in India. *Malar J* **7**, 83 (2008).

85. Kwiatkowski, D. *et al.* TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **336**, 1201–1204 (1990).
86. Armah, H. B. *et al.* Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* **6**, 147 (2007).
87. Nortey, L. N. *et al.* Genetics of cerebral malaria: pathogenesis, biomarkers and emerging therapeutic interventions. *Cell Biosci* **12**, 91 (2022).
88. Muppidi, P., Wright, E., Wassmer, S. C. & Gupta, H. Diagnosis of cerebral malaria: Tools to reduce *Plasmodium falciparum* associated mortality. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, 1090013 (2023).
89. Campanella, G. S. V. *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* **105**, 4814–4819 (2008).
90. Lau, L. S. *et al.* CD8+ T Cells from a Novel T Cell Receptor Transgenic Mouse Induce Liver-Stage Immunity That Can Be Boosted by Blood-Stage Infection in Rodent Malaria. *PLoS pathogens* **10**, e1004135 (2014).
91. Amante, F. H. *et al.* Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol* **185**, 3632–3642 (2010).
92. deWalick, S. *et al.* Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J Immunol* **178**, 6033–6037 (2007).
93. Tamura, T., Kimura, K., Yuda, M. & Yui, K. Prevention of Experimental Cerebral Malaria by Flt3 Ligand during Infection with *Plasmodium berghei* ANKA. *Infect Immun* **79**, 3947–3956 (2011).
94. Bagot, S. *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* **72**, 2817–2826 (2004).
95. Belnoue, E. *et al.* On the Pathogenic Role of Brain-Sequestered $\alpha\beta$ CD8+ T Cells in Experimental Cerebral Malaria1. *The Journal of Immunology* **169**, 6369–6375 (2002).
96. Gorgette, O. *et al.* Deletion of T Cells Bearing the V β 8.1 T-Cell Receptor following Mouse Mammary Tumor Virus 7 Integration Confers Resistance to Murine Cerebral Malaria. *Infect Immun* **70**, 3701–3706 (2002).
97. Haque, A. *et al.* Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* **186**, 6148–6156 (2011).
98. Nitcheu, J. *et al.* Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* **170**, 2221–2228 (2003).
99. Villegas-Mendez, A. *et al.* IFN- γ producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* **189**, 968–979 (2012).
100. Hansen, D. S., Bernard, N. J., Nie, C. Q. & Schofield, L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *J Immunol* **178**, 5779–5788 (2007).
101. Miu, J. *et al.* Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* **180**, 1217–1230 (2008).
102. Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A.-M. & Marsh, K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* **9**, 725–732 (2008).
103. Engwerda, C. R. *et al.* Locally Up-regulated Lymphotoxin α , Not Systemic Tumor Necrosis Factor α , Is the Principle Mediator of Murine Cerebral Malaria. *J Exp Med* **195**, 1371–1377 (2002).

104. van Hensbroek, M. B. *et al.* The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J Infect Dis* **174**, 1091–1097 (1996).
105. Nie, C. Q. *et al.* IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog* **5**, e1000369 (2009).
106. Wilson, N. O. *et al.* Pharmacologic inhibition of CXCL10 in combination with anti-malarial therapy eliminates mortality associated with murine model of cerebral malaria. *PLoS One* **8**, e60898 (2013).
107. Vigário, A. M. *et al.* Regulatory CD4+CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *International Journal for Parasitology* **37**, 963–973 (2007).
108. Blanc, A.-L. *et al.* Suppression of CD4⁺ Effector Responses by Naturally Occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells Contributes to Experimental Cerebral Malaria. *Infect Immun* **84**, 329–338 (2016).
109. Haque, A. *et al.* CD4+ Natural Regulatory T Cells Prevent Experimental Cerebral Malaria via CTLA-4 When Expanded In Vivo. *PLOS Pathogens* **6**, e1001221 (2010).
110. Alloo, J., Leleu, I., Grangette, C. & Pied, S. Parasite infections, neuroinflammation, and potential contributions of gut microbiota. *Front Immunol* **13**, 1024998 (2022).
111. Fung, T. C., Olson, C. A. & Hsiao, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* **20**, 145–155 (2017).
112. Fowkes, F. J. I., Boeuf, P. & Beeson, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology* **143**, 139–153 (2016).
113. Rogers, K. J., Vijay, R. & Butler, N. S. Anti-malarial humoral immunity: the long and short of it. *Microbes Infect* **23**, 104807 (2021).
114. Cohen, S., McGREGOR, I. A. & Carrington, S. Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria. *Nature* **192**, 733–737 (1961).
115. Tran, T. M. *et al.* An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to Plasmodium falciparum infection. *Clin Infect Dis* **57**, 40–47 (2013).
116. John, C. C. *et al.* Antibodies to Pre-erythrocytic Plasmodium falciparum Antigens and Risk of Clinical Malaria in Kenyan Children. *J Infect Dis* **197**, 519–526 (2008).
117. Flores-Garcia, Y. *et al.* Antibody-Mediated Protection against Plasmodium Sporozoites Begins at the Dermal Inoculation Site. *mBio* **9**, e02194-18 (2018).
118. Cohen, S., Butcher, G. A. & Crandall, R. B. Action of malarial antibody in vitro. *Nature* **223**, 368–371 (1969).
119. Akter, J. *et al.* Plasmodium-specific antibodies block in vivo parasite growth without clearing infected red blood cells. *PLoS Pathog* **15**, e1007599 (2019).
120. Kana, I. H. *et al.* Breadth of Functional Antibodies Is Associated With Plasmodium falciparum Merozoite Phagocytosis and Protection Against Febrile Malaria. *J Infect Dis* **220**, 275–284 (2019).
121. Boyle, M. J. *et al.* Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity* **42**, 580–590 (2015).
122. Osier, F. H. A. *et al.* Breadth and Magnitude of Antibody Responses to Multiple Plasmodium falciparum Merozoite Antigens Are Associated with Protection from Clinical Malaria. *Infect Immun* **76**, 2240–2248 (2008).
123. Pérez-Mazliah, D., Ndungu, F. M., Aye, R. & Langhorne, J. B-cell memory in malaria: Myths and realities. *Immunol Rev* **293**, 57–69 (2020).
124. Phan, T. G., Gray, E. E. & Cyster, J. G. The microanatomy of B cell activation. *Curr Opin Immunol* **21**, 258–265 (2009).

125. Garside, P. *et al.* Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* **281**, 96–99 (1998).
126. Bortnick, A. & Allman, D. What Is and What Should Always Have Been: Long-lived Plasma cells Induced by T-cell Independent Antigens. *J Immunol* **190**, 5913–5918 (2013).
127. Stebegg, M. *et al.* Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol* **9**, 2469 (2018).
128. Arroyo, E. N. & Pepper, M. B cells are sufficient to prime the dominant CD4⁺ Tfh response to Plasmodium infection. *J Exp Med* **217**, e20190849 (2020).
129. Sullivan, R. T. *et al.* B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. *Malaria Journal* **15**, 139 (2016).
130. Vijay, R. *et al.* Infection-induced plasmablasts are a nutrient sink that impairs humoral immunity to malaria. *Nat Immunol* **21**, 790–801 (2020).
131. Sebina, I. *et al.* IL-6 promotes CD4⁺ T-cell and B-cell activation during Plasmodium infection. *Parasite Immunol* **39**, (2017).
132. Ryg-Cornejo, V. *et al.* Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Rep* **14**, 68–81 (2016).
133. Hahn, W. O., Pepper, M. & Liles, W. C. B cell intrinsic expression of IFN λ receptor suppresses the acute humoral immune response to experimental blood-stage malaria. *Virulence* **11**, 594–606.
134. Obeng-Adjei, N. *et al.* Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Rep* **13**, 425–439 (2015).
135. Chan, J.-A. *et al.* Th2-like T Follicular Helper Cells Promote Functional Antibody Production during Plasmodium falciparum Infection. *Cell Rep Med* **1**, 100157 (2020).
136. Velu, V. *et al.* Induction of Th1-Biased T Follicular Helper (Tfh) Cells in Lymphoid Tissues during Chronic Simian Immunodeficiency Virus Infection Defines Functionally Distinct Germinal Center Tfh Cells. *J Immunol* **197**, 1832–1842 (2016).
137. Kurup, S. P. *et al.* Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nat Med* **23**, 1220–1225 (2017).
138. Obeng-Adjei, N. *et al.* Malaria-induced interferon- γ drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. *PLOS Pathogens* **13**, e1006576 (2017).
139. Weiss, G. E. *et al.* A Positive Correlation between Atypical Memory B Cells and Plasmodium falciparum Transmission Intensity in Cross-Sectional Studies in Peru and Mali. *PLOS ONE* **6**, e15983 (2011).
140. Guiyedi, V. *et al.* Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. *PLoS One* **2**, e389 (2007).
141. Guiyedi, V. *et al.* Asymptomatic Plasmodium falciparum infection in children is associated with increased auto-antibody production, high IL-10 plasma levels and antibodies to merozoite surface protein 3. *Malar J* **14**, 162 (2015).
142. Gitau, E. N., Kokwaro, G. O., Karanja, H., Newton, C. R. J. C. & Ward, S. A. Plasma and Cerebrospinal Proteomes From Children With Cerebral Malaria Differ From Those of Children With Other Encephalopathies. *J Infect Dis* **208**, 1494–1503 (2013).
143. Duarte, J. *et al.* High levels of immunoglobulin E autoantibody to 14-3-3 epsilon protein correlate with protection against severe Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* **206**, 1781–1789 (2012).
144. Lang, B. *et al.* Antibodies to voltage-gated calcium channels in children with falciparum malaria. *J Infect Dis* **191**, 117–121 (2005).
145. Gallien, S., Roussilhon, C., Blanc, C., Pérignon, J.-L. & Druilhe, P. Autoantibody against dendrite in Plasmodium falciparum infection: a singular auto-immune phenomenon

- preferentially in cerebral malaria. *Acta Trop* **118**, 67–70 (2011).
146. Tischfield, M. A. *et al.* Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* **140**, 74–87 (2010).
 147. Damian, R. T. Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and Its Consequences. *The American Naturalist* **98**, 129–149 (1964).
 148. Mourão, L. C., Cardoso-Oliveira, G. P. & Braga, É. M. Autoantibodies and Malaria: Where We Stand? Insights Into Pathogenesis and Protection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**, (2020).
 149. Donati, D. *et al.* Identification of a Polyclonal B-Cell Activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* **72**, 5412–5418 (2004).
 150. Fernandez-Arias, C. *et al.* Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. *Cell Host Microbe* **19**, 194–203 (2016).
 151. Mourão, L. C. *et al.* Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malaria Journal* **15**, 397 (2016).
 152. Rivera-Correa, J. *et al.* Atypical memory B-cells are associated with *Plasmodium falciparum* anemia through anti-phosphatidylserine antibodies. *Elife* **8**, e48309 (2019).
 153. Huerta, P. T., Kowal, C., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T. & Diamond, B. Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 678–683 (2006).
 154. Brown, H. *et al.* Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg* **64**, 207–213 (2001).
 155. Platt, M. P., Agalliu, D. & Cutforth, T. Hello from the Other Side: How Autoantibodies Circumvent the Blood–Brain Barrier in Autoimmune Encephalitis. *Front. Immunol.* **8**, 442 (2017).
 156. Waide, M. L. *et al.* Gut Microbiota Composition Modulates the Magnitude and Quality of Germinal Centers during *Plasmodium* Infections. *Cell Rep* **33**, 108503 (2020).
 157. Hansen, D. S., Siomos, M.-A., Buckingham, L., Scalzo, A. A. & Schofield, L. Regulation of Murine Cerebral Malaria Pathogenesis by CD1d-Restricted NKT Cells and the Natural Killer Complex. *Immunity* **18**, 391–402 (2003).
 158. Taniguchi, T. *et al.* *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. *Sci Rep* **5**, 15699 (2015).
 159. Gillrie, M. R. & Ho, M. Dynamic interactions of *Plasmodium* spp. with vascular endothelium. *Tissue Barriers* **5**, e1268667 (2017).
 160. Abkallo, H. M. *et al.* DNA from pre-erythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the faeces and blood of hosts. *Int J Parasitol* **44**, 467–473 (2014).
 161. Milner, D. A. *et al.* Quantitative Assessment of Multiorgan Sequestration of Parasites in Fatal Pediatric Cerebral Malaria. *J Infect Dis* **212**, 1317–1321 (2015).
 162. Balaji, S. N., Deshmukh, R. & Trivedi, V. Severe malaria: Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences. *J Vector Borne Dis* **57**, 1–13 (2020).
 163. Potts, R. A. *et al.* Mast cells and histamine alter intestinal permeability during malaria parasite infection. *Immunobiology* **221**, 468–474 (2016).
 164. Ghasemzadeh, M. & Hosseini, E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb Haemost* **113**, 1224–1235 (2015).
 165. Denny, J. E. *et al.* Differential Sensitivity to *Plasmodium yoelii* Infection in C57BL/6 Mice Impacts Gut-Liver Axis Homeostasis. *Sci Rep* **9**, 3472 (2019).
 166. Chau, J. Y. *et al.* Malaria-Associated l-Arginine Deficiency Induces Mast Cell-Associated Disruption to Intestinal Barrier Defenses against Nontyphoidal Salmonella Bacteremia. *Infect Immun* **81**, 3515–3526 (2013).

167. Yooseph, S. *et al.* Stool microbiota composition is associated with the prospective risk of *Plasmodium falciparum* infection. *BMC Genomics* **16**, 631 (2015).
168. Cekanaviciute, E. *et al.* Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 10713–10718 (2017).
169. Westfall, S. *et al.* Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell Mol Life Sci* **74**, 3769–3787 (2017).
170. Sun, M.-F. *et al.* Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain Behav Immun* **70**, 48–60 (2018).
171. Kowalski, K. & Mulak, A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil* **25**, 48–60 (2019).
172. Cryan, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* **99**, 1877–2013 (2019).
173. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W. & Knight, R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* **70 Suppl 1**, S38-44 (2012).
174. Sender, R. & Milo, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body.
175. Gill, S. R. *et al.* Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* **312**, 1355–1359 (2006).
176. Luckey, T. D. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* **25**, 1292–1294 (1972).
177. Neish, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **136**, 65–80 (2009).
178. Cowan, D. A., Ramond, J.-B., Makhalanyane, T. P. & De Maayer, P. Metagenomics of extreme environments. *Curr Opin Microbiol* **25**, 97–102 (2015).
179. Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915–1920 (2005).
180. Avershina, E. *et al.* Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol* **87**, 280–290 (2014).
181. Jakobsson, H. E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* **63**, 559–566 (2014).
182. Bäckhed, F. *et al.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* **17**, 852 (2015).
183. Aagaard, K. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **6**, 237ra65 (2014).
184. Rodríguez, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* **26**, 26050 (2015).
185. Koenig, J. E. *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4578–4585 (2011).
186. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biology* **5**, e177 (2007).
187. Claesson, M. J. *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4586–4591 (2011).
188. Dethlefsen, L. & Relman, D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**, 4554–4561 (2011).

189. Takiishi, T., Fenero, C. I. M. & Câmara, N. O. S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* **5**, e1373208 (2017).
190. Hooper, L. V. & Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* **10**, 159–169 (2010).
191. Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**, 20–32 (2016).
192. Gu, S. *et al.* Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLOS ONE* **8**, e74957 (2013).
193. Ouwerkerk, J. P., de Vos, W. M. & Belzer, C. Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **27**, 25–38 (2013).
194. Zarepour, M. *et al.* The mucin Muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun* **81**, 3672–3683 (2013).
195. Jeffery, I. B., Claesson, M. J., O'Toole, P. W. & Shanahan, F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol* **10**, 591–592 (2012).
196. Kovatcheva-Datchary, P., Tremaroli, V. & Bäckhed, F. The Gut Microbiota. in *The Prokaryotes* (eds. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F.) 3–24 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-30144-5_87.
197. Martiny, A. C. High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *ISME J* **13**, 2125–2128 (2019).
198. Mizrahi-Man, O., Davenport, E. R. & Gilad, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PLoS One* **8**, e53608 (2013).
199. Suau, A. *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4799–4807 (1999).
200. Hugon, P. *et al.* A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis* **15**, 1211–1219 (2015).
201. Li, J. *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* **32**, 834–841 (2014).
202. Krych, L., Hansen, C. H. F., Hansen, A. K., Van Den Berg, F. W. J. & Nielsen, D. S. Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. *PLoS ONE* **8**, e62578 (2013).
203. Park, J. C. & Im, S.-H. Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Exp Mol Med* **52**, 1383–1396 (2020).
204. Nagpal, R. *et al.* Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
205. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563 (2014).
206. Natividad, J. M. M. & Verdu, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* **69**, 42–51 (2013).
207. Cox, L. M. & Weiner, H. L. Microbiota Signaling Pathways that Influence Neurologic Disease. *Neurotherapeutics* **15**, 135–145 (2018).
208. Mayer, E. A., Tillisch, K. & Gupta, A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* **125**, 926–938 (2015).
209. Bäumlér, A. J. & Sperandio, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**, 85–93 (2016).

210. Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J. & Corthésy, B. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes* **5**, 688–695 (2014).
211. Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L. & Blumberg, R. S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539–544 (2016).
212. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. & Kasper, D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **122**, 107–118 (2005).
213. Metchnikoff, E. Les microbes intestinaux.
214. Pott, J. & Hornef, M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep* **13**, 684–698 (2012).
215. McDole, J. R. *et al.* Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345–349 (2012).
216. Sommer, F. & Bäckhed, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **11**, 227–238 (2013).
217. Bauer, H., Horowitz, R. E., Levenson, S. M. & Popper, H. The Response of the Lymphatic Tissue to the Microbial Flora. Studies on Germfree Mice. *Am J Pathol* **42**, 471–483 (1963).
218. Benveniste, J., Lespinats, G., Adam, C. & Salomon, J. C. Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J Immunol* **107**, 1647–1655 (1971).
219. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
220. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
221. Littman, D. R. & Pamer, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe* **10**, 311–323 (2011).
222. Sudo, N. *et al.* The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* **159**, 1739–1745 (1997).
223. De Filippo, C. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 14691–14696 (2010).
224. Louis, P., Hold, G. L. & Flint, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* **12**, 661–672 (2014).
225. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
226. Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T. & Vinolo, M. A. R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology* **5**, e73 (2016).
227. Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T. & Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* **3**, 858–876 (2011).
228. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451–455 (2013).
229. Sonnenburg, E. D. & Sonnenburg, J. L. Starving our Microbial Self: The Deleterious Consequences of a Diet Deficient in Microbiota-Accessible Carbohydrates. *Cell Metab* **20**, 779–786 (2014).
230. Pope, J. L., Tomkovich, S. & Jobin, C. Chapter 9 - Influence of Commensal Microbiota and Metabolite for Mucosal Immunity. in *Mucosal Vaccines (Second Edition)* (eds. Kiyono, H. & Pascual, D. W.) 143–164 (Academic Press, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-811924-2.00009-2.

231. KH, H, Hajipirloo, H., SH, K., Rezapour, B. & Barazesh, A. Prevalence of intestinal parasitic infections among primary school attending students in Barandooz-Chay rural region of Urmia, West Azerbaijan Province, Iran in 2008. *African journal of microbiology research* **5**, 788–791 (2011).
232. Saldiva, S. R. *et al.* Ascaris-Trichuris association and malnutrition in Brazilian children. *Paediatr Perinat Epidemiol* **13**, 89–98 (1999).
233. Naveed, A. & Abdullah, S. Impact of parasitic infection on human gut ecology and immune regulations. *Translational Medicine Communications* **6**, 11 (2021).
234. Dos Santos, L. M. *et al.* Intestinal microbiota regulates tryptophan metabolism following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* **42**, e12720 (2020).
235. Bereswill, S. *et al.* The impact of Toll-like-receptor-9 on intestinal microbiota composition and extra-intestinal sequelae in experimental *Toxoplasma gondii* induced ileitis. *Gut Pathog* **6**, 19 (2014).
236. Raetz, M. *et al.* Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol* **14**, 136–142 (2013).
237. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859–904 (2010).
238. Leung, J. M., Graham, A. L. & Knowles, S. C. L. Parasite-Microbiota Interactions With the Vertebrate Gut: Synthesis Through an Ecological Lens. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
239. Toro-Londono, M. A., Bedoya-Urrego, K., Garcia-Montoya, G. M., Galvan-Diaz, A. L. & Alzate, J. F. Intestinal parasitic infection alters bacterial gut microbiota in children. *PeerJ* **7**, e6200 (2019).
240. Burgess, S. L., Gilchrist, C. A., Lynn, T. C. & Petri, W. A. Parasitic Protozoa and Interactions with the Host Intestinal Microbiota. *Infect Immun* **85**, e00101-17 (2017).
241. Sipahi, A. M. & Baptista, D. M. Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. *World J Gastroenterol* **23**, 6009–6015 (2017).
242. Jenkins, T. P. *et al.* Infections by human gastrointestinal helminths are associated with changes in faecal microbiota diversity and composition. *PLOS ONE* **12**, e0184719 (2017).
243. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* **148**, 1258–1270 (2012).
244. Galván-Moroyoqui, J. M., Domínguez-Robles, M. del C., Franco, E. & Meza, I. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2**, e266 (2008).
245. Beyhan, Y. E. & Yıldız, M. R. Microbiota and parasite relationship. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **106**, 115954 (2023).
246. Pawlowski, S. W., Warren, C. A. & Guerrant, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology* **136**, 1874–1886 (2009).
247. Chudnovskiy, A. *et al.* Host-Protozoan Interactions Protect from Mucosal Infections through Activation of the Inflammasome. *Cell* **167**, 444-456.e14 (2016).
248. Benson, A., Pifer, R., Behrendt, C. L., Hooper, L. V. & Yarovinsky, F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* **6**, 187–196 (2009).
249. Dea-Ayuela, M. A., Rama-Iñiguez, S. & Bolás-Fernandez, F. Enhanced susceptibility to *Trichuris muris* infection of B10Br mice treated with the probiotic *Lactobacillus casei*. *Int Immunopharmacol* **8**, 28–35 (2008).
250. Ohnmacht, C. *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ ⁺ T cells. *Science* **349**, 989–993 (2015).
251. Villarino, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of

- malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2235–2240 (2016).
252. Ippolito, M. M., Denny, J. E., Langelier, C., Sears, C. L. & Schmidt, N. W. Malaria and the Microbiome: A Systematic Review. *Clin Infect Dis* **67**, 1831–1839 (2018).
 253. Kau, A. L. *et al.* Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci Transl Med* **7**, 276ra24 (2015).
 254. Sonnenburg, E. D. *et al.* Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**, 212–215 (2016).
 255. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. & Jansson, J. K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* **1**, 56–66 (2007).
 256. Morffy Smith, C. D. *et al.* Composition of the gut microbiota transcends genetic determinants of malaria infection severity and influences pregnancy outcome. *EBioMedicine* **44**, 639–655 (2019).
 257. Megur, A., Baltriukienė, D., Bukelskienė, V. & Burokas, A. The Microbiota–Gut–Brain Axis and Alzheimer’s Disease: Neuroinflammation Is to Blame? *Nutrients* **13**, 37 (2020).
 258. Nandwana, V. & Debbarma, S. Fecal Microbiota Transplantation: A Microbiome Modulation Technique for Alzheimer’s Disease. *Cureus* **13**, e16503 (2021).
 259. Cabrera-Maqueda, J. M. *et al.* [Antibiotic diffusion to central nervous system]. *Rev Esp Quimioter* **31**, 1–12 (2018).
 260. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* **11**, (2020).
 261. Hawkins, B. T. & Davis, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173–185 (2005).
 262. Braniste, V. *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* **6**, 263ra158 (2014).
 263. Matt, S. M. *et al.* Butyrate and Dietary Soluble Fiber Improve Neuroinflammation Associated With Aging in Mice. *Front Immunol* **9**, 1832 (2018).
 264. Erny, D. *et al.* Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* **18**, 965–977 (2015).
 265. Thion, M. S. *et al.* Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* **172**, 500–516.e16 (2018).
 266. Cryan, J. F. & Dinan, T. G. Gut microbiota: Microbiota and neuroimmune signalling-Metchnikoff to microglia. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 494–496 (2015).
 267. Wohleb, E. S., McKim, D. B., Sheridan, J. F. & Godbout, J. P. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci* **8**, 447 (2014).
 268. D’Mello, C. *et al.* Probiotics Improve Inflammation-Associated Sickness Behavior by Altering Communication between the Peripheral Immune System and the Brain. *J Neurosci* **35**, 10821–10830 (2015).
 269. Soliman, M. L., Combs, C. K. & Rosenberger, T. A. Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 287–300 (2013).
 270. Nilsson, N. E., Kotarsky, K., Owman, C. & Olde, B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1047–1052 (2003).
 271. Sun, Y. *et al.* Promotion of astrocyte-neuron glutamate-glutamine shuttle by SCFA contributes to the alleviation of Alzheimer’s disease. *Redox Biology* **62**, 102690 (2023).
 272. Agus, A., Planchais, J. & Sokol, H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* **23**, 716–724 (2018).

273. Beaver, M. H. & Wostmann, B. S. Histamine and 5-hydroxytryptamine in the intestinal tract of germ-free animals, animals harbouring one microbial species and conventional animals. *Br J Pharmacol Chemother* **19**, 385–393 (1962).
274. Dodd, D. *et al.* A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* **551**, 648–652 (2017).
275. Rothhammer, V. *et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* **22**, 586–597 (2016).
276. Zelante, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372–385 (2013).
277. Ma, Q. *et al.* Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *Journal of Neuroinflammation* **16**, 53 (2019).
278. Mahajan, E., Sinha, S., Bhatia, A., Sehgal, R. & Medhi, B. Evaluation of the effect of probiotic as add-on therapy with conventional therapy and alone in malaria induced mice. *BMC Res Notes* **14**, 246 (2021).
279. Toukam, L. L. *et al.* In vivo antimalarial activity of a probiotic bacterium *Lactobacillus sakei* isolated from traditionally fermented milk in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *J Ethnopharmacol* **280**, 114448 (2021).
280. Rhee, S. H., Pothoulakis, C. & Mayer, E. A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**, 306–314 (2009).
281. Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. & Vizi, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52**, 595–638 (2000).
282. Van Felius, I. D. *et al.* Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 267–276 (2003).
283. De Vadder, F. *et al.* Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 6458–6463 (2018).
284. Matsumoto, M. *et al.* Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci Rep* **2**, 233 (2012).
285. Dagorn, A. *et al.* Gamma-aminobutyric acid acts as a specific virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* **159**, 339–351 (2013).
286. Correale, J., Hohlfeld, R. & Baranzini, S. E. The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* **18**, 544–558 (2022).
287. Wen, J. *et al.* Efficacy of N-Acetylserotonin and Melatonin in the EAE Model of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* **11**, 763–773 (2016).
288. Sacramento, P. M. *et al.* Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4+ T-cell subsets in multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol* **48**, 1376–1388 (2018).
289. de las Casas-Engel, M. *et al.* Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *J Immunol* **190**, 2301–2310 (2013).
290. Zeinstra, E. M. *et al.* 5HT4 agonists inhibit interferon-gamma-induced MHC class II and B7 costimulatory molecules expression on cultured astrocytes. *J Neuroimmunol* **179**, 191–195 (2006).
291. Aminian, A. *et al.* Tropisetron diminishes demyelination and disease severity in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience* **248**, 299–306 (2013).
292. Kawase, T. *et al.* Gut microbiota of mice putatively modifies amino acid metabolism in the host brain. *Br J Nutr* **117**, 775–783 (2017).
293. Hoyles, L. *et al.* Regulation of blood-brain barrier integrity by microbiome-associated

- methyamines and cognition by trimethylamine N-oxide. *Microbiome* **9**, 235 (2021).
294. Mossad, O. & Erny, D. The microbiota–microglia axis in central nervous system disorders. *Brain Pathology* **30**, 1159 (2020).
295. Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J. & Ratan, R. R. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience Letters* **625**, 56–63 (2016).
296. Kong, Y., Jiang, B. & Luo, X. Gut microbiota influences Alzheimer’s disease pathogenesis by regulating acetate in *Drosophila* model. *Future Microbiology* **13**, 1117–1128 (2018).
297. Zhao, Y., Sharfman, N. M., Jaber, V. R. & Lukiw, W. J. Down-Regulation of Essential Synaptic Components by GI-Tract Microbiome-Derived Lipopolysaccharide (LPS) in LPS-Treated Human Neuronal-Glial (HNG) Cells in Primary Culture: Relevance to Alzheimer’s Disease (AD). *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 314 (2019).
298. Lien, E. *et al.* Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **105**, 497–504 (2000).
299. Yang, X., Yu, D., Xue, L., Li, H. & Du, J. Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10**, 475–487 (2020).
300. Lee, H.-J., Lee, K.-E., Kim, J.-K. & Kim, D.-H. Suppression of gut dysbiosis by *Bifidobacterium longum* alleviates cognitive decline in 5XFAD transgenic and aged mice. *Sci Rep* **9**, 11814 (2019).
301. Zhong, S.-R., Kuang, Q., Zhang, F., Chen, B. & Zhong, Z.-G. Functional roles of the microbiota-gut-brain axis in Alzheimer’s disease: Implications of gut microbiota-targeted therapy. *Translational Neuroscience* **12**, 581–600 (2021).
302. Schroeder, B. O. & Bäckhed, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* **22**, 1079–1089 (2016).
303. Rutsch, A., Kantsjö, J. B. & Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol* **11**, 604179 (2020).
304. Roy Sarkar, S. & Banerjee, S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol* **328**, 98–104 (2019).
305. Li, Z.-H., Jiang, Y.-Y., Long, C.-Y., Peng, Q. & Yue, R.-S. The gut microbiota-astrocyte axis: Implications for type 2 diabetic cognitive dysfunction. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **29**, 59–73 (2023).
306. Li, L., Acioglu, C., Heary, R. F. & Elkabes, S. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun* **91**, 740–755 (2021).
307. Phulwani, N. K., Esen, N., Md. Syed, M. & Kielian, T. Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in astrocytes is induced by TNF- α - and NF- κ B-dependent pathways. *J Immunol* **181**, 3841–3849 (2008).
308. Sanmarco, L. M. *et al.* Gut-licensed IFN γ + NK cells drive LAMP1+TRAIL+ anti-inflammatory astrocytes. *Nature* **590**, 473–479 (2021).
309. Cuervo-Zanatta, D. *et al.* Dietary Fiber Modulates the Release of Gut Bacterial Products Preventing Cognitive Decline in an Alzheimer’s Mouse Model. *Cell Mol Neurobiol* **43**, 1595–1618 (2023).
310. Wang, C., Zheng, D., Weng, F., Jin, Y. & He, L. Sodium butyrate ameliorates the cognitive impairment of Alzheimer’s disease by regulating the metabolism of astrocytes. *Psychopharmacology (Berl)* **239**, 215–227 (2022).
311. Natrus, L. V. *et al.* Effect of Propionic Acid on Diabetes-Induced Impairment of Unfolded Protein Response Signaling and Astrocyte/Microglia Crosstalk in Rat Ventromedial

- Nucleus of the Hypothalamus. *Neural Plast* **2022**, 6404964 (2022).
312. Yoo, W. *et al.* High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide. *Science* **373**, 813–818 (2021).
 313. Vogt, N. M. *et al.* The gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide is elevated in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **10**, 124 (2018).
 314. Brunt, V. E. *et al.* The gut microbiome-derived metabolite trimethylamine N-oxide modulates neuroinflammation and cognitive function with aging. *Geroscience* **43**, 377–394 (2021).
 315. Li, C. *et al.* Diet-Induced High Serum Levels of Trimethylamine-N-oxide Enhance the Cellular Inflammatory Response without Exacerbating Acute Intracerebral Hemorrhage Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, 1599747 (2022).
 316. Prinz, M., Jung, S. & Priller, J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* **179**, 292–311 (2019).
 317. Masuda, T. *et al.* Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* **566**, 388–392 (2019).
 318. Kierdorf, K. & Prinz, M. Microglia in steady state. *J Clin Invest* **127**, 3201–3209 (2017).
 319. Derecki, N. C., Katzmarski, N., Kipnis, J. & Meyer-Luehmann, M. Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta Neuropathol* **128**, 333–345 (2014).
 320. Abdel-Haq, R., Schlachetzki, J. C. M., Glass, C. K. & Mazmanian, S. K. Microbiome–microglia connections via the gut–brain axis. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 41–59 (2019).
 321. Bagot, S. *et al.* Susceptibility to Experimental Cerebral Malaria Induced by *Plasmodium berghei* ANKA in Inbred Mouse Strains Recently Derived from Wild Stock. *Infect Immun* **70**, 2049–2056 (2002).
 322. Keswani, T. *et al.* Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. *Genes Immun.* **21**, 45–62 (2020).
 323. Yeka, A. *et al.* Malaria in Uganda: Challenges to control on the long road to elimination. *Acta Tropica* **121**, 184–195 (2012).
 324. Scott, J. A. G. *et al.* Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *The Lancet* **378**, 1316–1323 (2011).
 325. Walsh, A. L., Phiri, A. J., Graham, S. M., Molyneux, E. M. & Molyneux, M. E. Bacteremia in febrile Malawian children: clinical and microbiologic features: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **19**, 312–318 (2000).
 326. Nyein, P. P. *et al.* High Frequency of Clinically Significant Bacteremia in Adults Hospitalized With Falciparum Malaria. *Open Forum Infectious Diseases* **3**, ofw028 (2016).
 327. Were, T. *et al.* Bacteremia in Kenyan Children Presenting with Malaria. *J Clin Microbiol* **49**, 671–676 (2011).
 328. Njim, T., Dondorp, A., Mukaka, M. & Ohuma, E. O. Identifying risk factors for the development of sepsis during adult severe malaria. *Malar J* **17**, 278 (2018).
 329. Nadjm, B. *et al.* WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: prospective study. *BMJ* **340**, c1350–c1350 (2010).
 330. Bassat, Q. *et al.* Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. *Tropical Med Int Health* **14**, 1011–1019 (2009).
 331. Berkley, J. A. *et al.* HIV Infection, Malnutrition, and Invasive Bacterial Infection among Children with Severe Malaria. *CLIN INFECT DIS* **49**, 336–343 (2009).
 332. Decuyper, S. *et al.* Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S

- Metagenomics Approach. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004470 (2016).
333. Ojima, M. *et al.* Metagenomic Analysis Reveals Dynamic Changes of Whole Gut Microbiota in the Acute Phase of Intensive Care Unit Patients. *Dig Dis Sci* **61**, 1628–1634 (2016).
 334. Keswani, T. *et al.* Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. *Genes Immun* **21**, 45–62 (2020).
 335. Bagot, S. *et al.* Identification of two cerebral malaria resistance loci using an inbred wild-derived mouse strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9919–9923 (2002).
 336. Feng, Y. *et al.* Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS ONE* **14**, e0218384 (2019).
 337. Yang, L. *et al.* The varying effects of antibiotics on gut microbiota. *AMB Expr* **11**, 116 (2021).
 338. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307–317 (2011).
 339. Takata, F., Nakagawa, S., Matsumoto, J. & Dohgu, S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **15**, (2021).
 340. Keswani, T. *et al.* Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. *Genes Immun* **21**, 45–62 (2020).
 341. Daneman, R. & Rescigno, M. The Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier: Are They So Different? *Immunity* **31**, 722–735 (2009).
 342. Alexandrov, P. N. *et al.* Aluminum-induced generation of lipopolysaccharide (LPS) from the human gastrointestinal (GI)-tract microbiome-resident *Bacteroides fragilis*. *Journal of Inorganic Biochemistry* **203**, 110886 (2020).
 343. Zhanel, G. G., Keynan, R., Keynan, Y. & Karlowsky, J. A. The role of Fecal Microbiota Transplantation (FMT) in treating patients with multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics* **23**, 921–930 (2023).
 344. Yu, W. *et al.* Probiotics alleviate cognitive dysfunction associated with neuroinflammation in cardiac surgery. *Am J Transl Res* **11**, 7614–7626 (2019).
 345. Zou, R. *et al.* *Akkermansia muciniphila* plays a neuroprotective role in HMC3 cells through the ‘gut–brain’ axis. *Future Microbiology* **18**, 255–266 (2023).
 346. Hoyles, L. *et al.* Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. *Microbiome* **6**, 55 (2018).
 347. Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B. & Jala, V. R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **11**, 1463–1482 (2021).
 348. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020412 (2015).
 349. Scalise, A. A., Kakogiannos, N., Zanardi, F., Iannelli, F. & Giannotta, M. The blood–brain and gut–vascular barriers: from the perspective of claudins. *Tissue Barriers* **9**, 1926190 (2021).
 350. Lewis, A. J., Seymour, C. W. & Rosengart, M. R. Current Murine Models of Sepsis. *Surgical Infections* **17**, 385–393 (2016).
 351. Zweigner, J., Gramm, H.-J., Singer, O. C., Wegscheider, K. & Schumann, R. R. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* **98**, 3800–3808 (2001).

352. Schumann, R. R. *et al.* The Lipopolysaccharide-Binding Protein Is a Secretory Class 1 Acute-Phase Protein Whose Gene Is Transcriptionally Activated by APRF/STAT-3 and Other Cytokine-Inducible Nuclear Proteins. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 3490–3503 (1996).
353. O’Keefe, S. J. Effect of fiber supplementation on the microbiota in critically ill patients. *WJGP* **2**, 138 (2011).
354. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* **13**, 321–335 (2013).
355. Arumugam, S., Lau, C. S. M. & Chamberlain, R. S. Probiotics and Synbiotics Decrease Postoperative Sepsis in Elective Gastrointestinal Surgical Patients: a Meta-Analysis. *J Gastrointest Surg* **20**, 1123–1131 (2016).
356. Li, Q. *et al.* Successful treatment of severe sepsis and diarrhea after vagotomy utilizing fecal microbiota transplantation: a case report. *Crit Care* **19**, 37 (2015).
357. Moncada, D., Keller, K. & Chadee, K. Entamoeba histolytica Cysteine Proteinases Disrupt the Polymeric Structure of Colonic Mucin and Alter Its Protective Function. *Infect Immun* **71**, 838–844 (2003).
358. Henke, M. T. *et al.* Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn’s disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 12672–12677 (2019).
359. Crost, E. H., Coletto, E., Bell, A. & Juge, N. Ruminococcus gnavus: friend or foe for human health. *FEMS Microbiology Reviews* **47**, fuad014 (2023).
360. Haynie, T. *et al.* Synthesis of the pentasaccharide repeating unit from Ruminococcus gnavus and measurement of its inflammatory properties. *RSC Adv.* **11**, 14357–14361 (2021).
361. Hifumi, T. Spontaneous Non-Traumatic Clostridium perfringens Sepsis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **73**, 177–180 (2020).
362. Fettucciari, K. *et al.* Proinflammatory Cytokines: Possible Accomplices for the Systemic Effects of Clostridioides difficile Toxin B. *JIR* **14**, 57–62 (2021).
363. Bartlett, J. G. Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* **18 Suppl 4**, S265-272 (1994).
364. Tuovinen, E., Keto, J., Nikkilä, J., Mättö, J. & Lähteenmäki, K. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal Clostridium species. *Anaerobe* **19**, 70–76 (2013).
365. Lv, Q.-B. *et al.* Changes of gut microbiota structure in rats infected with Toxoplasma gondii. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, (2022).
366. Rogala, A. R., Oka, A. & Sartor, R. B. Strategies to Dissect Host-Microbial Immune Interactions That Determine Mucosal Homeostasis vs. Intestinal Inflammation in Gnotobiotic Mice. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
367. Ning, X., Lei, Z., Rui, B., Li, Y. & Li, M. Gut Microbiota Promotes Immune Tolerance by Regulating ROR γ ⁺ Treg Cells in Food Allergy. *Advanced Gut & Microbiome Research* **2022**, e8529578 (2022).
368. Mishima, Y. *et al.* Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10–producing regulatory B cells. *J Clin Invest* **129**, 3702–3716 (2019).
369. Zegarra Ruiz, D. F. *et al.* Microbiota manipulation to increase macrophage IL-10 improves colitis and limits colitis-associated colorectal cancer. *Gut Microbes* **14**, 2119054 (2022).
370. Sun, M. *et al.* Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat Commun* **9**, 3555 (2018).
371. Corrêa, R. O. *et al.* Bacterial short-chain fatty acid metabolites modulate the inflammatory response against infectious bacteria. *Cellular Microbiology* **19**, e12720 (2017).

372. Chen, J. & Vitetta, L. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. *Immune Network* **20**, (2020).
373. Seekatz, A. M. *et al.* Restoration of short chain fatty acid and bile acid metabolism following fecal microbiota transplantation in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* **53**, 64–73 (2018).
374. Eslick, S. *et al.* Weight Loss and Short-Chain Fatty Acids Reduce Systemic Inflammation in Monocytes and Adipose Tissue Macrophages from Obese Subjects. *Nutrients* **14**, 765 (2022).
375. Rutsch, A., Kantsjö, J. B. & Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front. Immunol.* **11**, 604179 (2020).
376. Kuai, X. *et al.* Evaluation of fecal microbiota transplantation in Parkinson's disease patients with constipation. *Microbial Cell Factories* **20**, 98 (2021).
377. Lei, W. *et al.* Akkermansia muciniphila in neuropsychiatric disorders: friend or foe? *Front Cell Infect Microbiol* **13**, 1224155 (2023).
378. Nimgampalle, M. & Kuna, Y. Anti-Alzheimer Properties of Probiotic, Lactobacillus plantarum MTCC 1325 in Alzheimer's Disease induced Albino Rats. *J Clin Diagn Res* **11**, KC01–KC05 (2017).
379. Abdelhamid, M., Zhou, C., Jung, C.-G. & Michikawa, M. Probiotic Bifidobacterium breve MCC1274 Mitigates Alzheimer's Disease-Related Pathologies in Wild-Type Mice. *Nutrients* **14**, 2543 (2022).
380. Ravi, A. K. & Muthukrishnan, S. K. Combination of Probiotics and Natural Compounds to Treat Multiple Sclerosis via Warburg Effect. *Adv Pharm Bull* **12**, 515–523 (2022).
381. Lu, C.-S. *et al.* The Add-On Effect of Lactobacillus plantarum PS128 in Patients With Parkinson's Disease: A Pilot Study. *Frontiers in Nutrition* **8**, (2021).
382. Foligne, B. *et al.* Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* **13**, 236–243 (2007).
383. Yilmaz, B. *et al.* Gut Microbiota Elicits a Protective Immune Response against Malaria Transmission. *Cell* **159**, 1277–1289 (2014).
384. Lopetuso, L. R. *et al.* Towards a disease-associated common trait of gut microbiota dysbiosis: The pivotal role of Akkermansia muciniphila. *Dig Liver Dis* **52**, 1002–1010 (2020).
385. Xue, C. *et al.* Health and Disease: Akkermansia muciniphila, the Shining Star of the Gut Flora. *Research* **6**, 0107 (2023).
386. Yao, S., Zhao, Z., Wang, W. & Liu, X. Bifidobacterium Longum: Protection against Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research* **2021**, 1–11 (2021).
387. Kuczma, M. P. *et al.* Self and microbiota-derived epitopes induce CD4⁺ T cell anergy and conversion into CD4⁺Foxp3⁺ regulatory cells. *Mucosal Immunol* **14**, 443–454 (2021).
388. Sun, Y., Zhu, H., Cheng, R., Tang, Z. & Zhang, M. Outer membrane protein Amuc_1100 of Akkermansia muciniphila alleviates antibiotic-induced anxiety and depression-like behavior in mice. *Physiol Behav* **258**, 114023 (2023).
389. Ilhan, Z. E., Brochard, V., Lapaque, N., Auvin, S. & Lepage, P. Exposure to anti-seizure medications impact growth of gut bacterial species and subsequent host response. *Neurobiol Dis* **167**, 105664 (2022).
390. Harach, T. *et al.* Reduction of Aβ amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep* **7**, 41802 (2017).
391. Liu, S. *et al.* Oral Administration of miR-30d from Feces of MS Patients Suppresses MS-like Symptoms in Mice by Expanding Akkermansia muciniphila. *Cell Host Microbe* **26**, 779–794.e8 (2019).
392. Fang, X., Li, F. & Hong, D. Potential Role of Akkermansia muciniphila in Parkinson's

- Disease and Other Neurological/Autoimmune Diseases. *CURR MED SCI* **41**, 1172–1177 (2021).
393. Xu, R. *et al.* The role of the probiotic *Akkermansia muciniphila* in brain functions: insights underpinning therapeutic potential. *Critical Reviews in Microbiology* **49**, 151–176 (2023).
 394. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) *et al.* Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**, e06780 (2021).
 395. Hu, X. *et al.* Fecal microbiota transplantation inhibited neuroinflammation of traumatic brain injury in mice via regulating the gut–brain axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **13**, (2023).
 396. Srivastav, S. *et al.* Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **69**, 73–86 (2019).
 397. Khatoon, S., Kalam, N., Rashid, S. & Bano, G. Effects of gut microbiota on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience* **15**, (2023).
 398. Angelucci, F., Cechova, K., Amlerova, J. & Hort, J. Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation* **16**, 108 (2019).
 399. El-Assaad, F., Wheway, J., Hunt, N. H., Grau, G. E. R. & Combes, V. Production, Fate and Pathogenicity of Plasma Microparticles in Murine Cerebral Malaria. *PLOS Pathogens* **10**, e1003839 (2014).
 400. MacVicar, B. A. & Newman, E. A. Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020388 (2015).
 401. Hearn, J., Rayment, N., Landon, D. N., Katz, D. R. & de Souza, J. B. Immunopathology of Cerebral Malaria: Morphological Evidence of Parasite Sequestration in Murine Brain Microvasculature. *Infect Immun* **68**, 5364–5376 (2000).
 402. Dalko, E. *et al.* Heme dampens T-cell sequestration by modulating glial cell responses during rodent cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity* **58**, 280–290 (2016).
 403. Faustino, J. V. *et al.* Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J Neurosci* **31**, 12992–13001 (2011).
 404. Vidal-Itriago, A. *et al.* Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol* **13**, 997786 (2022).
 405. Chastain, E. M. L., Duncan, D. S., Rodgers, J. M. & Miller, S. D. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 265–274 (2011).
 406. Saijo, K. & Glass, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 775–787 (2011).
 407. Knowler, S. A. *et al.* Altered gastrointestinal tract structure and microbiome following cerebral malaria infection. *Parasitol Res* **122**, 789–799 (2023).
 408. Guan, W. *et al.* Observation of the Gut Microbiota Profile in C57BL/6 Mice Induced by *Plasmodium berghei* ANKA Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, (2021).
 409. O’Riordan, K. J. *et al.* Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **546**, 111572 (2022).
 410. Guo, J. *et al.* Characteristics of gut microbiota in representative mice strains: Implications for biological research. *Animal Models and Experimental Medicine* **5**, 337–349 (2022).
 411. Montgomery, T. L. *et al.* Interactions between host genetics and gut microbiota determine susceptibility to CNS autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 27516–27527 (2020).

412. Brambilla, R. *et al.* Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* **62**, 452–467 (2014).
413. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. & Mills, K. H. G. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology* **162**, 1–11 (2010).
414. Faivre, B. *et al.* Disentangling the effect of host genetics and gut microbiota on resistance to an intestinal parasite. *International Journal for Parasitology* **49**, 873–883 (2019).
415. Terveer, E. M. *et al.* Human Transmission of Blastocystis by Fecal Microbiota Transplantation Without Development of Gastrointestinal Symptoms in Recipients. *Clinical Infectious Diseases* **71**, 2630–2636 (2020).
416. Park, S.-H. *et al.* Cognitive function improvement after fecal microbiota transplantation in Alzheimer's dementia patient: a case report. *Current Medical Research and Opinion* **37**, 1739–1744 (2021).
417. Al, K. F. *et al.* Fecal microbiota transplantation is safe and tolerable in patients with multiple sclerosis: A pilot randomized controlled trial. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical* **8**, 20552173221086662 (2022).
418. Xue, L.-J. *et al.* Fecal microbiota transplantation therapy for Parkinson's disease: A preliminary study. *Medicine* **99**, e22035 (2020).
419. Vongsavath, T., Laeeq, T., Tun, K. M. & Hong, A. S. The Potential Role of Fecal Microbiota Transplantation in Parkinson's Disease: A Systematic Literature Review. *Applied Microbiology* **3**, 993–1002 (2023).
420. Matheson, J.-A. T. & Holsinger, R. M. D. The Role of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 1001 (2023).
421. Lin, D. *et al.* Potential Gut Microbiota Features for Non-Invasive Detection of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
422. Klitzing, E. von, Ekmekciu, I., Kuhl, A. A., Bereswill, S. & Heimesaat, M. M. Intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of *Toxoplasma gondii* induced acute ileitis in mice harboring a human gut microbiota. *PLOS ONE* **12**, e0176144 (2017).
423. Duarte-Silva, E., Morais, L. H., Clarke, G., Savino, W. & Peixoto, C. Targeting the Gut Microbiota in Chagas Disease: What Do We Know so Far? *Frontiers in Microbiology* **11**, (2020).
424. Travers, M.-A., Florent, I., Kohl, L. & Grellier, P. Probiotics for the Control of Parasites: An Overview. *Journal of Parasitology Research* **2011**, e610769 (2011).
425. Decrease of spleen invariant natural killer T and natural killer cell numbers in *Burkholderia thailandensis*-infected C57BL/6 mice. *Asian Pac J Allergy Immunol* (2022) doi:10.12932/AP-070519-0556.
426. Wan, X. *et al.* Impact of broad-spectrum antibiotics on the gut–microbiota–spleen–brain axis. *Brain, Behavior, & Immunity - Health* **27**, 100573 (2023).
427. Choileáin, S. N. *et al.* CXCR3+ T cells in multiple sclerosis correlate with reduced diversity of the gut microbiome. *Journal of Translational Autoimmunity* **3**, 100032 (2020).
428. Bachem, A. *et al.* Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells. *Immunity* **51**, 285-297.e5 (2019).
429. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221–1227 (1987).
430. Mao, B. *et al.* Effects of Different Doses of Fructooligosaccharides (FOS) on the

Composition of Mice Fecal Microbiota, Especially the Bifidobacterium Composition.

Nutrients **10**, 1105 (2018).

431. Nishitsuji, K. *et al.* Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep* **7**, 15876 (2017).

432. Liu, X. *et al.* Regulation of short-chain fatty acids in the immune system. *Front. Immunol.* **14**, 1186892 (2023).

433. Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y. & Hodin, R. A. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **132**, 1012–1017 (2002).

434. Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. & Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **13**, 2826–2832 (2007).

435. Ashburner, B. P., Westerheide, S. D. & Baldwin, A. S. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* **21**, 7065–7077 (2001).

436. Jeong, Y. *et al.* Histone deacetylase isoforms regulate innate immune responses by deacetylating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J Leukoc Biol* **95**, 651–659 (2014).

437. Gao, Y., Xie, D., Wang, Y., Niu, L. & Jiang, H. Short-Chain Fatty Acids Reduce Oligodendrocyte Precursor Cells Loss by Inhibiting the Activation of Astrocytes via the SGK1/IL-6 Signalling Pathway. *Neurochem Res* **47**, 3476–3489 (2022).

438. Halili, M. A. *et al.* Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol* **87**, 1103–1114 (2010).

439. Smith, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569–573 (2013).

440. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–450 (2013).

441. Singh, N. *et al.* Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **40**, 128–139 (2014).

442. Zhao, C. *et al.* A fiber-enriched diet alleviates Staphylococcus aureus-induced mastitis by activating the HDAC3-mediated antimicrobial program in macrophages via butyrate production in mice. *PLOS Pathogens* **19**, e1011108 (2023).

443. Huang, C., Du, W., Ni, Y., Lan, G. & Shi, G. The effect of short-chain fatty acids on M2 macrophages polarization in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* **207**, 53–64 (2022).

444. Ersching, J. *et al.* Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. *Immunity* **46**, 1045–1058.e6 (2017).

445. Bergman, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* **70**, 567–590 (1990).

446. Moreau, M. C., Ducluzeau, R., Guy-Grand, D. & Muller, M. C. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmacytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* **21**, 532–539 (1978).

447. Daïen, C. I. *et al.* Gut-derived acetate promotes B10 cells with antiinflammatory effects. *JCI Insight* **6**, e144156, 144156 (2021).

448. Belzer, C. & de Vos, W. M. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. *ISME J* **6**, 1449–1458 (2012).

449. Lin, C.-H. *et al.* Altered gut microbiota and inflammatory cytokine responses in

- patients with Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation* **16**, 129 (2019).
450. Yang, X. *et al.* Parkinson's Disease Is Associated with Impaired Gut-Blood Barrier for Short-Chain Fatty Acids. *Mov Disord* **37**, 1634–1643 (2022).
451. Huseyin, C. E., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. & Scanlan, P. D. Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiology Reviews* **41**, 479–511 (2017).
452. Jaswal, K., Todd, O. A. & Behnsen, J. Neglected gut microbiome: interactions of the non-bacterial gut microbiota with enteric pathogens. *Gut Microbes* **15**, 2226916 (2023).
453. Däbritz, J., Schneider, M., Just-Nuebling, G. & Groll, A. H. Minireview: invasive fungal infection complicating acute *Plasmodium falciparum* malaria: Invasive fungal infections and acute *P. falciparum* malaria. *Mycoses* **54**, 311–317 (2011).
454. Cariaco, Y. *et al.* Ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. *Sci Rep* **8**, 1547 (2018).
455. Wilson, A. P. R., Wright, S. & Bellingan, G. Disseminated Fungal Infection Following *Falciparum* Malaria. *Journal of Infection* **40**, 202–204 (2000).
456. Drummond, R. A. What fungal CNS infections can teach us about neuroimmunology and CNS-specific immunity. *Seminars in Immunology* **67**, 101751 (2023).
457. Deigendesch, N., Costa Nunez, J. & Stenzel, W. Parasitic and fungal infections. *Handb Clin Neurol* **145**, 245–262 (2017).
458. Lo, A. C., Faye, B., Gyan, B. A. & Amoah, L. E. *Plasmodium* and intestinal parasite perturbations of the infected host's inflammatory responses: a systematic review. *Parasites & Vectors* **11**, 387 (2018).
459. Kupritz, J., Angelova, A., Nutman, T. B. & Gazzinelli-Guimaraes, P. H. Helminth-Induced Human Gastrointestinal Dysbiosis: a Systematic Review and Meta-Analysis Reveals Insights into Altered Taxon Diversity and Microbial Gradient Collapse. *mBio* **12**, e02890-21.

ANNEXES

Annexe 1

Ma contribution à cet article a été de participer dans la rédaction, la révision et le montage des schéma. Pour accéder à la revue veuillez cliquer sur le lien suivant :

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35330166/>



Communication

Autophagy Pathways in the Genesis of *Plasmodium*-Derived Microvesicles: A Double-Edged Sword?

Inès Leleu , Jeremy Alloo , Pierre-André Cazenave, Jacques Roland and Sylviane Pied *

U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Inserm, CNRS, Université Lille, F-59000 Lille, France; ines.leleu@inserm.fr (I.L.); jeremy.alloo@pasteur-lille.fr (J.A.); cazenave@pasteur.fr (P.-A.C.); jacques.roland@pasteur-lille.fr (J.R.)

* Correspondence: sylviane.pied@pasteur-lille.fr

Annexe 2

J'ai également participé aux travaux de recherche menés par le Dr Fatima Hellani en vue d'une publication en réalisant des d'expériences de RTqPCR pour la quantification de l'expression des cytokines/chimiokines (*Cxcl10*, *Il6*, *Tnfa*, *Ccl2* et *Ifng*) ainsi que des molécules associées à la sénescence (*P16*, *P21*, *P38*, *P53*, *Rb*, *Gadd45*). J'ai également effectué les infections par *PbA* en modèles murins. Pour accéder à ces travaux veuillez cliquer sur le lien suivant :

<https://www.theses.fr/2022ULILS054>

Title: Impact of senescent astrocytes on premature aging of the brain and associated cognitive deficits during CM

MÉDIATION SCIENTIFIQUE

- Impact of gut microbiota on neuroinflammatory diseases, Présentation au congrès, ***The annual Neuroimmunology Symposium of the French Neuroimmunology club***, (France) Mai 2023.
- Impact of gut microbiota and potential contribution of probiotics in cerebral malaria development, **Presentation trimestriel pour le suivi du projet PROMAL auprès de la SAAT nord**, France, 2022-2023., France
- Impact du microbiote intestinal sur le développement du neuropaludisme, **Ma thèse en 180 seconde, finaliste régional**, France, 2023.
- Impact of gut microbiota in cerebral malaria development, **Prix du meilleur poster, Journée hors site de l'Institut Pasteur de Lille, CIIL**, France, 2023.
- **Ambassadeur chez DECLIC**, travaux de médiation scientifique en lycée, conférence de sensibilisation aux métiers de la recherche et rencontre personnalisé avec des groupes de lycéens. France, 2022
- **Responsables « apprentis-chercheur »** en collaboration avec l'association « L'arbre des connaissances ». Accueil d'un binôme de Lycée pendant 8 demi-journées pour réaliser un projet de recherche en vue d'une restitution au cours d'un symposium.
- **Médiateur scientifique à l'évènement G0300**, Sensibilisation de 16 lycéens à la prise de parole et la création de discours scientifiques.
- **Enseignement**, Master 2 BMC, Sorbonne-Université, France, 2022-2023
- **Enseignement**, Master 2, Université Henri-Warembourg, France 2022-2023
- **Participant au « CIIL's got talent »** mis en place par l'association des jeunes chercheurs du CIIL, à l'Institut Pasteur de Lille, France