



HAL
open science

**Etude in vivo du rôle potentiel de la phospholipase A2
de groupe IIA humaine dans le paludisme :
Caractérisation de la physiopathologie de l'infection à
Plasmodium chabaudi chez la souris C57BL/6
transgénique pour l'enzyme**

Mélanie Dacheux

► **To cite this version:**

Mélanie Dacheux. Etude in vivo du rôle potentiel de la phospholipase A2 de groupe IIA humaine dans le paludisme : Caractérisation de la physiopathologie de l'infection à Plasmodium chabaudi chez la souris C57BL/6 transgénique pour l'enzyme. Maladies infectieuses. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2018. Français. NNT : 2018MNHN0007 . tel-02951818

HAL Id: tel-02951818

<https://theses.hal.science/tel-02951818>

Submitted on 29 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Année 2018

MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Spécialité : **Parasitologie, Biologie cellulaire, Physiopathologie**

Présentée et soutenue publiquement par

Mélanie Angéline DACHEUX

Le 28 septembre 2018

**Etude *in vivo* du rôle potentiel de la phospholipase A2 de
groupe IIA humaine dans le paludisme.**

Caractérisation de la physiopathologie de l'infection à *Plasmodium
chabaudi* chez la souris C57BL/6 transgénique pour l'enzyme.

Sous la direction du Pr. Philippe GRELLIER

JURY :

Mme. ATHINA-KARABINA, Sonia	Professeur, INSERM, Hôpital Armand-Trousseau, Paris	Rapporteur
M. KHALIFE, Jamal	DR, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Lille	Rapporteur
M. LAMBEAU, Gérard	DR, CNRS, Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne	Examineur
M. TOUQUI, Lhousseine	Professeur, Hôpital Cochin/ Institut Pasteur de Paris, Paris	Président
Mme. DEREGNAUCOURT, Christiane	CR1, CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Examineur
M. GRELLIER, Philippe	Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci au Pr. Sonia ATHINA-KARABINA et au Dr. Jamal KHALIFE d'avoir accepté le rôle de rapporteur, ainsi qu'au Dr. Gérard LAMBEAU et au Pr. Lhousseine TOUQUI d'avoir accepté de faire partie du jury.

J'adresse toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Pr. Philippe GRELLIER, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis de travailler sur ce sujet passionnant. Merci Philippe pour votre soutien lors la dernière ligne droite.

Je souhaite également faire part de mon immense gratitude à mon encadrante de thèse, le Dr. Christiane DEREGNAUCOURT, pour sa confiance en m'ayant remis entre les mains un sujet qui était le sien, pour sa disponibilité quotidienne (et les heures passées à me former), ses qualités pédagogiques et son soutien dans les moments de doute. Merci également pour vos admirables qualités humaines qui m'ont permis de me sentir toujours à l'aise avec vous. Je n'aurais pas pu espérer meilleure encadrante et ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Un immense merci au Dr. Gérard LAMBEAU sans qui ce travail n'aurait pas eu lieu. Son aide matérielle a été décisive au cours de mes recherches. Je lui dois la protéine hGIIA recombinante, les anticorps contre les sPLA2 murines et humaine, les liposomes et le dosage des cytokines. Je le remercie également pour son implication dans mon travail, ses conseils et son soutien (notamment lors de la conférence à Athènes). Ce fut un véritable honneur de travailler en collaboration avec un scientifique comme vous et encore une fois, merci pour tout.

Je tiens à remercier profondément le Pr. Lhousseine TOUQUI, qui m'a fourni les souris transgéniques pour la sPLA2 hGIIA. Sans lui, ce travail n'aurait pas vu le jour non plus. Merci également pour son soutien scientifique (notamment lors de ma première conférence internationale à Toulouse), ses conseils et sa disponibilité. Merci pour les contacts que nous avons eu au cours de ces 3 années.

Merci au Dr. Grégory JOUVION de l'institut Pasteur de Paris pour son expertise histologique et au Dr. David HARDY pour les immunomarquages.

Merci au Dr. Isabelle LAGRANGE pour son implication experte dans les analyses hématologiques effectuées à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort et au Dr. Sylvain BELLIER pour avoir permis cette collaboration.

Un énorme merci à mes collègues et anciens collègues de travail pour votre aide, votre bonne humeur, nos moments partagés à la cantine, en pause-café ou en dehors du labo mais surtout pour tous vos conseils : (et je me dois de consacrer quelques lignes à chacun pour leur exprimer ma gratitude)

Tout d'abord, un grand merci aux deux chefs d'équipe : le Dr. Coralie MARTIN et le Pr. Isabelle FLORENT pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Merci à Soraya CHAOUCH, dont l'aide technique pour les expériences de RT-qPCR a été indispensable (et aussi pour les manip *in vivo*). Merci également pour ta gentillesse et ton soutien. Tu es une personne géniale et je te suis immensément reconnaissante pour ton travail irréprochable et tout ce que tu as fait.

Merci au Dr. Cissé SOW pour son aide précieuse lors des extractions. Mais il y a tellement plus ! Ce fut un réel plaisir de partager le « bureau des étudiants » en ta compagnie. Merci pour ta bonne humeur, tes chansons improvisées qui me donnent toujours le sourire, nos courses à pieds, nos sessions « commissures des lèvres » et puis surtout, merci pour ton soutien et ton humour. Je suis bien contente de partir avant toi parce que le Muséum sans toi n'aurait plus été le même...

Merci à Amandine LABAT pour son aide technique au cours des manip *in vivo* et les extractions notamment. Ton rire, ta gaité et tes « gaffes » vont vraiment trop me manquer...

Merci à Lisy RAVEENDRAN pour son aide technique dans la découpe des organes et les colorations. Vous m'avez été d'une aide précieuse.

Merci à Joy ALONSO, qui s'est occupée des croisements et de mes petits animaux avec beaucoup de douceur et de savoir-faire tout au long de la thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Un immense (immense) merci au Dr. Nathaly VALLARINO, pour son aide au cours des manip d'injections. Je te suis vraiment reconnaissante de ta disponibilité, même les week-ends ! Merci mille fois au Dr. Coralie MARTIN pour la même raison. Mais je tiens également à vous remercier pour votre accueil dans le labo et votre soutien.

Merci au Dr. Linda KOHL de m'avoir formée lors des TP ARNi. Mais un grand merci aussi pour ta disponibilité (lors de la fête de la science, le site web du labo et pour mes corrections...).

Un grand merci au Dr. Dhikra SOUIDENNE, ma habibti ! Pour ton soutien principalement et puis aussi pour ta joie de vivre. Merci pour ton hospitalité quelles que soient les situations. Tu as toujours des mots réconfortants.

A Brice MOLINELLI, un grand merci pour tous ces moments passés ensemble, des petit-déjs dans le jardin de chimie les matins ensoleillés, à ton partage culturel et puis bien entendu, nos footing les jeudis midi (avec Cissé et très rarement Estelle, mais on y viendra !). Merci pour tout Brice, tu as rendu ces 3 ans plus festifs !

Merci à Estelle REMION, avec qui j'ai eu le plaisir de faire le TP d'ARNi, la dernière année. Je suis obligée de te remercier aussi pour ta patience lors de nos séances photos pour le Muséum. Par contre pour la course... Ca manque encore de motivation ! Merci pour ta disponibilité (avec Fred) lorsque j'en avais besoin. Et merci pour ta bonne humeur et nos petites pauses papotages quand on en avait l'occasion. Je te souhaite beaucoup de courage et de persévérance pour ta thèse.

Merci au Dr. Caroline THALER pour sa jovialité communicative. Merci aussi pour tes conseils. Et bien sûr je te souhaite le meilleur du monde pour cette nouvelle étape de ta vie. Je suis persuadée que tu feras une mère exceptionnelle.

Un grand merci au Dr. Lotfi BOUNAADJA pour son soutien infaillible. Tu sais te rendre disponible pour les gens et je te suis vraiment reconnaissante de ton appui dans les moments difficiles.

Merci au Dr. Elizabeth MOURAY pour sa gentillesse et sa bienveillance. Ce fut un plaisir de vous rencontrer.

Merci au Dr. Linda DUVAL pour sa sympathie et nos discussions sciences (ou autres !).

Merci également à tous les autres collègues du labo pour leur accueil : Irène (et Cali), Joseph, Delphine, Marc, Isabelle D., et Mr. Schrével.

Merci aux étudiants, maintenant docteurs pour certains, avec qui j'ai passé de jolis moments : Karl, Emilie, Fred, Salony, Juan, Jikate, Jessica et tous les autres !

A mes amis brésiliens qui sont venus puis repartis à Rio ou à Brasilia au cours de leur thèse :

A Dra. Mônica VIEIRA (minha « cozinha »), e também a minha primeira amiga brasileira (que sorte) ! Muito obrigada por tudo, o teu apoio e tua simpatia. Foi (e é) um prazer imenso conhecer-te « migs ».

Ao Victor-Hugo BORBA, gostei muito conhecer-te, desejo-te o melhor e muito sucesso nos estudos e na vida. Obrigada pela tua amizade e pelos momentos que passamos juntos. A très bientôt (j'espère) !

A Thuany de MOURA, (Txutxu « bella » ou feia, depende dos dias), hoje és a « bella » porque recordo-me dos momentos passados juntas e estou com saudades... Obrigada por tudo minha Txutxu.

Et bien sûr, merci à mes parents Thierry et Perpétua, qui m'ont toujours soutenu et qui croient en moi plus que n'importe qui (à part peut-être Eva !)

Enfin, merci à ma sœur, Eva, pour son soutien, son écoute dans les bons moments comme les difficiles, mais par-dessus tout, son amour inconditionnel depuis toujours malgré les kilomètres qui maintenant nous séparent...

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	17
PARTIE 1 : LE PALUDISME	19
1. HISTORIQUE ET DONNEES ACTUELLES CONCERNANT LE PALUDISME	19
1.1. <i>Bref historique du paludisme</i>	19
1.2. <i>Epidémiologie actuelle</i>	20
2. GENERALITES	21
2.1. <i>Phylogénie du genre Plasmodium, l'agent du paludisme</i>	21
2.2. <i>Cycle de vie de Plasmodium</i>	21
2.2.1. Le cycle de développement de <i>Plasmodium</i> chez l'hôte intermédiaire	22
2.2.1. Le cycle de développement de <i>Plasmodium</i> chez l'hôte définitif	24
2.3. <i>L'agent pathogène</i>	24
2.4. <i>Le vecteur</i>	26
3. MODES DE TRANSMISSION CHEZ L'HOMME	27
4. CHIMIOPROPHYLAXIE ET VACCIN.....	28
5. PHYSIOLOGIE DES MANIFESTATIONS CLINIQUES DU PALUDISME CHEZ L'HOMME.....	28
5.1. <i>Accès simple</i>	28
5.2. <i>Accès grave</i>	29
6. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES INDUITES PAR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	31
6.1. <i>Modifications du globule rouge</i>	31
6.2. <i>Le sang</i>	31
6.3. <i>Changements macroscopiques : splénomégalie et hépatomégalie</i>	32
7. IMMUNITE ANTI- <i>PLASMODIUM</i>	32
7.1. <i>Résistance innée contre Plasmodium</i>	32
7.1.1. Groupe sanguin Duffy-négatif	32
7.1.2. Quelques hémoglobinopathies protectrices	33
7.1.2.1. Drépanocytose hétérozygote et paludisme	33
7.1.2.2. Thalassémies et paludisme	34
7.2. <i>Prémunition acquise dans les zones endémiques</i>	34
7.3. <i>Réponse immunitaire de l'hôte lors d'un accès palustre</i>	35
7.3.1. Rôles des polynucléaires neutrophiles (PNN)	35
7.3.2. Rôles des cellules Natural Killer (NK)	36
7.3.3. Rôles des monocytes et des macrophages.....	36
7.3.4. Rôles des lymphocytes T et B.....	37
7.3.4.1. Immunité anti- <i>Plasmodium</i> à médiation cellulaire	37
7.3.4.2. Immunité humorale anti- <i>Plasmodium</i>	38
7.3.5. Rôles des cytokines.....	38
7.3.5.1. Les cytokines pro-inflammatoires.....	39
7.3.5.2. Les cytokines anti-inflammatoires	39
7.3.6. Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire de l'hôte au cours du paludisme	41
7.4. <i>Mécanismes d'évasion de Plasmodium vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte</i>	42
8. MOYENS D'ETUDE DU PALUDISME	42
8.1. <i>Espèces palustres humaines : études in vitro</i>	42
8.2. <i>Modèles animaux du paludisme : études in vivo</i>	42
8.2.1. Les modèles murins du paludisme.....	43
8.2.2. Le modèle murin à <i>P. chabaudi</i>	45

PARTIE 2 : LES PHOSPHOLIPASES A2	47
1. GENERALITES	47
2. LES PHOSPHOLIPASES A2.....	48
2.1. PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium	49
2.2. PLA2 indépendantes du calcium.....	50
2.3. La PAF-acétylhydrolase (PAF-AH).....	50
2.4. Les phospholipases A2 sécrétées.....	50
3. PROPRIETES DES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES	52
3.1. Propriétés enzymatiques relatives aux substrats	52
3.2. Les récepteurs des phospholipases A2 sécrétées.....	53
3.2.1. Les récepteurs de type N et M.....	53
3.2.2. Autres ligands des sPLA2	54
3.3. Les inhibiteurs des sPLA2.....	55
3.4. Propriétés protéolytiques des sPLA2	55
4. ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DES PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES	55
5. LA PHOSPHOLIPASE A2 SECRETEE DE GROUPE IIA	60
6. APPORT DES MODELES ANIMAUX A L'ETUDE DU ROLE DE LA SPLA2-IIA DANS UN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE OU PHYSIOPATHOLOGIQUE	61
6.1. La souris transgénique pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA humaine (hGIIA)	61
6.2. Construction et caractéristiques de la lignée transgénique	61
6.3. Utilisation de la souris transgénique pour la sPLA2-IIA humaine dans l'étude des pathologies humaines.....	62
PARTIE 3 : SPLA2 ET PROTISTES PARASITES	64
1. POTENTIALITES ANTIPARASITAIRES DES SPLA2	64
2. PLA2 DES PROTISTES PARASITES.....	65
3. PHOSPHOLIPASES A2 SECRETEES DE L'HOTE ET PALUDISME	66
OBJECTIF DE LA THESE	69
II. MATERIEL ET METHODES	71
EXPÉRIMENTATION <i>IN VIVO</i>, MODÈLE MURIN DU PALUDISME	73
1. ETHIQUE	73
2. INFECTION CONTROLÉE A <i>PLASMODIUM</i> SUR MODÈLE MURIN (<i>IN VIVO</i>)	73
2.1. L'agent infectieux : <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> souche 864VD	73
2.2. Constitution des stocks de <i>Plasmodium</i>	73
2.3. Les souris	74
2.4. Infestation des souris.....	74
2.4.1. Inoculation de <i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> 864VD	74
2.4.2. Analyses sanguines.....	75
2.4.2.1. Frottis sanguin	75
2.4.2.1.1. Détermination de la parasitémie.....	75
2.4.2.1.2. Identification et numération des sous-populations leucocytaires	75
2.4.2.2. Sang total.....	75
2.4.2.2.1. Numération des GR et des GB (méthode manuelle)	75
2.4.2.2.2. Analyse NFS (méthode automatisée)	76
2.4.2.3. Analyses biochimiques du plasma sanguin	79

2.4.2.3.1.	Test d'activité sPLA2.....	79
2.4.2.3.2.	Mesure de la peroxydation des lipides (méthode des TBARS)	79
2.4.2.3.3.	Dosage des protéines	80
2.4.3.	Autopsie des souris, prélèvement des organes et tissus.....	80
2.4.3.1.	Exsanguination et prélèvement des organes.....	80
2.4.3.2.	Fixation des organes en vue des analyses histologiques	80
2.4.3.3.	Conservation des organes avant analyse par RT-qPCR	81
2.4.4.	Histologie.....	81
2.4.4.1.	Inclusion en paraffine	81
2.4.4.2.	Montage sur lame.....	81
2.4.4.3.	Coloration à l'hématoxyline-éosine (HE)	81
2.4.4.4.	Immunomarquages sur coupes d'organes.....	82
2.4.4.4.1.	Immuno-marquage de la hGIIA	82
2.4.4.4.2.	Marquage des lymphocytes T (anticorps anti-CD3) et des lymphocytes B (anticorps anti-B220)	82
2.4.5.	RT-PCR quantitative (RT-qPCR) : expression de l'ARNm de la hGIIA dans les tissus des souris infectées ...	83
2.4.5.1.	Extraction des ARN totaux au phénol-chloroforme.....	83
2.4.5.2.	Détermination de la quantité et de la qualité des ARN extraits	84
2.4.5.3.	Traitement à la DNase	84
2.4.5.4.	Rétro-transcription des ARN messagers en ADN complémentaires	85
2.4.5.5.	PCR quantitative (qPCR).....	85
2.4.5.5.1.	Conception des amorces pour la qPCR.....	86
2.4.5.5.2.	Amplification par qPCR.....	88
2.4.5.5.3.	Etapas de validation de la méthode.....	88
2.4.5.5.3.1.	Spécificité des amorces	89
2.4.5.5.3.2.	Vérification de l'absence d'inhibiteur	90
2.4.5.5.3.3.	Contrôle de la contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique (ADNg)	90
2.4.5.5.3.4.	Mesure de l'efficacité.....	90
2.4.5.5.4.	Quantification relative.....	91
2.4.5.5.5.	Schéma récapitulatif des grandes étapes de la RT-qPCR.....	93
2.4.6.	Injection de hGIIA exogène à des souris WT parasitées	94
2.4.7.	Injection de liposomes substrats de la hGIIA à des souris Tg+ parasitées.....	94
2.5.	Récapitulatif des expériences réalisées in vivo.....	95
3.	ANALYSES STATISTIQUES	97
APPROCHE EXPÉRIMENTALE IN VITRO DU MÉCANISME D'ACTIVITÉ ANTI-PLASMODIUM DE LA HGIIA		97
1.	CULTURE IN VITRO DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	97
2.	TESTS D'INHIBITION DE CROISSANCE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> PAR LA HGIIA EN PRESENCE DE LIPOSOMES RICHES EN PUFA.....	97
2.1.	Préparation des liposomes	97
2.2.	Test d'inhibition de croissance de <i>P. falciparum</i>	98
III. RESULTATS		99
PARTIE 1 : DONNÉES HÉMATOLOGIQUES		102
1.	CARACTERISATION DU PROFIL INFECTIEUX CHEZ LA SOURIS C57BL/6 TRANSGENIQUE POUR LA HGIIA INFECTÉE PAR <i>PLASMODIUM CHABAUDI CHABAUDI</i> 864VD.....	102
1.1.	Les souris Tg+ présentent une diminution de la parasitémie au pic de crise par rapport aux souris Tg-.....	102
1.2.	Augmentation du niveau d'activité sPLA2 dans le plasma des souris Tg+ au cours de l'infection par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	103
1.2.1.	L'activité sPLA2 mesurée dans le plasma des souris Tg+ augmente parallèlement à l'infection	104
1.2.2.	L'augmentation d'activité sPLA2 du plasma ne résulte pas d'une augmentation globale de la protéinémie.....	105
1.3.	Rôle de la hGIIA dans la baisse de parasitémie	105

1.3.1.	L'injection de hGIIA recombinante à des souris WT infectées par <i>P. chabaudi</i> induit une baisse de parasitémie au pic de crise	105
2.	CARACTERISATION DES PARAMETRES SANGUINS DE L'INFECTION A <i>P. C. CHABAUDI</i> 864VD CHEZ LA SOURIS C57BL/6 TRANSGENIQUE POUR LA HGIIA.....	107
2.1.	<i>Quantification des globules rouges et des leucocytes au cours de l'infection</i>	107
2.1.1.	La concentration sanguine érythrocytaire diminue avec le développement du parasite chez les souris Tg- et Tg+, mais dure plus longtemps chez les Tg+.....	107
2.1.2.	Le nombre de leucocytes augmente au pic parasitaire chez les deux types de souris.....	108
2.2.	<i>Distribution des sous-populations leucocytaires au cours de l'infection</i>	110
	POINTS FORTS – DISCUSSION	112
	PARTIE 2 : DONNÉES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES	115
1.	ANALYSE DES ORGANES ET DES TISSUS CHEZ LES SOURIS INFECTÉES	115
1.1.	<i>Evolution du poids des souris au cours de l'infection</i>	115
1.2.	<i>Hépatomégalie et splénomégalie au cours de l'infection</i>	116
1.2.1.	L'hépatomégalie est plus précoce chez les souris Tg+ infectées	117
1.2.2.	Une splénomégalie comparable à celle des souris Tg- est observée chez les souris Tg+ au cours de l'infection.....	118
1.2.3.	Les reins ne présentent pas de modification macroscopique au cours de l'infection	120
2.	ANALYSES HISTOLOGIQUES.....	122
2.1.	<i>Analyse histologique des poumons au cours de l'infection par P. c. chabaudi 864VD</i>	123
2.1.1.	Généralités.....	123
2.1.2.	Les souris Tg+, comme les souris Tg-, présentent de légères lésions histopathologiques du poumon au cours de l'infection par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD	124
2.2.	<i>Analyse histologique des reins au cours de l'infection par P. c. chabaudi 864VD</i>	126
2.2.1.	Généralités.....	126
2.2.2.	Les souris Tg+, comme les souris Tg-, ne présentent pas de lésions histopathologiques du rein au cours de l'infection par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD	127
2.3.	<i>Analyse histologique du foie au cours de l'infection par P. c. chabaudi 864VD</i>	129
2.3.1.	Généralités.....	129
2.3.2.	Les souris Tg+ présentent les mêmes lésions du foie que les souris Tg- au cours de l'infection par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	130
2.4.	<i>Analyse histologique de la rate au cours de l'infection par P. c. chabaudi 864VD</i>	133
2.4.1.	Généralités.....	133
2.4.2.	Les souris Tg+ présentent une désorganisation tissulaire de la rate plus précoce que les souris Tg- au cours de l'infection <i>P. c. chabaudi</i> 864VD	134
2.4.3.	Caractérisation de la désorganisation splénique par immunomarquage des lymphocytes B et T.....	136
3.	ANALYSES MOLECULAIRES	138
3.1.	<i>Immunomarquage de la hGIIA dans les organes des souris Tg+ infectées par P. c. chabaudi 864VD</i>	138
3.2.	<i>Analyse par RT-qPCR</i>	141
3.2.1.	Le foie.....	142
3.2.2.	La rate	142
3.2.3.	Le sang	143
3.2.4.	Analyse quantitative des ARNm des sPLA2 murines de groupe IIF, III, V et X dans le foie, la rate et le sang des souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	144
	POINTS FORTS – DISCUSSION	146
	PARTIE 3 : ETUDE DU MÉCANISME D'ACTION ANTI-PLASMODIUM DE LA HGIIA	149
	HYPOTHESE 1 : L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES LIPOPROTEINES OXYDEES LIBERE DES ACIDES GRAS TOXIQUES POUR <i>PLASMODIUM</i>	150

1.1. L'injection précoce de hGIIA recombinante à des souris C57BL/6 WT infectées par P. c. chabaudi 864VD ne modifie pas le profil infectieux	150
1.2. Mesure de l'oxydation lipidique chez les souris parasitées	152
1.3. La hGIIA inhibe la multiplication de P. falciparum en culture in vitro en présence de liposomes anioniques riches en acide arachidonique.....	154
POINTS FORTS – DISCUSSION	156
HYPOTHESE 2 : LE PROFIL CELLULAIRE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE EST MODIFIE CHEZ LA SOURIS TG+ PARASITEE	158
2.1. Mesure de l'anémie	158
2.2. Erythrocytes et réticulocytes	159
2.3. Leucocytes	162
2.3.1. Evolution de la concentration sanguine en leucocytes au cours de l'infection	164
2.3.2. Distribution des sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux	164
2.4. Numération des plaquettes.....	169
POINTS FORTS – DISCUSSION	171
IV. DISCUSSION GENERALE	175
1. DISCUSSION DU MODELE EXPERIMENTAL CHOISI	177
2. HGIIA ET HEMATOGRAMME CHEZ LA SOURIS TG+ NAÏVE.....	178
4. HGIIA ET ANEMIE CHEZ LA SOURIS TG+ INFECTEE	182
5. HGIIA ET REPONSE LEUCOCYTAIRE CHEZ LA SOURIS TG+ INFECTEE.....	183
6. HYPOTHESES MECANISTIQUES SUR L'ACTIVITE ANTIPARASITAIRE <i>IN VIVO</i> DE LA HGIIA	184
7. QUEL ROLE POURRAIT JOUER LA HGIIA DANS LE NEUROPALUDISME ?.....	185
V. PERSPECTIVES	187
ANNEXES.....	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	215

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la répartition mondiale du paludisme du milieu du xixème siècle à 2010.....	20
Figure 2 : Distribution du paludisme dans le monde, 2014.....	20
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> (chez l'Homme et le moustique).....	23
Figure 4 : Morphologie des <i>Plasmodium</i> humains observables sur frottis en couche mince.....	25
Figure 5 : répartition mondiale des anophèles.....	27
Figure 6 : Structure de l'hémoglobine.....	33
Figure 7 : Sites d'hydrolyse des phospholipases.....	48
Figure 8 : La famille des sPLA2 et leurs principales fonctions.....	51
Figure 9 : Représentation du cycle catalytique d'une sPLA2.....	53
Figure 10 : Distribution des normocytes, réticulocytes et plaquettes sur le canal RET.....	78
Figure 11 : Distribution des sous-populations leucocytaires sur le canal DIFF.....	78
Figure 12 : Profil d'une réaction de PCR quantitative.....	85
Figure 13 : Exemple d'un plan de plaque pour l'analyse de l'expression de la hGIIA dans le foie aux 4 temps de l'infection, chez les souris Tg- et Tg+.....	88
Figure 14 : Exemple de « melting curves » et de « melting peaks » obtenus par le logiciel du LightCycler®480 II après une expérience de qPCR.....	89
Figure 15 : Comparaison des profils infectieux chez les souris C57BL/6J Tg- et Tg+ infectées par <i>P. chabaudi</i>	103
Figure 16 : Activité sPLA2 au cours de l'infection chez les souris Tg+.....	104
Figure 17 : Mesure de la concentration en protéines du plasma au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+.....	105
Figure 18 : Effet de l'injection de hGIIA recombinante sur le développement parasitaire chez des souris C57BL/6 WT infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	106
Figure 19 : Evolution moyenne du nombre de globules rouges par μ L de sang au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+.....	108
Figure 20 : Concentration sanguine médiane en leucocytes au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+.....	109
Figure 21 : Evolution moyenne des sous-populations leucocytaires.....	111
Figure 22 : Evolution du poids des souris au cours de l'infection.....	115
Figure 23 : Schéma représentatif du profil infectieux « type » dans le modèle <i>P. chabaudi</i> / C57BL/6.....	116
Figure 24 : Evolution du poids du foie au cours de l'infection, chez les souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	117
Figure 25 : Changement de coloration du foie et hépatomégalie au jours 0 et 14 de l'infection.....	118
Figure 26 : Evolution du poids de la rate au cours de l'infection, chez les souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. chabaudi</i> 864VD.....	119
Figure 27 : Splénomégalie et changement de coloration de la rate au cours de l'infection.....	120
Figure 28 : Evolution du poids des reins au cours de l'infection, chez les souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. chabaudi</i> 864VD.....	121
Figure 29 : Anatomie des poumons de souris (Tg-).....	123
Figure 30 : Organisation histologique du poumon de souris saine.....	123
Figure 31 : Observations histologiques du poumon au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+.....	125
Figure 32 : Organisation anatomique et histologique du rein.....	126
Figure 33 : Observation histologique du rein chez les souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	127

Figure 34 : Organisation histologique du foie.	129
Figure 35 : Observations histopathologiques du foie au cours de l'infection à <i>P. c. chabaudi</i> 864VD de souris C57BL/6 Tg- et Tg+.....	131
Figure 36 : Coupe histologique d'une rate de souris C57BL/6 (Tg-) naïve.....	133
Figure 37 : Observations histopathologiques de la rate au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+.....	135
Figure 38 : Immunomarquages anti-CD3 et anti-B220 sur coupes de rates de souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	137
Figure 39 : Immunomarquage de la hGIIA dans le foie des souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.	139
Figure 40 : Immunomarquage de la sPLA2 hGIIA sur des coupes de rein de souris infectées par <i>P. c. chabaudi</i> 864VD.....	140
Figure 41 : Mesure de la quantité d'ARNm hGIIA dans le foie des souris Tg+ au cours de l'infection.	142
Figure 42 : Mesure de la quantité d'ARNm hGIIA dans la rate des souris Tg+ au cours de l'infection.	143
Figure 43 : Mesure de la quantité d'ARNm hGIIA par les cellules du sang des souris Tg+ au cours de l'infection.	144
Figure 44 : Analyse quantitative des ARNm des sPLA2 murines mGIIIF et mGV par les cellules de la rate des souris Tg- et Tg+ au cours de l'infection.	145
Figure 45 : Profil infectieux des souris C57BL/6 WT après injection précoce de hGIIA recombinante.....	150
Figure 46 : Mesure de la peroxydation lipidique par la méthode des TBARS au cours de l'infection.	152
Figure 47 : Test d'inhibition de <i>P. falciparum in vitro</i> en présence de liposomes.	155
Figure 48 : Mesure de l'anémie au cours de l'infection chez les souris Tg- et Tg+ infectées.	159
Figure 49 : Variation du nombre de globules rouges et de l'hématocrite au cours de l'infection.	160
Figure 50 : Canal RET : analyse par cytométrie en flux du sang total de souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i>	161
Figure 51 : Concentration sanguine des leucocytes (sous-populations leucocytaires) chez les souris Tg- et Tg+ naïves.....	163
Figure 52 : Evolution du nombre de leucocytes ($10^3/\mu\text{L}$ de sang) au cours de l'infection.....	164
Figure 53 : Canal DIFF : analyse par cytométrie en flux du sang total de souris Tg- et Tg+ infectées par <i>P. c. chabaudi</i>	165
Figure 54 : Aspect des lymphocytes et monocytes normaux et activés sur frottis sanguin.	167

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Manifestations sévères du paludisme à <i>P. falciparum</i> selon l'OMS (2000).	29
Tableau 2 : Caractéristiques biologiques des parasites murins du paludisme.	43
Tableau 3 : Niveau de sévérité et domaine d'utilisation des <i>Plasmodium</i> murins en fonction de l'hôte.....	44
Tableau 4 : Similitudes et différences biologiques, physiopathologiques et immunitaires entre <i>P. falciparum</i> et <i>P. c. chabaudi</i>	46
Tableau 5 : Classification des PLA2.....	49
Tableau 6 : Abréviation, nom, fonction et séquences des gènes de référence et d'intérêt choisis.	87
Tableau 7 : Composition des liposomes.	98
Tableau 8 : Récapitulatif du nombre de souris Tg- et Tg+ utilisées pour l'observation des paramètres macroscopiques.	116
Tableau 9 : Nombre de souris Tg- et Tg+ utilisées pour les analyses histologiques.	122
Tableau 10 : Nombre de souris utilisées par jour de sacrifice et par organe.	141
Tableau 11 : Mesure de la concentration sanguine en réticulocytes au cours de l'infection.....	160
Tableau 12 : Comptages des leucocytes totaux et des sous-populations leucocytaires.	166
Tableau 13 : Recherche de leucocytes atypiques sur frottis.	168
Tableau 14 : Analyse des plaquettes au cours de l'infection par NFS.	170

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Publication soumise	194
ANNEXE 2 : Numération des GR/ μ L de sang, hématorite et volume globulaire moyen au cours de l'infection (Hématogramme).....	209
ANNEXE 3 : Caractérisation des érythrocytes et réticulocytes	210
ANNEXE 4 : Distribution des sous-populations leucocytaires au cours de l'infection	211
ANNEXE 5 : Valorisation des résultats, missionnariat et formations.....	212

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	degré Celsius	H	
%	pourcent	h	heure
µg	microgramme	HbS	hémoglobine S
µL	microlitre	HE	hématoxyline-éosine
µM	micromolaire	HFR	reticulocytes de fluorescence élevée
A		HGB	hémoglobine
A	absorbance	hGIIA	sPLA2 de groupe IIA humaine
AA	acide arachidonique	HJ	Howell-Jolly
Ac	anticorps	HSPG	protéoglycane à héparane sulfate
Ad-PLA2	PLA2 du tissu adipeux	Hz	Hertz
ADN	acide désoxyribonucléique	I	
ADNc	ADN complémentaire (à l'ARN)	ICAM	intercellular adhesion molecule
ADNg	ADN génomique	IFN γ	interféron gamma
Ag	antigène	Ig	immunoglobuline(s)
An.	<i>Anopheles</i>	IHC	immunohistochimie
ARN	acide ribonucléique	IL	interleukine
ARNm	ARN messenger	IP	intrapéritonéal
B		iPLA2	PLA2 intracellulaire
BSA	bovin serum albumin	IRF	reticulocytes immatures
bvPLA2	bee venom sPLA2	J	
C		J	jour
CD36/ 23	cluster determinant 36/ 23	K	
Cl ₅₀	concentration inhibitrice à 50%	KAHRP	knob-associated histidine rich protein
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité	kb	kilobase
COX	cyclo-oxygénase	kDa	kilodalton
CPA	cellule présentatrice d'antigène	KIR (récepteur)	killer cell Ig-like receptor
cPLA2	PLA2 cytosolique	L	
cpm	coups par minute	LB	lymphocyte B
CR-1	complement receptor-1	LDL	low density lipoprotein
D		LFR	reticulocytes de fluorescence faible
DHA	acide docosahéxaénoïque	L-PLA2	PLA2 lysosomales
E		LOX (5-)	5-lipoxygénase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lp-PLA2	lipoprotein-associated PLA2
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique	LPS	lipopolysaccharide
ELAM-1	endothelial-leukocyte adhesion molecule-1	LT	lymphocyte T
EMH	hématopoïèse extra-médullaire	LysoPE	lysophosphatidyléthanolamine
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	LysoPL	lysophospholipide
EV	Microvésicule extracellulaire	M	
F		M	molaire
FSC	forward scatter	MDA	malondialdéhyde
G		mg	milligramme
GAG	glycosaminoglycane(s)	mGIIA	murin group IIA sPLA2
GB	globule(s) blanc(s)	mGIIF	murin group IIF sPLA2
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	mGIII	murin group III sPLA2
g/L	gramme par litre	mGV	murin group V sPLA2
GlycéroPL	glycérophospholipide(s)	mGX	murin group X sPLA2
GR	globule(s) rouge(s)	MFR	reticulocytes de fluorescence moyenne
GRI	globule(s) rouge(s) infecté(s)	min	minute
		mL	millilitre
		mm	millimètre
		mM	millimolaire
		MNHN	Muséum national d'Histoire naturelle
		N	

NETs	neutrophil extracellular traps
NFS	numération formule sanguine
ng	nanogramme
NK (cellule)	natural killer (cellule)
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
P	
<i>P. c. chabaudi</i>	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
p.i.	post-inoculation
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. simium</i>	<i>Plasmodium simium</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAF	platelet activating factor
PAF-AH	platelet-activating factor-acetyl hydrolase
PAMP	pathogen associated molecular patterns
pb	paire de bases
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PE	phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PfEMP1/2	<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein-1/ -2
PfHRP1/3	<i>P. falciparum</i> histidine-rich-protein-1/ -3
PG	phosphatidylglycérol
PI	phosphatidylinositol
PLA1	phospholipase A1
PLA2	phospholipase A2
PLA2R1	phospholipase A2 receptor 1 = récepteur de type M (muscle)
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PLP	patatin-like protein
PLT	plaquettes
PNPLA2	patatin-like PLA2
PNN	polynucléaire(s) neutrophile(s)
PRR	pattern recognition receptor
PS	phosphatidylsérine
PUFA	Polyunsaturated fatty acid

Q

qPCR reaction quantitative polymerase chain reaction

R

RESA ring-associated erythrocyte surface antigen

RT rétro-transcription

RT-qPCR real time quantitative polymerase chain reaction

S

SFL side fluorescence light

SLS sodium lauryl sulfate

SLS-HGB complexe sodium lauryl sulfate-hémoglobine

SM sphingomyéline

sn streereospecific numbering

sPLA2 phospholipase A2 sécrétée

SSC side scatter

T

TAE tris acétate EDTA

TBARS thiobarbituric acid reactive substances

TCR T-cell receptor

TEP 1,1,1,3,3-tétraéthoxypropane

Tg- souris non transgéniques

Tg+ souris transgéniques pour la sPLA2-IIA humaine

TGFβ transforming growth factor bêta

TgPL *Toxoplasma gondii* patatin-like protein

TNFα tumor necrosis factor alpha

U

UV ultraviolets

V

V volt

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule-1

VGM volume globulaire moyen

VLDL very low-density lipoprotein

W

WT souris wild-type (type sauvage)

RESUME

Le paludisme est une maladie tropicale causée par un parasite du genre *Plasmodium*. Chez l'Homme, un niveau élevé de phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA humaine (hGIIA) est mesuré dans le plasma des patients impaludés. Cette enzyme est connue pour son rôle antibactérien et pro-inflammatoire. Cependant, son rôle dans le paludisme n'a jamais été exploré. Pour comprendre le rôle *in vivo* de la hGIIA dans cette pathologie, nous avons entrepris la caractérisation hématologique, histopathologique et immunohistochimique de l'infection de souris C57BL/6, transgéniques (Tg+) pour l'enzyme humaine, par l'espèce murine *Plasmodium chabaudi chabaudi* 864VD. Ce modèle reproduit un paludisme non léthal.

Nos résultats ont permis d'établir que les souris Tg+ ont un meilleur contrôle de l'infection au moment du pic de crise parasitaire (J14 post-inoculation), avec une diminution de 27% de la parasitémie, comparé aux souris « littermates » non transgéniques (Tg-). L'injection de hGIIA recombinante aux jours 12, 13 et 14 p.i. (0,125 mg/kg deux fois par jour) à des souris C57BL/6 wild-type (WT) infectées par *P. c. chabaudi* 864VD provoque une diminution d'environ 19% de la parasitémie à J14 p.i., démontrant un rôle direct de la hGIIA dans la diminution de la population parasitaire.

Les données hématologiques montrent que l'infection chez la souris Tg+ provoque une anémie plus durable que chez la souris Tg- et une élévation nettement plus importante du nombre de leucocytes, en particulier des polynucléaires neutrophiles. Chez la souris Tg+ parasitée, on observe aussi l'activation d'un nombre important de lymphocytes et une activation spécifique des monocytes avant le pic de crise. Chez la souris Tg- infectée, les données histologiques mettent en avant une meilleure récupération des lésions histopathologiques du foie et une hyperplasie des lymphocytes B dans la rate, tandis que les souris Tg+ infectées présentent des lésions hépatiques tardives et une hématopoïèse extramédullaire splénique. Les résultats des analyses par RT-qPCR suggèrent que l'ARNm de la hGIIA augmente au pic parasitaire dans le foie des souris Tg+ infectées, mais diminue dans la rate et les cellules sanguines. L'injection de hGIIA recombinante au début de la phase patente est sans effet sur la parasitémie, ce qui laisse supposer que des événements plus tardifs dans l'infection sont nécessaires à l'activité antiparasitaire de l'enzyme. L'étude du rôle des lipoprotéines oxydées comme substrat potentiel de l'activité antiparasitaire de l'enzyme, basée sur des résultats *in vitro*, est abordée.

En conclusion, nos études ont permis de dresser un tableau large de l'infection à *Plasmodium* chez la souris exprimant la hGIIA, et ouvrent de nouvelles perspectives dans l'analyse du rôle de l'enzyme dans la physiopathologie du paludisme.

ABSTRACT

Malaria is a tropical disease caused by a parasite of the *Plasmodium* genus. High levels of circulating human group IIA secreted phospholipase A₂ (hGIIA) have been reported in malaria patients. The enzyme is well known for its bactericidal and pro-inflammatory actions. However, so far its role in malaria is unknown. In order to address the *in vivo* role of hGIIA in malaria, we performed a hematological, histopathological and immunohistochemical characterization of C57BL/6 hGIIA transgenic mice (Tg+ mice) infected with *P. chabaudi chabaudi* (864VD strain), a murine *Plasmodium* species and strain which causes non-lethal chronic malaria.

Infected Tg+ mice present a 27% reduction of parasitaemia at the peak of infection (D14 post-inoculation, p.i.) compared to infected non-transgenic littermates (Tg- mice). Intraperitoneal injection of recombinant hGIIA at D12, D13 and D14 p.i. (0.125 mg/kg twice a day) into *P. chabaudi* 864VD-infected WT C57BL/6 mice leads to a 19% reduction of the parasitaemia at D14 p.i., demonstrating the direct and acute role of hGIIA in lowering parasite population and presumably ruling out a potential effect linked to chronic overexpression of hGIIA in Tg+ mice.

Hematological data show a durable anemia in Tg+ mice compared to Tg- mice during the infection and an important increase of leucocytes, especially of polynuclear neutrophils. The parasitized Tg+ mouse also presents a higher activation of lymphocytes and a specific activation of monocyte cells at the pic of crisis. In the infected Tg- mouse, histological data show a better histopathological recovery in the liver and B cells hyperplasia in the spleen, whereas the infected Tg+ mouse presents late hepatic injuries and splenic extra-medullar hematopoiesis. RT-qPCR analyses suggest that hGIIA mRNA increases at the pic of infection in the liver of infected Tg+ mice, but decreases in spleen and blood. Intraperitoneal injection of recombinant hGIIA at the patent phase is without effect on parasitaemia, which suggests that later infection events are needed for the enzyme antiparasitic activity. Involvement of oxidized-lipoproteins as potential hGIIA substrates, based on *in vitro* studies, is discussed.

In conclusion, our studies allowed us to elaborate a larger picture of the infection of *Plasmodium* in the mice expressing hGIIA and open new perspectives in the analysis of the role of the enzyme in malaria pathophysiology.

I. INTRODUCTION

PARTIE 1 : Le paludisme

1. Historique et données actuelles concernant le paludisme

1.1. Bref historique du paludisme

Le paludisme est une maladie très ancienne dont les symptômes ont été décrits pour la première fois il y a 2700 ans avant J.-C. dans des écrits médicaux chinois du Nei Ching. On retrouve également ce qui semble être aujourd'hui un accès palustre sur des tablettes d'argile de Mésopotamie datant de 2000 ans avant J.-C. ou encore des papyrus égyptiens datant de 1570 ans avant J.-C. (Cox, 2010).

Pendant plusieurs siècles, le manque de connaissance sur le paludisme a provoqué une idée erronée de son mode de transmission. En effet, l'étymologie même du mot paludisme, qui vient du latin « *palus* », « *paludis* », signifie « marais ». D'autre part, le mot anglophone, pour désigner cette maladie « malaria », vient de l'italien « mal'aria », pour « mauvais air ». Il était donc admis que le paludisme était causé par des émanations toxiques provenant de marais.

Il fallut attendre 1880 pour que Charles Louis Alphonse Laveran, un médecin militaire français, découvre l'agent pathogène du paludisme, et mette fin à la théorie des miasmes, à partir d'observations microscopiques de sang prélevé de malades. Cette même année, les italiens Ettore Marchiafava et Angelo Celli étudient le cycle de reproduction du parasite dans le sang humain et en 1885, ils nomment ce protozoaire *Plasmodium*. Laveran obtiendra pour sa découverte le prix Nobel en 1907.

En 1897, le britannique Ronald Ross découvre que le vecteur du paludisme est le moustique et l'italien Giovanni Battista Grassi, en identifie le genre : l'anophèle (*Anopheles*). Peu après, l'allemand Robert Koch parvient à identifier les effets antipalustres de la quinine. Enfin, en 1948, Henry Shortt et Cyril Garnham découvrent le cycle exo-érythrocytaire du paludisme et en 1982, Wojciech Krotoski démontre l'existence d'un stade parasitaire dormant au sein des cellules du foie.

Au moment de ces premières découvertes, le paludisme était présent sur la quasi-totalité du globe ([Figure 1](#)).

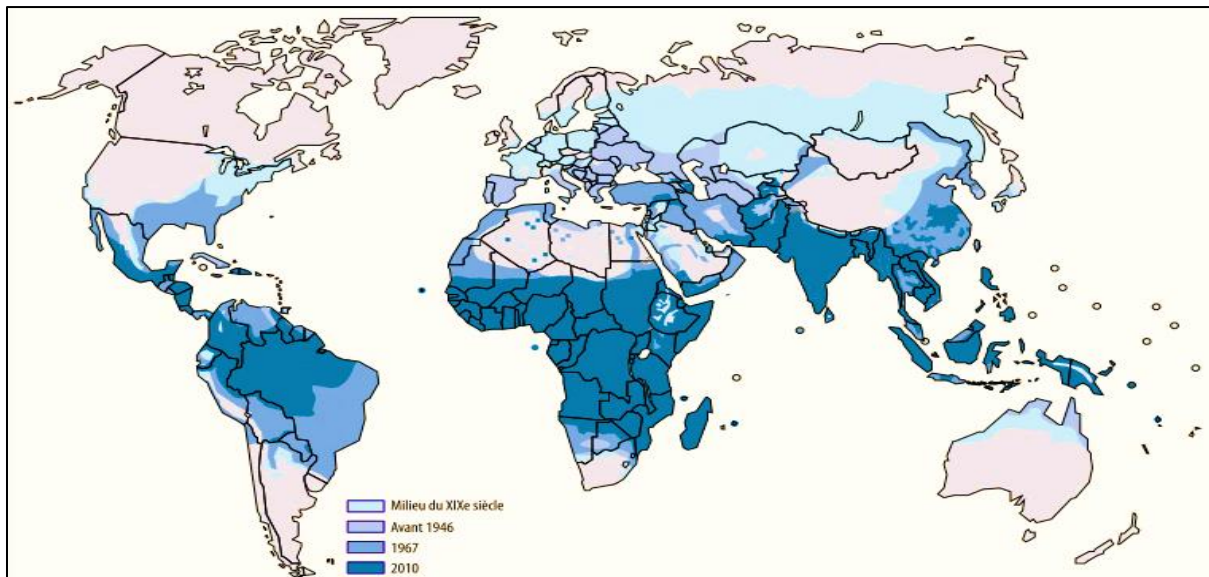


FIGURE 1 : EVOLUTION DE LA REPARTITION MONDIALE DU PALUDISME DU MILIEU DU XIXEME SIECLE A 2010.

D'après Roll Back Malaria (RBM, Plan d'action mondiale contre le paludisme)

1.2. Epidémiologie actuelle

Aujourd'hui, cette infection pouvant être mortelle, reste endémique dans 91 pays sous-développés ou en voie de développement en Amérique centrale et du sud, en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud-est (Figure 2). En France, à ce jour, les cas de paludisme sont exclusivement des cas d'importation.

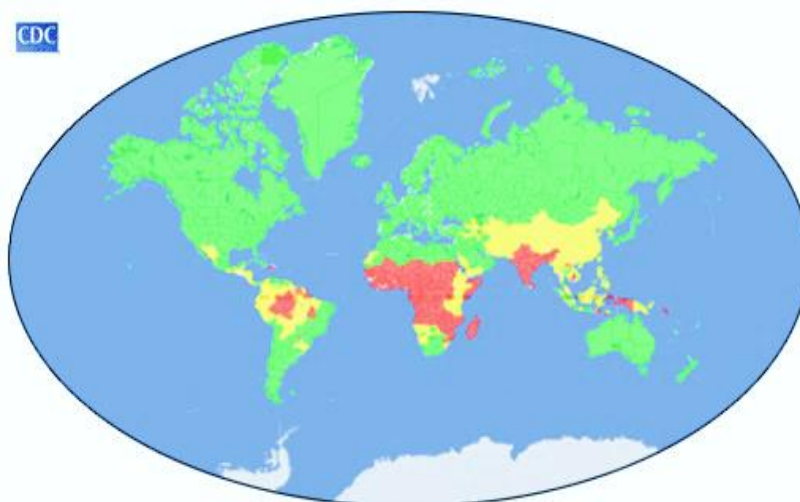


FIGURE 2 : DISTRIBUTION DU PALUDISME DANS LE MONDE, 2014.

En rouge : zones de transmission dans tout le pays. En jaune : zones de transmission dans certaines régions du pays. En vert : pas de transmission du paludisme. *D'après Centers for Disease Control and Prevention (CDC).*

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a comptabilisé 216 millions (intervalle de confiance 95% : 196-263 millions) de cas de paludisme en 2016 et l'incidence de la maladie a été estimée à 63‰ (WHO, 2017). Bien que ces chiffres correspondent à une augmentation de 5 millions de cas par rapport à 2015, la mortalité

associée à cette maladie a été de 445 000 personnes, soit 1 000 décès de moins que l'année précédente. 91% des cas sont survenus en Afrique, où cette infection reste la principale cause de mortalité, notamment juvénile dans certains de ces pays.

Le paludisme constitue un obstacle de grande ampleur au développement des pays où il est endémique. D'une part, par les moyens financiers déployés par les gouvernements locaux pour la lutte anti-paludisme. Et d'autre part, par l'inactivité des employés impaludés qui, lors d'un accès palustre, se trouvent dans l'incapacité d'accomplir leurs tâches de travail quotidiennes. A l'heure actuelle, le paludisme reste un problème de santé publique majeur, et la lutte contre le paludisme, conjointement à la lutte contre le SIDA et la tuberculose constitue un des « Objectifs du Millénaire pour le Développement » établi par l'Organisation des Nations Unies (ONU).

2. Généralités

2.1. Phylogénie du genre *Plasmodium*, l'agent du paludisme

Le paludisme est une infection parasitaire tropicale causée par un protozoaire intracellulaire hétéroxène du genre *Plasmodium*.

D'un point de vue phylogénique, le genre *Plasmodium* appartient à l'embranchement des Apicomplexa, caractérisé par la présence d'un complexe apical permettant sa pénétration dans la cellule hôte. Il fait partie de la classe des Sporozoa, correspondant à des parasites intracellulaires dépourvus de cil ou de flagelle qui débutent leur cycle sous forme vermifère : le sporozoïte. Sa sous-classe est celle des Coccidia, définie par un cycle de développement alternant une reproduction sexuée et une reproduction asexuée, pouvant se dérouler au sein d'un même hôte (monoxène) ou de deux hôtes différents (hétéroxène). Il appartient à l'ordre des Haemosporida, typique des parasites d'érythrocytes ; et à la famille des Plasmodiidae, dont les principales caractéristiques sont le développement indépendant des gamètes sexuels et la production d'un pigment appelé hémozoïne. Enfin, le genre est celui de *Plasmodium*, regroupant des centaines d'espèces.

2.2. Cycle de vie de *Plasmodium*

Le cycle de vie de *Plasmodium* comporte différents stades de développement dans 2 hôtes distincts : un hôte invertébré (hôte définitif) vecteur de la maladie : le moustique femelle du genre *Anopheles*, et un hôte vertébré (hôte intermédiaire) ([Figure 3](#), page 23). Au sein de l'hôte définitif, le parasite accomplira son cycle sexué (sporogonie) tandis qu'au sein de l'hôte intermédiaire se déroulera le cycle parasitaire asexué (schizogonie).

2.2.1. Le cycle de développement de Plasmodium chez l'hôte intermédiaire

Lors d'un repas sanguin, le moustique femelle infesté par *Plasmodium* va relarguer dans un vaisseau sanguin de son hôte vertébré de la salive, indispensable à son repas. En effet, cette écume contient un anticoagulant qui bloque l'action des thrombocytes (plaquettes sanguines) de l'hôte et ainsi la coagulation du sang, empêchant l'occlusion de la trompe de l'insecte. Les sporozoïtes, formes parasitaires infestantes stockées dans les glandes salivaires du moustique, sont libérés dans la circulation sanguine : l'infection commence ([Figure 3 \[1\]](#)).

Les sporozoïtes vont rapidement se disperser à travers l'organisme, pénétrant indifféremment dans différents types de cellules où ils avorteront. Seuls ceux ayant atteint les cellules du foie (hépatocytes) vont pouvoir se développer ([Figure 3 \[2\]](#)). Il a toutefois été démontré *in vivo* qu'au sein des cellules de l'épiderme, du derme et des follicules pileux, quelques parasites pouvaient également se développer (Gueirard et al., 2010). Lorsque le sporozoïte a pénétré dans l'hépatocyte, il se développe en trophozoïte, puis en schizonte hépatique où plusieurs divisions de mitose se succèdent ([Figure 3 \[3\]](#)). C'est la phase intra-hépatique du parasite, désignée sous le nom de cycle exo-érythrocytaire schizogonique ([Figure 3 \[A\]](#)), ou cycle pré-érythrocytaire, bien qu'il s'agisse d'une phase plutôt que d'un cycle à proprement parler.

En 10 à 15 jours, le schizonte hépatique mûr provoque la rupture de l'hépatocyte infecté, libérant dans la circulation systémique jusqu'à 40 000 parasites unicellulaires appelés mérozoïtes ([Figure 3 \[4\]](#)). Ces mérozoïtes ont la capacité d'infecter les globules rouges (GR) de l'hôte. En quelques secondes, le mérozoïte infecte un GR sain ([Figure 3 \[5\]](#)) où il se développe en 3 stades distincts :

- (1) le stade anneau, qui correspond au premier stade du parasite dans le GR ; les principaux organites se trouvent en périphérie et délimitent un cytoplasme fin. Le parasite se nourrit de l'hémoglobine ;
- (2) le stade trophozoïte, où le parasite croît. Le volume des organites augmente fortement et l'hème de l'hémoglobine, qui ne se digère pas, est stocké sous forme de polymères inertes (cristaux) d'hémozoïne dans la vacuole digestive du parasite. En parallèle, le parasite exporte des protéines parasitaires à la membrane de la cellule hôte et certains phospholipides membranaires sont modifiés. A la fin du stade trophozoïte, les premières divisions de mitoses commencent ;
- (3) le stade schizonte, correspondant à la biogénèse des mérozoïtes est un stade de divisions cellulaires actif. L'hémozoïne forme une masse dense au sein du GR.

Arrivé à maturité, le schizonte induit la rupture du globule rouge infecté (GRi) ce qui permet la libération de 16 à 32 mérozoïtes dans le compartiment sanguin ([Figure 3 \[6\]](#)). Ces mérozoïtes vont alors réenvahir de nouveaux GR sains où le même schéma se perpétue. C'est la phase sanguine, appelée cycle intra-érythrocytaire schizogonique, ou endo-érythrocytaire ([Figure 3 \[B\]](#)). Elle est à l'origine de la destruction massive des GR et des manifestations cliniques chez l'Homme.

En parallèle, une petite partie des parasites se trouvant sous forme d'anneau vont se développer en microgamétocytes (pré-gamètes sexuels mâles) ou en macrogamétocytes (pré-gamètes sexuels femelles)

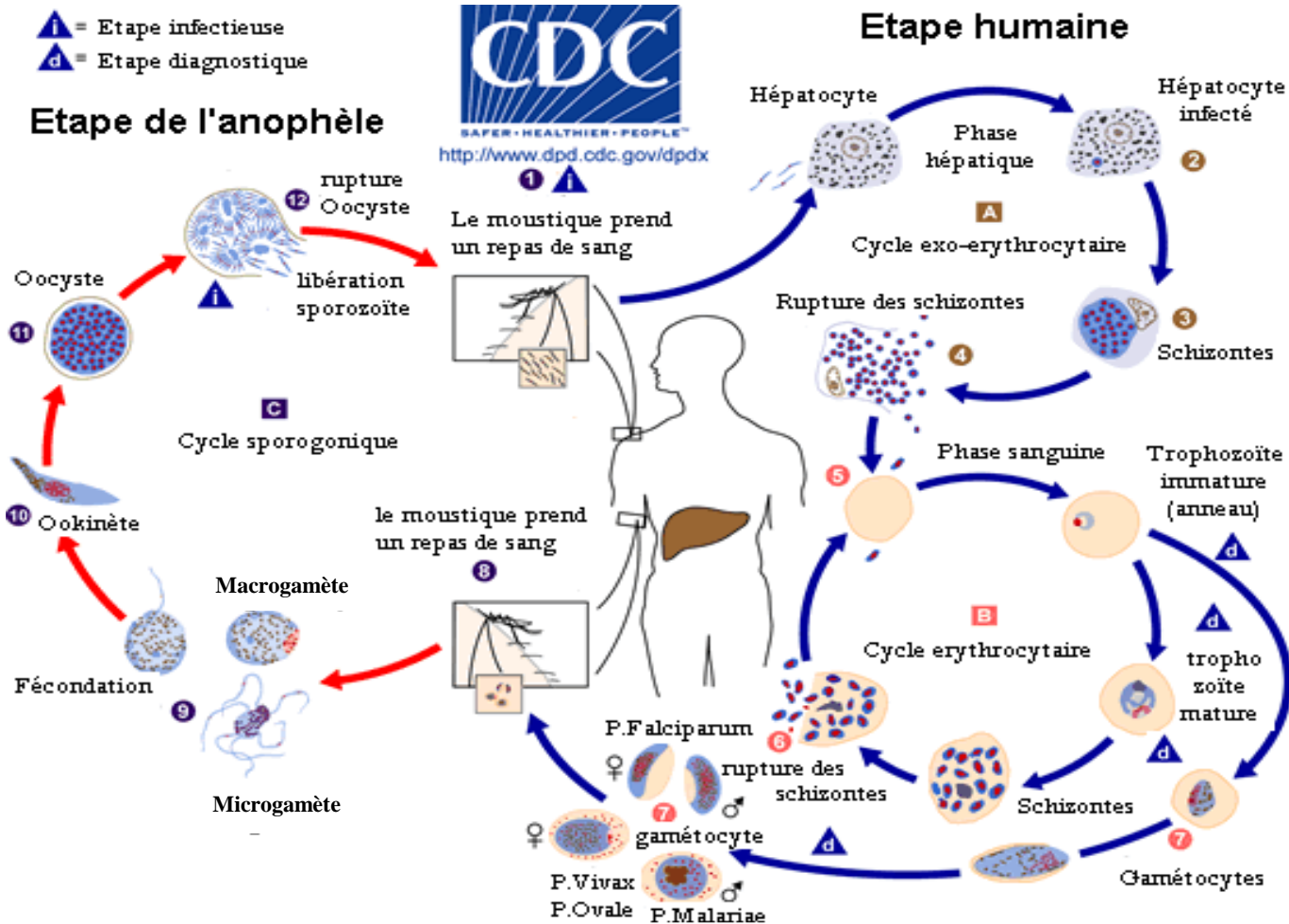


FIGURE 3 : CYCLE DE VIE DE PLASMODIUM (CHEZ L'HOMME ET LE MOUSTIQUE).

A : Cycle exo-érythrocytaire hépatique (1 : repas sanguin d'un moustique infesté, relargue des sporozoïtes ; 2 : hépatocyte infecté ; 3 : schizontes hépatiques ; 4 : rupture des schizontes hépatiques, relargage des mérozoïtes hépatiques). B : Cycle intra-érythrocytaire schizogonique (5 : GR infecté par un mérozoïte ; 5 à 6 : stade anneau, stade trophozoïte, stade schizonte ; 6 : rupture des schizontes, libération des mérozoïtes ; 7 : gamétocytes). C : Cycle sporogonique (8 : contamination d'un moustique lors d'un repas sur un hôte infesté ; 9 : fécondation des gamétocytes mâle et femelle ; 10 : ookinète ; 11 : oocyste ; 12 : rupture de l'oocyste, libération des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires du moustique où ils resteront stockés avant le prochain repas). *i* : étapes infectieuses. *d* : étapes diagnostiques. En bleu : étapes chez l'Homme. En rouge : étape chez l'anophèle. D'après Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018.

(Figure 3 [7]). Le mécanisme induisant cette différenciation en forme parasitaire sexuée est encore mal connu, mais il semblerait que de multiples facteurs environnementaux en soient à l'origine (Baker, 2010; Meibalan and Marti, 2017). Les gamétocytes femelles et mâles vont subir une maturation en 5 stades (notés de I à V). Les gamétocytes arrivés au stade V ingérés par un moustique femelle durant un repas sanguin vont alors pouvoir se développer et s'accoupler pour accomplir le cycle sexué au sein de cet hôte définitif.

2.2.1. Le cycle de développement de *Plasmodium* chez l'hôte définitif

Lors d'un repas sanguin sur un vertébré infesté par *Plasmodium*, le moustique va ingérer différentes formes parasitaires sexuées et asexuées (Figure 3 [8]). Arrivés dans l'estomac, les microgamétocytes et macrogamétocytes de stade V vont se transformer respectivement en microgamète mâle et en macrogamète femelle, puis la fécondation intervient (Figure 3 [9]), ce qui aboutit à la formation d'un zygote. Le zygote se transforme en ookinète mobile qui va traverser la paroi stomachale pour se fixer sur la membrane externe de l'estomac. Il se transforme en oocyste (Figure 3 [11]). L'oocyste va effectuer des divisions mitotiques successives, qui vont conduire à la formation des sporozoïtes (sporogonie). Les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe du moustique et atteignent les glandes salivaires, où ils seront stockés, prêts à être relargués lors du prochain repas de l'insecte infecté. Ces étapes du cycle de développement du parasite correspondent au cycle sporogonique (Figure 3 [C]).

2.3. L'agent pathogène

Il existe plus de 200 espèces de *Plasmodium* capables d'infecter diverses espèces de vertébrés. Mais du fait de leurs nombreuses différences (biologiques, physiologiques, génétiques etc.), les espèces plasmodiales ont chacune un hôte de « prédilection ». Chez l'Homme, seules 5 espèces sont infestantes : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) et *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Cependant, plusieurs cas d'infection à *Plasmodium simium* (*P. simium*), un *Plasmodium* simien, ont été rapportés chez l'Homme, au Brésil, entre 2015 et 2016 (Brasil et al., 2017).

Ces espèces plasmodiales diffèrent par leur morphologie (Figure 4), les symptômes cliniques qu'elles provoquent, leur cycle biologique mais également par leur virulence :

- ***P. falciparum*** (Figure 4 [A]) est l'espèce plasmodiale la plus virulente. Elle est responsable de la grande majorité des cas graves et peut causer la mort. Elle possède un cycle intra-érythrocytaire de 48h. C'est l'espèce la plus répandue en Afrique sub-saharienne.

P. knowlesi (Figure 4 [B]) est une espèce identifiée en 1932 par RM Knowles chez le macaque, *Macaca fascicularis* (Knowles and Gupta, 1932). Les premiers cas d'infection chez l'Homme sont décrits en 1965 (Chin et al., 1965). Aujourd'hui, on sait que cette espèce a longtemps été confondue avec *P. falciparum*, en

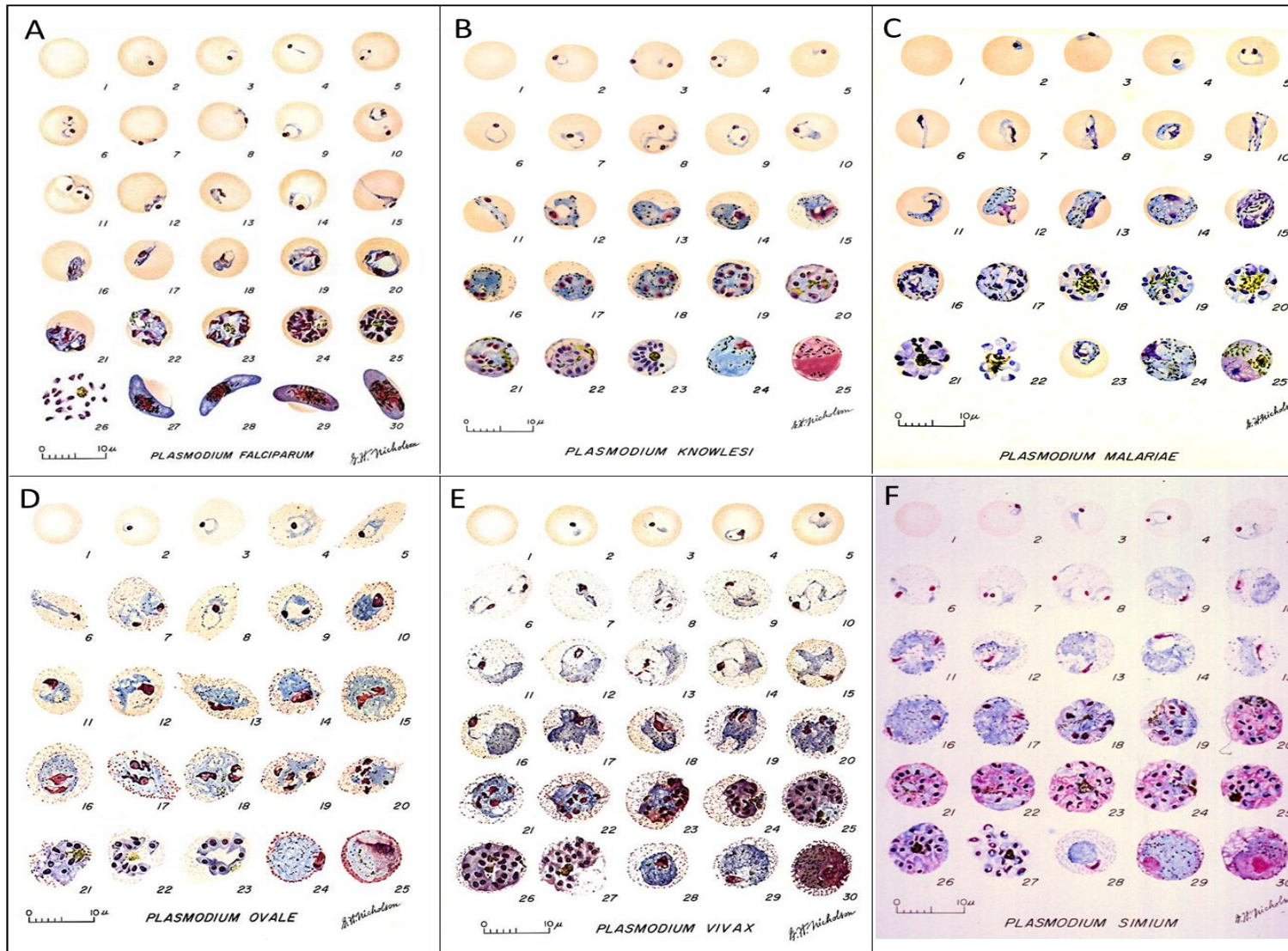


FIGURE 4 : MORPHOLOGIE DES *PLASMODIUM* HUMAINS OBSERVABLES SUR FROTTIS EN COUCHE MINCE.

Stades intra-érythrocytaires de (A) *P. falciparum*, (B) *P. knowlesi*, (C) *P. malariae*, (D) *P. ovale*, (E) *P. vivax*, (F) *P. simium*. (A), (E) et (F) : 1 : Globule rouge normal. 2-5 : Stades parasitaires anneau. 6-18 : Stades parasitaires trophozoïte. 19-26 : Stades parasitaires schizonte. 27-28 : gamétocyte femelle de stade V. 29-30 : gamétocyte mâle de stade V. (B), (C) et (D) : 1 : Globule rouge normal. 2-5 : Stades parasitaires anneau. 6-13 : Stades parasitaires trophozoïte. 14-22 : Stades parasitaires schizonte. 23 : développement en gamétocyte. 24 : gamétocyte femelle de stade V. 25 : gamétocyte mâle de stade V. Illustration : Gertrude H. Nicholson. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (U.S.), 1971.

stade parasitaire jeune, ou *P. malariae*, en stade parasitaire âgé. Son cycle intra-érythrocytaire est le plus rapide des espèces plasmodiales humaines puisqu'il s'accomplit en 24h. *P. knowlesi* est présent dans de nombreux pays d'Asie du sud-est où il peut causer des complications et parfois la mort (Cox-Singh et al., 2010).

- ***P. malariae*** (Figure 4 [C]) est une espèce causant un paludisme chronique sans complication mortelle mais provoquant des atteintes rénales de type syndrome néphrotique (da Silva et al., 2017; Hendrickse et al., 1972; Kibukamusoke and Hutt, 1967). Elle a un cycle érythrocytaire long de 72h. Bien que cette espèce ne soit pas létale, elle contribue néanmoins à la morbidité attribuée aux espèces palustres par ses manifestations cliniques, la diminution des défenses immunitaires de l'hôte infecté et la diminution du taux de natalité. Cette espèce est présente dans toutes les zones endémiques.
- ***P. ovale*** (Figure 4 [D]) est une espèce causant un paludisme chronique sans complication mortelle. Chez cette espèce, comme chez *P. vivax*, il existe une forme parasitaire qualifiée de dormante, appelée hypnozoïte. Il s'agit d'une forme latente du parasite pouvant rester dans l'hépatocyte plusieurs mois voire années, donnant lieu à une reviviscence lors de son « réveil ». Ceci augmente considérablement la durée de la phase intra-hépatique chez ces deux espèces plasmodiales. La durée du cycle intra-érythrocytaire est de 48h. Cette espèce est présente en Afrique et en Asie du sud-est où sa prévalence reste très faible.
- ***P. vivax*** (Figure 4 [E]) est, après *P. falciparum*, l'espèce la plus répandue. Elle reste majoritairement bénigne mais peut, dans quelques cas, causer des complications (Baird, 2014; Demissie and Ketema, 2016; Quispe et al., 2014), voire entraîner la mort (Baird, 2013). Cette espèce n'est quasiment pas présente en Afrique due à une immunité anti-*P. vivax* présente dans la population. En revanche, elle est présente en Amérique latine et en Asie.
- ***P. simium*** (Figure 4 [F]) : récemment, 28 cas d'infections à *P. simium* ont été confirmés chez des autochtones de la région de la forêt Atlantique de l'état de Rio de Janeiro au Brésil (Brasil et al., 2017). On ne peut pas considérer cette espèce comme une espèce plasmodiale humaine mais cette étude met en avant une nouvelle transmission zoonotique possible du singe à l'Homme, retraçant le schéma observé en Asie du sud-est avec *P. knowlesi* (Grigg and Snounou, 2017).

2.4. Le vecteur

Chez les mammifères, le vecteur du paludisme est un moustique hématophage du genre *Anopheles* (*An.*) dont l'espèce varie en fonction de l'hôte. Pendant la période de gestation, les moustiques femelles, qui se nourrissent normalement de nectars de fruits, ont besoin d'un apport protéique important pour la formation de leurs œufs. C'est pourquoi, seules les femelles piquent les vertébrés à la recherche de sang frais contenant les protéines nécessaires au développement de leurs descendances. Les moustiques mâles ne sont pas des vecteurs du paludisme.

Chez l'Homme, une cinquantaine d'espèces d'anophèles sont capables de transmettre *Plasmodium* (revue : Pages et al., 2007). L'étude du comportement du vecteur est un aspect non négligeable à prendre en

compte, car il permet de comprendre les conditions de transmission de la maladie et de mettre en œuvre des moyens de lutte antivectorielle. Ainsi, pendant la saison des pluies, certaines espèces piquent préférentiellement les Hommes ou les animaux, le jour ou la nuit, à l'extérieur des habitations ou à l'intérieur. Tous ces facteurs permettent de mettre en place des moyens de préventions pour les populations endémiques afin de limiter les infections.

La distribution géographique des anophèles n'est pas la même à la surface du globe (Figure 5). En effet, la topographie, la température, et les comportements du moustique sont des éléments qui vont définir leur répartition. En France, 3 espèces d'anophèles, potentiellement capables de transmettre le paludisme, sont présentes : *An. atroparvus*, *An. labranchiae* et *An. messeae*.

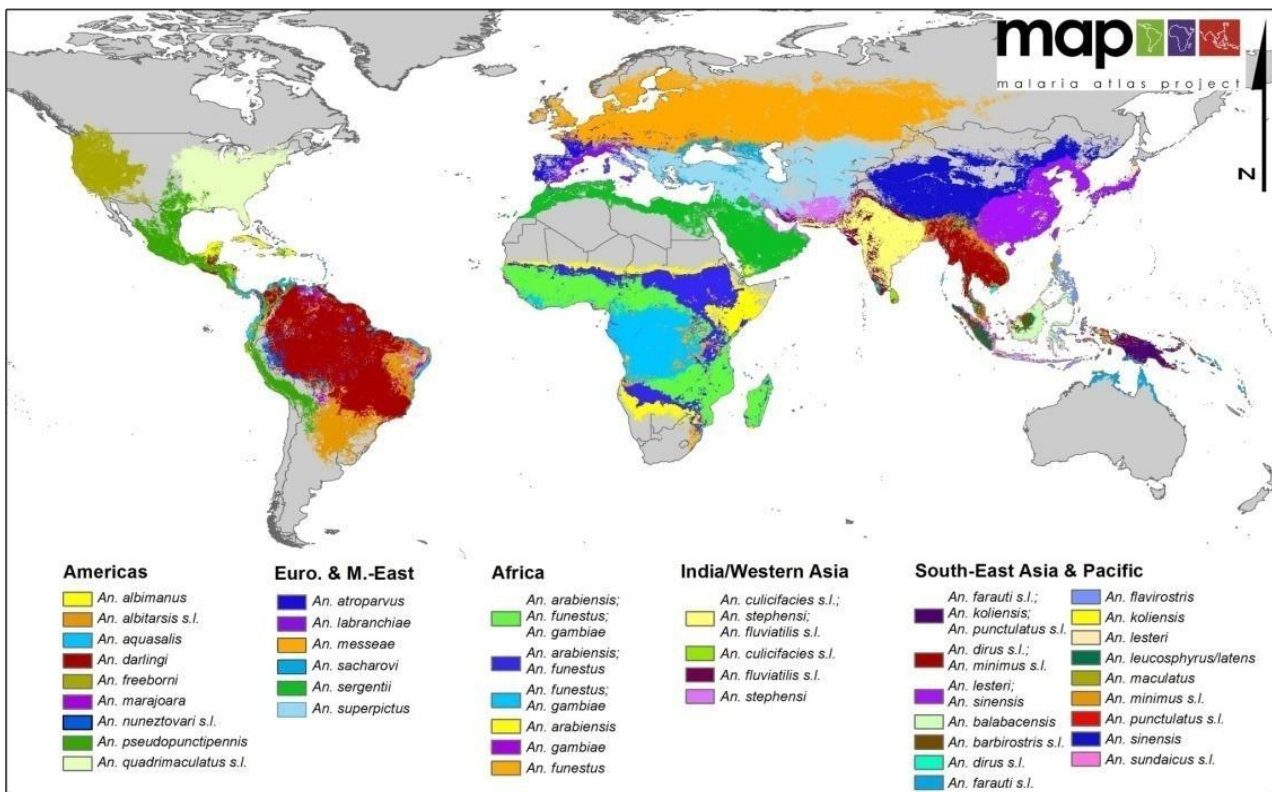


FIGURE 5 : REPARTITION MONDIALE DES ANOPHELES.

Les moustiques du genre *Anopheles* sont largement répartis à travers le monde. On ne retrouve pas les mêmes espèces aux mêmes endroits et certains moustiques cohabitent dans les mêmes régions, notamment en Afrique et en Asie. D'après *Malaria Atlas Project (MAP)*.

3. Modes de transmission chez l'Homme

Chez l'Homme, 3 modes de transmission de *Plasmodium* sont possibles :

- (1) La transmission par le vecteur, l'anophèle femelle, est la forme de transmission la plus courante.
- (2) La transmission par transfusion sanguine. Dans ce cas, les GRi contenant des formes asexuées sont directement transférés à un nouvel hôte. Le parasite va être exempté de la phase hépatique mais va continuer son cycle intra-érythrocytaire au sein du receveur. Les personnes receveuses, généralement en état d'immunodépression, sont exposées à un risque infectieux potentiellement mortel.

- (3) La transmission *in utero*, de la mère à l'enfant, lorsqu'une femme enceinte contracte le paludisme (paludisme congénital). Le parasite peut être présent dans le placenta, le sang du cordon ombilical et/ou le sang du fœtus (Schwetz and Peel, 1934). Ceci peut aboutir à un retard de croissance du fœtus, un accouchement prématuré, un faible poids à la naissance ou une anémie chez le nourrisson. L'issue peut également être fatale avec une fausse couche spontanée ou un enfant mort-né.

4. Chimio prophylaxie et vaccin

Les traitements préventifs contre le paludisme sont les mêmes que les traitements curatifs. De manière générale, les molécules utilisées contre *Plasmodium* sont la chloroquine, la quinine, le proguanil, la méfloquine, la doxycycline, les dérivés de l'artésunate et l'association sulphadoxine-pyriméthamine. Ces molécules ont des cibles différentes chez le parasite. Cependant, en fonction de la zone d'endémicité, les parasites peuvent présenter des résistances contre certaines molécules antipalustres, le traitement préventif et/ou curatif n'est donc pas le même en fonction des zones géographiques. Aujourd'hui, toutes les molécules thérapeutiques existantes sont sujettes à des résistances (Cui et al., 2015).

En ce qui concerne les stratégies vaccinales, plusieurs vaccins ou candidats sont développés. Ils ont pour cibles différents stades du cycle parasitaire (pré-érythrocytaire, érythrocytaire sexuée ou asexuée). Le vaccin candidat RTS,S/AS01 (Mosquirix™), développé par le laboratoire GSK (Glaxosmithkline), est celui le plus avancé contre *P. falciparum* et sera entre 2018 et 2020 administré dans le cadre d'un programme pilote aux trois pays d'Afrique Ghana, Kenya et Malawi (Coelho et al., 2017). Ce vaccin cible les parasites au stade sporozoïte et les essais de phase III ont montré une diminution des signes cliniques du paludisme chez 26% des jeunes enfants de l'étude ayant reçu 3 doses de RTS,S. Une quatrième dose, administré 18 mois après la première réduit de 39% les cas cliniques (Rts, 2015).

5. Physiologie des manifestations cliniques du paludisme chez l'Homme

5.1. Accès simple

L'accès palustre simple ou paludisme simple se définit cliniquement par des symptômes de type « grippe » :

- Fièvre brutale : avec la particularité d'apparaître tous les 2 jours, lors d'une infection à *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale* (on parle de fièvre tierce) ; ou tous les 3 jours, lors d'une infection à *P. malariae* (on parle de fièvre quarte) ;
- Malaise général avec myalgies ;
- Maux de tête ;
- Frissonnements et diaphorèse ;
- Accompagnés parfois de troubles digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements...).

Physiologiquement, ces symptômes sont les conséquences de la rupture massive des GRi lors de la croissance exponentielle des parasites pendant le cycle intra-érythrocytaire et de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

En effet, lorsque le mérozoïte a pénétré dans le GR, le parasite se nourrit de l'hémoglobine qui contient les acides aminés nécessaires à son développement. Cependant, le fer contenu dans l'hème, qui ne peut être digéré, est stocké sous forme d'hémozoïne, ou pigment malarique, dans la vacuole digestive. Lors de la rupture du GRi, les mérozoïtes et l'hémozoïne vont être libérés dans le sang. L'hémozoïne a une action pyrogène et active le système immunitaire, ce qui explique les fièvres tierces avec *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax*, qui ont un cycle de développement intra-érythrocytaire de 48h, et la fièvre quarte avec *P. malariae*, dont la durée du cycle est de 72h. La durée du cycle asexué coïncide avec les poussées de fièvre intermittentes.

5.2. Accès grave

Comme il a été évoqué, *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale la plus virulente. Ceci est dû au fait que cette espèce provoque des accès palustres graves (encore appelés sévères ou pernicioeux). En 2000, l'OMS a ré-évalué les critères de sévérité du paludisme afin de permettre une meilleure assistance clinique aux patients (Beales et al., 2000).

Un patient est considéré comme faisant un accès grave s'il présente au moins l'un des symptômes cliniques ou physiologiques listés dans le [tableau 1](#).

TABLEAU 1 : MANIFESTATIONS SEVERES DU PALUDISME A P. FALCIPARUM SELON L'OMS (2000).

Manifestations cliniques	Manifestations physiologiques
Détresse respiratoire	Anémie sévère (hémoglobine < 7g/dL, hématocrite < 20%)
Œdème pulmonaire	Hypoglycémie (glycémie < 2,2mmol/L)
Saignements anormaux	Acidose (bicarbonates plasmatiques < 15mmol/L, ou acidémie avec pH < 7,35)
Jaunisse	Hyperlactatémie (lactates plasmatiques > 5mmol/L)
Prostration	Altération rénale (créatininémie > 265µmol/L ou urée sanguine > 17mmol/L et diurèse < 400mL/24h)
Conscience altérée	
Convulsions	Atteinte cérébrale : neuropaludisme (ou paludisme cérébral)
Coma	

Le neuropaludisme et l'anémie sévère, sont des complications majeures du paludisme à *P. falciparum*. Basées au départ sur des études anatomopathologiques post-mortem réalisées chez des patients décédés de neuropaludisme, de très nombreuses recherches ont été développées pour en étudier la physiopathologie.

Néanmoins, d'autres tissus, que le cerveau et le sang, peuvent être touchés lors d'un accès sévère : les poumons, le foie, les reins et la rate.

Plusieurs théories, probablement complémentaires sont actuellement retenues :

- **La cytoadhérence des GRi.** *P. falciparum* a la particularité de provoquer la formation de protubérances (« knobs ») à la surface des GRi lors de l'exportation de ses protéines parasitaires à la surface de la cellule hôte. Ces « knobs » constituent une jonction entre le GRi et l'endothélium vasculaire (Sharma, 1991). Il existe aussi d'autres facteurs parasitaires ou endothéliaux favorisant la cytoadhérence. Les facteurs parasitaires étant PfEMP1 et PfEMP2 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 et -2), KAHRP (knob-associated histidine rich protein), RESA (ring-associated erythrocyte surface antigen), PfHRP1, PfHRP3 (*Plasmodium falciparum* histidine-rich-protein-1/ -3); et ceux de la cellule endothéliale : ICAM-1, ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-1/ -2), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E- et P-sélectine, $\alpha_v\beta_3$ intégrine, CD36 et CD23 (cluster-determinant 36/ 23) (Alister et al., 2012).

De plus, des GR sains peuvent également adhérer aux GRi (par des facteurs tels que CR-1 ou CD36), formant ce que l'on appelle des « rosettes ». Ceci aboutit à la séquestration et l'accumulation de GRi et de GR sains dans la microcirculation de différents organes. Ce phénomène peut engendrer l'occlusion des microvaisseaux conduisant à une hypoxie locale et provoquant des atteintes pulmonaires, rénales, et/ou cérébrales.

- **La libération massive de microparticules.** Les microparticules sont des vésicules extracellulaires (microvésicules de 0,1 à 1 μm) émises par les cellules présentes dans la circulation sanguine. Elles portent à leur surface les antigènes de leurs cellules d'origine (Combes et al., 2004) et fonctionnent comme messagers. Elles participent à l'adhérence, aux interactions cellulaires, à la signalisation ou encore à l'inflammation (Faille et al., 2009). Lors d'un paludisme cérébral, un nombre très élevé de microparticules est retrouvé dans le plasma des patients (Combes et al., 2005). D'autre part, une étude *in vivo* a montré qu'il était possible d'induire les symptômes du neuropaludisme chez des souris en leur injectant des microparticules issues du plasma de souris atteintes d'un paludisme cérébral (El-Assaad et al., 2014).
- **L'inflammation due aux cytokines pro-inflammatoires.** Certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interféron gamma (IFN γ) favorisent la fièvre et/ou l'apparition d'un neuropaludisme, en induisant l'expression de molécules d'adhérence, comme ICAM-1, CD36, VCAM-1 et ELAM-1 à la surface des endothélium (Pasloske and Howard, 1994). Le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) est également un facteur pyrogène stimulé par la libération de l'hémozoïne, responsable de l'hypoglycémie, des troubles de la coagulation et de la régulation du récepteur ICAM-1 (Olivier et al., 2014). La production accrue de ces cytokines contribue au développement d'un accès palustre sévère (Schofield and Grau, 2005).

Bien que les atteintes sévères soient très majoritairement causées par *P. falciparum*, certaines ont pu être observées avec les autres espèces *P. knowlesi* (Cox-Singh et al., 2010; Fatih et al., 2012; Taylor et al., 2012a), *P. malariae* (da Silva et al., 2017), *P. ovale* (Facer and Rouse, 1991; Imbert et al., 2009; Lemmerer et al., 2016; Zidouh et al., 2017) et *P. vivax* (Alister et al., 2012; Anstey et al., 2007; Horvath and Murray, 2008; Kenangalem et al., 2016; Navarro et al., 1989; Tan et al., 2008).

6. Modifications physiopathologiques induites par *Plasmodium falciparum*

6.1. Modifications du globule rouge

Une fois à l'intérieur de l'érythrocyte, le parasite modifie progressivement la membrane de sa cellule-hôte. Il crée un réseau de transport qui lui permet d'une part d'exporter des protéines parasitaires à la surface de l'érythrocyte et d'autre part, d'échanger des lipides avec la membrane de la cellule-hôte (Hsiao et al., 1991). Chez *P. falciparum*, l'exportation de protéines parasitaires est associée à la formation des « knobs » et à la cytoadhérence des GRi par les formes mûres du parasite (trophozoïtes âgés et schizontes) et des GR sains dans les vaisseaux sanguins. La séquestration des GRi permet au parasite d'échapper à la clairance mécanique et immunitaire effectuée par la rate.

Par ailleurs, les phospholipides membranaires du GR vont eux aussi être modifiés. Le feuillet externe de la membrane de l'érythrocyte contient une forte proportion de phosphatidylcholine (PC) et de sphingomyéline (SM), tandis que le feuillet interne est riche en phosphatidylsérine (PS) et en phosphatidyléthanolamine (PE). Les phospholipides du feuillet interne contiennent une forte proportion d'acides gras poly-insaturés (PUFA – polyunsaturated fatty acid). L'infection palustre cause une diminution de la proportion de PUFA, en particulier la diminution des acides linoléique (C18:2), arachidonique (C20:4) (AA) et docosahexaénoïque (C22:6) (DHA), et une augmentation en acide oléique (C18:1) (Hsiao et al., 1991). Ces changements vont induire des modifications de la perméabilité de la membrane érythrocytaire et laisser l'accès aux métabolites de faible poids moléculaire, comme des acides aminés, des ions organiques ou inorganiques et des vitamines ; mais ils vont également induire des modifications des propriétés physiques du GR comme sa déformabilité et sa souplesse (Glenister et al., 2002; Shelby et al., 2003).

6.2. Le sang

La phase de schizogonie érythrocytaire entraîne une hémolyse en partie responsable d'une anémie qui s'installe progressivement. L'hème libéré est principalement catabolisé en biliverdine puis en bilirubine par la rate et transportée dans le foie où elle est transformée en pigment biliaire. La destruction massive des GR entraîne un excès d'hémoglobine qui sera éliminé dans les urines entraînant une hémoglobinurie et une

biliverdinurie, rendant compte d'un dysfonctionnement de ces organes. D'autre part, la libération de l'hémozoïne lors de l'éclatement du GR est en partie responsable de la fièvre. L'hémozoïne est phagocytée par les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles (leucocytes mélanifères).

Au cours d'un accès palustre, on observe aussi une thrombopénie, perturbation biologique due à la séquestration des plaquettes. Les mécanismes régissant la séquestration sont mal connus, probablement immunologiques.

6.3. Changements macroscopiques : splénomégalie et hépatomégalie

Dans les zones endémiques, les infections plasmodiales à répétition (paludisme chronique) peuvent entraîner une augmentation du volume hépatique (hépatomégalie) et/ou du volume de la rate (splénomégalie). Ces changements macroscopiques sont les conséquences d'une hyperactivité du foie et de la rate, de la congestion et de l'activité phagocytaire intense. En ce qui concerne la splénomégalie, on en distingue deux types : la splénomégalie palustre hyper-réactive et le lymphome tropical splénique à lymphocytes villeux (Dascalescu et al., 2005). Le second type étant une complication du premier. Certains cas de splénomégalie grave peuvent aboutir à une splénectomie (Dascalescu and Najman, 2005).

7. Immunité anti-*Plasmodium*

7.1. Résistance innée contre *Plasmodium*

7.1.1. Groupe sanguin Duffy-négatif

L'antigène Duffy est une glycoprotéine servant de récepteur à la surface des réticulocytes pour *P. vivax*, permettant ainsi son entrée dans la cellule hôte (Barnwell et al., 1989). Dans certaines zones endémiques d'Afrique de l'Ouest, de l'Afrique Centrale et de l'Amérique du sud, une forte proportion des populations sont de groupe sanguin Duffy-négatif. Jusqu'à récemment, les populations ne présentant pas l'antigène Duffy étaient considérées comme naturellement immunisées contre les infections à *P. vivax* (Miller et al., 1976; Young et al., 1955). Cependant, plusieurs études ont montré que des individus Duffy-négatif pouvaient être infectés par cette espèce plasmodiale (Menard et al., 2010; Mendes et al., 2011; Ryan et al., 2006; Zimmerman, 2017). A l'heure actuelle, on ne sait pas s'il s'agit d'une adaptation récente des parasites ou si l'absence de détection de *P. vivax* chez les individus Duffy-négatif était erronée (Gunalan et al., 2018).

7.1.2. Quelques hémoglobinopathies protectrices

Le GR a une importance capitale dans l'infection palustre, il est le siège du développement de stades asexués et sexués. Au cours de sa maturation en schizonte dans les hématies, le parasite se nourrit de l'hémoglobine. L'hémoglobine est constituée de deux chaînes α de globine (codées par deux gènes du chromosome 16) et deux chaînes β de globine (codées par un gène du chromosome 11). Chaque chaîne de globine est liée à un groupement hème contenant un atome de fer servant à capter une molécule de dioxygène (Figure 6).

Des mutations sur les gènes codant les chaînes de globine peuvent affecter leur structure (cas de la drépanocytose) ou leurs mécanismes de synthèse (cas des thalassémies), avec des conséquences physiopathologiques importantes.

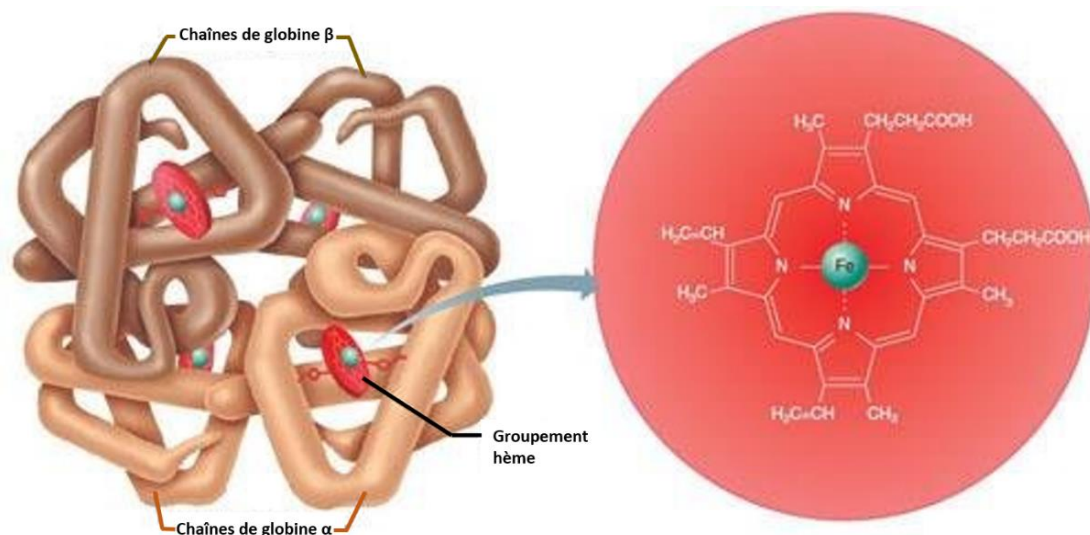


FIGURE 6 : STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE.

A gauche : Chaînes de globines α et β (en marron clair et foncé) contenant chacune un hème = association d'un groupement prosthétique (en rouge) à un atome de fer (en vert). A droite : structure de l'hème. D'après Marieb, *Anatomie et physiologie humaine*, 6^{ème} Ed., 2005, p. 668.

7.1.2.1. Drépanocytose hétérozygote et paludisme

La drépanocytose est une maladie causée par une mutation sur le gène codant la chaîne de globine β , on parle d'hémoglobine S (HbS) (pour sickle en anglais, signifiant faucille) donnant au GR une forme particulière en faucille. La forme homozygote de cette pathologie est délétère et provoque de graves anémies et des désordres hématologiques ; tandis que la forme hétérozygote peut engendrer des accès anémiques rares. Chez les hétérozygotes, environ la moitié des GR contient de l'HbS.

La drépanocytose ne protège pas contre l'infection à *Plasmodium* mais confère une résistance à la maladie, notamment contre les accès pernecieux, par la réduction de l'exposition à la membrane de la protéine

de surface PfEMP-1 impliquée dans la cytoadhérence, la production d'hème-oxygénase-1, empêchant l'accumulation de l'hème libre circulant et l'inhibition de la réponse pathogénique des lymphocytes T CD8⁺ (Bunn, 2013; Ferreira et al., 2011).

7.1.2.2. Thalassémies et paludisme

Les thalassémies (α -thalassémie et β -thalassémie) constituent un groupe de désordres hématologiques dont la particularité est l'absence ou la diminution de la synthèse d'une ou plusieurs chaînes de globine.

De la même manière que pour la drépanocytose, les thalassémies ne protègent pas de l'infection palustre mais induisent par exemple, la diminution : des invasions des parasites dans les GR (Brockelman et al., 1987; Bunyaratvej et al., 1992; Chotivanich et al., 2002), les accès graves (Krause et al., 2012; May et al., 2007; Mockenhaupt et al., 2004), la formation des rosettes et la cytoadhérence (Butthep et al., 2006; Carlson et al., 1994; Krause et al., 2012; Udomsangpetch et al., 1993). Bien que la protection contre les formes sévères soit connue, la protection contre les accès simples n'est pas claire. Certaines études montrent que l' α -thalassémie induit une diminution de l'incidence du paludisme (Enevold A. et al., 2008; Williams et al., 2005) ; tandis que d'autres ne notent pas de corrélation (Taylor et al., 2012b; Wambua et al., 2006) ou observent une augmentation de l'incidence (Williams et al., 1996).

D'autres hémoglobinopathies (hémoglobine C, hémoglobine E) ainsi que certaines déficiences enzymatiques (glucose-6-phosphate déshydrogénase, pyruvate kinase), protègeraient contre les accès graves du paludisme (Goheen et al., 2017).

7.2. Prémunition acquise dans les zones endémiques

Dans les zones endémiques où la population est exposée de manière continue aux parasites (infections chroniques), une prémunition peut s'établir (Obi et al., 2010). Les populations recevant des piqûres infestantes vont se contaminer avec le parasite mais les symptômes vont s'atténuer voire disparaître (porteur asymptomatique). D'autre part, la mortalité associée est quasiment nulle. Ce mécanisme d'adaptation, bien que favorable pour les individus vivant en zone de forte endémie, contribue toutefois à la propagation du paludisme dans la mesure où ils constituent un réservoir de gamétocytes pour les moustiques. Par ailleurs, cette prémunition peut disparaître si le sujet n'est plus en contact avec le parasite. Ce mécanisme de perte de prémunition n'est pas connu.

7.3. Réponse immunitaire de l'hôte lors d'un accès palustre

Le cycle de vie de *Plasmodium* est complexe. Il fait intervenir 2 hôtes, au sein desquels les formes parasitaires se succèdent pour que le parasite accomplisse un développement complet. Chez l'hôte vertébré mammifère, le système immunitaire réagit dès la piqûre infestante du moustique et va engendrer des mécanismes de défense contre toutes les formes parasitaires. De nombreuses cellules et cytokines participent activement à la défense et/ou à la pathogénèse du paludisme.

La réponse immune débute par l'interaction des PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns), antigènes présents à la surface des pathogènes, avec les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor), présents à la surface de toutes les cellules de l'immunité innée, initiant la première ligne de défense immunitaire (immunité innée). Environ 7 jours plus tard, une réponse immunitaire adaptative se met en place pour répondre plus spécifiquement à l'infection.

En début d'infection, la réponse précoce de l'immunité innée met en jeu les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes, les macrophages et les cellules NK (pour Natural Killer). Puis, lorsque l'immunité adaptative est en place, les lymphocytes T (LT) et B (LB) participent activement à l'élimination du parasite. Ces mécanismes, pas toujours élucidés, sont complexes et dépendent les uns des autres.

7.3.1. Rôles des polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les PNN ont la capacité de phagocyter et de tuer les sporozoïtes (Mac-Daniel et al., 2014), les mérozoïtes et les GRi (Metzger et al., 1995; Sun and Chakrabarti, 1985). Lors d'un contact avec le parasite, le PNN s'active et l'internalise dans un phagosome. Là, deux événements successifs entraînent la mort parasitaire (Klebanoff, 1999) : les sous-unités de la NADPH oxydase présentes dans le phagosome s'assemblent et transfèrent des électrons à l'oxygène formant des anions superoxydes qui dismutent en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Ces trois éléments sont appelés formes réactives de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species ; (Hampton et al., 1998). Les ROS sont délétères pour le pathogène. Puis, deuxièmement, les granules neutrophiliques fusionnent avec le phagosome relarguant des enzymes et des peptides anti-microbiens, aboutissant à la mort du parasite. *In vitro*, il a été montré que l'activité phagocytaire des PNN envers les mérozoïtes est augmentée en présence des cytokines INF γ , TNF α et IL-1 β (Kumaratilake and Ferrante, 2000). De plus, l'inhibition de *Plasmodium* en culture dépend du rapport PNN/GRi. Un fort ratio inhibe la croissance des parasites (Kharazmi and Jensen, 1984). Cependant, malgré les évidences actuelles du rôle phagocytaire des PNN dans la mort parasitaire, la contribution de ces cellules à la clairance du parasite *in vivo* n'est pas claire. Il semblerait que les PNN jouent un rôle protecteur durant la phase précoce de l'infection, mais aussi qu'ils pourraient participer à la pathogénèse des accès pernicieux au cours de la phase tardive de l'infection (revue : Tannous and Ghanem, 2018).

Les PNN peuvent également avoir une action *via* la formation d'un réseau neutrophilique de fibres extracellulaires (NETs – Neutrophil extracellular traps). Ce processus est appelé nétose. Pour former des NETs, la membrane nucléaire du neutrophile se dissout et la chromatine se mélange aux granules cytoplasmiques. Puis

des réseaux de chromatine associée à des protéines granulaires adhérentes sortent de la membrane plasmique en formant des fibres extracellulaires. Ce réseau constitue un moyen de défense extracellulaire impliqué dans la destruction des bactéries Gram- et Gram+ et certains champignons (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Urban et al., 2006). Dans le paludisme, l'acide urique et l'hémozoïne contenus dans le GRi sont libérés après rupture de la cellule. Ces cristaux ainsi que le contact direct des PNN avec les parasites vont induire la formation de NETs (Schorn et al., 2012). Ces réseaux neutrophiliques circulent dans le sang et ont la capacité d'adhérer aux mérozoïtes et aux trophozoïtes (Baker et al., 2008), inhibant ainsi leur propagation. Mais ce mécanisme de défense est également à l'origine de la production d'anticorps antinucléaire provoquant l'activation d'une auto-immunité envers l'ADN double brin exposé par les réseaux extracellulaires (Baker et al., 2008), et il semble qu'il puisse participer au paludisme sévère (revue : Boeltz et al., 2017). La formation de NETs est un mécanisme mis en place par l'organisme dans l'élimination des pathogènes mais qui peut conduire à des défaillances d'organes en l'absence de mécanismes de contre-régulation (Lögters et al., 2009).

7.3.2. Rôles des cellules Natural Killer (NK)

Durant l'infection palustre, l'activation des cellules NK dépend de différents facteurs comme la présence des IL-12 et -18 (Artavanis-Tsakonas et al., 2003), ou un contact direct avec les macrophages (Newman et al., 2006) ou les GRi (Artavanis-Tsakonas et al., 2003). Ces cellules sont capables d'éliminer les GR et les hépatocytes parasités de manière directe, par cytotoxicité, ou de manière indirecte, *via* la production de cytokines. Au cours de la phase précoce, la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK contribue au contrôle de la parasitémie et à la clairance parasitaire (Stegmann et al., 2015) et confère ainsi une protection contre le paludisme. Cette production permet également l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Choudhury et al., 2000; Mohan et al., 1997) et des cellules phagocytaires.

Par ailleurs, le rôle anti-*Plasmodium* des cellules NK est hétérogène au sein des individus et dépend des haplotypes des récepteurs inhibiteurs KIR (Killer cell Ig-like Receptor) et de ceux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Yindom et al., 2010).

7.3.3. Rôles des monocytes et des macrophages

Les monocytes et les macrophages sont des cellules phagocytaires qui ont la capacité d'« apprêter » l'antigène en vue de sa présentation aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). On parle de cellule présentatrice d'antigène (CPA). Ce processus d'apprêtement résulte de la fragmentation des protéines exogènes, puis de l'association de ces fragments à des molécules du CMH-II formant un complexe peptide/CMH-II, qui va être exposé à la surface des CPA.

In vitro, l'IFN γ produit par les cellules NK permet la phagocytose des mérozoïtes et des GRi par les macrophages (Mota et al., 1998). En plus de leur fonction de CPA et de leur capacité à réguler les cytokines, les monocytes et les macrophages peuvent internaliser et détruire les GRi *via* l'opsonisation des cellules infectées (Bouharoun-Tayoun et al., 1990; Mota et al., 1998; Stevenson and Riley, 2004). L'activation des macrophages augmente leur production de cytokines, l'infiltration cellulaire, la séquestration des GRi ainsi que la formation de microparticules (Schofield and Grau, 2005).

Toutefois, il a été démontré que l'accumulation d'hémozoïne dans les monocytes et les macrophages pouvait être délétère pour ces cellules et entraîner la perte de leurs fonctions (Schwarzer et al., 1998; Schwarzer et al., 1992).

7.3.4. Rôles des lymphocytes T et B

Les LT et les LB sont des cellules de l'immunité adaptative qui agissent de manière ciblée vis-à-vis d'un pathogène, après un processus de sélection clonale. Au sein des LT on distingue :

- Les populations LT CD4⁺ (lymphocytes auxiliaires ou « helper »), elles-mêmes composées, entre autres, des T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2). La différence est fonctionnelle, basée sur le profil cytokinique produit par ces cellules. Les Th1 produisent majoritairement de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL-2. Les Th2 ont une sécrétion majoritaire d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13 (Romagnani, 1999). Par ailleurs, ces deux réponses sont antagonistes : l'IFN γ bloque le développement de la réponse Th2. Et la production d'IL-4 bloque la réponse Th1 ;
- Et les populations LT CD8⁺ (lymphocytes cytotoxiques).

Les LT induisent une réponse immunitaire dite « cellulaire ». Les LB induisent une réponse humorale, se caractérisant par la production d'anticorps (Ac). Après sélection et expansion clonale, une partie des LB se différencie en LB mémoires et une autre partie constitue un pool de plasmocytes sécréteurs d'Ac. Lorsque les Ac spécifiques reconnaissent l'Ag, ils forment un complexe immun qui sera internalisé puis détruit par les cellules phagocytaires.

7.3.4.1. Immunité anti-*Plasmodium* à médiation cellulaire

Durant la phase exo-érythrocytaire, les hépatocytes infectés vont présenter des antigènes parasitaires à leur membrane sous forme de complexes avec le CMH-I, complexes reconnus par le TCR (T-cell receptor) des LT CD8⁺ (Weiss et al., 1990). Cette reconnaissance va induire l'apoptose des cellules infectées (Bjorkman et al., 1987). D'autre part, ces LT cytotoxiques sécrètent de l'IFN γ , qui active l'oxyde nitrique synthétase à l'origine de la production d'oxyde nitrique, impliqué dans la destruction des parasites (Nardin and Nussenzweig, 1993).

Durant la phase érythrocytaire, l'immunité à médiation cellulaire fait intervenir une réponse Th1 soutenue qui laisse place, plus tardivement, à une réponse Th2. Cette réponse Th1 est stimulée par l'IFN γ sécrété par diverses cellules et diminue au fur et à mesure que la parasitémie décroît (Taylor-Robinson et al., 1993). La production d'IFN γ active les macrophages et stimule l'activité des LT CD8 $^+$. *In vivo*, il a été montré que les souris présentant une faible sécrétion d'IFN γ succombaient à l'infection car une réponse Th2 précoce se met en place au détriment de la voie Th1 (Torre et al., 2002; Xu et al., 2002). Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans l'augmentation de la production d'Ac (principalement les immunoglobulines (Ig) de type G1 et G3, chez l'Homme ; et les IgG2a et IgG3 chez la souris) par les LB, permettant l'opsonisation et la phagocytose des cellules infectées. Les lymphocytes Th2 promeuvent la production d'IgG4 chez l'Homme, et d'IgG1 chez la souris (Wipasa et al., 2002).

Les cytokines produites au cours de l'infection permettent également l'activation d'autres cellules effectrices, comme les NK, actives dans l'élimination des parasites. D'autre part, il a été montré chez la souris que les LT CD4 $^+$ peuvent à eux seuls conférer une protection contre l'infection et contrôler la parasitémie en absence de LB (van der Heyde et al., 1994).

7.3.4.2. Immunité humorale anti-*Plasmodium*

Tout au long de l'infection, les deux principaux rôles de la réponse humorale sont la production d'Ac spécifiques des antigènes parasitaires et le passage d'une réponse Th1 à une réponse Th2.

Bien que les LT CD4 $^+$ soient capables de contrôler la parasitémie, la présence des LB est cruciale pour l'orientation vers une réponse Th2 et la résolution de l'infection (Langhorne et al., 1998; Taylor-Robinson et al., 1993). De plus, les modèles murins du paludisme ont permis d'établir que la déplétion en LB induisait des recrudescences chroniques (von der Weid et al., 1996).

La prémunition observée dans les populations endémiques est imputée aux Ac protecteurs dirigés contre la protéine PfEMP1 (Bull et al., 1998). D'autre part, le degré de protection immunitaire est corrélé avec le niveau d'Ac dirigés contre les antigènes des formes parasitaires asexuées, aussi bien chez l'Homme (Astagneau et al., 1995) que chez la souris (Hirunpetcharat et al., 1997).

7.3.5. Rôles des cytokines

Les cytokines constituent une large famille de petites protéines produites par les cellules immunitaires ou autres, et sont considérées comme des éléments à part entière du système immunitaire. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme l'inflammation, la réparation tissulaire, l'angiogenèse, la défense contre les pathogènes (revue : Feldmann, 2008), en constituant des réseaux de signalisation à travers tout l'organisme.

7.3.5.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Parmi les nombreuses cytokines pro-inflammatoires participant à la réponse immunitaire anti-*Plasmodium*, l'IL-12, l'IFN γ et le TNF α sont les plus importantes.

L'IL-12 : cette cytokine est sécrétée majoritairement par les cellules phagocytaires (monocytes/macrophages, cellules dendritiques et PNN). Elle induit la production d'IFN γ par les cellules NK et les LT (Agudelo et al., 2012; Stevenson and Riley, 2004), l'enclenchement de la réponse Th1 (Romagnani, 1999; Romani et al., 1997) et stimule la production d'Ac par les LB (Crutcher et al., 1995). Cette cytokine permet également la différenciation des LT CD4⁺ en cellules Th1 (O'Garra and Arai, 2000). D'autre part, de fortes concentrations en IL-12 modulent l'activité des macrophages, induisant une destruction des GR et une dysérythropoïèse (Crutcher et al., 1995; Luty et al., 2000).

L'IFN γ : produit majoritairement par les cellules NK et les LT (CD4⁺ & CD8⁺), il permet l'activation des PNN (Kumaratilake et al., 1991), des monocytes et des macrophages (Kumaratilake and Ferrante, 1994). Au stade pré-érythrocytaire (phase hépatique) de la maladie, l'IFN γ inhibe le développement des parasites (Schofield et al., 1987). Une étude a montré que des individus faisant un accès grave sécrétaient peu d'IFN γ comparés à ceux faisant un accès simple (Luty et al., 1999). De la même manière, les individus moins susceptibles à l'infection sécrètent des quantités importantes d'IFN γ (McCall and Sauerwein, 2010). D'autre part, cette cytokine confère chez l'Homme une protection contre la réinfection (Luty et al., 1999).

Le TNF α : Produit par les macrophages après leur activation, le TNF α est détecté dans la circulation des patients (Grau et al., 1989; Kwiatkowski et al., 1990) et inhibe la croissance du parasite durant le cycle intra-érythrocytaire (Cruz et al., 2016). Une étude a également montré que le TNF α issu de patients ou de souris infectées empêchait le développement *in vitro* du parasite dans les hépatocytes (Depinay et al., 2011). Cette cytokine régule par ailleurs la production d'IL-12 par les macrophages et la production d'IFN γ par les cellules NK (Tripp et al., 1993). Cependant, une forte concentration de TNF α est également corrélée avec la sévérité de la maladie chez les patients impaludés (Singh et al., 2000).

7.3.5.2. Les cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires ont pour rôle la diminution de l'inflammation. Au cours du paludisme, l'IL-10, l'IL-4 et le TGF β , ont un rôle prépondérant.

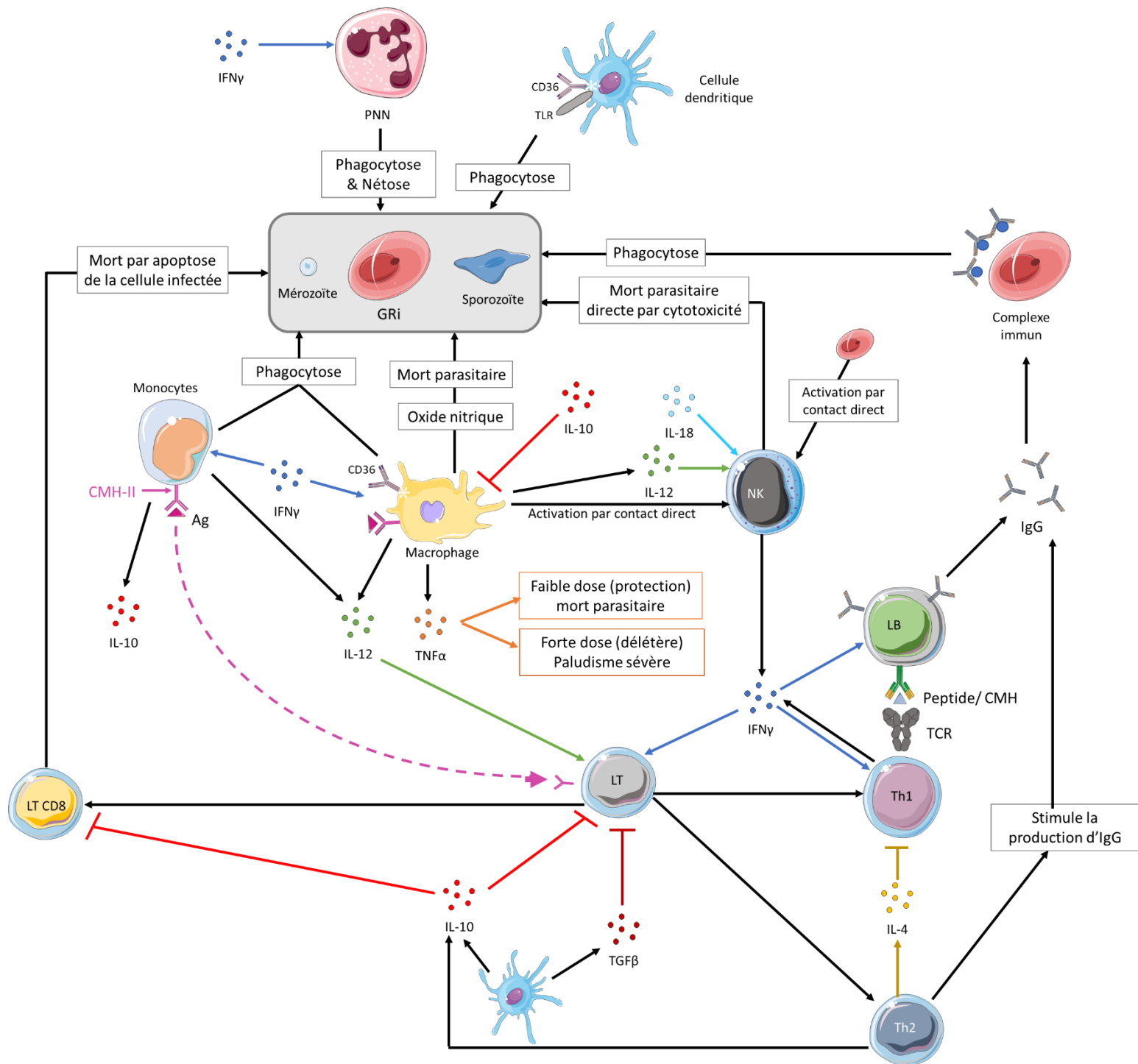
L'IL-4 : Produit par les cellules Th2, l'IL-4 active les basophiles et les mastocytes. Cette cytokine stimule la croissance des cellules Th2 et inhibe la production d'IFN γ , induisant l'inhibition fonctionnelle des cellules Th1 (Luty et al., 2000).

L'IL-10 : Produit par les monocytes, les cellules Th2, les LB et les cellules dendritiques, l'IL-10 régule négativement l'action des macrophages, ce qui a pour conséquence d'inhiber la production d'oxide nitrique, la diminution de leur capacité à présenter l'Ag, l'inhibition de l'IFN γ , l'IL-6, le TNF α et le GM-CSF (Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Akdis and Blaser, 1999). Cette cytokine inhibe également la production de cytokines par les cellules Th1 et les LT CD8⁺ (Stevenson and Riley, 2004). Dans le plasma de patients atteints de paludisme sévère, de fortes concentrations d'IL-10 ont été mesurées (Wenisch et al., 1995) ; tandis que de faibles concentrations en IL-10 sont associées à une anémie sévère (Kurtzhals et al., 1998). D'autre part, une étude a montré que cette cytokine pouvait moduler le métabolisme du fer durant l'infection palustre en régulant l'hepcidine, l'hormone hépatique contrôlant la disponibilité du fer dans l'organisme (Huang et al., 2014).

Le TGFβ (Transforming Growth Factor beta) : Produit par de nombreuses cellules comme les macrophages, les cellules NK, les LT, les LB et les cellules dendritiques, le TGFβ joue un rôle important dans la transition de la réponse pro-inflammatoire à la réponse anti-inflammatoire au cours de la phase aigüe et de la phase de résolution du paludisme (Tsunawaki et al., 1988). Une production précoce de TGFβ, en faible quantité, active les monocytes et les macrophages ce qui permet la phagocytose des parasites (Ferrante et al., 1990). Tandis que de fortes concentrations de TGFβ régulent négativement l'action des macrophages (Stevenson and Riley, 2004; Tsunawaki et al., 1988). D'autre part, une forte concentration de TGFβ précocement au cours de l'infection inhibe la production d'IFNγ et de TNFα et une faible concentration tardivement au cours de l'infection empêche le contrôle de la parasitémie due à une surproduction des cytokines produites par les cellules Th1 (Omer et al., 2000).

7.3.6. Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire de l'hôte au cours du paludisme



7.4. Mécanismes d'évasion de *Plasmodium* vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte

Face au déploiement des diverses actions des cellules de l'immunité pour combattre l'infection, *Plasmodium* utilise deux moyens principaux pour échapper à la réponse immunitaire :

La diversité antigénique : elle s'appuie sur deux phénomènes, l'un est le polymorphisme allélique résultant de mutations/recombinaisons génétiques, conduisant à l'existence de formes alternatives du gène codant pour un antigène ; l'autre est la variation antigénique, où une lignée clonale de parasites exprime successivement des formes alternatives d'un antigène sans modification de son génotype (Ferreira et al., 2004).

La séquestration : elle est réalisée par les produits des familles multigéniques *PfEMP-1*, *Var*, *Rifin* et *Stevor*. Ces protéines permettent l'adhérence des GR parasités à l'endothélium vasculaire, ce qui se traduit par leur séquestration dans les microcapillaires de différents organes et leur évite d'être éliminés (clairance) par la rate (Gomes et al., 2016).

8. Moyens d'étude du paludisme

8.1. Espèces palustres humaines : études *in vitro*

Les différentes phases du cycle biologique des espèces de *Plasmodium* infectant l'Homme ont été adaptées à la culture *in vitro* avec plus ou moins de succès. *P. falciparum* est la seule espèce pour laquelle les phases érythrocytaire et hépatique peuvent être maintenues en culture *in vitro* (Schuster, 2002).

Il existe de nombreuses souches de *P. falciparum*, issues à l'origine de patients, adaptées depuis plusieurs années en laboratoire (Trager and Jensen, 1976), telles que : FcB1, originaire de Colombie, résistante à la chloroquine ; F32, souche de Tanzanie, sensible à la chloroquine ; HB3, originaire du Honduras, sensible à la chloroquine et la pyriméthamine etc. Ces souches permettent l'étude de la biologie et de la génétique du parasite, de l'activité antiparasitaire de molécules potentiellement thérapeutiques, et de l'immunité dans un contexte contrôlé. Toutefois, les études *in vitro* ne reproduisent pas la complexité des interactions possibles entre le parasite et son hôte, c'est pourquoi des modèles *in vivo* ont également été développés.

8.2. Modèles animaux du paludisme : études *in vivo*

Il existe différents modèles animaux du paludisme, utilisant le singe, le canari, le canard, le rat ou la souris. Ces hôtes sont infectés par des espèces plasmodiales différentes, qui leurs sont propres. La combinaison espèce-hôte/ espèce plasmodiale est décrite comme un modèle expérimental du paludisme.

8.2.1. Les modèles murins du paludisme

Pour des raisons éthiques, économiques et pratiques, les modèles murins du paludisme sont les plus utilisés. Dans les années suivant la découverte par Vincke en 1948 que les parasites du paludisme infectent le rongeur Africain « thicket rat » (rat des fourrés), ces parasites ont été largement utilisés pour la recherche en laboratoire sur le paludisme. Quatre espèces plasmodiales ont ainsi été adaptées aux rongeurs de laboratoire : *Plasmodium berghei* (Vincke & Lips, 1948), *Plasmodium chabaudi* (Landau, 1965), *Plasmodium vinckei* (Rodhain, 1952) et *Plasmodium yoelii* (Landau and Killick-Kendrick, 1966). Toutes les souches et les clones parasitaires utilisés en laboratoire sont issus de ces 4 espèces plasmodiales. Ils ont été adaptés au rat ou à la souris, mais ils ont l'inconvénient de ne pas pouvoir être maintenus *in vitro*.

Ces espèces murines passent par les mêmes stades de développement que les espèces de *Plasmodium* humaines, avec qui elles présentent également de nombreuses similarités au niveaux génétique et phénotypique (Walliker et al., 1971). Cependant, chaque espèce plasmodiale murine a des caractéristiques qui lui sont propres (Tableau 2) (Stephens et al., 2012). Bien qu'un modèle animal unique ne reflète pas l'infection humaine, l'ensemble des modèles disponibles permet néanmoins une bonne compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu, de la pathogénèse des accès graves, et la découverte de molécules thérapeutiques potentielles.

TABLEAU 2 : CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES PARASITES MURINS DU PALUDISME.

	<i>P. berghei</i>	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. vinckei</i>	<i>P. yoelii</i>
Longueur moyenne des sporozoïtes (µm)	11	11,7	14,7-21	14
Diamètre moyen des schizontes hépatiques (µm)	27	38-45	35	35-50
Durée de la schizogonie hépatique (heures)	50	52-53	53-61	43-50
Durée de la schizogonie érythrocytaire (heures)	22-24	24	24	18
Préférence érythrocytaire	Réticulocytes	Normocytes	Normocytes	Réticulocytes
Synchronicité du cycle intra-érythrocytaire	Asynchrone	Synchrone	Synchrone	Asynchrone
Nombre de mérozoïtes par schizonte	12-18	6-8	6-12	12-18
Durée de la gamétogénèse (heures)	26-30	36	7	27

D'après Stephens, Culleton & Lamb, (2012) « The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria », Cell.

Le [tableau 3](#) présente pour chaque modèle murin du paludisme, le niveau de sévérité de l'infection et le domaine d'utilisation expérimentale (Li et al., 2001).

TABLEAU 3 : NIVEAU DE SEVERITE ET DOMAINE D'UTILISATION DES PLASMODIUM MURINS EN FONCTION DE L'HOTE.

Espèce de <i>Plasmodium</i>	Souche	Lignée de souris	Niveau de sévérité	Domaine d'utilisation expérimentale	
<i>P. berghei</i>	ANKA	BALB/c	Létal	Pathogénèse	
		C57BL/6		Paludisme cérébral/ séquestration	
		CBA			
	K173	BALB/c		Pathogénèse	
		CBA		Contrôle du paludisme cérébral	
		DBA			
	C57BL/6				
<i>P. chabaudi adami</i>		BALB/c C57BL/6	Non létal	Mécanismes immunitaires	
<i>P. chabaudi chabaudi (P. c. chabaudi)</i>	864VD	CBA	Non létal	Mécanismes immunitaires	
		BALB/c		Signes cliniques/ séquestration	
	AS	CBA		Létal	Mécanismes immunitaires
		C57BL/6			Signes cliniques/ séquestration
		BALB/c			
		129sv	Pathogénèse		
	A/J	Chimiothérapie ; résistance et susceptibilité ; mécanismes immunitaires			
	DBA/2				
	CB	CBA	Létal		
		C57BL/6			
<i>P. vinckei petteri</i>	CR	C57BL/6	Non létal	Mécanismes immunitaires	
		BALB/c			
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	Létal	Chimiothérapie ; pathogénèse ; signes cliniques/ séquestration	
<i>P. yoelii</i>	17XL	CBA	Létal	Mécanismes immunitaires	
		BALB/c			
		C57BL/6			
		DBA			
		Swiss		Pathogénèse ; paludisme cérébral/ séquestration	
	YM	CBA		Non létal	Vaccination
		BALB/c			Pathogénèse
		C57BL/6			Hypoglycémie
		DBA			
	17XNL	CBA		Non létal	Réponses immunitaires
		BALB/c	Vaccination		
		C57BL/6	Mécanismes immunitaires		
		DBA			

D'après Li, Seixas & Langhorne (2001) « Rodent malaria: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by erythrocytic stages of the parasite », Med Microbiol Immunol.

8.2.2. Le modèle murin à *P. chabaudi*

Le modèle murin *P. chabaudi* reflète le paludisme humain par de nombreux aspects pathologiques et immunologiques (Tableau 4 [A]). Comme *P. falciparum* chez les humains, *P. chabaudi* envahit à la fois les normocytes et les réticulocytes, et les GR infectés par les formes matures du parasite (schizontes) adhèrent à l'endothélium vasculaire (séquestration) et aux GR non infectés (rosetting = formation de rosettes). Comme dans le cas de *P. falciparum* aussi, les schizontes ne sont pratiquement jamais observés dans la circulation sanguine, et la séquestration résulte de la liaison des GRi à des récepteurs endothéliaux comme CD36 et aux molécules d'adhésion de type ICAM et VCAM.

On connaît à l'heure actuelle 3 sous-espèces de *P. chabaudi* : *P. chabaudi chabaudi* (*P. c. chabaudi*), isolée en République d'Afrique Centrale, *P. chabaudi adami*, isolée au Congo-Brazaville et une sous-espèce pas encore caractérisée, *P. chabaudi spp*, isolée au Cameroun.

La sous-espèce la plus utilisée est *P. c. chabaudi*, qui est généralement non létale et adhère à l'endothélium vasculaire, induit une infection chronique, et peut-être facilement transmise par *Anopheles stephensi*. *P. c. chabaudi* présente toutefois quelques différences avec *P. falciparum* (Tableau 4 [B]), comme l'organe préférentiel de séquestration, qui est le foie au lieu du cerveau, un niveau plus élevé de parasitémie circulante, des différences de symptômes comme une hypothermie plutôt qu'une hyperthermie, et des profils différents de parasitémie selon la lignée murine hôte.

Les modèles avec *P. c. chabaudi* sont utilisés dans de nombreux domaines expérimentaux comme l'étude de l'anémie, la variation antigénique et le mécanisme d'évasion au système immunitaire, la biologie du parasite (pénétration et sortie d'une cellule, fonction(s) des protéines parasitaires etc.), l'étude des ligands impliqués dans la séquestration, l'étude de la phase pré-érythrocytaire, la virulence et le paludisme congénital (revue : Stephens et al., 2012). D'autre part, la physiopathologie du paludisme à *P. c. chabaudi* montre certaines similitudes avec la physiopathologie du paludisme à *P. falciparum*, comme le développement d'une anémie sévère, la suppression temporaire de l'érythropoïèse, le développement d'une splénomégalie, d'une hépatomégalie et d'une hypoglycémie (Stephens et al., 2012). Au niveau immunitaire, le modèle murin reflète de manière assez proche ce qui se passe chez l'Homme, que ce soit en ce qui concerne les fonctions des cellules immunitaires ou le rôle des cytokines produites au cours de l'infection (Angulo and Fresno, 2002).

TABLEAU 4 : SIMILITUDES ET DIFFERENCES BIOLOGIQUES, PHYSIOPATHOLOGIQUES ET IMMUNITAIRES ENTRE *P. FALCIPARUM* ET *P. C. CHABAUDI*.

A. Similitudes biologiques, physiopathologiques et immunitaires entre *P. falciparum* et *P. c. chabaudi*.

	Similitudes
Biologie des parasites	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infection des GR matures (normocytes) ▪ Cycle intra-érythrocytaire synchrone ▪ Cytoadhérence
Physiopathologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anémie, suppression de l'érythropoïèse et thrombopénie ▪ Splénomégalie/ hépatomégalie ▪ Désorganisation de l'architecture splénique au cours de l'infection ▪ Hypoglycémie
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Monocytes : phagocytose des GRi ▪ Macrophages : production d'IL-12 ▪ IL-12 & IFNγ associée au contrôle de la parasitémie (Luty et al., 2000 ; Luty et al., 1999 ; Li, Seixas & Langhorne, 2001) ▪ Th1 favorise la résolution de l'infection ▪ Corrélation IgG avec la diminution de parasitémie

B. Différences biologiques, physiopathologiques et immunitaires entre *P. falciparum* et *P. c. chabaudi*.

	Différences	
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. chabaudi chabaudi</i>
Biologie des parasites	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parasitémie < 10% ▪ Adhérence grâce aux knobs ▪ Cycle érythrocytaire de 48h 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parasitémie jusqu'à 50% ▪ Adhérence via le récepteur CD36 ▪ Cycle érythrocytaire de 24h
Physiopathologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fièvre tierce ▪ Neuropaludisme ▪ Syndrome de détresse respiratoire aigüe ▪ Acidose métabolique 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypothermie ▪ Pas de neuropaludisme ▪ Non observé ▪ Niveau d'acidose non connu
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunité complète après de longues années de contact avec le parasite ▪ IFNγ produit essentiellement par Th1, mais aussi Th2 et Th17 en plus faible quantité ▪ Résistance associée aux Ac produits au cours des infections et aux cellules Th1 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunité complète contre la réinfection après la 1^{ère} infection ▪ IFNγ produit par les Th1 ▪ Production d'IL-12 associée à la résistance

D'après Stephens, Culleton & Lamb, (2012) «The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria», Cell ; Taylor-Robinson, (2010) «Regulation of immunity to Plasmodium: Implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design», Experimental Parasitology ; Taylor-Robinson, (1995) «Regulation of immunity to malaria : valuable lessons learned from murine models», Parasitology Today.

Un des avantages de l'espèce *P. chabaudi* est la disponibilité de nombreuses souches clonées ou non, bien caractérisées. Toutes ces souches sont synchrones. Elles présentent des niveaux différents de gravité, de séquestration, et de transmissibilité au moustique. Plusieurs stocks de différentes souches de différentes sous-espèces de *Plasmodium* murins sont disponibles dans les collections nationales du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN). Dans cette étude, nous avons utilisé la souche (non clonale) 864VD de *P. c. chabaudi*.

PARTIE 2 : LES PHOSPHOLIPASES A2

1. Généralités

Les phospholipases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester des phospholipides.

Les phospholipides cellulaires sont constitués d'une très grande variété d'espèces moléculaires qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Ils sont construits sur un squelette glycérol (glycérophospholipides) ou sphingosine (sphingolipides). Parmi les glycérophospholipides (glycéroPL), on distingue : l'acide phosphatidique, les lysophospholipides (lysoPL), les plasmalogènes, les cardiolipines, et les phosphatides, qui incluent : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

Les membranes biologiques sont constituées principalement de phospholipides, ainsi que d'une proportion variable de sphingolipides tels que la sphingomyéline et de stéroïdes tels que le cholestérol. Les phospholipides, lorsqu'ils se trouvent en milieu aqueux, s'organisent de façon à minimiser les interactions entre les queues aliphatiques (acides gras) et les molécules d'eau, adoptant par auto-assemblage moléculaire une configuration en micelles, liposomes, vésicules ou doubles couches lipidiques, dans lesquelles les têtes polaires sont en contact avec l'eau tandis que les queues aliphatiques se rassemblent pour former un milieu presque totalement anhydre. Les membranes biologiques sont formées d'une bicouche lipidique comportant un feuillet externe et un feuillet interne. La composition des feuillets est différente dans de nombreuses membranes. Les feuillets internes (cytoplasmiques) des GR humains sont essentiellement constitués de PE, de PS et de PI. Les feuillets externes, quant à eux, sont constitués essentiellement de PC, de sphingomyéline, et de glycolipides. La nature et la configuration des groupes présents sur les têtes hydrophiles des bicouches lipidiques déterminent les propriétés chimiques de leur surface. Le groupe de tête de la PC, qui constitue environ la moitié des phospholipides des cellules de mammifères, est la phosphocholine. C'est un groupe de tête zwitterionique, qui porte une charge électrique négative sur le groupe phosphate et une charge électrique positive sur l'ammonium quaternaire, la résultante étant une charge nulle pour l'ensemble de la molécule. Au pH physiologique, la tête hydrophile des autres phospholipides (PS, PE, PI, PG) est porteuse d'une charge électrique négative au niveau des groupes phosphate, ce qui peut jouer sur les interactions électrostatiques des petites molécules avec la bicouche lipidique.

La plupart des glycéroPL sont estérifiés en position *sn*-1 (stereospecific numbering) et *sn*-2 par un acide gras saturé et un acide gras insaturé respectivement. En position *sn*-3, on trouve une tête polaire : choline, sérine, éthanolamine, inositol, liée au squelette carboné par une liaison phosphodiester. Il y a donc quatre liaisons esters dans un glycéroPL : entre chacun des acides gras et le glycérol, entre le glycérol et le phosphate, entre le phosphate et l'alcool. Ces quatre liaisons esters sont susceptibles d'être hydrolysées par les estérases que sont les phospholipases.

Les phospholipases constituent une classe d'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse d'acyl-esters (activité déacylase) et d'esters de phosphate (activité phosphoestérase ou phosphohydrolase). Elles sont définies par la position de leur site de clivage sur le squelette phospholipidique (Figure 7).

En fonction du site de clivage, on distingue :

- La phospholipase A1 (PLA1 ; EC 3.1.1.32), qui hydrolyse la liaison ester en position *sn*-1 du glycérol. Il en résulte la libération de l'acide gras (généralement saturé) et d'un lysophospholipide.
- **La phospholipase A2 (PLA2 ; EC 3.1.1.4)**, qui hydrolyse la liaison ester en position *sn*-2 du glycérol ; libérant ainsi l'acide gras (généralement insaturé) et un lysophospholipide.
- La phospholipase C (PLC ; EC 3.1.4.10), qui hydrolyse la liaison ester entre le groupement phosphate et le glycérol, permettant la libération d'un diacylglycérol et d'un « phospho-alcool ».
- La phospholipase D (PLD ; EC 3.1.4.4), qui clive la liaison ester reliant l'alcool au phosphate, libérant un alcool et un acide phosphatidique.

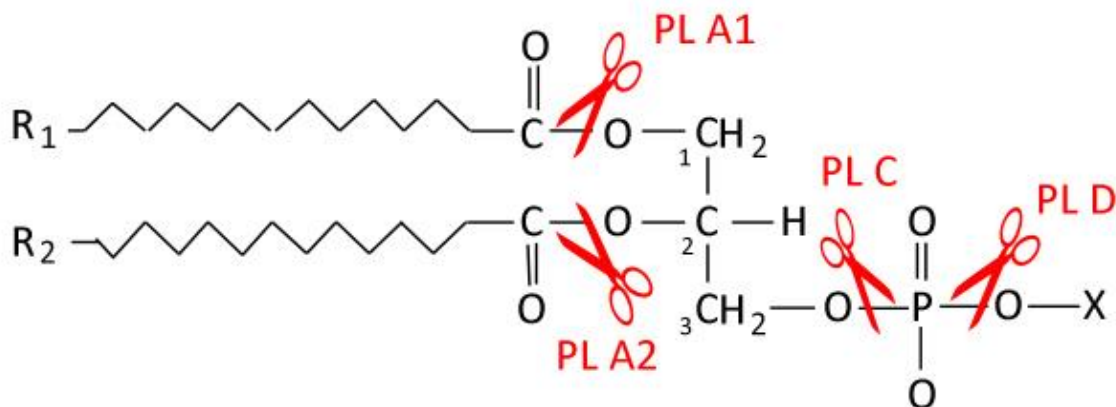


FIGURE 7 : SITES D'HYDROLYSE DES PHOSPHOLIPASES.

2. Les phospholipases A2

Historiquement, les PLA2 de venins d'animaux ont été les premières phospholipases décrites, avant leur découverte dans les tissus de mammifères. En 1877, Bokay observe qu'un élément du suc pancréatique a la capacité d'hydrolyser la PC. On sait aujourd'hui qu'il s'agissait de la PLA2 pancréatique (PLA2 sécrétée de groupe IB). Jusqu'en 1989, la PLA2 pancréatique était la seule PLA2 connue avant la découverte de la PLA2 sécrétée de groupe IIA, purifiée à partir de plaquettes et de liquide synovial rhumatoïde (Kramer et al., 1989). A la fin des années 1980, des activités intracellulaires de type PLA2 sont rapportées, et en 1992, JD Clark et RM Kramer font part du clonage de la première PLA2 cytosolique (cPLA2) humaine. A partir de là, un système de numérotation des PLA2 est établi (Group Numbering System) (Dennis, 1994). Depuis, toutes les PLA2 de mammifères connues actuellement ont été clonées, jusqu'à la plus récente, la PLA2 de groupe XVI, isolée du tissu adipeux (Duncan et

al., 2008; Jaworski et al., 2009). Les désignations actuelles des PLA2, fonction de la structure, du mécanisme d'action, de la localisation cellulaire, de la séquence génétique et de la dépendance au calcium, sont rapportées dans le tableau 5 (Dennis et al., 2011). Dans les 50 dernières années, six grands types de PLA2 ont été identifiés, à savoir : les PLA2 sécrétées (sPLA2), les PLA2 cytosoliques (cPLA2), les PLA2 indépendantes du calcium (iPLA2), les PLA2 de type PAF-acétylhydrolase (PAF-AH ou Lp-PLA2 pour lipoprotein-associated PLA2), les PLA2 lysosomales (L-PLA2), et les PLA2 du tissu adipeux (Ad-PLA2).

TABLEAU 5 : CLASSIFICATION DES PLA2

Type	Groupe	Sous-groupe	Masse moléculaire (kDa)	Résidus catalytiques
sPLA2	GI	A, B	13-15	Histidine/Asparagine
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA2	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ϵ), F(ζ)	60-114	Sérine/Asparagine
iPLA2	GVI	A1, A2(β), B(γ), C(δ), D(ϵ), E(ζ), F(η)	84-90	Sérine/Asparagine
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA2), B(PAF-AH II)	40-45	Sérine/Histidine/Asparagine
	GVIII	A(α_1), B(α_2), β	26-40	
L-PLA2	GXV		45	Sérine/Histidine/Asparagine
Ad-PLA2	GXVI		18	Histidine/Cystéine

D'après Dennis et al., (2011) « Phospholipase A(2) Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. », Chemical Reviews.

Les PLA2 ont en commun des éléments de structure et d'activité enzymatique, elles utilisent une dyade ou une triade catalytique pour hydrolyser la liaison ester des phospholipides. En revanche, leur localisation varie : les sPLA2 et Lp-PLA2 sont des enzymes sécrétées qui agissent sur les phospholipides dans le milieu extracellulaire, alors que les cPLA2 et iPLA2 hydrolysent les phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique et/ou les phospholipides des membranes des organites cellulaires. Les localisations des L-PLA2 et Ad-PLA2 sont mal connues.

2.1. PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium

Les PLA2 de groupe IV (cPLA2) sont actuellement au nombre de 6 (GIVA, GIVB, GIVC, GIVD, GIVE, GIVF). Ce sont des enzymes de haut poids moléculaire (60 à 114 kDa), dont l'activité est régulée par le calcium (en concentration micromolaire), et que l'on trouve dans les cellules de la plupart des tissus humains. La liaison de la protéine au calcium induit sa translocation vers une membrane phospholipidique. Son activité catalytique utilise une dyade sérine/asparagine (Ser/Asp). L'enzyme hydrolyse indifféremment la PC, la PE ou le PI, mais avec une forte spécificité pour l'acide arachidonique (AA) en position *sn*-2. L'AA est un précurseur des eicosanoïdes

(prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes etc.) impliqués dans la signalisation cellulaire, l'inflammation et la régulation du métabolisme (Ghosh et al., 2006). La cPLA2 a aussi une activité de lysophospholipase et de transacylase.

2.2. PLA2 indépendantes du calcium

Les iPLA2 (Groupe VI) ou « patatin-like » PLA2 (PNPLA2) sont des enzymes intracellulaires de haut poids moléculaire (84 à 90 kDa) qui fonctionnent en absence de calcium. Sept isoformes ont été identifiées (VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE, VIF). Les iPLA2 sont largement distribuées au sein des tissus humains. Elles pourraient jouer un rôle important dans le remodelage des phospholipides membranaires (Balsinde et al., 1995). Dans les cellules en apoptose, l'iPLA2 de groupe VIA est activée *via* une protéase de type caspase 3, induisant une augmentation d'acides gras responsable des changements membranaires (Atsumi et al., 2000).

2.3. La PAF-acétylhydrolase (PAF-AH)

La PAF-AH (pour Platelet-Activating Factor-Acetyl Hydrolase) est une enzyme indépendante du calcium, qui catalyse l'hydrolyse de l'acétyl ester en position *sn-2* du PAF (platelet activating factor). La famille des PAF-AH comporte 4 isoformes intracellulaires (PLA2 de groupe VIIB ou PAF-AH II ; PLA2 de groupe VIIIA ; PLA2 de groupe VIIB et PAF-AH Ib) et 1 isoforme sécrétée, que l'on trouve dans le plasma (appelée aussi Lp-PLA2, ou PLA2 de groupe VIIA). La majorité de la PAF-AH plasmatique est associée aux LDL, le reste est associé aux HDL et aux autres lipoprotéines plasmatiques. Les PAF-AH ont des caractéristiques biochimiques et structurales différentes. La PAF-AH plasmatique et la PAF-AH II dégradent non seulement le PAF mais aussi les phospholipides fragmentés au cours de processus d'oxydation. La PAF-AH plasmatique est l'objet de nombreuses études cliniques des maladies inflammatoires comme l'asthme, le sepsis (inflammation généralisée accompagnant une infection), et les maladies vasculaires, parce que son activité enzymatique est altérée chez les patients atteints de ces maladies (revue : Karasawa et al., 2003; Marathe et al., 2014).

2.4. Les phospholipases A2 sécrétées

Les sPLA2 (sPLA2 pour « secreted phospholipase A2 ») ont été les premières PLA2 à être découvertes. On les trouve dans des sources aussi diverses que les venins de serpents, scorpions, insectes (etc.), le suc pancréatique, le liquide synovial des patients atteints d'arthrite, et de nombreux tissus biologiques (Six and Dennis, 2000).

Les mammifères possèdent F12 sPLA2 majoritairement de petite taille (masse moléculaire ≈ 14 kDa), dépendantes de concentrations de l'ordre du 1 mM en calcium, fonctionnant avec la dyade catalytique Histidine-Asparagine (His-Asp), et appartenant aux groupes et sous-groupes : IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA et XIIB. Une 12^{ème} sPLA2 atypique de 95 kDa, l'otoconine-95, a été isolée de l'oreille interne des mammifères.

Les sPLA2 sont classées en 3 catégories : (1) les sPLA2 dites « classiques », incluant les groupes I, II, V et X ; (2) les sPLA2 « atypiques » incluant la sPLA2 de groupe III, et (3) la sPLA2 de groupe XII (Lambeau and Gelb, 2008; Murakami et al., 2015a) (Figure 8). Les sPLA2 « classiques » sont des enzymes de 14 à 19 kDa avec un domaine de liaison au calcium hautement conservé, un site catalytique His-Asp, 6 ponts disulfures conservés et 1 à 2 ponts disulfures variables, leur conférant un fort degré de stabilité. Les sPLA2 « atypiques » ont de faibles homologies avec les sPLA2 « classiques » mais conservent un domaine de liaison au calcium et un site catalytique His-Asp (Murakami and Kudo, 2002).

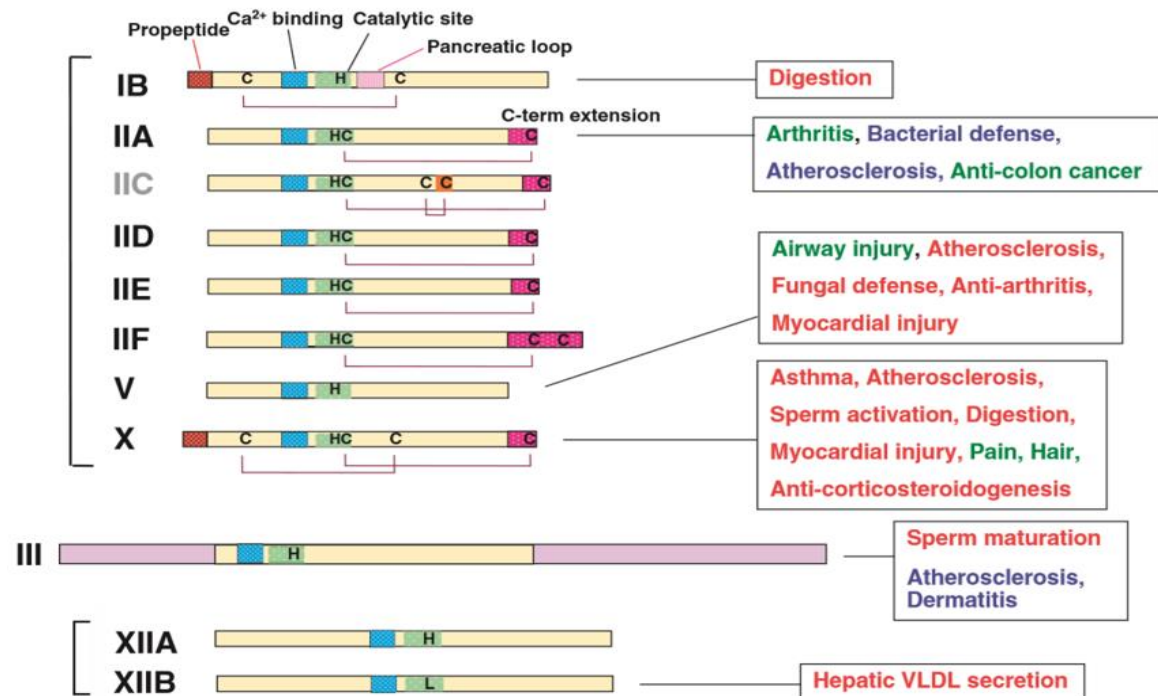


FIGURE 8 : LA FAMILLE DES sPLA2 ET LEURS PRINCIPALES FONCTIONS.

Les 3 catégories de sPLA2 ont un centre catalytique conservé avec une dyade Histidine/Asparagine et une boucle de liaison au calcium. Sauf la sPLA2 de groupe XIIB qui possède une leucine au lieu de l'histidine dans le centre catalytique, la rendant inactive. Les sPLA2 de groupes IB et X sont caractérisées par la présence d'un propeptide en N-terminal. Les autres sPLA2 n'ont pas de propeptide. Les fonctions biologiques assignées à chaque isoforme ont été obtenues par les souris knockout (en rouge), transgéniques (en bleu) ou les deux (en vert). D'après Murakami, Taketomi, Sato & Yamamoto, (2011) « Secreted phospholipase A2 revisited », The Journal of Biochemistry.

Chez l'Homme, on trouve 11 sPLA2, tandis qu'il en existe 12 chez la souris ; le gène de la sPLA2 de groupe IIC (hGIIC) étant un pseudogène chez l'Homme (Murakami et al., 2011; Murakami et al., 2016). Toutes les sPLA2 sont catalytiquement actives, excepté la sPLA2 de groupe XIIB, une mutation dans le site actif ayant remplacé l'histidine de la dyade catalytique par une leucine (Rouault et al., 2003).

Les sPLA2 de mammifères diffèrent par leurs fonctions physiologiques et physiopathologiques, par leur localisation tissulaire et également par leur préférence de substrat. Elles sont sécrétées par une grande variété de cellules et, à l'exception de l'otoconine-95, elles peuvent agir de manière autocrine ou paracrine sur des membranes cellulaires ou des phospholipides extracellulaires comme les lipoprotéines, le surfactant pulmonaire, les lipides alimentaires, les membranes microbiennes ou les vésicules extracellulaires (Murakami et al., 2011). En dehors de leurs fonctions digestives ou métaboliques, les sPLA2 sont essentiellement connues pour leur rôle dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques, qui nécessite la libération de précurseurs tels que l'AA.

3. Propriétés des phospholipases A2 sécrétées

3.1. Propriétés enzymatiques relatives aux substrats

L'activité catalytique des sPLA2 est strictement dépendante du calcium, elles possèdent toutes un site actif composé d'un site de liaison au calcium et d'une dyade catalytique. Cependant, l'interaction de chaque sPLA2 avec son substrat se fait par un domaine distinct du site catalytique appelé domaine de liaison interfaciale, ou i-domaine, surface plane de la protéine composée d'environ 20 acides aminés et de surface environ 1500 Å² (Figure 9). Les acides aminés constituant le i-domaine sont différents d'une enzyme à l'autre, et sa charge électrique globale peut être neutre, acide ou basique. Les interactions électrostatiques entre le i-domaine de la protéine et le substrat agrégé déterminent la force d'interaction entre une sPLA2 et son substrat. De ce fait, les sPLA2 ont des préférences de substrat différentes : la sPLA2 de groupe IIA a une forte affinité pour les surfaces phospholipidiques (substratum) chargées négativement, riches en phospholipides tels que le PG, la PS ou la PE, alors que les sPLA2 de groupes III, V et X ont une bonne affinité pour les surfaces neutres (zwitterioniques, chargées en PC) ou les surfaces anioniques. Par ailleurs, certaines sPLA2 peuvent aussi avoir des préférences vis-à-vis de la chaîne carbonée des acides gras en position *sn*-2 du glycérol. Par exemple, la sPLA2 de groupe V hydrolyse préférentiellement les phospholipides contenant des acides gras saturés (comme l'acide palmitique (C16 :0)) ou à faible degré d'insaturation (comme l'acide oléique (C18 :1)), et la sPLA2 de groupe X hydrolyse préférentiellement les phospholipides riches en acides gras polyinsaturés (comme l'AA (C20 :4) ou le DHA (C22 :6)) (Guillaume et al., 2015; Murakami et al., 2003; Pruzanski et al., 2005). Les sPLA2 des groupes IB, IIA et III n'ont pas de préférence quant au type d'acide gras présent en position *sn*-2 du glycérol.

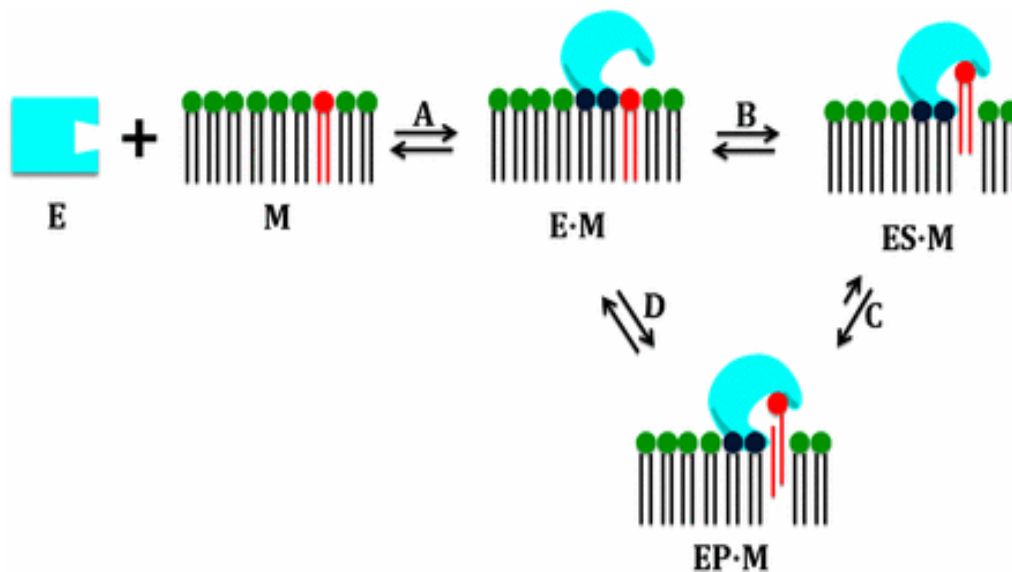


FIGURE 9 : REPRESENTATION DU CYCLE CATALYTIQUE D'UNE sPLA2.

(A) association de l'enzyme à la membrane sur le i-domaine. (B) Extraction et positionnement d'une seule molécule de phospholipide dans le site catalytique. (C) Hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 du phospholipide. (D) Diffusion des produits dans la membrane. E : enzyme ; M: membrane ; ES : enzyme-substrat ; EP : enzyme-produit. *D'après Varnavas et al., (2014) « Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A2, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates », PNAS.*

3.2. Les récepteurs des phospholipases A2 sécrétées

En plus d'agir par hydrolyse des phospholipides, les sPLA2 peuvent être biologiquement actives *via* leur fixation à un récepteur.

3.2.1. Les récepteurs de type N et M

Historiquement, deux types de récepteurs ont été identifiés grâce aux sPLA2 issues de venins animaux, notamment la neurotoxine OS₂ du venin du serpent taïpan *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Lambeau et al., 1989; Lambeau and Lazdunski, 1999; Lambeau et al., 1990) : les récepteurs de type N (« neuronal ») et de type M (« muscle »).

Le récepteur de type N a été identifié à l'origine dans le cerveau du rat (Lambeau et al., 1989), avant d'être observé dans le cœur, le foie, les poumons et les reins. Plusieurs sPLA2 de venins, comme la sPLA2 de venin d'abeille (sPLA2 de type groupe III), sont capables de se lier à ce récepteur avec une haute affinité, suggérant qu'il pourrait avoir un rôle dans les effets neurotoxiques de ces sPLA2 (Lambeau et al., 1989). Ce récepteur n'ayant pas été cloné, sa structure, son(ses) ligand(s) naturel(s) et son(ses) rôle(s) physiologique(s) sont de ce fait inconnu(s).

Le récepteur de type M (aussi nommé PLA2R1) a d'abord été identifié dans une culture de cellules de muscle squelettique de lapin (Lambeau et al., 1991; Lambeau et al., 1990), avant d'être retrouvé abondamment dans les reins de l'Homme, et en plus faible quantité dans le placenta, les poumons et le muscle squelettique

(Ancian et al., 1995). En fonction des espèces, la distribution tissulaire de ce récepteur est variable. Par exemple, chez la souris, on le retrouve majoritairement dans les reins, les poumons, le côlon et les glandes salivaires, tandis qu'il est présent à plus faible niveau dans le cœur et le foie (Cupillard et al., 1999). Le récepteur de type M est également présent à la surface de certains types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les macrophages, les PNN et les podocytes (Augert et al., 2009; Cupillard et al., 1997; Granata et al., 2005; Hanasaki and Arita, 2002; Rys-Sikora et al., 2000; Scott et al., 2006; Silliman et al., 2002).

Ce récepteur, de masse moléculaire de 180 kDa, appartient à la famille des lectines de type C, et lie différentes sPLA2 de type « conventionnelle » avec des affinités distinctes (Rouault et al., 2007). Il existe sous forme de protéine transmembranaire, contenant une longue région extracellulaire comportant 10 domaines distincts et un court domaine cytoplasmique, ou sous forme de protéine soluble, produite par épissage alternatif ou par excrétion du récepteur lié à la membrane (Ancian et al., 1995; Ishizaki et al., 1994; Lambeau et al., 1994). La liaison des sPLA2 au récepteur entraîne l'inhibition de leur activité catalytique. Les sPLA2 de groupe IB et X se lient fortement au récepteur, contrairement à la sPLA2 de venin d'abeille, de groupe III.

Il a été proposé que le récepteur M pourrait agir de 3 manières différentes : (1) comme un récepteur de clairance en inactivant les sPLA2 (Ancian et al., 1995; Zvaritch et al., 1996), (2) comme un transducteur de signaux dépendants des sPLA2 mais ne faisant pas intervenir leur activité enzymatique (Hanasaki and Arita, 2002) ; et (3) comme un récepteur pléiotropique pouvant lier alternativement d'autres ligands que les sPLA2 (Ancian et al., 1995; Rouault et al., 2007).

Enfin, il est important de noter que le récepteur M a été récemment impliqué dans deux maladies chez l'Homme. Dans le cancer, où il aurait un rôle antitumoral lié à sa capacité à induire la sénescence et/ou l'entrée en apoptose des cellules cancéreuses ou pré-cancéreuses, et dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse idiopathique, maladie rénale auto-immune où une population d'auto-anticorps dirigés contre PLA2R1 a été identifiée. PLA2R1 est fortement exprimé à la surface des podocytes du rein chez l'Homme, et la fixation des auto-anticorps serait susceptible d'entraîner un dysfonctionnement rénal (Beck et al., 2009; Girard et al., 2014).

3.2.2. Autres ligands des sPLA2

Les sPLA2 des groupes II, III et V sont capables de se lier aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), ce qui leur permet d'être à proximité de la membrane cellulaire. La liaison des sPLA2 aux HSPG, comme au récepteur M, peut entraîner l'internalisation de l'enzyme par la cellule par un mécanisme d'endocytose. D'autres molécules susceptibles de se lier aux sPLA2 ont été identifiées assez récemment, mais leur rôle éventuel reste à déterminer (Sribar and Krizaj, 2011).

3.3. Les inhibiteurs des sPLA2

Les inhibiteurs de sPLA2 sont importants pour analyser les effets biologiques des sPLA2. Ils pourraient à terme faire partie d'un arsenal thérapeutique dirigé contre certaines sPLA2 impliquées dans la pathogénèse de certaines maladies.

Les premières molécules découvertes capables d'inhiber les sPLA2 étaient des inhibiteurs non spécifiques, qui agissaient soit sur le substrat phospholipidique, comme la mépacrine (ou quinacrine), soit sur la sPLA2 en ciblant l'histidine du site actif (comme le bromophénacyl-bromide) (Reid, 2005) ou le domaine interfacial (cas du manoalide) (Balsinde et al., 1995; Dal Piaz et al., 2002; Reynolds et al., 1991).

A l'heure actuelle, il existe différents inhibiteurs compétitifs des sPLA2 comme les amides et phosphonates *sn-2*, qui sont des analogues de phospholipides et des inhibiteurs de type indole (comme les molécules LY311727, LY315920, LY329722, LY333013, méthyl-indoxam, indoxam) (Reid, 2005; Schevitz et al., 1995). Ces inhibiteurs n'ont pas les mêmes spécificités d'une sPLA2 à l'autre (Oslund et al., 2008).

Les tentatives cliniques d'utilisation d'inhibiteurs de sPLA2 dans certaines pathologies n'ont à ce jour pas été concluantes. Par exemple, il a été rapporté que dans le choc septique, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de la sPLA2 de groupe IIA, LY315920NA/S-5920, n'améliore pas l'état du patient (Zeiber et al., 2005).

A ce jour, aucun inhibiteur n'est capable d'inhiber l'activité enzymatique des sPLA2 des groupes III et XIA.

3.4. Propriétés protéolytiques des sPLA2

Une publication récente de Cavigliolo et Jayaraman indique que certaines sPLA2 auraient une activité protéolytique qui s'ajoute à leur activité lipolytique (Cavigliolo and Jayaraman, 2014). Les auteurs montrent que les sPLA2-IB bovine et porcine, la sPLA2-IIA humaine (hGIIA), et la sPLA2-III de venin d'abeille, ont la capacité de fragmenter l'apolipoprotéine A1 (apoA-1) délipidée. L'apoA-1 est une protéine constitutive des HDL. L'activité protéolytique des sPLA2 est indépendante du calcium, contrairement à leur activité phospholipolytique. Cette nouvelle fonction pourrait avoir des implications dans le domaine de la recherche sur l'athérosclérose, et plus généralement sur le métabolisme des lipoprotéines. Cependant, l'activité protéolytique des sPLA2 n'a été rapportée que dans cette étude et reste donc à confirmer.

4. Rôles physiologiques et physiopathologiques des phospholipases A2 sécrétées

Il semble que le maintien à l'homéostasie de la concentration en sPLA2 soit critique pour un certain nombre de fonctions physiologiques. En effet, certaines situations pathologiques comme l'athérosclérose, le cancer ou les désordres immuns, sont associées à des taux élevés de sPLA2 diverses (Murakami et al., 2015b).

Les sPLA2 sont généralement surexprimées dans les épisodes inflammatoires ou les maladies inflammatoires comme l'arthrite, l'athérosclérose ou le sepsis. Mais on les trouve aussi dans certains cancers comme le cancer du côlon, du pancréas ou de la prostate, et il semble que leur rôle puisse être délétère ou bénéfique selon l'isoforme considérée.

Les pathologies inflammatoires, où les sPLA2 sont surexprimées, s'accompagnent généralement d'une élévation de la concentration en AA. L'AA peut être métabolisé par les cellules en médiateurs pro-inflammatoires (eicosanoïdes) de type prostaglandines et leucotriènes, par l'intermédiaire des enzymes COX (cyclo-oxygénase) et 5-LOX (5-lipoxygénase). Ces médiateurs stimulent à leur tour la production de cytokines inflammatoires dont le TNF α et certaines interleukines.

La capacité des sPLA2 à enclencher les signaux cellulaires n'est pas toujours liée à leur activité catalytique. Elles peuvent aussi le faire en se liant à différents récepteurs (PLA2R) et aux glycosaminoglycanes (GAG, macromolécules glucidiques composant des matrices extracellulaires). Les sPLA2 de groupes IIA et V se lient à certaines isoformes de GAG comme le HSPG, la chondroïtine sulfate et l'héparine (revue : Quach et al., 2014).

De plus, certaines sPLA2 ont la capacité de se lier aux intégrines, aux récepteurs à activité tyrosine kinase, aux canaux ioniques (K⁺), ou à des protéines intracellulaires comme la calmoduline, ce qui pourrait être important pour leur localisation et leur activité de signalisation cellulaire (Sribar and Krizaj, 2011).

Il ressort donc que les sPLA2, bien qu'elles partagent des propriétés communes, ne remplissent pas automatiquement les mêmes fonctions. De plus, selon le contexte physiologique ou physiopathologique, une même sPLA2 peut avoir deux fonctions opposées. Ci-dessous sont regroupés les principaux rôles actuellement connus des sPLA2. Cette liste n'est pas exhaustive. Par ailleurs, l'otoconine-95, bien qu'appartenant à la famille des sPLA2 n'est pas décrite ici dans la mesure où il s'agit d'une protéine structurale de l'oreille interne non impliquée dans le métabolisme des phospholipides (Zhao et al., 2007; Wang et al., 1998).

La sPLA2 de groupe IB (sPLA2-IB) est principalement exprimée dans le pancréas, par les cellules acineuses pancréatiques (Nevalainen and Haapanen, 1993). Cette enzyme est activée dans le duodénum après clivage par la trypsine (Verheij et al., 1983). Dans ce cadre, son rôle est d'hydrolyser les phospholipides alimentaires, au cours de la digestion (Huggins et al., 2002).

Par ailleurs, une étude récente, *in vivo*, a montré que la sPLA2 de groupe IB avait une action antihelminthique, au niveau de l'intestin, sur le parasite *Heligmosomoides polygyrus* (nématode) en réduisant l'abondance phospholipidique à la surface des larves (Entwistle et al., 2017). Cette étude est la première à accorder un rôle antiparasitaire à une sPLA2 de mammifère, *in vivo*.

La sPLA2 de groupe IIC (sPLA2-IIC). Chez l'homme la sPLA2-IIC est un pseudogène. Il n'existe donc pas de protéine. Les études chez la souris ont permis de montrer que la sPLA2-IIC est surexprimée dans les hépatocytes

infectés par le virus de l'hépatite B et permet la libération de lyso-phosphatidyléthanolamine (LysoPE), qui présenté par les cellules CD1D participe à la réponse anti-virale (Zeissig et al., 2012).

La sPLA2 de groupe IID (sPLA2-IID) est la sPLA2 (avec la sPLA2 de groupe IIE) structurellement la plus proche de la sPLA2 de groupe IIA (Valentin et al., 1999b). Chez l'Homme et la souris, cette enzyme est principalement exprimée par les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate et les ganglions lymphatiques (Miki et al., 2013). Chez la souris, la sPLA2-IID est capable de mobiliser des acides gras polyinsaturés, qui sont métabolisés en médiateurs lipidiques « pro-résolvant », comme la résolvine D1 dérivée du DHA, ayant un rôle dans la résolution de l'inflammation par la suppression des cytokines produites par les cellules Th1 et l'activation des cellules dendritiques (Miki et al., 2013).

La sPLA2 de groupe IIE (sPLA2-IIE). *In vivo*, l'expression de la sPLA2-IIE est induite dans les adipocytes lors d'un repas riche en graisses. Cette enzyme altère la composition lipidique des lipoprotéines par hydrolyse des phospholipides anioniques, ce qui faciliterait l'accumulation de graisse dans le tissu adipeux et le foie (Sato et al., 2014).

Par ailleurs, la sPLA2-IIE présente dans les kératinocytes jouerait également un rôle dans l'homéostasie des follicules capillaires où son expression est corrélée au cycle capillaire (Yamamoto et al., 2016).

Chez la souris, cette enzyme est exprimée dans l'utérus, le tissu adipeux et la peau (Valentin et al., 1999a; Yamamoto et al., 2016). Chez l'Homme, il n'y a pas de preuve de son expression dans ces tissus. Toutefois, la sPLA2-IIA, un de ses proches homologues est exprimée dans la peau et le tissu adipeux chez l'Homme (Yamamoto et al., 2016). Il se pourrait que la sPLA2-IIA exerce chez l'Homme les fonctions que la sPLA2-IIE exerce chez la souris (Murakami et al., 2011).

La sPLA2 de groupe IIF (sPLA2-IIF) est abondamment exprimée au niveau de l'épiderme suprabasal. Le modèle *in vivo* a montré son implication dans l'acidification de la couche cornée de l'épiderme et son rôle dans la protection de la peau (Ilic et al., 2014).

La sPLA2 de groupe III (sPLA2-III) est une enzyme ayant un potentiel pro-inflammatoire dans diverses pathologies. Le modèle *in vivo* utilisant la souris transgénique *ApoE*^{-/-} surexprimant la sPLA2-III a montré une augmentation de l'athérosclérose due à une accélération de l'hydrolyse des LDL (low density lipoprotein) et une augmentation de la synthèse de thromboxane A2 (Sato et al., 2008). Ces souris développent également des inflammations dues à une augmentation de la formation d'eicosanoïdes (Sato et al., 2009).

Chez l'Homme, la sPLA2-III est un biomarqueur candidat pour le cancer du côlon (Mounier et al., 2008) et certains polymorphismes sont corrélés à un haut risque de cancer du côlon (Hoeft et al., 2010).

Dans un modèle neuronal humain, cette enzyme est induite lors d'un stress oxydatif et des polymorphismes de la sPLA2-III seraient associés à la maladie d'Alzheimer (Martínez-García et al., 2010).

Par ailleurs, la sPLA2-III est également présente au niveau de l'épithélium de l'épididyme où elle agit sur les spermatozoïdes immatures pour remodeler les phospholipides (Sato et al., 2010).

La sPLA2 de groupe V (sPLA2-V). L'expression de la sPLA2-V est principalement induite par les cytokines IL-4 et IL-13 produites par les cellules Th2, et plus faiblement par des stimuli pro-inflammatoires (lipopolysaccharide (LPS), zymosan, cytokines des cellules Th1) (Ohta et al., 2013; Rubio et al., 2015; Sato et al., 2014). Selon le contexte pathologique, cette enzyme peut jouer un rôle pro- ou anti-inflammatoire.

Chez la souris, la sPLA2-V est exprimée dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages alvéolaires. La souris *Pla2g5^{-/-}* est protégée de certaines pathologies respiratoires (Meliton et al., 2013; Muñoz et al., 2007; Muñoz et al., 2009). A l'opposé, des souris transgéniques surexprimant la sPLA2-V développent une détresse respiratoire et meurent prématurément (Ohtsuki et al., 2006). Ce phénotype transgénique a été attribué à une hydrolyse aberrante des phospholipides du surfactant pulmonaire.

Par ailleurs, les souris *Pla2g5^{-/-}*, où l'activité phagocytaire des macrophages est réduite, sont plus sensibles aux infections par *Candida albicans* ou *Escherichia coli* et à l'arthrite (Balestrieri et al., 2009; Boilard et al., 2010; Degousee et al., 2011).

La sPLA2-V a également été impliquée dans le développement de l'athérosclérose et d'autres désordres cardiovasculaires (Murakami et al., 2015b).

Dans les désordres du métabolisme, comme l'obésité, cette enzyme joue un rôle protecteur en hydrolysant la PC des LDL et en établissant un équilibre immunitaire qui empêche l'inflammation du tissu adipeux (Sato et al., 2014). Chez l'Homme, les polymorphismes du gène *Pla2g5* sont associés à des niveaux différents de LDL chez les patients présentant un diabète de type 2 (Wootton et al., 2007).

La sPLA2 de groupe X (sPLA2-X). Comme la sPLA2-IB, la sPLA2-X est synthétisée sous forme de proenzyme, et rendue active par l'élimination d'un propeptide en position N-terminal (Cupillard et al., 1997). Ce processus peut avoir lieu avant ou après la sécrétion de la protéine (Jemel et al., 2011; Masuda et al., 2005). Dans la famille des sPLA2, la groupe X est celle qui présente la plus haute affinité pour la PC, et donc celle qui a la plus grande capacité à hydrolyser des phospholipides membranaires des cellules saines (Bezzine et al., 2000).

Les souris *Pla2g10^{-/-}* présentent une réponse à l'asthme atténuée (Henderson, Chi, Bollinger, Tien et al., 2007) et sont partiellement protégées de la première phase d'inflammation pulmonaire dans le modèle de la grippe (Kelvin et al., 2014). Chez l'Homme, la sPLA2-X est une des sPLA2 les plus fortement détectées dans les voies aériennes des patients asthmatiques (Hallstrand et al., 2011).

Les souris *Pla2g10*^{-/-} sont également protégées des infarctus du myocarde et de l'anévrisme (Fujioka et al., 2008; Watanabe et al., 2012), ont une douleur inflammatoire réduite (Sato et al., 2011) et présentent une altération de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β , ce qui pourrait être dû à une réduction de la synthèse de prostaglandine E2 (Shridas et al., 2014).

Par ailleurs, les résultats de plusieurs études concernant cette enzyme sont contradictoires. Par exemple chez la souris, certaines études démontrent son implication ou non dans l'athérosclérose (Ait-Oufella et al., 2013); dans l'altération ou non de la fonction des macrophages (Shridas et al., 2011); ou encore dans l'augmentation ou la diminution de l'accumulation de graisses dans les adipocytes (Li et al., 2010; Sato et al., 2011).

La sPLA2-X est principalement exprimée dans le tractus gastrointestinal et les organes reproducteurs (Sato et al., 2011). Elle est la deuxième sPLA2 (avec la sPLA2-IB) impliquée dans la digestion des lipides alimentaires (Sato et al., 2011). En parallèle, l'expression de la sPLA2-X dans les intestins pourrait altérer le microbiote, ce qui pourrait, dans un second temps, influencer l'immunité et la balance métabolique de l'hôte (Ley et al., 2005; Mazmanian et al., 2005; Tremaroli and Backhed, 2012).

En ce qui concerne les organes reproducteurs, la sPLA2-X est stockée au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes (Escoffier et al., 2010), d'où elle est relarguée par la cellule activée durant la réaction acrosomique. Les souris *Pla2g10*^{-/-} présentent une faible réaction acrosomique et une faible fertilité (Escoffier et al., 2010; Sato et al., 2011).

De plus, l'enzyme a également été impliquée dans le développement du cancer du sein, où elle stimulerait la formation de gouttelettes lipidiques et l'oxydation des acides gras (Pucer et al., 2013).

Enfin, une dernière fonction pouvant être citée est son activité antivirale *in vitro* contre le VIH, résultant de la dégradation de la membrane virale (Fenard et al., 1999; Kim et al., 2007).

Les sPLA2 de groupe XII (sPLA2-XII) incluent les isoformes sPLA2-XIIA et -XIIB. La sPLA2-XIIA est exprimée dans de nombreux tissus mais la souris transgénique *Pla2g12a*^{-/-} n'existant pas, ses fonctions physiologiques ne sont pas connues. *In vitro*, cette enzyme est capable de tuer des bactéries Gram négatif, comme *Helicobacter pylori* (Huhtinen et al., 2006; Koduri et al., 2002). Par ailleurs, la surexpression de la sPLA2-XIIA dans des embryons de xénope (*Xenopus laevis*) induit la neurogénèse des structures olfactives (Muñoz-Sanjuan and Brivanlou, 2005). Chez l'Homme, il existe une association entre le polymorphisme de la sPLA2-XIIA et la réponse au traitement anti-facteurs de croissance des endothéliums vasculaires chez les patients atteints d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge (Wang et al., 2012).

La sPLA2-XIIB, catalytiquement inactive, est exprimée dans le foie et la souris *Pla2g12b*^{-/-} présente une stéato-hépatite due à l'altération de la sécrétion des VLDL (very-low-density lipoprotein) (Guan et al., 2011).

5. La phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA

Un intérêt particulier est porté ici à la sPLA2-IIA humaine (ou hGIIA), dans la mesure où son rôle potentiel dans le paludisme fait l'objet de cette thèse.

Chez l'Homme, le gène codant la sPLA2 de groupe IIA est situé sur le chromosome 1 (Kramer et al., 1989). La région promotrice du gène contient une TATA box et une CAAT box ainsi que différents éléments nécessaires pour la liaison aux facteurs de transcription AP-1, C/EBPs, CREB, NFκB, STAT et PPARγ (Couturier et al., 1999; Crowl et al., 1991). Dans plusieurs cellules, l'induction de la synthèse de sPLA2-IIA est sous le contrôle de la voie cPLA2α-12/15-lipoxygénase (Couturier et al., 1999; Kuwata et al., 2000) ou de stimuli pro-inflammatoires *via* le TNFα, l'IL1, l'IL-6 ou le LPS (Oka and Arita, 1991). Elle est régulée négativement par des cytokines anti-inflammatoires et les glucocorticoïdes (Nakano et al., 1990).

Chez l'Homme, on trouve, en situation d'homéostasie, la sPLA2-IIA dans différents organes et tissus comme l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléum, le côlon, ou au niveau des cellules de Paneth dans des granules de sécrétion (Nevalainen and Haapanen, 1993). Cependant, la source la plus importante de sPLA2-IIA est dans le cartilage, au niveau des chondrocytes et de la matrice cartilagineuse (Nevalainen and Haapanen, 1993). Bien que la protéine soit présente, la concentration en sPLA2-IIA est beaucoup plus faible dans les autres organes comme le pancréas, le foie, la rate et le placenta (Nevalainen and Haapanen, 1993). Par ailleurs, cette enzyme est sécrétée par certaines cellules sanguines telles que les leucocytes polynucléaires (Franson et al., 1977), les macrophages (Vadas and Hay, 1980), ou encore les plaquettes (Jesse and Franson, 1979).

La sPLA2-IIA est à ce jour la seule sPLA2 détectée dans la circulation sanguine de manière constitutive (en concentration de l'ordre de 0,01-0,1 nM). Toutefois, la sPLA2-IB est également présente dans le sérum sous forme de proenzyme. La concentration en sPLA2-IIA augmente en conditions pathologiques, comme dans l'arthrite rhumatoïde (Seilhamer et al., 1989), l'asthme (Bowton et al., 1997), les accidents cardiovasculaires (Koenig et al., 2009) et certaines pathologies infectieuses (Vadas et al., 1993) ; (Grönroos et al., 2002). Cette enzyme est souvent qualifiée de « sPLA2 inflammatoire » du fait de l'augmentation de sa concentration par des stimuli pro-inflammatoires, et son niveau élevé dans le sérum ou les exsudats inflammatoires, corrélé à la sévérité de l'inflammation (Kramer et al., 1989; Pruzanski and Vadas, 1991; Seilhamer et al., 1989).

On lui attribue un rôle dans l'immunité innée, en particulier dans la défense antibactérienne, par sa capacité à dégrader les membranes bactériennes riches en PG et PE (Weinrauch et al., 1998). Son mode d'action à l'égard des bactéries Gram+ est différent de celui des bactéries Gram-. Les bactéries Gram+ ne possèdent pas de membrane externe ni de LPS, dans ce cas, la sPLA2-IIA a une action phospholipolytique directe sur la membrane cytoplasmique bactérienne, après traversée du peptidoglycane (Koduri et al., 2002). En revanche, les bactéries Gram- possèdent une membrane externe asymétrique présentant une épaisseur de LPS résistante aux sPLA2. Dans ce cas de figure, l'action phospholipolytique de la sPLA2-IIA requiert l'action préalable de la protéine BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) ou du complexe d'attaque membranaire du complément (Laine et al., 2000b; Madsen et al., 1996; Weiss et al., 1994).

6. Apport des modèles animaux à l'étude du rôle de la sPLA2-IIA dans un contexte physiologique ou physiopathologique

Depuis quelques années, l'étude du rôle des sPLA2 dans diverses pathologies s'est tournée vers les modèles animaux génétiquement modifiés. Les fonctions de plusieurs sPLA2 *in vivo* ont ainsi été découvertes, grâce à l'utilisation de souris transgéniques et « knock-out ». Comme nous l'avons vu, individuellement les sPLA2 ont des localisations tissulaires et cellulaires différentes et des propriétés enzymatiques spécifiques, ce qui suggère qu'elles pourraient avoir des rôles physiologiques et physiopathologiques différents. L'insertion d'un transgène chez la souris permet d'obtenir des informations sur l'activité potentielle de l'enzyme au sein de la cellule ou du tissu qui l'exprime, tandis que l'élimination du gène permet d'obtenir des informations sur la fonction biologique de la sPLA2.

Des lignées de souris KO pour le gène murin, ainsi que des lignées transgéniques pour le gène murin ou humain ont été construites. Dans le deuxième cas, l'insertion du transgène a été faite chez des souris naturellement KO pour le gène de la sPLA2, comme les souris C57BL/6 et 129Sv, dont le gène *Pla2g2a* présente une mutation « frame-shift » dans l'exon 3 (Kennedy et al., 1995).

6.1. La souris transgénique pour la phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA humaine (hGIIA)

L'étude *in vivo* de la hGIIA a été facilitée par la création, par la société Chrysalis DNX Transgenic Sciences (Princeton, NJ, USA), en 1996, d'une souris C57BL/6 génétiquement modifiée (Grass et al., 1996). C'est cette lignée qui est utilisée dans notre étude.

6.2. Construction et caractéristiques de la lignée transgénique

Le génome d'une souris (*Mus musculus*) contient 12 gènes codant pour les sPLA2 murines mGIB, mGIIA, mGIIIC, mGIIID, mGIIIE, mGIIIF, mGIIL, mGV, mGX, mGXIIA, mGXIIB et l'otoconine (Murakami et al., 2011). Contrairement à certaines lignées de laboratoire (BALB/c, C3H/HE, DBA/1 etc.), mais comme d'autres (129/Sv, B10.RIII) les souris C57BL/6 ne synthétisent pas de sPLA2-IIA murine fonctionnelle (mGIIA) (Kennedy et al., 1995). En effet, le gène *Pla2g2a* contient une mutation « indel », correspondant à l'insertion d'une thymine en position 166 dans l'exon 3 du gène, conduisant à un décalage de lecture (frameshift). Il en résulte un dysfonctionnement du domaine de liaison au calcium (calcium-binding domain) et une perte de l'activité des domaines codés par les exons 4 et 5. Cette mutation naturelle aboutit à la traduction d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Les souris C57BL/6 WT sont homozygotes pour cette déficience.

La lignée de souris transgénique a été produite par micro-injection d'un fragment de restriction HindIII de 6,2 kb contenant le gène *Pla2g2a* humain, dans des embryons (stade 1 cellule) F2 hybrides (C57BL/6 x SJL) (Grass et al., 1996). Les embryons ont ensuite été transférés dans une mère receveuse ICR pseudo-gestante et la grossesse a été menée à terme selon la méthode standard (Hogan and Klein, 1994). Les souris transgéniques pour la hGIIA obtenues ont été croisées avec des souris C57BL/6J pour produire les animaux G1. Quatre lignées G1 de souris transgéniques ont été obtenues, avec un nombre variable de copies du transgène, résultant de la technique dite « d'insertion aléatoire » utilisée à l'époque. Il est important de signaler que les auteurs ont montré que le nombre de copies chez une souris n'avait pas d'influence sur le niveau d'activité sPLA2 circulant chez cette souris (Grass et al., 1996). Le transgène contient le gène *Pla2g2a* complet (5 exons et 4 introns) prolongé d'une extrémité 5'-flanquante de 1,6 kb et d'une extrémité 3'-flanquante de 0,35 kb. Le transgène contient les régions régulatrices humaines et est susceptible d'être régulé par ses promoteurs naturels, parmi lesquels on compte : l'IL-1, l'IL-6, le TNF α , ou le LPS.

Le premier phénotype observé chez les souris transgéniques, qui expriment le gène humain de façon constitutive, est une peau anormale, avec hyperplasie épidermique, hyperkératose et alopecie, mais sans inflammation apparente (Grass et al., 1996). Chez ces souris, la protéine hGIIA a été détectée par immunomarquage dans différents tissus : en grande quantité dans les hépatocytes, l'aorte, les chondrocytes, le derme et les cellules des tubes proximaux du rein, et en quantité plus faible dans la capsule de Bowman, le mésangium glomérulaire, la muqueuse et les muscles lisses de la vessie, la matrice osseuse, les tendons, la peau et les cellules de l'épithélium bronchique (Nevalainen et al., 1997). La présence de l'enzyme dans les différents tissus n'induit pas de différence histologique par rapport aux souris WT (Grass et al., 1996).

D'un point de vue hématologique, différents aspects chez la souris transgénique pour la hGIIA ont aussi été notés : 1) la hGIIA circule constitutivement dans leur plasma, sous une forme enzymatiquement active ; 2) les leucocytes sont plus nombreux et plus riches en PNN et lymphocytes que chez les souris non-transgéniques (Laine et al., 2000a) ; 3) le taux circulant de HDL est plus bas et les particules sont plus petites, avec 11% de phospholipides en moins, que chez les souris non-transgéniques (de Beer et al., 1997). En revanche, le taux de cholestérol LDL et VLDL est plus élevé (Ivandic et al., 1999).

6.3. Utilisation de la souris transgénique pour la sPLA2-IIA humaine dans l'étude des pathologies humaines

La souris transgénique pour la hGIIA a été utilisée dans le cadre d'études sur l'athérosclérose, le cancer, les infections bactériennes, et les maladies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde.

La fonction la plus évidente de la hGIIA est sans doute son activité antibactérienne, résultant de sa capacité à s'attaquer sélectivement aux membranes bactériennes, riches en phospholipides anioniques (PE et PG) (Singer et al., 2002). Il a été montré que les souris transgéniques résistent mieux à l'infection par

Staphylococcus aureus et *Bacillus anthracis* (Gram+) (Piris-Gimenez et al., 2005), ou *Escherichia coli* (Gram-) que les souris WT (Weiss, 2015). Elles sont aussi protégées contre les infections à streptocoque B (Mouvert et al., 2013).

La lignée transgénique a été utilisée pour l'étude de l'athérosclérose. Les souris transgéniques font spontanément de l'athérosclérose en absence d'hyperlipidémie, ce qui semble indiquer que la hGIIA est un acteur direct dans l'athérosclérose (Ivandic et al., 1999). Dans la mesure où le lipoprotéinogramme des souris est affecté et que l'activité paraoxonase du sérum est diminuée, ceci suggère que les modifications des lipoprotéines pourraient être impliquées dans l'effet pro-athérogénique de la hGIIA. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que très récemment, l'utilisation des souris transgéniques a montré que la hGIIA augmente la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, empêchant l'obésité de s'installer chez des souris nourries avec un régime riche en graisses (Kuefner et al., 2017).

Chez l'Homme, le niveau de hGIIA dans le sérum ou les exsudats inflammatoires est corrélé à la sévérité de l'inflammation ou de l'atteinte aux tissus (Pruzanski and Vadas, 1991). Parce qu'elle est induite par des stimuli pro-inflammatoires et qu'elle peut potentiellement libérer de l'AA, la hGIIA a longtemps été considérée comme un des acteurs du métabolisme de l'AA sur les sites inflammatoires. Cependant, les évidences *in vivo* manquaient.

Son rôle dans différents cancers, en particulier le cancer du côlon, a fait l'objet de nombreuses études *in vivo* (revue : Park et al., 2012). Les modèles expérimentaux *in vivo* ont aussi permis de mettre en évidence son implication dans le contrôle du développement tumoral dans les cas de tumeurs gastrointestinales (Cormier et al., 1997; MacPhee et al., 1995). Dans d'autres types de cancer, au contraire, l'expression de la hGIIA est corrélée positivement avec le développement du cancer : c'est le cas du cancer de la prostate (Graff et al., 2001; Sved et al., 2004), de l'œsophage (Mauchley et al., 2010) ou le cancer du poumon (Yu et al., 2012a; Yu et al., 2012b). Cette enzyme pourrait donc avoir différents impacts selon le type de cancer considéré.

PARTIE 3 : sPLA2 et protistes parasites

Dans le monde des parasites, les sPLA2 sont impliquées à la fois comme acteurs de la biologie des parasites et dans la physiopathologie de l'hôte infecté, mais aussi comme outils thérapeutiques potentiels dans la lutte contre ces microorganismes.

1. Potentialités antiparasitaires des sPLA2

Divers venins, fractions de venins ou molécules issues de venins ont été testés pour leurs propriétés antiparasitaires potentielles. Les sPLA2 de venins font partie dans ce contexte, des molécules les plus largement étudiées. Elles sont à la fois considérées comme des moyens pour lutter contre les maladies parasitaires, et comme des outils pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces maladies.

Quelques exemples : chez le trypanosome africain *Trypanosoma brucei brucei*, la sPLA2 de venin d'abeille s'est révélée très active contre le parasite en culture *in vitro* (Boutrin et al., 2008). De même, chez les leishmanies, BnSP-7, une sPLA2 sans activité catalytique issue du venin du serpent *Bothrops pauloensis*, est active contre les formes amastigote et promastigote de *Leishmania (L.) amazonensis* (Nunes et al., 2013) ; et la sPLA2 du venin du crotale *Crotalus durissus terrificus* est active *in vitro* contre *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Barros et al., 2015).

Dans le paludisme, des travaux originaux dédiés à la recherche de moyens de blocage de la transmission de la maladie, ont testé les capacités des sPLA2 de *Crotalus adamanteus* et d'*Apis mellifera*, et montré qu'elles pouvaient bloquer la formation des oocystes de *P. falciparum* chez le moustique. Ce blocage est indépendant de l'activité catalytique des enzymes, et semble résulter de l'attachement de la sPLA2 à l'épithélium intestinal de l'insecte, qui empêche l'ookinète de se fixer (Zieler et al., 2001). En 2002, le groupe de Jacobs-Lorena a inséré dans le génome d'*Anopheles stephensi* le gène de la sPLA2 de venin d'abeille sous contrôle d'un promoteur inductible par le repas sanguin du moustique, et montré que la transmission du *Plasmodium* murin *P. berghei* à des souris *via* ce moustique transgénique est largement compromise (Moreira et al., 2002). Cependant, les tests de « fitness » du moustique transgénique, en termes de survie, fécondité, fertilité, et avantages sélectifs vis-à-vis des moustiques non-transgéniques, étaient au désavantage du moustique transgénique (Moreira et al., 2004). C'est pourquoi un nouveau moustique transgénique a été construit avec *Aedes fluviatilis*, chez qui un gène muté au niveau du site actif de l'enzyme a été inséré, de façon à éliminer les effets délétères pour le moustique de l'activité sPLA2 (Rodrigues et al., 2008), ce qui a permis d'améliorer les performances du moustique en termes de « fitness » (Smith et al., 2013).

Des sPLA2 issues de venins animaux ont aussi été testées vis-à-vis de la phase sanguine du développement de *P. falciparum in vitro*. Les études effectuées au MNHN ont montré que plusieurs sPLA2, et particulièrement la sPLA2 de venin d'abeille (*Apis mellifera*), inhibent le parasite en culture, par un mécanisme indirect faisant appel à l'hydrolyse enzymatique des lipoprotéines contenues dans le plasma humain ajouté au milieu de culture du parasite (Guillaume et al., 2004; Rouault et al., 2006). La sPLA2 de venin d'abeille se lie sélectivement aux

lipoprotéines et les hydrolyse, libérant des acides gras poly-insaturés (PUFA) comme l'AA ou le DHA, toxiques pour le parasite (Guillaume et al., 2006).

2. PLA2 des protistes parasites

Les PLA2 d'origine parasitaire ont été relativement peu étudiées. Cependant, elles peuvent jouer un rôle important, et différentes études mettent en avant leur implication dans l'invasion des cellules-hôtes. Nous présenterons ici quelques descriptions qui ont été faites des activités PLA2 chez certains microorganismes parasites responsables de maladies humaines.

Toxoplasma : le toxoplasme est un parasite intracellulaire des macrophages, agent de la toxoplasmose. Une PLA2 indépendante du calcium de type patatine (TgPL1), importante pour la survie du parasite dans les macrophages activés a été identifiée chez *Toxoplasma gondii* en 2012. La délétion du gène de *Tgpl1* conduit à la dégradation intracellulaire du parasite ; TgPL1 est catalytiquement inactive (Tobin and Knoll, 2012). Depuis, 6 gènes contenant des domaines de type patatine (PLP – patatin like-protein) ont été identifiés chez le parasite, dont 4 coderaient pour des enzymes actives (site actif « normal »). TgPL2 serait essentiel au maintien de l'intégrité de la membrane de l'apicoplaste (Leveque et al., 2017). TgPL3, qui pourrait être important pour la virulence du parasite, est actuellement à l'étude.

Trypanosoma : le trypanosome est un parasite responsable des trypanosomiasés. Des travaux assez anciens (1993) ont fait état d'une PLA2 hautement spécifique des dimyristoyl-PC et dioeloyl-PC chez *Trypanosoma congolense*. Cette PLA2 aurait des propriétés hémolytiques et anticoagulantes (Nok et al., 1993). En 1998, d'autres études mettent en évidence chez *Trypanosoma brucei* une activité PLA2 d'origine parasitaire capable de libérer de l'AA à partir de substrats phospholipidiques (Eintracht et al., 1998). En 2001, Ridgley et Ruben montrent qu'il existe chez *Trypanosoma brucei brucei* et *Trypanosoma brucei gambiense*, une activité d'hydrolyse des phospholipides faisant appel à une déacylation séquentielle due à une activité PLA1 suivie d'une activité lysoPL (Ridgley and Ruben, 2001). Une autre étude a montré une activité enzymatique de type PLA2, indépendante du calcium et stimulée par le Triton X-100, chez *Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei brucei* (Shuaibu et al., 2001).

Leishmania : les leishmanies sont des parasites hébergés par les macrophages, agents de la leishmaniose. Il a été rapporté que les surnageants et les lysats de promastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis* contiennent une activité PLA2 qui n'est pas inhibée par la dexaméthasone, un inhibiteur de cPLA2 (Passero et al., 2008). Chez *Leishmania major*, une PLA2 enzymatiquement active de type PAF-AH a été identifiée ; les leishmanies mutantes sans activité PLA2/PAF-AH sont moins virulentes chez la souris que les leishmanies non mutantes (Pawlowic and Zhang, 2012).

Plasmodium : en 1993, une activité de type PLA2, indépendante du calcium, est détectée dans les GR infectés par *P. falciparum*, mais pas dans les GR sains, ce qui permet de supposer que le parasite synthétise ce type d'enzyme (Zidovetzki et al., 1993). Puis, en 2005, une PLA2 présentant des similitudes avec la lécithine :

cholestérol acyl-transférase des mammifères, est identifiée à la surface des sporozoïtes, formes infectantes du parasite. Cette enzyme aiderait à la traversée des cellules de la peau par les sporozoïtes, étape nécessaire pour atteindre le flux sanguin (Bhanot et al., 2005). Depuis, quatre gènes codant pour des PLA2 contenant un domaine de type patatine ont été identifiés chez *P. falciparum*. Des travaux rapportés très récemment (en 2018), mentionnent qu'une de ces PLP putatives (Pf3D7_0209100) aurait une localisation cytosolique et nucléaire, et qu'une autre, Pf3D7_092400, pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie des lipides membranaires (Wilson and Knoll, 2018). Enfin, Flammersfeld *et al.*, ont recherché les phospholipases potentielles de *P. falciparum* en utilisant la base de données PlasmoDB et ont identifié dans le génome du parasite 22 protéines putatives présentant un domaine enzymatique de type lipolytique. Parmi ces 22 protéines, 14 présentent un domaine prédictif de type α/β hydrolase, 4 ont un domaine de type PLP, et les 4 dernières contiennent respectivement : un domaine PC:stérol-O-acyltransférase, un domaine PI-PLC, un domaine shynomyéline phosphodiesterase et un domaine PLA/lipase (Flammersfeld et al., 2018). Aucune sPLA2 ou sPLA2 putative n'a été décrite à ce jour chez *Plasmodium*.

3. Phospholipases A2 sécrétées de l'hôte et paludisme

Dans le paludisme, comme dans d'autres pathologies ou traumatismes, le taux circulant d'activité sPLA2 est anormalement augmenté. En 1992, une première étude, qui portait sur l'identification de (des) enzymes responsable(s) de cette activité, avait montré que chez des adultes parasités par *P. falciparum* ou *P. vivax*, l'activité sPLA2 du sérum est fortement corrélée à la concentration en hGIIA. Ce qui suggérait que la hGIIA était très largement responsable de l'activité mesurée (Vadas et al., 1992). Dans une deuxième étude, les mêmes auteurs ont montré que le niveau de gravité du paludisme, chez des patients parasités par *P. falciparum*, est positivement associé au niveau de hGIIA circulant (Vadas et al., 1993). Récemment, le métabolome plasmatique d'enfants d'Afrique sub-saharienne (Malawi) atteints de paludisme cérébral a été analysé. Les résultats ont montré que l'AA et d'autres métabolites lipidiques, ainsi que l'activité sPLA2 du plasma, augmentent dans le paludisme cérébral. L'augmentation est positivement associée à la turgescence du cerveau, phénomène prédictif d'une issue fatale dans cette complication (Pappa et al., 2015). Une des hypothèses est que l'AA, précurseur des eicosanoïdes, pourrait augmenter la perméabilité de l'endothélium vasculaire dans le cerveau par l'intermédiaire des prostaglandines.

On voit donc que l'activité sPLA2 plasmatique chez les malades pourrait être un acteur-clé de la physiopathologie du paludisme. Les études précédentes, effectuées au MNHN, avec les sPLA2 de venins ayant montré que ces enzymes pouvaient inhiber la croissance de *P. falciparum in vitro*, la question se posait de savoir si les sPLA2 humaines pouvaient elles aussi inhiber la croissance parasitaire *in vitro*, et au-delà, être impliquées dans le contrôle de la parasitémie chez les malades.

L'ensemble des sPLA2 humaines recombinantes a été testé *in vitro vis-à-vis* de *P. falciparum* en culture sur GR humains et en présence de plasma humain. Quatre d'entre elles, les sPLA2-X, -IIF, -III et -V, ont montré

des capacités d'inhibition, avec des concentrations inhibitrices (CI₅₀) de respectivement : $2,9 \pm 2,4$ nM ; $10,7 \pm 2,1$ nM ; $16,5 \pm 9,7$ nM et $94,2 \pm 41,9$ nM (Guillaume et al., 2015). Il est apparu que le pouvoir inhibiteur de chaque sPLA2 dépendait de sa capacité à hydrolyser les lipoprotéines plasmatiques et à libérer des PUFA. Dans ce contexte, la sPLA2-X, qui hydrolyse activement la PC, est la plus active, et la sPLA2-V, qui libère difficilement les PUFA, est la moins active (Guillaume et al., 2015). Dans les conditions du test, la sPLA2-IIA n'est pas inhibitrice pour *Plasmodium*.

Dans une deuxième étape, cette étude a été reprise en présence de lipoprotéines oxydées. En effet, dans les situations d'infection, d'inflammation, de trauma, le taux d'oxydation des lipoprotéines plasmatiques augmente (Memon et al., 2000). Le paludisme ne fait pas exception (Sibmoo et al., 2004). Dans la mesure où les lipoprotéines oxydées ont une charge électrique globale plus négative que celle des lipoprotéines natives, et que la sPLA2-IIA a une affinité plus grande pour les surfaces phospholipidiques chargées négativement, l'hypothèse a été émise qu'en situation pathologique, la sPLA2-IIA pourrait dégrader les lipoprotéines oxydées et être active contre *Plasmodium*.

Nos travaux les plus récents (voir manuscrit en [annexe 1](#)) ont montré qu'effectivement, la sPLA2-IIA est capable d'inhiber la croissance de *P. falciparum* quand des lipoprotéines (LDL, HDL ou lipoprotéines totales) préalablement oxydées *in vitro*, sont ajoutées au milieu de culture du parasite. La CI₅₀ de la sPLA2-IIA est de l'ordre de 150 nM, et est donc plus élevée que celles des autres sPLA2 actives contre le parasite, qui, par ailleurs, restent actives dans le milieu de culture contenant des lipoprotéines oxydées.

Nos travaux montrent aussi que les plasmas de patients atteints de paludisme simple à *P. falciparum*, ne contiennent pas de quantités détectables des sPLA2-IIF, -V ou -X. Seule la sPLA2-IIA est clairement détectée, avec une concentration moyenne de 2,3 nM (médiane = 1,55 nM ; n = 41), soit 10 fois supérieure à celle des individus non parasités (0,2 nM en moyenne). Ces valeurs restent cependant très en-dessous des concentrations détectées chez les patients atteints de paludisme sévère, telles que rapportées dans la publication de P. Vadas *et al.* en 1993, qui, chez certains patients, pouvaient atteindre les 200 nM (Vadas et al., 1993).

Nous montrons aussi que lorsque la concentration endogène en hGIIA des plasmas de malades est augmentée à 100 nM par ajout de hGIIA recombinante, ces plasmas deviennent inhibiteurs de la croissance *in vitro* de *P. falciparum*. En revanche, l'ajout de hGIIA recombinante à des plasmas sains n'a pas d'effet sur la croissance parasitaire. De plus, la sPLA2 est capable de libérer des acides gras à partir des plasmas de malades mais pas des plasmas sains ; et la mesure de l'oxydation des lipoprotéines montre que les LDL des plasmas de malades sont significativement plus oxydées que les LDL des plasmas sains.

L'ensemble de ces données nous a permis de proposer une hypothèse où la hGIIA serait un acteur de la défense de l'hôte contre le parasite, par un mécanisme indirect impliquant l'hydrolyse des lipoprotéines oxydées et la libération d'acides gras toxiques, potentiellement polyinsaturés. Dans cette hypothèse, il apparaît que l'hydrolyse des lipoprotéines conduirait aussi à la production de médiateurs lipidiques potentiels (PUFA et lysoPL), susceptibles d'agir sur le système immunitaire et/ou d'induire des effets métaboliques et physiologiques divers.

OBJECTIF DE LA THESE

L'objectif principal du travail de thèse était d'étudier, *in vivo*, le rôle potentiel de la phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA humaine dans le paludisme, par la caractérisation de l'infection chez la souris C57BL/6 transgénique, infectée par *P. chabaudi chabaudi* 864VD.

Les objectifs spécifiques étant de :

- Décrire et comparer les paramètres hématologiques au cours de l'infection entre les souris transgéniques et non transgéniques ;
- Analyser les différences histopathologiques entre les souris transgéniques et non transgéniques ;
- Vérifier l'expression protéique et transcriptionnelle de la hGIIA dans différents tissus chez la souris transgénique infectée ;
- Analyser les mécanismes potentiels d'action de la hGIIA chez la souris transgénique vis-à-vis du parasite, à travers (1) l'hydrolyse de lipoprotéines oxydées et (2) la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique.

II. MATERIEL ET METHODES

Expérimentation *in vivo*, modèle murin du paludisme

1. Ethique

Les procédures expérimentales sur animaux ont été réalisées en conformité avec la Directive Européenne 2010/63/UE et la législation nationale, à savoir le Décret n° 2013-118 du 1^{er} février 2013, du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique du MNHN (n° de dépôt APAFIS 201802281454598) et par la Direction départementale de la protection des populations (n° C75- 05-15).

2. Infection contrôlée à *Plasmodium* sur modèle murin (*in vivo*)

2.1. L'agent infectieux : *Plasmodium chabaudi chabaudi* souche 864VD

Comme chez l'Homme, les *Plasmodium* murins n'ont pas le même potentiel de virulence chez la souris d'une espèce et/ou d'une souche à l'autre. La lignée de souris choisie influence également le profil infectieux. Dans la mesure où la grande majorité des cas de paludisme humain sont des paludismes simples et chroniques, notre choix pour étudier le rôle de la hGIIA s'est porté sur une souche non létale et chronique maintenue au laboratoire : *Plasmodium chabaudi chabaudi* 864VD (*P. c. chabaudi*). L'espèce plasmodiale murine *chabaudi* présente des similitudes avec l'espèce plasmodiale humaine *falciparum*. Comme elle, elle infecte préférentiellement les GR matures et le développement des parasites dans le sang se fait de manière synchrone. D'autre part, au cours de son cycle de reproduction asexué, *P. c. chabaudi* a la particularité d'être séquestré dans la microcirculation hépatique et pulmonaire, sans pour autant causer de complication mortelle (Brugat et al., 2014).

2.2. Constitution des stocks de *Plasmodium*

Les stocks de *Plasmodium* disponibles au laboratoire sont congelés à -80°C. Ils font partie de la collection de *Plasmodium* du MNHN (Unicellular Eukaryotes Collection, Parasitic Protists, Muséum National d'Histoire Naturelle). Les stocks de *P. c. chabaudi* utilisés pour le travail de thèse ont été préparés comme suit : à partir d'une souris ayant atteint une parasitémie de 8-10%, une exsanguination est effectuée au niveau du sinus rétro-orbital avec une pipette héparinée. Après centrifugation du sang récolté à 800 x g pendant 5 minutes, les GR sont séparés du plasma et resuspendus dans un volume minimum de solution saline de NaCl (9 g/L). Le volume est déterminé (V_{total}). Un frottis est réalisé avec cette suspension et coloré au Diff-Quik™ (Medion Diagnostics), afin de déterminer le pourcentage de GR infectés (% GRi), par comptage au microscope optique. La suspension est diluée dans une solution saline au 1/500^{ème} et la concentration totale en GR (GR/mL) est déterminée par lecture en hématocytomètre (Kovaslides®, VWR). La concentration totale en GR est donnée par la formule suivante :

$[GR/\mu L] = \text{nombre total de GR comptés dans 9 carrés} \times 10 \times \text{facteur de dilution}$

La concentration en parasites $[P/\mu L]$, est calculée par la formule : $[P/\mu L] = [GR/\mu L] \times \% \text{ Gri}$.

La suspension cellulaire est diluée en solution d'Alsever (Dextrose : 20,5 g/L ; trisodium citrate, 2H₂O : 7,90 g/L ; NaCl : 4,2 g/L ; glycérol : 10% (vol/vol)) pour obtenir une suspension de 1×10^7 GR parasites /mL. La solution obtenue est homogénéisée et aliquotée en tubes à cryopréservation de 1 mL, stockés ensuite à -80°C. La solution d'Alsever permet aux GR de ne pas être lysés lors de la décongélation.

2.3. Les souris

Trois types de souris ont été utilisés :

- (1) **Souris WT** : (wild-type) lignée consanguine C57BL/6J OlaHsd, commercialisée par la société ENVIGO (Harlan France Sarl, Gannat, France).
- (2) **Souris Tg+** : souris de la lignée C57BL/6 transgéniques pour la hGIIA (Grass et al., 1996). Ces souris nous ont été fournies par le Dr. Lhousseine TOUQUI (Institut Pasteur/Hôpital Cochin Paris). Les souris sont hétérozygotes pour le transgène humain (*Pla2g2a*^{+/+}). L'élevage de la lignée a été poursuivi au MNHN, par croisement de mâles Tg+ avec des femelles WT.
- (3) **Souris Tg-** : souris « littermates » (issues des mêmes portées que les souris Tg+) de phénotype sauvage (ne possèdent pas le transgène humain), obtenues par croisement d'un mâle Tg+ et d'une femelle WT.

Les souris Tg- et Tg+ ont été maintenues en élevage au sein de l'animalerie du MNHN pour la durée de la thèse. Toutes les souris utilisées étaient des mâles âgés de 8 à 28 semaines, ayant librement accès à l'eau et à la nourriture (granulés rafles de maïs) au cours des expérimentations et maintenues sous des cycles nycthémeraux de 12h jour/12h nuit.

2.4. Infestation des souris

2.4.1. Inoculation de *Plasmodium chabaudi chabaudi* 864VD

Les souris C57BL/6 WT, Tg- et/ou Tg+, pesant 20-25 g environ, ont reçu une injection de 1×10^6 globules rouges infectés par *P. c. chabaudi* par voie intrapéritonéale (IP), soit 100 μ L d'une suspension de 1×10^7 GRi/mL en solution d'Alsever. En contrôle, des souris C57BL/6 WT, Tg- et/ou Tg+ ont reçu la même quantité de GR sains dans la même solution.

2.4.2. Analyses sanguines

2.4.2.1. Frottis sanguin

2.4.2.1.1. Détermination de la parasitémie

Une goutte de sang est récupérée par prélèvement caudal et un frottis sur lame de verre est réalisé. Les lames sont colorées au Diff-Quik™ – solution de fixation : méthanol ; solution I : 1,22 g/L d'éosine Y dans du tampon phosphate pH = 6,6 et < 0,1% d'azide de sodium ; solution II : 1,1 g/L de thiazine dans du tampon phosphate, pH = 6,6. Le pourcentage d'hématies parasitées est déterminé par comptage d'au moins 1500-2000 hématies au microscope optique (objectif x100, oculaire x5). La parasitémie (% GRi) est obtenue en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ GRi} = \text{Nombre de GRi} / \text{Nombre de GR totaux} \times 100$$

2.4.2.1.2. Identification et numération des sous-populations leucocytaires

A partir d'un frottis sanguin coloré au Diff-Quik™, l'identification morphologique et la numération des sous-populations leucocytaires est effectuée (lymphocytes, monocytes, PNN, polynucléaires éosinophiles (PNE), et polynucléaires basophiles (PNB)) – en raison du très faible nombre de polynucléaires basophiles dans le sang total (≈ 30 basophiles/ μL de sang), il est extrêmement rare d'en voir sur les frottis sanguins. Le pourcentage de chaque type leucocytaire est déterminé après comptage de 100 à 150 leucocytes.

2.4.2.2. Sang total

Parallèlement au frottis, quelques gouttes de sang total sont récupérées (20 à 30 μL) à partir de la queue, dans un microtube de 2mL contenant 5 μL d'héparine (Choay, 5 000 UI/mL). Le volume total est mesuré à l'aide d'un pipetman pour estimer la dilution du sang dans l'héparine. 4 μL de sang seront utilisés pour la numération des GR et des leucocytes (GB) le reste du sang sera centrifugé à 800 x g pendant 5 minutes à température ambiante pour séparer les cellules du plasma. Le plasma est prélevé et congelé à -80°C pour les analyses biochimiques.

2.4.2.2.1. Numération des GR et des GB (méthode manuelle)

Les GR sont comptés à partir de 2 μL de sang dilué au 1/500^{ème} ou au 1/1000^{ème} dans une solution de NaCl (9 g/L). 10 μL de la suspension sont déposés sur un hématocytomètre (KovaSlide®). Le comptage s'effectue au microscope optique (objectif x40, oculaire x10) sur 9 petits carrés de la KovaSlide® et le nombre de GR/ μL de sang est obtenu par la formule suivante :

$$[\text{GR}/\mu\text{L}] = \text{Nombre de GR} \times 10 \times \text{facteur de dilution}$$

Les GB sont comptés sur 2 µL de sang. Le sang est dilué au 1/20^{ème} en acide acétique 3% contenant du bleu de méthylène. L'acide acétique induit la lyse des GR et le bleu de méthylène colore les leucocytes en bleu. 10µL de cette solution sont utilisés pour comptage sur KovaSlide® comme ci-dessus.

2.4.2.2.2. Analyse NFS (méthode automatisée)

Ces analyses ont été réalisées au BioPôle de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), en collaboration avec le Dr. Isabelle LAGRANGE, vétérinaire hématologue.

La numération formule sanguine (NFS) automatisé est un examen biologique réalisé à partir du sang total qui permet de quantifier les types cellulaires présents dans un échantillon sanguin par mesure d'impédance et par fluoro-cytométrie en flux.

Un volume minimum de 150 µL de sang total a été prélevé à la jugulaire maxillaire des souris, par piqûre au niveau du maxillaire inférieur, et récupération des gouttes de sang directement dans un microtube coaté à l'EDTA (K2-EDTA). Un frottis a été établi à partir de chaque prélèvement et coloré au Diff-Quik™. Dans certains cas, un deuxième frottis a été établi à l'ENVA et coloré au May-Grünwald Giemsa et bleu de Crésyl brillant pour une analyse en double par le Dr. Lagrange. Les échantillons en tube EDTA ont été conservés à température ambiante et transportés dans les 2-3h qui suivent du MNHN à l'ENVA. La numération a été réalisée à l'aide d'un analyseur de NFS commercialisé par la société Sysmex, modèle Sysmex XT-2000iV, dédié à l'analyse du sang de divers animaux (cheval, chien, chat, rat, souris etc.), et paramétré dans notre étude pour le sang de souris.

L'analyseur NFS utilise diverses technologies. Les échantillons de sang EDTA sont aspirés par l'analyseur, le sang est séparé en aliquotes avant d'être utilisé dans les différents canaux de l'automate et traité avec différents réactifs pour révéler les propriétés spécifiques des cellules. Les GR et les plaquettes sont mesurés simultanément au niveau d'un orifice de comptage par la technique de l'impédance, combinée à la focalisation hydrodynamique. Un réactif sans cyanure est utilisé pour mesurer l'hémoglobine par photométrie. La fluoro-cytométrie en flux est la principale méthode de détection pour la formule leucocytaire et la numération des réticulocytes.

b) Détection de l'hémoglobine (HGB) par spectrophotométrie

Le procédé de détection de l'hémoglobine utilise du sodium lauryl sulfate (SLS). Le SLS lyse les cellules de l'échantillon. Les groupes hydrophiles du SLS se lient à l'hème (contenant un atome de fer) de l'hémoglobine et forment un complexe coloré stable (SLS-HGB) qui est analysé à l'aide d'une méthode photométrique. Une diode électroluminescente émet une lumière monochromatique, qui est absorbée par le complexe SLS-HGB du mélange. L'absorbance est mesurée par un capteur photosensible. Elle est inversement proportionnelle à la

concentration en hémoglobine de l'échantillon. La méthode SLS-HGB permet de minimiser les interférences possibles dues à la turbidité de l'échantillon (lipémie ou leucocytose), grâce à une dilution au 1/747^{ème}.

c) Numération des globules rouges et des plaquettes : impédance et focalisation hydrodynamique

L'analyseur Sysmex utilise l'impédance, combinée à la technique de focalisation hydrodynamique, pour la numération des GR et des plaquettes. L'impédance à volume fixe calibré permet de compter les cellules à travers un micro-orifice de comptage. Cet orifice de comptage est composé de 2 électrodes traversées par un courant continu afin d'obtenir des impulsions électriques proportionnelles au volume des cellules qui le traversent. Ces données électriques sont converties en histogrammes, représentant la distribution du volume. La focalisation hydrodynamique en amont et en aval de la zone de mesure garantit une injection du liquide de gainage permettant le passage d'une unique cellule, un centrage optimum des cellules, ainsi que l'absence de déformation cellulaire.

d) Fluoro-cytométrie en flux

Principe général de la technologie Sysmex

Dans un premier temps, un échantillon de sang est aspiré, puis dilué pour atteindre une teneur prédéfinie, et marqué à l'aide d'un fluorochrome qui se lie spécifiquement aux acides nucléiques. Les cellules et les particules passent par un orifice de comptage très étroit. L'échantillon est illuminé par le faisceau d'un laser semi-conducteur, capable de différencier des cellules au moyen de trois signaux différents :

- Diffusion frontale de la lumière (FSC : « forward scatter »). L'intensité de la diffusion frontale indique le volume de la cellule ;
- Diffusion latérale de la lumière (SSC : « side scatter »). La diffusion latérale fournit des informations sur le contenu de la cellule, telles que la taille du noyau ou les granulations ;
- Fluorescence latérale de la lumière (SFL : « side fluorescence light »). La fluorescence latérale indique la quantité d'ADN et d'ARN que contient la cellule.

Les cellules ayant des propriétés physiques et chimiques similaires forment une population similaire sur un graphique appelé diagramme de dispersion (ou cytogramme ou scattergram). Un code couleur permet d'identifier les populations.

Canal RET (réticulocytes) / PLT-O (plaquettes)

Dans ce canal, des réactifs spécifiques remplissent deux fonctions : 1) un agent tensio-actif induit une légère perforation de la membrane cellulaire des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes ; 2) un fluorochrome (à base de polyméthine) migre dans le cytoplasme des cellules sanguines et marque les acides nucléiques. Puis, l'échantillon est transféré vers une chambre de comptage.

Les différentes populations cellulaires sont séparées par FSC et SSC. En fonction de l'intensité de la fluorescence (SFL), les réticulocytes sont fractionnés en trois catégories représentant leurs différents stades de maturité : LFR (réticulocytes de fluorescence faible, les plus « âgés »), MFR (réticulocytes de fluorescence moyenne), HFR (réticulocytes de fluorescence élevée, les plus « jeunes »). La fraction de réticulocytes immatures (IRF) se calcule comme la somme des MFR et des HFR (Figure 10).

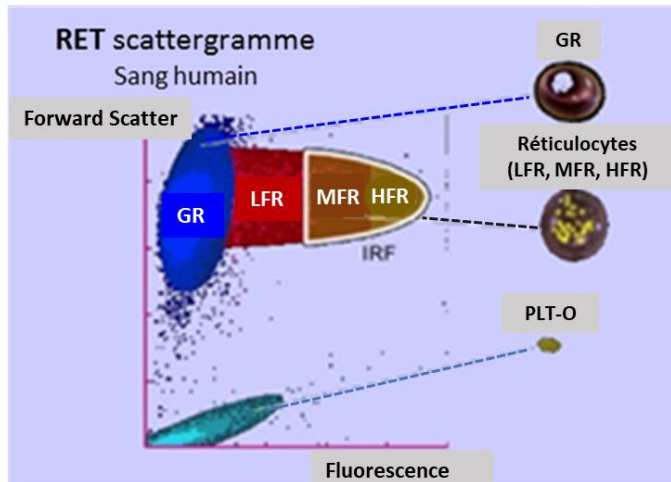


FIGURE 10 : DISTRIBUTION DES NORMOCYTES, RETICULOCYTES ET PLAQUETTES SUR LE CANAL RET.

<https://www.slideshare.net/babu3151/xt-2000i-cell-counter-autoanalyser>

Les plaquettes (PLT), qui contiennent aussi des acides nucléiques (ARN ribosomaux principalement), forment une population distincte sur le diagramme de dispersion, ce qui permet d'obtenir une numération des plaquettes en optique.

Canal DIFF (différenciation des leucocytes)

Un agent tensio-actif dans le réactif induit la lyse des érythrocytes de l'échantillon de sang. Parallèlement, les membranes cellulaires des leucocytes sont perforées, ce qui permet au fluorochrome (à base de polyméthine) de se lier aux acides nucléiques. L'échantillon est ensuite analysé par fluoro-cytométrie en flux.

Les signaux de mesure relatifs à la diffusion latérale de la lumière (SSC) et à la fluorescence latérale de la lumière (SFL) sont analysés et représentés à l'aide d'un diagramme de dispersion, sur lequel les cellules présentant des propriétés cytochimiques similaires se situent dans la même zone sur le diagramme et peuvent être séparées en différentes populations à l'aide d'algorithmes avancés (Figure 11).

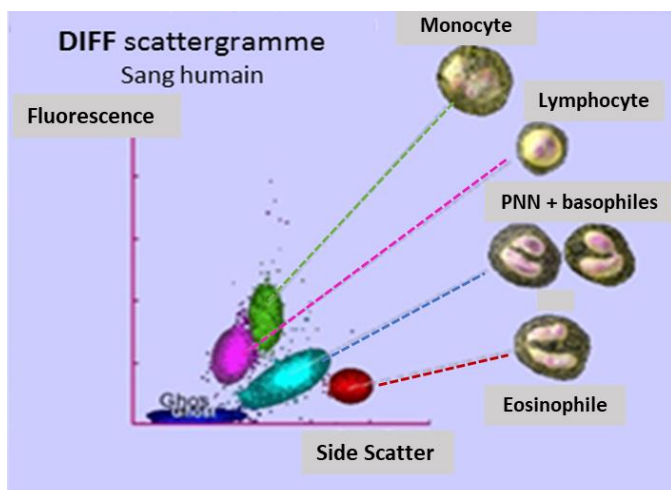


FIGURE 11 : DISTRIBUTION DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES SUR LE CANAL DIFF.

<https://www.slideshare.net/babu3151/xt-2000i-cell-counter-autoanalyser>

2.4.2.3. Analyses biochimiques du plasma sanguin

2.4.2.3.1. Test d'activité sPLA2

Adapté de : Franson R, Patriarca P & Elsbach P. (1974) « *Phospholipid metabolism by phagocytic cells phospholipases A2 associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules.* » J. Lipid Res. 15:380-388.

Le principe de ce dosage repose sur la mesure des acides gras libérés par l'hydrolyse enzymatique des membranes d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Les bactéries ont été préalablement incubées en présence d'acide oléique tritié, qui s'incorpore en position *sn-2* des phospholipides membranaires. Les membranes bactériennes ainsi marquées sont incubées avec la sPLA2. Les acides gras libérés par l'hydrolyse enzymatique des phospholipides sont captés dans le surnageant d'incubation par de la BSA délipidée, et isolés après sédimentation des membranes par centrifugation. La quantité d'acide oléique marqué libéré par l'action de l'enzyme rend compte de son activité. Les membranes d'*E. coli* marquées (100 000 dpm/ μ L) ont été fournies par le Dr. Gérard LAMBEAU (UMR7275, Nice Sophia-Antipolis).

Protocole : un volume de 30 μ L d'une solution de membranes d'*E. coli* marquées est dilué dans 1,5 mL de tampon d'activité (0,1 M Tris, 10 mM CaCl₂ 2H₂O, 0,1% BSA, pH = 8). 40 μ L de cette suspension (\approx 80 000 dpm) sont mélangés à 2 μ L d'échantillon à tester (plasma pur ou dilué) préalablement déposé dans 20 μ L de tampon d'activité. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de 80 μ L de tampon stop buffer (0,1 M EDTA, 0,2% BSA fatty-acid-free). Après centrifugation à 12 000 x g pendant 5 minutes, 100 μ L de surnageant sont transférés dans une plaque 96 puits auxquels on ajoute 100 μ L de liquide scintillant (Optiphase Supermix, Perkin-Elmer). La quantité d'³H-acide oléique libéré est mesurée au compteur à scintillation (Trilux 1450 MicroBeta, Wallac). Les valeurs sont normalisées par soustraction de la radioactivité mesurée dans le surnageant de membranes incubées en absence de sPLA2. Un autre échantillon de membranes, sans PLA₂ ajoutée et qui ne subit pas de centrifugation, est utilisé pour mesurer la radioactivité totale (quantité d'³H-acide oléique présent dans les membranes au début de l'incubation).

2.4.2.3.2. Mesure de la peroxydation des lipides (méthode des TBARS)

Lors d'un stress oxydatif, les acides gras polyinsaturés présents dans les membranes sont sujets à l'oxydation et génèrent des peroxydes lipidiques très réactifs, comme le malondialdéhyde (MDA). Le dosage des TBARS (thiobarbituric acid reactive substances ; substances réactives à l'acide thiobarbiturique), mesure la peroxydation lipidique en mesurant la quantité de MDA dans un échantillon (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

Protocole : un volume de 70 μ L de plasma est transféré dans un tube contenant 70 μ L d'H₂O (milli-Q). On ajoute 140 μ L de réactif TBA (37,5 mg d'acide thiobarbiturique, 1,5 g d'acide trichloro-acétique, 10 mL d'acide chlorhydrique 0,25 N) fraîchement préparé. Le mélange est vortexé puis chauffé 15 minutes à 85°C. Après récupération sur glace, 140 μ L de butanol sont ajoutés. L'échantillon est vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante. Le tube est centrifugé 5 minutes à 6 700 x g à température ambiante, et 200 μ L de la

phase supérieure sont transférés dans un nouveau tube. L'échantillon est une nouvelle fois centrifugé 5 minutes à 6 700 x g et 150 µL de surnageant sont transférés dans un autre tube. 250 µL d'éthanol sont ajoutés avant lecture au spectrofluorimètre. La concentration en MDA des échantillons est déterminée à partir d'une gamme étalon [0 à 16 µM] de 1,1,1,3,3-tétraéthoxypropane (TEP). Les échantillons de la gamme sont traités de la même façon que les échantillons de plasma. Ils sont préparés à partir d'une solution-stock de TEP 0,1 M (Sigma) par dilution en éthanol 40% (vol/vol). Le dosage est effectué au spectro-fluorimètre (Aminco Bowman Series 2) en microcuve de quartz (excitation : 515 nm ; émission : 550 nm).

2.4.2.3.3. Dosage des protéines

La concentration en protéines totales des échantillons de plasma est mesurée au moyen du Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (méthode colorimétrique basée sur la méthode de Bradford). La concentration en protéines des échantillons est déterminée à partir d'une gamme de concentration croissante d'albumine bovine (fraction V) en H₂O [gamme BSA : 0 à 0,8 mg/mL]. L'absorbance des échantillons à $\lambda = 595$ nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Labsystems Multiskan MS). La concentration est calculée graphiquement à partir de la courbe : Absorbance = f (concentration BSA).

2.4.3. Autopsie des souris, prélèvement des organes et tissus

2.4.3.1. Exsanguination et prélèvement des organes

Les souris sont pesées avant sacrifice, puis euthanasiées par exsanguination totale au sinus rétro-orbital puis dislocation cervicale, à J0, J8, J14 et J21 post-inoculation (p.i.) des parasites. Le sang est recueilli dans un microtube contenant 5µL d'héparine (Choay, 5 000 UI/mL), puis centrifugé à 800 x g pendant 5 minutes, à température ambiante. Le plasma est conservé à -80°C. Le culot de cellules (≈ 300 µL) est resuspendu dans 1 mL de TRIzol®(Ambion®), vortexé puis congelé à -80°C avant dosage des ARN totaux (voir ci-après).

Après ouverture de l'abdomen des souris, la rate, le foie et les reins sont rapidement extraits et pesés à l'aide d'une balance de précision (ES 225 SM-DR, PrecisaFrance). Puis les poumons, le cœur et le cerveau sont prélevés à leur tour.

2.4.3.2. Fixation des organes en vue des analyses histologiques

A chaque temps de sacrifice, la partie postérieure de la rate, le lobe hépatique supérieur (le plus gros lobe), le rein droit, le lobe pulmonaire gauche, le cœur droit et l'hémisphère cérébral droit sont plongés dans une solution de 50 mL de formaldéhyde 4% en PBS pour 48h, avec renouvellement de la solution après 24h.

2.4.3.3. Conservation des organes avant analyse par RT-qPCR

En parallèle, la partie antérieure de la rate, le lobe hépatique bilobé, le rein gauche, les lobes pulmonaires droits, le cœur gauche et l'hémisphère cérébral gauche sont coupés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel puis chaque organe en morceaux est plongé séparément dans 1 mL d'une solution de RNA later® (QUIAGEN) avant d'être congelé à -80°C. Le RNA later® imprègne rapidement les tissus afin de stabiliser et protéger l'intégrité de l'ARN. Les échantillons traités de cette manière sont mieux protégés de la dégradation et restent intacts avant congélation.

2.4.4. Histologie

2.4.4.1. Inclusion en paraffine

Les organes fixés par le formaldéhyde sont déshydratés par une succession de 3 bains d'éthanol à 70%, 3 bains d'éthanol à 95%, 3 bains d'éthanol à 100% et enfin 3 bains de toluène. Chaque bain a une durée de 10 minutes, à température ambiante. Puis chaque organe est plongé dans un bain de paraffine liquide (Leica-Paraplast PLUS) à 57°C (température de fusion de la paraffine) pendant au moins 24h. Les blocs de paraffine contenant les organes sont ensuite coulés dans des moules d'inclusion à l'aide d'une station d'inclusion en paraffine (Leica EGAA50H) et une cassette permettant le montage sur le microtome est disposée au-dessus du bloc. Le bloc est refroidi sur une plaque de refroidissement (Leica EG1150C) pour figer son contenu.

2.4.4.2. Montage sur lame

Les blocs sont coupés au microtome (Leica RM2245) par tranches d'épaisseur 5 µm. Les sections réalisées sont ensuite déposées à la surface de l'eau d'un bain-marie chauffant à 40°C, permettant l'étalement du tissu sans faire fondre la paraffine. Une lame de verre (de qualité Superfrost ou Superfrost Plus, Thermo Scientific) est plongée dans le bain à la verticale puis, en remontant, les coupes lisses adhèrent à la lame. Les lames sont ensuite séchées à l'étuve à 57°C toute une nuit.

2.4.4.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine (HE)

Les coupes sur lames Superfrost sont déparaffinées par 3 bains de toluène, puis réhydratées successivement par 2 bains d'éthanol à 100%, 1 bain d'éthanol à 95%, 1 bain d'éthanol à 70% et un bain d'eau du robinet. Tous les bains ont une durée de 10 minutes.

Les sections d'organes sont ensuite encerclées au Dakopen (DAKO), colorées à l'hématoxyline de Mayer filtrée (filtre pore 0,45 µm) pendant 10 minutes, puis rapidement rincées à l'eau du robinet. Les lames sont plongées dans de l'éosine 1% en H₂O Milli-Q pendant 1 minute, rincées 3 fois dans de l'eau du robinet puis déshydratées par un bain d'éthanol à 70% d'une minute et d'un bain d'éthanol à 100% de 30 secondes. Enfin, les

lames sont plongées dans un bain de toluène pendant 1 minute pour fixer la coloration avant d'être montées entre lame et lamelle avec du baume d'Eukitt® (Polylabo).

Les lames sont observées au microscope optique (objectifs x4, x10, x20, x40 et x100 ; oculaire x10 ; Olympus BX63) et des photos sont prises et traitées par le logiciel CellSens Dimension4.

2.4.4.4. Immunomarquages sur coupes d'organes

Les coupes sur lames Superfrost Plus sont déparaffinées et réhydratées comme pour les colorations histologiques. Pour tous les marquages, le démasquage des antigènes est réalisé à pH = 6 dans la solution Antigen Unmasking de Vector Laboratories pour le marquage anti-hGIIA et dans la solution Diapath pour les marquages anti-CD3 et -B220, pendant 30 minutes à 95°C. Les lames sont ensuite refroidies pendant 5 minutes à température ambiante puis plongées dans un bain de PBS (pH = 7,5) pendant 5 minutes. Les sections d'organes sont encerclées au Dakopen.

2.4.4.4.1. Immuno-marquage de la hGIIA

Les peroxydases endogènes sont bloquées par ajout de 100 µL de solution DualEndogenous Enzyme Block (DAKO) sur chaque coupe pendant 10 minutes en chambre humide et à température ambiante. Les lames sont rincées dans un bain de PBS pendant 3 minutes à température ambiante. Les sites non spécifiques sont bloqués avec du sérum de lapin non immun 5% en PBS pendant 20 minutes en chambre humide, puis les anticorps primaires polyclonaux anti-hGIIA (sérum de lapin, fournis par le Dr. G. LAMBEAU), dilués au 1/100^{ème} dans une solution de sérum de lapin non immun 5% en PBS, sont ajoutés et les lames sont incubées jusqu'au lendemain à 4°C, en chambre humide. Les lames sont plongées dans 2 bains successifs de PBS, d'une durée de 3 minutes, puis une goutte de EnVision+ Dual Link System-HRP (DAKO) est ajoutée sur chaque section pendant 10 minutes à température ambiante. Ce réactif contient des anticorps secondaires anti-IgG (Fc) de lapin couplés à la peroxydase, capables de se fixer à des anticorps de lapin ou de souris (Dual Link). Le substrat de la peroxydase AEC+ High Sensitivity Ready-to-Use (DAKO) est ajouté pour 3 minutes. La précipitation des produits de la réaction enzymatique donne une coloration rouge vif. Un contremarquage à l'hématoxyline de Mayer pour visualiser les noyaux des cellules est réalisé pendant 30 secondes avant montage des coupes entre lame et lamelle à l'Aquatex (Merck).

2.4.4.4.2. Marquage des lymphocytes T (anticorps anti-CD3) et des lymphocytes B (anticorps anti-B220)

Les marquages anti-CD3 et anti-B220 ont été réalisés par le Dr. David HARDY à l'institut Pasteur de Paris. Les sites non spécifiques sont bloqués avec de la BSA 3% en PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires anti-CD3 et anti-B220, dilués au 1/100^{ème} dans du PBS, sont mis à incuber jusqu'au

lendemain à 4°C. Les lames sont plongées dans 3 bains successifs de PBS de 5 minutes. L'inhibition des peroxydases endogènes est réalisée avec 100 µL par coupe d'une solution de H₂O₂ 0,3% en PBS, pendant 20 minutes à température ambiante. Une goutte de N-Histofine de lapin (CD3) ou de N-Histofine de rat (B220) est ajoutée sur chaque section pendant 30 minutes à température ambiante. Comme le réactif EnVision+ Dual Link System-HPR, le réactif N-Histofine contient des anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Les lames sont rincées dans 3 bains successifs de 5 minutes dans du PBS, puis le substrat AEC (Sigma) est ajouté pour 5 minutes. Le marquage donne une coloration marron. Un contre-marquage est réalisé avec de l'hématoxyline de Gill (Leica) quelques secondes avant montage avec de l'immunomount (Shandon).

2.4.5. RT-PCR quantitative (RT-qPCR) : expression de l'ARNm de la hGIIA dans les tissus des souris infectées

Ces analyses ont été réalisées avec l'aide de Soraya CHAOUCH, responsable de la plateforme de RT-qPCR au laboratoire du MNHN.

2.4.5.1. Extraction des ARN totaux au phénol-chloroforme

Les échantillons de rate et de foie, et les cellules du sang des souris sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i. (conservés congelés à -80°C dans du RNA later[®] (rate et foie) ou du TRIzol[®] (sang)) ont été utilisés pour extraire l'ARN total selon les étapes suivantes :

- (1) **Broyage des tissus** : Cette étape a lieu pour les organes uniquement. Après décongélation sur glace, 50 à 100 mg de tissu sont placés dans un microtube Eppendorf de 2 mL contenant 1 mL de TRIzol[®] et 3 billes de tungstène de 3 mm (QUIAGEN), nettoyées au préalable avec une solution de RNase away[®] et aux ultraviolets (UV) pendant 20 minutes. Le tissu est dissocié à l'aide du broyeur à billes TissueLyser II (QUIAGEN) par 2 cycles de 1 min 30 à 20 Hz. Les billes sont ensuite retirées du tube et l'échantillon est centrifugé 10 minutes à 12 000 x g (4°C). La couche grasse (anneau supérieur) est éliminée et le surnageant est transféré dans un nouveau tube.
- (2) **Phase de séparation** : L'échantillon homogénéisé est incubé 5 minutes à température ambiante, ce qui permet la dissociation complète du complexe nucléoprotéique. 200 µL de chloroforme par mL de TRIzol[®] utilisé lors du broyage sont ajoutés. Après agitation vigoureuse à la main pendant 15 secondes, l'échantillon est laissé en attente 2 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé 15 minutes à 12 000 x g (4°C). La phase aqueuse, contenant l'ARN, est transférée dans un nouveau tube.
- (3) **Précipitation des ARN** : 500 µL d'isopropanol 100%, par mL de TRIzol[®], sont ajoutés à la phase aqueuse. Puis après une attente de 10 minutes à température ambiante, le mélange est centrifugé 10 minutes à 12 000 x g (4°C).
- (4) **Lavage de l'ARN** : le surnageant est jeté et le culot d'ARN est resuspendu dans 1 mL d'éthanol 75%. Le tube est vortexé brièvement puis centrifugé 5 minutes à 7 500 x g (4°C). Deux autres lavages sont effectués dans

les mêmes conditions. Après élimination du surnageant, le culot est asséché sous le flux d'une hotte chimique (Sorbonne) pendant au moins 10 minutes.

- (5) **Elution de l'ARN** : l'ARN est élué sur glace avec 20 à 150 μL d' H_2O débarrassée de ses ARNases (RNase-free) (le volume d' H_2O ajouté est fonction de la taille du culot). L'échantillon est incubé 10 minutes à 55°C , puis récupéré sur glace.

Après vérification de la quantité et la qualité des ARN extraits, les échantillons sont stockés à -80°C .

2.4.5.2. Détermination de la quantité et de la qualité des ARN extraits

La quantité et la qualité des ARN obtenus sont vérifiées par spectrophotométrie à spectre complet (Nanodrop2000, Thermo Scientific) et par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Le spectrophotomètre mesure les valeurs d'absorbance pour des longueurs d'onde allant de 220 à 350nm. A partir des données recueillies pour chaque échantillon, les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} sont calculés. Les valeurs obtenues renseignent sur la pureté de l'échantillon. Un échantillon d'ARN est considéré comme dépourvu de contaminants (solvants, sels, protéines etc.) si le ratio A_{260}/A_{280} est égal à 2 et si le ratio A_{260}/A_{230} est compris entre 1,8 et 2,2. Dans la pratique, les valeurs minimales acceptables sont $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ et $A_{260}/A_{230} \geq 1,6$.

La quantité d'ARN extraite est mesurée au Nanodrop2000, en déposant $1\mu\text{L}$ d'échantillon sur le lecteur.

Pour juger de l'intégrité des molécules d'ARN, 500 ng d'ARN sont repris dans un tampon de charge dénaturant (RNA Gel Loading Dye 2X, Thermo Scientific™), chauffés à 70°C pendant 10 minutes, puis déposés sur gel d'agarose 1,5% en Tris acétate EDTA 4,84 g/L, pH = 8 (TAE). Après une migration de 45 minutes à 80 V, les ARN sont visualisés sous UV (système Biocapt, Vilbert Lourmat). Deux bandes sont attendues : une bande correspondant à l'ARN ribosomique 18S ($\approx 1,9$ kb) et une seconde bande correspondant à l'ARN ribosomique 28S (≈ 5 kb). Les échantillons présentant deux bandes distinctes non dégradées dans un rapport de quantité 28S > 18S, sont validés pour l'étape suivante.

2.4.5.3. Traitement à la DNase

Cette étape vise à l'élimination de l'ADN éventuellement présent dans l'échantillon d'ARN extrait. Les échantillons sont dilués dans de l'eau RNase-free à une concentration de 200 ng/ μL dans un volume final de 44 μL puis sont traités à la DNase en utilisant le kit Turbo DNA-free (Ambion® by life technologies), en suivant les instructions du fabricant. Pour chaque échantillon, le mix suivant est préparé : 44 μL d'ARN, 5 μL de Buffer 10X et 1 μL de DNase à 2U/ μL . Le tout est homogénéisé à la pipette puis incubé à 37°C pendant 30 minutes. 5 μL de solution d'inactivation sont ensuite ajoutés dans le tube. Après resuspension, le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. Une centrifugation de 90 secondes est réalisée à 10 000 x g puis le surnageant est déposé dans un nouveau tube. La quantité d'ARN est de nouveau mesurée au spectromètre Nanodrop2000 puis l'échantillon est stocké à -80°C .

2.4.5.4. Rétro-transcription des ARN messagers en ADN complémentaires

Lors de cette étape, les ARNm sont rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) simple brin par une rétro-transcriptase (ou transcriptase inverse). La rétro-transcription est réalisée avec le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), suivant les instructions du fabricant.

A 500 ng d'ARN traité à la DNase (décongelés sur glace), on ajoute 1 μL d'oligo(dT)18 (à 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ final), et le volume final de l'échantillon est amené à 12 μL avec de l'eau RNase-free. Le mélange est incubé 5 minutes à 65°C dans un thermocycleur (Mastercycler® Nexus, Eppendorf) puis récupéré sur glace pour stopper la réaction. Après cette étape de dénaturation des ARN et hybridation de l'amorce oligo(dT), les autres composants du kit (en particulier le mélange de désoxyribonucléotides et la transcriptase réverse) sont ajoutés et l'échantillon est incubé à 42°C pour 1 heure, puis à 70°C pour 5 minutes (thermocycleur T Professional Basic Gradient, Biometra). Après récupération sur glace, l'échantillon est dilué au 1/20^{ème} dans de l'eau RNase-free puis stocké à -20°C.

2.4.5.5. PCR quantitative (qPCR)

Le principe de la PCR (polymérase chain reaction) quantitative (qPCR) repose sur le suivi au cours du temps (« en temps réel » =, « real time » RT-qPCR) de l'amplification d'ADN par PCR à l'aide de la fluorescence. A chaque cycle de PCR, l'intensité de fluorescence correspondant aux produits de PCR néo-formés est enregistrée.

Le profil d'une réaction PCR quantitative classique peut se décomposer en 3 étapes (Figure 12) :

- Une première étape dite de bruit de fond : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- Une seconde étape de phase exponentielle de croissance : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Une dernière étape de phase de plateau : certains composants de la réaction deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

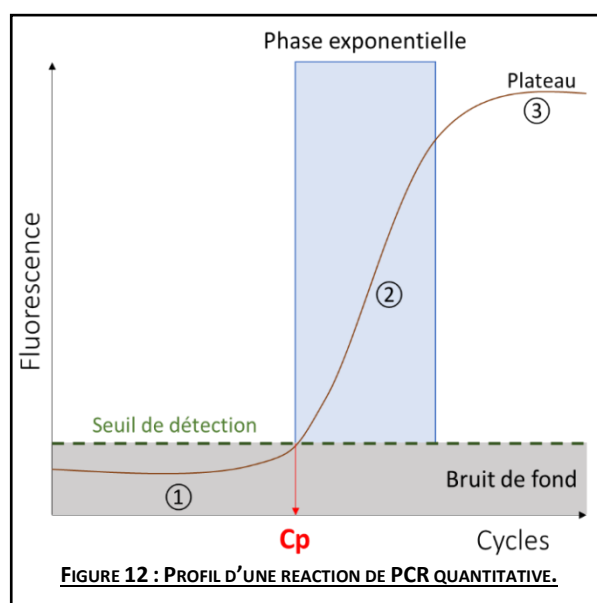


FIGURE 12 : PROFIL D'UNE REACTION DE PCR QUANTITATIVE.

Plus l'échantillon contient de molécules d'ADNc d'intérêt à l'origine, moins il faudra de cycles d'amplification avant que débute la phase exponentielle de croissance. Le nombre de cycles précédant le début

de la phase exponentielle correspond au « crossing point » Cp (ou « threshold cycle » Ct, ou encore « quantification cycle » Cq).

Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur LightCycler® 480 II (Roche). Le composé organique fluorescent est le SYBR green, il se lie aux molécules d'ADN double brin uniquement et émet un signal fluorescent lorsqu'il est complexé à l'ADN.

Une quantification de l'ADNc a été réalisée pour 3 gènes d'intérêts, à savoir les gènes codant pour la hGIIA et les 2 sPLA2 murines mGIIF et mGV. Les mGIII et mGX ont également été testées mais aucune quantification n'a pu être réalisée.

2.4.5.5.1. Conception des amorces pour la qPCR

Les séquences nucléotidiques de certains couples d'amorces utilisés pour les sPLA2 ont été reprises des publications de l'équipe du Dr. Gérard LAMBEAU. Les autres amorces ont été reprises d'autres articles ou conçues manuellement et vérifient les conditions suivantes : longueur entre 20 et 23 pb, température d'hybridation de 60 à 62°C, %GC entre 40 et 60%, produit de PCR (amplicon) de 75 à 200 pb. La spécificité des amorces pour l'ADNc cible est vérifiée par BLAST (NCBI) afin de confirmer qu'elles ne sont complémentaires d'aucune autre séquence dans les génomes de la souris C57BL/6 ou de *Plasmodium chabaudi*.

Les couples d'amorces testés sont répertoriés dans le tableau 6.

Les amorces ont été fabriquées par l'entreprise Eurofins. Les amorces, lyophilisées, sont resuspendues en H₂O RNase-free à la concentration finale de 100 µM (volumes indiqués par l'entreprise Eurofins). Les couples d'amorces sont préparés et conservés dans un même tube à la concentration de 5 µM.

TABLEAU 6 : ABBREVIATION, NOM, FONCTION ET SEQUENCES DES GENES DE REFERENCE ET D'INTERET CHOISIS.

	Gène	Protéine	Accession numbers	Séquences des amorces nucléotidiques	Référence
Gènes de référence	<i>Actb</i> (1)	Actine bêta	ID: 11461 NM_007393	F : CCTTCTTGGGTATGGAATCCTGT R : CACTGTGTTGGCATAGAGGTCTTTAC	(Gong et al., 2016)
	<i>Actb</i> (2)			F : CCACTGCCGCATCCTCTTCC R : CTCGTTGCCAATAGTGATGACCTG	Conçues manuellement
	<i>Actb</i> (3)			F : CTTCTTTGCAGCTCCTTCGTT R : TTCTGACCCATTCCCACCA	(Wang et al., 2010)
	<i>Actb</i> (4)			F : TCCTTCTTGGGTATGGAATCCTG R : TGGCATAGAGGTCTTTACGGAT	Conçues manuellement
	<i>B2m</i>	Bêta 2 microglobuline	ID: 12010	F : GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA R : GTTCGGCTTCCATTCTCC	(Wang et al., 2010)
	<i>Gapdh</i> (1)	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	ID: 14433 NM_00128972 NM_008084.3	F : GAACATCATCCCTGCATCCA R : CAAGTGAGCTTCCCGTTCA	(Gong et al., 2016)
	<i>Gapdh</i> (2)			F : AGCTACTCGCGGCTTTA R : CTGCTTATCCAGTCTAGC	Conçues manuellement
	<i>Gapdh</i> (3)			F : TGCACCACCAACTGCTTAGC R : GGCATGGACTGTGGTCATGAG	(Gilsbach et al., 2006)
	<i>Gapdh</i> (4)			F : ATTGTCAGCAATGCATCCTG R : ATGGACTGTGGTCATGAGCC	(Engelbrecht et al., 2003)
	<i>Gusb</i> (1)	Glucuronidase bêta	ID : 110006 NM_010368.1	F : CCGACCTCTCGAACAACCG R : GCTTCCCGTTCATACCACACC	(Gong et al., 2016)
	<i>Gusb</i> (2)			F : TAGCTTCAATGACATCACCC R : CATGTTCCACCACATGAATC	Conçues manuellement
	<i>Gusb</i> (3)			F : CCGATTATCCAGAGCGAGTATG R : CTCAGCGGTGACTGGTTCG	(Wang et al., 2010)
	<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase 1	ID : 15452 NM_013556	F : TGACACTGGCAAACAATGCA R : GGTCTTTTACCAGCAAGCT	(Gong et al., 2016)
	<i>Tbp1</i>	Tata box-binding protein 1	ID : 21374 NM_013684.3	F : CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT R : ATGTGGTCTTCTGAATCCCT	(Wang et al., 2010)
	<i>Pgk1</i> (1)	Phosphoglycérate kinase 1	ID : 18655 NM_008828.2	F : ATGTCGCTTCCAACAAGCTG R : GCTCCATTGTCCAAGCAGAAT	(Gong et al., 2016)
	<i>Pgk1</i> (2)			F : CTAGGGGTTCATCACTATC R : GGAAGGACTTTACCTTCCAG	Conçues manuellement
	<i>Pgk1</i> (3)			F : CTCCGCTTTCATGTAGAGGAAG R : GACATCTCCTAGTTTGGACAGTG	(Willems et al., 2006)
	<i>RPLPO</i>	Ribosomal protein large PO	Gene ID : 11837 NM_007475	F : GAGGACCTCACTGAGATTCCGG R : TTCTGAGCTGGCAGATGAC F : ACTGAGATTCGGGATATGCTGT R : TGCCTCTGGAGATTTTCGTG	Conçues manuellement (Wang et al., 2010)
	<i>hGIIA</i> (1)	Phospholipase A2 sécrétée de groupe IIA humaine	ID : 5320 NM_000300.3 NM_001161727.1	F : GGCACCAAATTTCTGAGCTACA R : TTATCACACTCACAGTTGACTTCTG	G. Lambeau
	<i>hGIIA</i> (2)			F : AAACGTCTGGAGAAACGTGG R : TTGCACAGGTGATTCTGCTC	Conçues manuellement
<i>hGIIA</i> (3)	F : CCGCACTCAGTTATGGCTTCT R : GGTGCCACATCCACGTTTC			(Burger et al., 2002)	
<i>mGIIF</i>	Phospholipase A2 sécrétée de groupe IIF murine	Gene ID : 26971 NM_012045	F : TCAGGGCCTCTCCTCTAAAA R : GGACTGCGATGGCAAAGAAT	G. Lambeau	
<i>mGIII</i>	Phospholipase A2 sécrétée de groupe III murine	Gene ID : 237625 NM_172791	F : TGGCCCAAACATCAAAGTG R : GGCTTGATCTGGTGCTCACA	G. Lambeau	
<i>mGV</i>	Phospholipase A2 sécrétée de groupe V murine	Gene ID : 18784 NM_001122954	F : CCCAAGGATGGCACTGAT R : GCACAGTCTTTTCTCCAGTTG	G. Lambeau	
<i>mGX</i>	Phospholipase A2 sécrétée de groupe X murine	Gene ID : 26565 NM_011987	F : GGCTGTTATTGTGGCCTTGGT R : TCCTGAGCCCGAGAGTAGCA	G. Lambeau	

2.4.5.5.2. Amplification par qPCR

Pour chaque échantillon d'ADNc, le mélange réactionnel suivant est réalisé : 4 µL de l'échantillon d'ADNc dilué au 1/20^{ème}, 1 µL de la solution du couple d'amorces (5 µM), 5 µL de Master mix 2X (SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit – Bioline). Les amplifications sont réalisées dans des plaques à 96 puits. Chaque échantillon est analysé en triplicata.

Les expériences ont été réalisées de manière à effectuer sur une même plaque de 96 puits les amplifications correspondant à : 1 couple d'amorces donné, 1 organe donné, les 4 temps de sacrifice, et 3 souris différentes par temps de sacrifice, pour les souris Tg- et Tg+ (Figure 13).

FIGURE 13 : EXEMPLE D'UN PLAN DE PLAQUE POUR L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA hGIIA DANS LE FOIE AUX 4 TEMPS DE L'INFECTION, CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Point de gamme 1 du gène hGIIA = dilution 1			Foie souris « 1a » Tg- Non infectée J0			Foie souris « 2a » Tg- Non infectée J0			Foie souris « 3a » Tg- Non infectée J0		
B	Point de gamme 2 du gène hGIIA = dilution 2			Foie souris « 1b » Tg- Infectée J8			Foie souris « 2b » Tg- Infectée J8			Foie souris « 3b » Tg- Infectée J8		
C	Point de gamme 3 du gène hGIIA = dilution 3			Foie souris « 1c » Tg- Infectée J14			Foie souris « 2c » Tg- Infectée J14			Foie souris « 3c » Tg- Infectée J14		
D	Point de gamme 4 du gène hGIIA = dilution 4			Foie souris « 1d » Tg- Infectée J21			Foie souris « 2d » Tg- Infectée J21			Foie souris « 3d » Tg- Infectée J21		
E	Point de gamme 5 du gène hGIIA = dilution 5			Foie souris « 1e » Tg+ Non infectée J0			Foie souris « 2e » Tg+ Non infectée J0			Foie souris « 3e » Tg+ Non infectée J0		
F	Point de gamme 6 du gène hGIIA = dilution 6			Foie souris « 1f » Tg+ Infectée J8			Foie souris « 2f » Tg+ Infectée J8			Foie souris « 3f » Tg+ Infectée J8		
G	Point de gamme 7 du gène hGIIA = dilution 7			Foie souris « 1g » Tg+ Infectée J14			Foie souris « 2g » Tg+ Infectée J14			Foie souris « 3g » Tg+ Infectée J14		
H	H ₂ O			Foie souris « 1h » Tg+ Infectée J21			Foie souris « 2h » Tg+ Infectée J21			Foie souris « 3h » Tg+ Infectée J21		

Le programme d'amplification est le suivant :

Etape 1	Activation de l'enzyme		95°C – 2 minutes
Etape 2	Cycles d'amplification n = 45	Dénaturation des brins d'ADNc	95°C – 10 secondes
		Hybridation des amorces à la matrice	60°C – 5 secondes
		Elongation	72°C – 10 secondes
Etape 3	Etape de fusion		65°C – 1 minute puis 65°C à 95°C (Acquisition continue)

A la fin du programme, la plaque est récupérée et conservée à 4°C.

2.4.5.5.3. Etapes de validation de la méthode

Ces étapes correspondent à la vérification de : 1) la spécificité des amorces, 2) l'absence d'inhibiteurs de la polymérase dans les échantillons d'ARN, 3) l'absence de contamination des ADNc par de l'ADN génomique et 3) l'efficacité de l'amplification par RT-qPCR.

2.4.5.5.3.1. Spécificité des amorces

Ce contrôle permet de s'assurer que les amorces utilisées amplifient un seul et unique fragment d'ADN correspondant au gène d'intérêt.

Méthode : à la fin des 45 cycles d'amplification par qPCR, ce qu'on appelle l'étape de fusion correspond à une augmentation progressive de la température (jusqu'à 95°C), destinée à provoquer la dénaturation des doubles brins d'ADN formés à l'issue de l'amplification. La dénaturation entraîne la séparation des brins d'ADN et donc une chute de la fluorescence (le SYBR green se décroche). Cette baisse de fluorescence est mesurée par le LightCycler® 480 II et est retranscrit à l'écran par une courbe sigmoïde décroissante (« melting curves ») ([Figure 14](#)). Pour une question de simplicité visuelle, le programme donne également la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température (courbe en « cloche ») informant sur la température de fusion du produit amplifié (« melting peaks », [figure 14](#)). Lorsque les amorces sont spécifiques du gène d'intérêt, un seul produit se forme au cours de la PCR, lequel sera dénaturé à une température donnée. Un seul et unique pic de fusion est observable. En revanche, si le couple d'amorces n'est pas spécifique, d'autres produits peuvent être formés à partir d'autres ADNc. Au moment de la dénaturation finale, plusieurs températures de fusion vont être enregistrées, ce qui visuellement se traduira par l'apparition de pics supplémentaires.

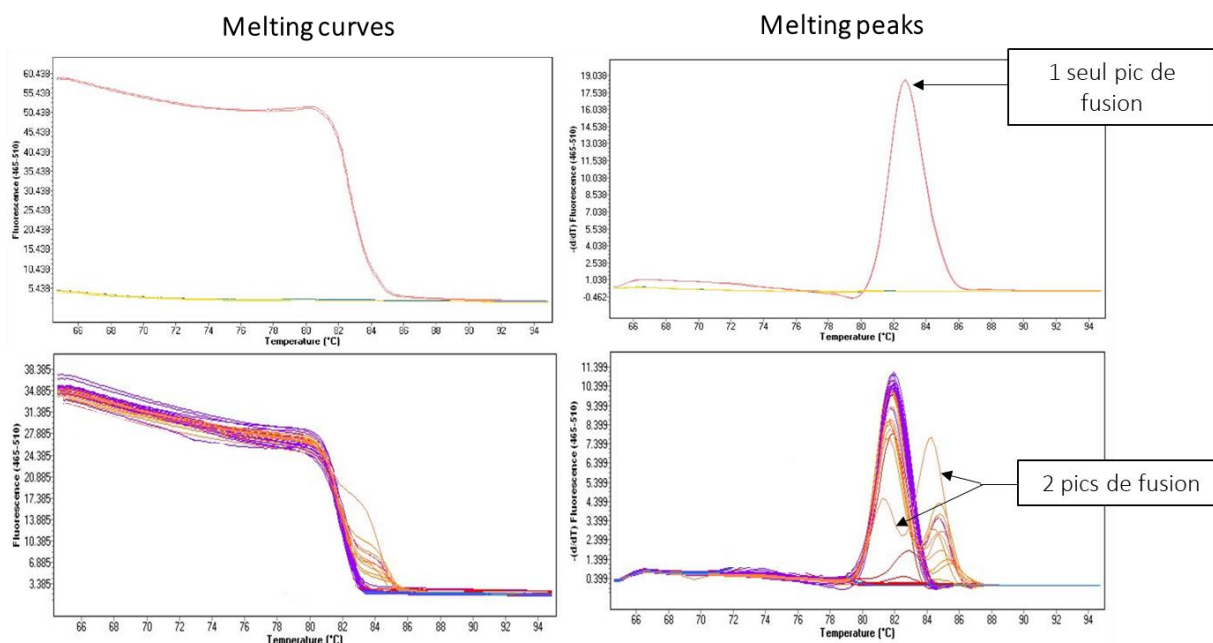


FIGURE 14 : EXEMPLE DE « MELTING CURVES » ET DE « MELTING PEAKS » OBTENUS PAR LE LOGICIEL DU LIGHTCYCLER®480 II APRES UNE EXPERIENCE DE QPCR.

La spécificité des amorces est vérifiée visuellement sur tous les échantillons à chaque expérience de qPCR et confirmée par électrophorèse sur gel 1,5% d'agarose en TAE (migration de 45 minutes à 80V) pour au moins un résultat d'amplification obtenu à partir d'un organe et pour chaque couple d'amorces.

2.4.5.5.3.2. Vérification de l'absence d'inhibiteur

Cette étape permet de vérifier que l'ARN purifié obtenu après traitement à la DNase ne contient pas d'inhibiteur de la transcriptase réverse, ce qui pourrait entraîner un défaut de fabrication de l'ADNc.

Le principe est le suivant : une gamme d'ARN de quantité décroissante (dilutions en série) est réalisée, puis des réactions de rétro-transcription (RT) sont faites sur chaque point de la gamme, suivies d'une amplification par qPCR. Si l'échantillon ne contient pas d'inhibiteur de la réaction de RT, alors les échantillons rétro-transcrits contiennent une quantité proportionnelle d'ADNc. Lors de la qPCR, chaque point de gamme dilué apparaîtra un Cp après le point de gamme précédent. Cependant, si les échantillons contiennent des inhibiteurs de la réaction de RT, alors les points les plus concentrés de la gamme seront rapprochés et apparaîtront en même temps ou à moins d'un Cp.

La présence d'inhibiteur a été testée sur les ARN extraits du foie, pour les 4 temps de sacrifices (J0, J8, J14 et J21 p.i.) sur les deux génotypes murins. Ces tests ont été réalisés avec le couple d'amorces spécifiques du gène *Hprt1*. Quatre quantités d'ARN ont été testées : 500 ng, 250 ng, 125 ng et 62,5 ng.

2.4.5.5.3.3. Contrôle de la contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique (ADNg)

Cette étape permet de s'assurer que l'amplification du gène d'intérêt a lieu à partir de l'ADNc et non de l'ADNg, qui pourrait être présent dans l'échantillon malgré le traitement à la DNase.

Lors de la conception des amorces, le choix s'est porté sur des séquences exoniques séparées de préférence par un intron, de façon à introduire une différence de taille entre l'amplicon d'ADNc et un éventuel amplicon d'ADNg. Le seul couple d'amorces que nous avons conçu qui ne répond pas à cette exigence est celui ciblant le gène de ménage *Gapdh*. Pour cette raison, le contrôle de la contamination par de l'ADNg a été effectué sur tous nos échantillons avec les amorces correspondant à ce gène.

Pour détecter la présence d'ADNg contaminant, l'astuce consiste à procéder à l'amplification de la séquence nucléotidique d'intérêt sans passer par l'étape de fabrication de l'ADNc. Dans ces conditions, seule la séquence d'ADN génomique, si elle est présente, sera amplifiée. Le protocole appliqué est le même qu'en « **2.4.5.4. Rétro-transcription des ARN messagers en ADN complémentaires** », si ce n'est que l'étape de rétro-transcription est faite en absence de transcriptase réverse (omission de la RevertAid dans le mélange réactionnel).

2.4.5.5.3.4. Mesure de l'efficacité

La mesure de l'efficacité est un moyen de vérifier que le doublement de la matrice a lieu à chaque cycle d'amplification. En effet, l'efficacité de la duplication n'est pas toujours totale. Il peut arriver qu'une proportion faible des amorces ne s'hybrident pas avec la matrice d'ADN à chaque étape d'hybridation des amorces. Ceci peut être dû à une mauvaise conception des amorces (taille, richesse en GC ou non etc.), à la présence

d'inhibiteur, à l'épuisement des éléments réactionnels en fonction de la phase de la réaction, aux structures secondaires des acides nucléiques ou à une température d'hybridation inadaptée etc.

La mesure d'efficacité est réalisée grâce à la méthode des dilutions sérielles par l'élaboration d'une gamme d'ADNc de concentration décroissante (ici sur 7 points), puis d'une amplification par qPCR selon le protocole indiqué dans la partie « 2.4.5.5.2 Amplification par qPCR ». A partir des valeurs de Cp obtenues pour chaque point de gamme, la droite de type $[Cp = f(\text{Log concentration échantillon standard})]$ (« standard curve ») permet de calculer l'efficacité (E) par la formule : $E = 10^{\frac{-1}{p}} - 1$, avec p, la pente de la droite. L'efficacité doit être le plus proche possible de 1, ce qui correspond en pratique à un doublement de 100% de la matrice après un cycle d'amplification. Cependant, l'efficacité est considérée comme acceptable dès 0,9, soit 90% de doublement d'un cycle à l'autre.

Cette mesure est effectuée pour chaque couple d'amorces à chaque expérience de qPCR. Cette gamme doit couvrir les Cp des échantillons cibles. Sa disposition dans la plaque de 96 puits est indiquée dans la figure 13, partie « 2.4.5.5.2 Amplification par qPCR ».

2.4.5.5.4. Quantification relative

La quantification relative fait intervenir des gènes de référence qui servent de normalisateurs dans la mesure où ces gènes sont, en théorie, exprimés de façon constitutive et à un niveau identique dans tous les échantillons à analyser (ce qui implique qu'ils ne soient pas régulés dans le système expérimenté). Ils fournissent un contrôle interne à l'échantillon, et permettent de s'affranchir des biais de la qPCR pouvant provenir : des variations dans la quantité et la qualité des extraits tissulaires, des erreurs de pipetage et/ou des variations d'efficacité entre les expériences de qPCR. Avant de sélectionner un gène de référence, il faut démontrer que le protocole expérimental n'influence pas son expression. Un bon gène de référence devrait être exprimé de la même manière dans chaque échantillon.

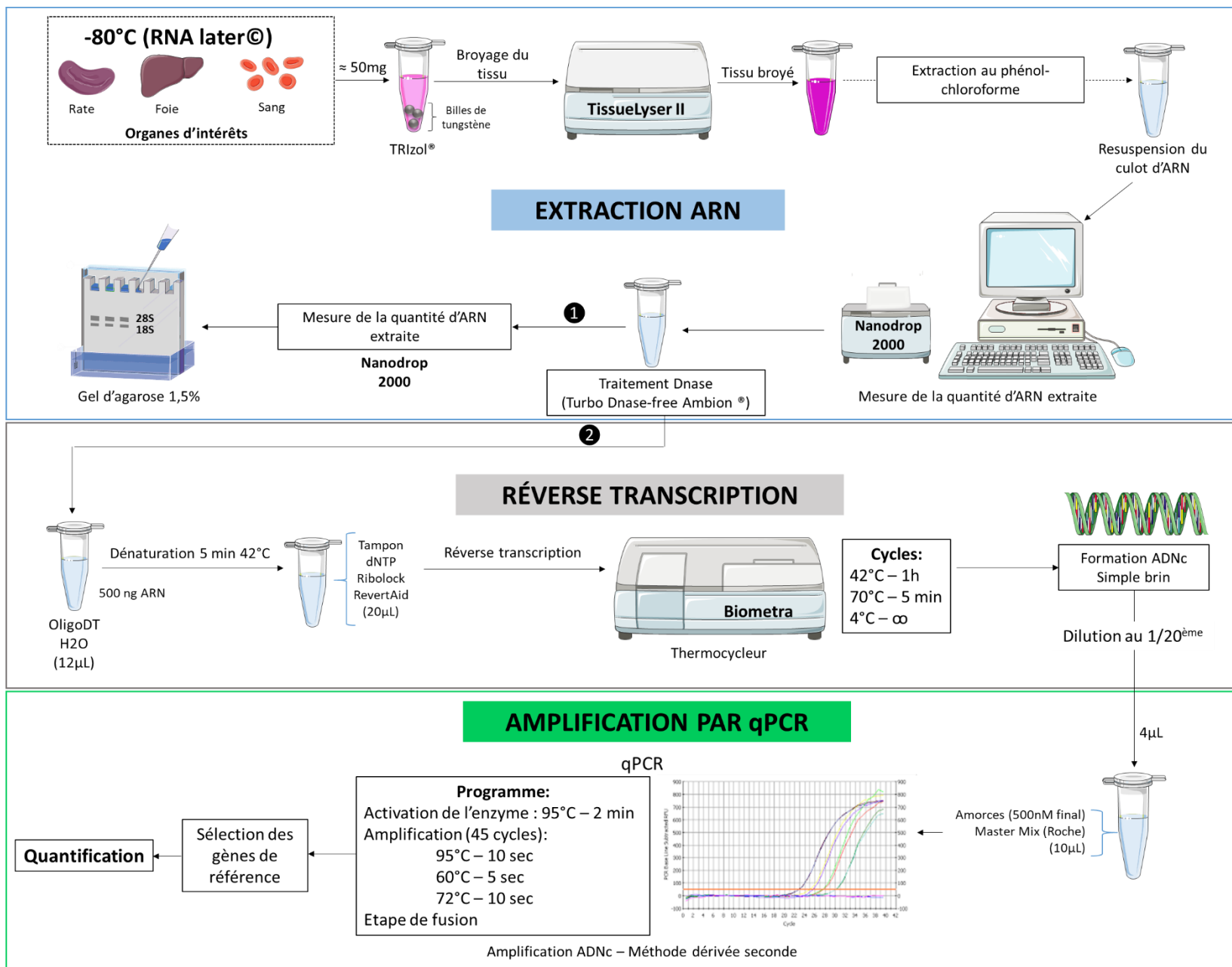
8 gènes de ménage ont été testés *Actb* (actine B), *B2m* (bêta 2 microglobuline), *Gapdh* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), *Gusb* (bêta-glucuronidase), *Hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransférase), *Tbp1* (Tata box-binding protein), *Pgk1* (3-phosphoglycérate kinase) et *Rplpo* (ribosomal protein large PO). Pour tester la stabilité de leur expression l'algorithme Genorm a été utilisé. Il a permis de sélectionner, pour chaque organe (foie, rate et sang) les gènes de référence présentant des niveaux d'expression comparables dans les 4 conditions testées (J0, J8, J14 et J21 p.i.). L'algorithme permet aussi de déterminer le nombre minimum de gènes de référence nécessaires pour établir un coefficient de normalisation, en se basant sur deux paramètres : la stabilité d'expression du gène et la variation par paires, en comparant les gènes de référence deux à deux.

Le calcul de la normalisation (R) a été réalisé à l'aide de la formule suivante :

(avec n nombre de gènes de référence choisis)

$$R = \frac{(1 + E_{\text{Gène intérêt}})^{\overline{Cp_{\text{temps } 0}} - \overline{Cp_{\text{temps } x}}}}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n (1 + E_{\text{Gène de référence}})^{\overline{Cp_{\text{temps } 0}} - \overline{Cp_{\text{temps } x}}}}}$$

2.4.5.5. Schéma récapitulatif des grandes étapes de la RT-qPCR



2.4.6. Injection de hGIIA exogène à des souris WT parasitées

Dans le cadre de l'analyse des effets de la hGIIA sur le développement parasitaire chez les souris, de la hGIIA recombinante a été injectée (collaboration Dr. G. LAMBEAU). Des souris C57BL/6 WT ont été inoculées par voie IP avec *P. c. chabaudi* 864VD (1×10^6 GRi), puis elles ont reçu des injections de hGIIA à des moments choisis de l'infection : soit au début de la phase patente, soit juste avant le pic de crise. Elles ont eu chacune deux injections par voie IP par jour (une le matin et une le soir) pendant 3 jours. La hGIIA à injecter a été préparée à partir d'une solution stock en Tris/HCl pH = 8, 10 mM CaCl₂, 0,1% BSA, par dilution en PBS contenant 1% de sérum de souris saine C57BL/6 WT, de façon à obtenir une solution d'enzyme à 1,8 µM stérilisée par filtration sur membrane 0,2µm. En contrôle, des souris inoculées de la même manière ont reçu aux mêmes moments une injection de 100 µL de tampon PBS-sérum, sans PLA2. Lors de ces expériences, chaque souris a donc reçu 0,125 mg/kg/injection de hGIIA recombinante.

2.4.7. Injection de liposomes substrats de la hGIIA à des souris Tg+ parasitées

Afin de tester l'hypothèse où l'effet anti-*Plasmodium in vivo* de la hGIIA serait dû à la production de PUFA par l'enzyme, des liposomes-substrats enrichis en AA ont été fabriqués (voir [Tableau 7](#), partie « **2.1. Préparation des liposomes** », ci-après) et injectés à des souris Tg+ parasitées. Le résultat attendu était une accentuation de l'effet antiparasitaire. Les souris inoculées par *P. c. chabaudi* 864VD, ont reçu une injection par voie IP de 50µL de liposomes à 0,1 mg PL/mL par jour, sur 2 jours. Les liposomes étaient de composition variable ([Tableau 7](#)). Les souris contrôles, inoculées avec *P. c. chabaudi* de la même manière, ont reçu aux mêmes moments une injection de 50 µL de PBS.

2.5. Récapitulatif des expériences réalisées *in vivo*

N°	Question scientifique	Tests effectués	Type de souris	Nombre d'animaux	Nombre final d'animaux*	Age des souris
1	Le profil infectieux est-il différent entre les souris Tg- et Tg+ ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les jours ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires 	Tg- Tg+	7 7 Total : 19	3 7 Total : 10	4 mois
2	Répétition de l'expérience 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Numération des GR et des GB ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Mesure de la protéinémie ▪ Dosage de l'activité hGIIA circulante 	Tg- Tg+	10 9 Total : 19	10 8 Total : 18	2 à 3 mois
3	Y-a-t-il des différences histopathologiques entre les souris Tg- et Tg+ ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Numération des GR et des GB ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Coupe/Coloration à l'hématoxyline éosine ▪ Marquages immunohistochimiques des LT et des LB ▪ Mesure des TBARS dans plasma 	Tg- Tg+	20 14 Total : 34	18 13 Total : 31	2 à 3 mois
4	L'injection de hGIIA recombinante, juste avant le pic parasitaire, à des souris non transgéniques infectées permet-elle de reproduire le phénotype parasitaire observé chez les souris Tg+ ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Injection de hGIIA recombinante à J12, J13 & J14 p.i. 	Tg- Tg+	24 10 Total : 34	19 7 Total : 26	2 à 5,5 mois
5	Répétition de l'expérience 4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Injection de hGIIA à J12, J13 & J14 	WT	23 Total : 23	16 Total : 16	2,5 mois
6	Répétition de l'expérience 3 Y-a-t-il un changement d'expression des ARNm des sPLA2 hGIIA, mGIIF, mGIII, mGV et mGX dans le foie, la rate et le sang au cours de l'infection ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Coloration à l'hématoxyline éosine ▪ Mesure des TBARS ▪ RT-qPCR 	Tg- Tg+	24 24 Total : 48	18 18 Total : 36	2 à 5,5 mois

N°	Question scientifique	Tests effectués	Type de souris	Nombre d'animaux	Nombre final d'animaux*	Age des souris (mois)
7	L'injection de hGIIA recombinante à des souris WT au début de la phase patente de l'infection permet-elle de diminuer la parasitémie ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Répartition des sous-populations leucocytaires ▪ Injection de hGIIA recombinante à J8, J9 & J10 	WT	16 Total : 16	11 Total : 11	3 mois
8	L'injection de liposomes à des souris Tg+ permet-elle d'amplifier le phénotype parasitaire et donc d'engendrer une baisse de parasitémie plus importante ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Injection de liposomes à J10 & J11 	Tg- Tg+	35 35 Total : 70	18 21 Total : 39	2,5 à 6,5 mois
9	Le nombre et le statut des cellules sanguines varient-ils au cours de l'infection et diffèrent-ils entre souris Tg- et Tg+ ?	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suivi de la parasitémie tous les 2/3 jours ▪ Numération de formule sanguine (ENVA) 	Tg- Tg+	24 24 Total : 48	21 10 Total : 31	2,5 à 7 mois

*Contrôles non infectés inclus

3. Analyses statistiques

Les données ont été analysées au moyen du logiciel GraphPad Prism6 (San Diego, CA). La normalité est testée avec le test de Shapiro-Wilk pour les effectifs de $n \geq 6$. Lorsque les valeurs ont une distribution normale, la significativité est testée par le test paramétrique unpaired t-test (bilatéral). Lorsque les valeurs ne présentent pas une distribution normale et/ou lorsque les effectifs sont de $n \leq 6$, le test de Mann-Whitney (non paramétrique) est appliqué pour des échantillons indépendants ou, pour des échantillons dépendants, celui de Wilcoxon. Les p-values $< 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***) et $< 0,0001$ (****) sont considérés respectivement comme statistiquement significatif, très significatif, hautement significatif et extrêmement significatif.

Approche expérimentale *in vitro* du mécanisme d'activité anti-*Plasmodium* de la hGIIA

1. Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

La souche palustre colombienne chloroquine résistante FcB1 (MNHN-CEU-224-PfFCB1, Unicellular Eukaryots Collection, National Museum of Natural History) est cultivée *in vitro* selon la méthode de (Trager and Jensen, 1976), dans des GR de groupe A+ et du plasma issu de sang du même groupe. Les cultures sont maintenues en routine à un hématoците de 2% dans du RPMI 1640 (Roosevelt Park Medium Institute, Gibco™, Life Technologies), supplémenté avec 50 µg/mL de pénicilline et streptomycine, 11 mM de glucose, et 27,5 mM de NaHCO₃. Ceci forme le milieu de base. Pour la culture du parasite, on ajoute au milieu de base du plasma humain A+ décomplémenté (8% final). Ceci forme le milieu complet. Les cultures sont maintenues sous atmosphère à 6% de dioxygène, 3% de dioxyde de carbone, et 91% de diazote, à 37°C. Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures. Les cultures sont régulièrement diluées dans des GR (conservés en chambre froide depuis moins de 3 semaines), préalablement lavés en milieu de base.

2. Tests d'inhibition de croissance de *Plasmodium falciparum* par la hGIIA en présence de liposomes riches en PUFA

2.1. Préparation des liposomes

Les liposomes ont été fabriqués à l'IPMC de Nice Sophia-Antipolis, par les Drs Bruno ANTONNY et Gérard LAMBEAU. Les phospholipides utilisés : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine, 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine, 1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-(1-glycérol)], et 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-(1-glycérol)] sont commercialisés par la société Avanti® Polar Lipids.

Quatre préparations de liposomes avec et sans PUFA ont été réalisées suivant les compositions présentées dans le tableau 7.

TABLEAU 7 : COMPOSITION DES LIPOSOMES.

	16:0-18:1 PC ¹	18:0-20:4 PC ²	18:0-18:1 PG ³	18:0-20:4 PG ⁴	Cholestérol
Liposomes 1 Liposomes anioniques PUFA +	20%	30%	10%	20%	20%
Liposomes 2 Liposomes anioniques PUFA -	50%	0%	30%	0%	20%
Liposomes 3 Liposomes zwitterioniques PUFA +	30%	50%	0%	0%	20%
Liposomes 4 Liposomes zwitterioniques PUFA -	80%	0%	0%	0%	20%

PUFA + : avec PUFA/ PUFA - : sans PUFA. ¹ 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine. ² 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine. ³ 1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-(1-glycérol)]. ⁴ 1-stéaroyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-[phospho-rac-(1-glycérol)].

Les quantités nécessaires aux expériences *in vitro* et *in vivo* ont été préparées, aliquotées et stockées à -20°C sous argon avant l'étape d'extrusion. L'extrusion est réalisée peu de temps avant l'utilisation des liposomes (3-4 jours), de façon à minimiser les risques de changements de conformation liés à un stockage long.

Les films lipidiques de composition en lipides définie ont été fabriqués dans un évaporateur rotatif et resuspendus dans du PBS fraîchement dégazé pour éviter l'oxydation. Les suspensions de liposomes (5 mg/mL) ont été aliquotées, puis congelées et décongelées 5 fois pour diminuer la multilamellarité des vésicules, et finalement conservées à -20°C sous argon.

Pour chaque préparation de liposome, un tube de 400 µL a été décongelé et soumis à 19 cycles d'extrusion à travers un filtre de polycarbonate de 0,4 µm (Avanti extruder). Les liposomes extrudés ont été conservés jusqu'à 4 jours à 4°C sous argon avant manipulation. La concentration finale en phospholipides, estimée à 5 mg/mL, a été vérifiée avec le kit de dosage des phospholipides de la société Biolabo.

2.2. Test d'inhibition de croissance de *P. falciparum*

Une culture de la souche FcB1 de *P. falciparum* en milieu complet est amenée à 2% hématocrite et environ 0,2% parasitémie, supplémentée avec du CaCl₂ 2H₂O 1 mM final, puis est distribuée dans une plaque à 96 puits à raison de 150 µL par puits. Les suspensions de liposomes sont distribuées dans les puits concernés à la concentration finale de 0,02 mg/mL de phospholipides (ajout de 6 µL de la suspension de liposomes diluée au 1/10^{ème} en PBS, par puits). Un volume de 3 µL d'une solution 5 µM de hGIIA recombinante en 0,1 M Tris, 10 mM CaCl₂ 2H₂O, 0,1% BSA, pH = 8 est ajoutée dans les puits concernés (concentration finale en enzyme = 100 nM). Le même volume de Tris-calcium-BSA est ajouté dans les puits contrôles sans hGIIA. La plaque est incubée à 37°C en cloche à trigaz (6% O₂, 3% CO₂, 91% N₂). Un frottis coloré au Diff-Quik™ est réalisé, à partir de 50 µL prélevés dans chaque puits, au bout de 24h et de 48h. La parasitémie est déterminée par comptage de 1000 GR. Deux expériences indépendantes ont été réalisées.

III. RESULTATS

Afin d'analyser le ou les effets de la hGIIA dans l'infection plasmodiale, nous avons entrepris la caractérisation de l'infection à *P. chabaudi* chez les souris C57BL/6 transgéniques pour l'enzyme humaine (souris Tg+). Cette caractérisation s'est faite selon différentes approches :

(1) La première approche a consisté à établir le profil infectieux des souris Tg+, à analyser différents paramètres biochimiques et cellulaires du sang au cours de l'infection, et à valider le phénotype antiparasitaire observé dans le modèle murin par injection de hGIIA exogène à des souris non transgéniques.

(2) Le deuxième volet a consisté à élargir nos connaissances de la physiopathologie du modèle murin transgénique par une analyse histologique et immunohistochimique des organes chez la souris infectée, complétée d'une approche moléculaire focalisée sur l'expression des ARNm de la hGIIA dans quelques organes.

(3) Enfin, nous avons abordé l'étude de deux mécanismes susceptibles d'être impliqués dans l'activité antiparasitaire de la hGIIA chez la souris Tg+ : (i) la libération de lipides toxiques pour *Plasmodium*, par hydrolyse enzymatique des lipoprotéines oxydées contenues dans le plasma, (ii) la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte murin.

PARTIE 1 : Données hématologiques

1. Caractérisation du profil infectieux chez la souris C57BL/6 transgénique pour la hGIIA infectée par *Plasmodium chabaudi chabaudi* 864VD

Afin d'analyser *in vivo* l'effet éventuel de la hGIIA sur le développement parasitaire, des souris C57BL/6 transgéniques pour l'enzyme ont été inoculées par l'espèce murine de *Plasmodium* : *P. chabaudi chabaudi* 864VD, et le profil infectieux a été établi. Ce profil a été comparé à celui de souris non transgéniques issues des mêmes portées.

1.1. Les souris Tg+ présentent une diminution de la parasitémie au pic de crise par rapport aux souris Tg-

Deux expériences indépendantes ont été menées. Des prélèvements de sang caudal ont été effectués tous les jours (expérience 1) ou tous les 2/3 jours (expérience 2). A partir de ces prélèvements, un frottis a été réalisé afin d'établir les parasitémies.

Les [figures 15 \[A\] et 15 \[C\]](#) présentent l'évolution de la parasitémie chez les souris Tg- et les [figures 15 \[B\] et 15 \[D\]](#) celle de la parasitémie chez les souris Tg+ au cours des expériences 1 et 2. Pour les deux génotypes de souris, on observe une période de latence de 7 jours environ (phase pré-patente), où aucun parasite n'est détecté sur frottis sanguin coloré, puis les premiers parasites apparaissent sur frottis, soit vers le 8^{ème} jour post-inoculation (J8 p.i.) (début de la phase patente). Après une augmentation rapide et importante du nombre de parasites dans le sang, la parasitémie atteint un maximum vers J14 p.i., (c'est le pic de crise) suivi d'une chute brutale dans les jours suivants. Une recrudescence parasitaire de faible amplitude (parasitémie de 5 à 10%) a pu être observée chez la moitié des souris Tg- (5 souris sur 10) et plus rarement chez les souris Tg+ (2 souris sur 13), après le pic de crise. A partir de J22 p.i. environ et jusqu'à J28 p.i., l'observation des frottis montre une absence de parasites dans le sang des souris Tg- et Tg+.

L'établissement des valeurs de parasitémie montre une différence entre les deux types de souris. On observe en effet une baisse de la parasitémie au moment du pic de crise ([Figure 15 \[E\]](#)), avec une parasitémie maximale moyenne de 37,9% chez les souris Tg- et de 27,5% chez les souris Tg+, soit une diminution de la parasitémie d'environ 27% chez les souris Tg+. La différence est statistiquement très significative (unpaired t-test, ***p = 0,0002) ([Figure 15 \[F\]](#)).

Au final, la comparaison des profils infectieux chez les souris Tg- et Tg+ permet de mettre en avant 3 points : (1) le déroulement des premières phases de l'infection (durée de la phase pré-patente, moment du pic de crise) est identique chez les souris Tg- et Tg+ ; (2) les souris Tg+ exercent un meilleur contrôle parasitaire au pic de crise que les souris Tg-, se traduisant par une baisse de la parasitémie d'environ 27% ; et (3) une recrudescence parasitaire qui survient rapidement après le pic s'observe de manière assez fréquente chez les souris Tg- et plus rarement chez les souris Tg+.

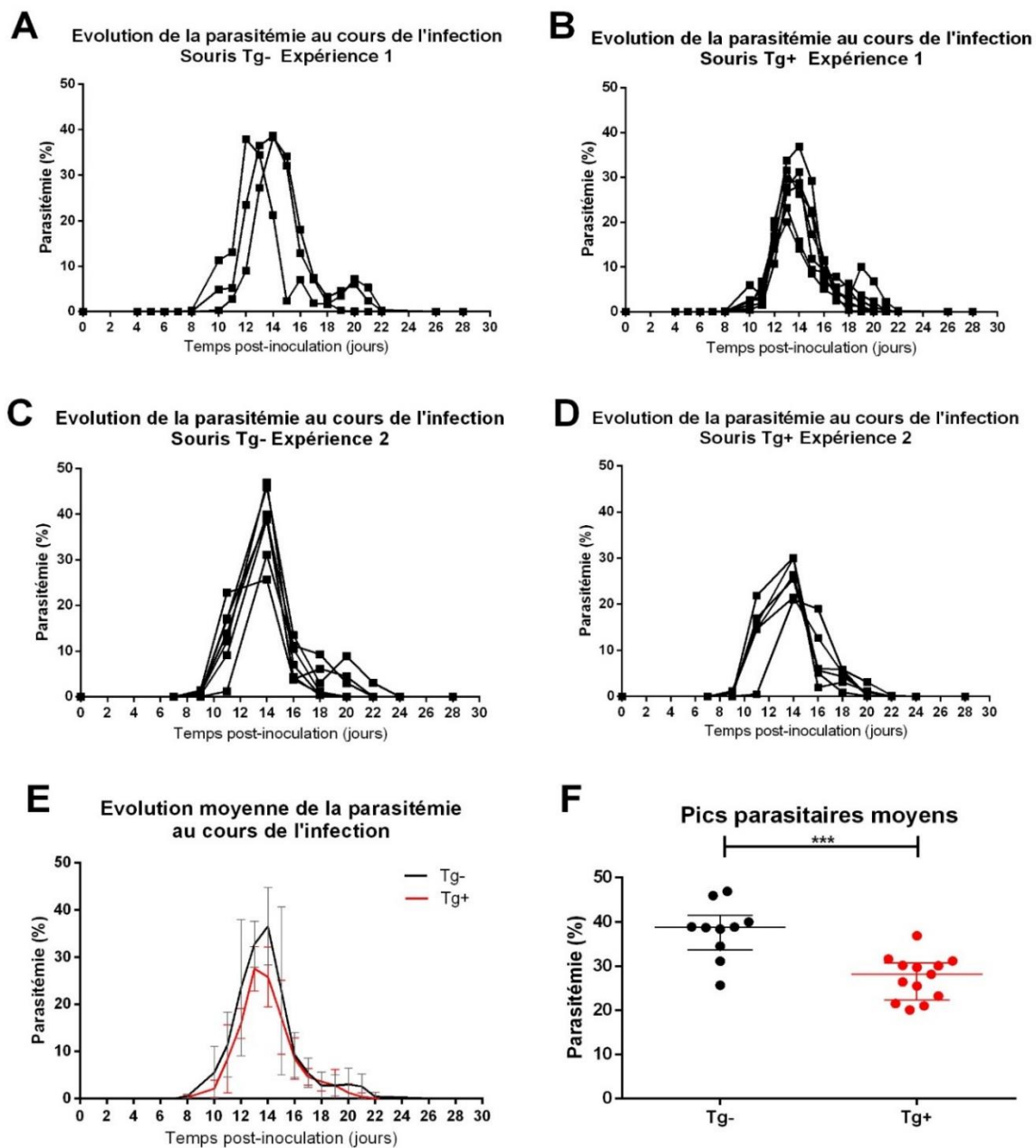


FIGURE 15 : COMPARAISON DES PROFILS INFECTIEUX CHEZ LES SOURIS C57BL/6J Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR P.CHABAUDI.

Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Les souris Tg- et Tg+ ont reçu une injection de 1×10^6 GRi en IP. La parasitémie a été suivie tous les jours (A) et (B) ou tous les 2/3 jours (C) et (D) sur frottis de sang caudal. (A) Expérience 1 : profil infectieux de 3 souris Tg-. (B) Profil infectieux de 7 souris Tg+ (C) Expérience 2 : profil infectieux de 7 souris Tg- (D) Profil infectieux de 6 souris Tg+. (E) Moyennes des valeurs de parasitémie au cours de l'infection chez les souris Tg- (en noir) et Tg+ (en rouge). (F) Comparaison des valeurs maximales de parasitémie atteintes chez les souris Tg- (en noir), $n = 10$ et Tg+ (en rouge), $n = 13$. Unpaired t-test, *** $p = 0,0002$.

1.2. Augmentation du niveau d'activité sPLA2 dans le plasma des souris Tg+ au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

La mesure de l'activité enzymatique de type sPLA2 du plasma a été réalisée afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications du niveau d'activité de la hGIIA au cours de l'infection parasitaire chez les souris Tg+.

Le plasma issu du sang caudal de 2 groupes de souris Tg+ (au total : n = 12) et d'un groupe de souris Tg- (n = 4), a été testé au cours de 2 expériences d'infection indépendantes. L'activité sPLA2 a été mesurée par le test classique d'hydrolyse des membranes d'*E. coli* marquées à l'acide oléique tritié.

1.2.1. L'activité sPLA2 mesurée dans le plasma des souris Tg+ augmente parallèlement à l'infection

Nos résultats ont montré que le niveau d'activité enzymatique de type sPLA2 présent dans le plasma des souris Tg- est négligeable par rapport au niveau d'activité décelé dans le plasma des souris Tg+. En effet, un taux d'hydrolyse du substrat \leq à 20% (conditions vitesse initiale) est obtenu pour des dilutions \geq 1/500^{ème} des plasmas des souris Tg+ ; alors que les plasmas des souris Tg- non dilués ne présentent qu'une faible activité résiduelle.

Comme attendu (Grass et al., 1996), chez les souris Tg+ naïves, une forte activité enzymatique de type sPLA2 a été mesurée (temps « -14 » sur la [figure 16](#)). Rapportée à une gamme d'activité sPLA2 établie avec des concentrations croissantes de hGIIA recombinante dans du plasma de souris saine, la concentration circulante d'enzyme chez les souris naïves a été estimée à 30nM. La concentration augmente parallèlement à l'infection pour atteindre une valeur maximale médiane d'environ 65nM au pic de crise parasitaire (temps « 0 » sur la [figure 16](#)). L'activité sPLA2 décroît ensuite rapidement jusqu'à son niveau initial.

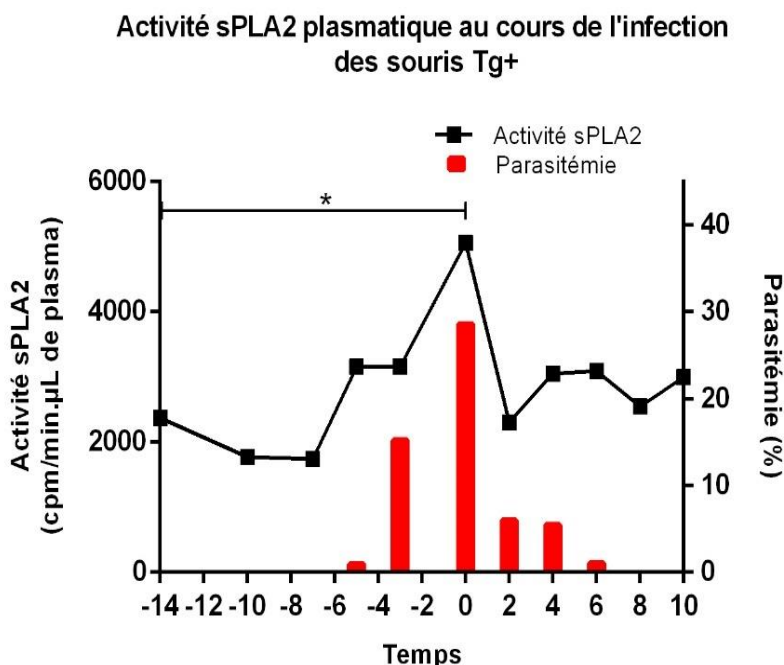


FIGURE 16 : ACTIVITE sPLA2 AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg+.

Deux groupes de 6 souris Tg+ ont été inoculés avec 1×10^6 GRI lors de 2 expériences indépendantes. Un prélèvement caudal a été effectué tous les 2-3 jours. Un frottis a été établi puis le sang a été centrifugé afin de dissocier les cellules du plasma. L'activité sPLA2 du plasma, dilué au 1/500^{ème} (Tg+) a été mesurée par le test d'hydrolyse de membranes d'*E. coli* marquées à l'acide oléique tritié. Le graphique a été établi en regroupant les résultats des deux expériences. Les valeurs reportées sont celles de la médiane. Activité sPLA2 (■), Parasitémie (■). Noter que sur l'axe des abscisses, pour des commodités de présentation, l'origine a été établie au pic de crise (« 0 » correspond au jour du pic, « +1 » à un jour après le pic et « -1 » à un jour avant le pic etc.) L'augmentation d'activité enzymatique mesurée entre J-14 et J0 est statistiquement significative. Test de Wilcoxon, *p = 0,0425.

1.2.2. L'augmentation d'activité sPLA2 du plasma ne résulte pas d'une augmentation globale de la protéinémie

Un dosage de la protéinémie a été réalisé ici afin de vérifier si l'augmentation de l'activité sPLA2 observée chez les souris Tg+ parasitées était spécifique ou si elle reflétait une augmentation globale des protéines plasmatiques.

Les concentrations en protéines des plasmas de 7 souris Tg- et 6 souris Tg+ infectées par *P. c. chabaudi* ont été mesurées à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay. Les résultats présentés en [figure 17](#) montrent que la concentration moyenne des plasmas varie peu au cours de l'infection et que le profil des variations est similaire entre les souris Tg- et Tg+. Ces résultats ont été validés statistiquement. Ceci indique que l'augmentation d'activité de la hGIIA entre le premier jour de l'infection et le jour du pic de crise est spécifique à l'enzyme.

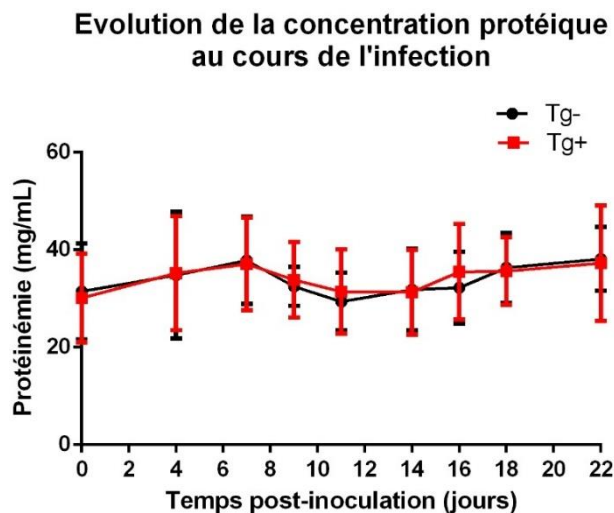


FIGURE 17 : MESURE DE LA CONCENTRATION EN PROTEINES DU PLASMA AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+

7 souris Tg- et 6 souris Tg+ ont reçu une injection de 1×10^6 GRI en IP à J0. Le plasma a été préparé par centrifugation de sang caudal prélevé à intervalles réguliers et la concentration protéique a été mesurée. Les valeurs sont données en moyenne \pm SD. Le « unpaired t-test » a été appliqué pour analyser la variation de la concentration au cours de l'infection dans chaque groupe de souris ($n^{\text{sp}} > 0,05$). Et le test de Mann-Whitney a été appliqué pour la comparaison Tg- vs Tg+ ($n^{\text{sp}} > 0,05$). Souris Tg- (●), souris Tg+ (■).

1.3. Rôle de la hGIIA dans la baisse de parasitémie

1.3.1. L'injection de hGIIA recombinante à des souris WT infectées par *P. chabaudi* induit une baisse de parasitémie au pic de crise

Ces premières données nous ont poussés à vérifier si le phénotype de baisse parasitaire observé chez les souris Tg+ au moment du pic de crise pouvait être attribué à l'augmentation de la hGIIA circulante ou s'il était plutôt dû au « fond génétique » de la souris, c'est-à-dire résulter d'éventuelles modifications d'ordre physiologique/ métabolique induites par la présence constitutive de l'enzyme humaine. Pour cela, la hGIIA produite sous forme de protéine recombinante dans le laboratoire du Dr. G. LAMBEAU a été injectée à des souris C57BL/6 non transgéniques (WT ou Tg-) infectées par *P. c. chabaudi* 864VD. Deux expériences indépendantes ont été réalisées (voir tableau page 95 dans « II. Matériels et Méthodes »), une expérience avec un lot de souris Tg- de l'élevage ($n = 11$) et une autre avec des souris WT d'origine commerciale ($n = 12$). Toutes les souris ont été inoculées à J0 avec 1×10^6 GRI, par voie IP. A partir de chaque lot de souris, un groupe test et un groupe contrôle ont été établis. Le groupe test a reçu les injections de hGIIA recombinante (0,125 mg/kg/injection), le groupe

contrôle a reçu des injections de tampon seul (soit 100µL de PBS). La parasitémie a été suivie à partir de frottis de sang caudal.

Dans la mesure où l'activité enzymatique de la hGIIA augmente dans le sang des souris avant le pic de crise, moment où s'observe la baisse de parasitémie, nous avons choisi d'injecter l'enzyme sur un intervalle de temps couvrant cette période, soit à J12, J13 et J14 p.i.. Par ailleurs, *P. chabaudi* est un parasite capable de séquestration des formes mûres. La séquestration parasitaire a lieu la nuit. Ne sachant pas si l'effet antiparasitaire de la hGIIA chez les souris Tg+ touche les formes jeunes circulantes ou a lieu au cours de la séquestration, nous avons réalisé deux injections par jour : une le matin, lorsque les parasites sont sous forme d'anneaux circulants dans le sang et une seconde le soir, au début de la période de séquestration.

L'application de ce protocole a permis d'observer une baisse de la parasitémie à J14 p.i. chez les souris ayant reçu la hGIIA (Figure 18 [A]). Les valeurs maximales de parasitémie atteintes dans les deux groupes de souris ont été comparées. La parasitémie a atteint 41,6% (médiane, n = 10) chez les souris contrôles et 30,1% (médiane, n = 13) chez les souris ayant reçu la hGIIA recombinante. La différence, d'environ 18,6%, est statistiquement significative (unpaired t-test, *p = 0,0238) (Figure 18 [B]). Il faut noter que la baisse de parasitémie est décelée à J14 p.i., à partir de frottis établis avant la dernière série d'injections, ce qui indique que les injections faites à J12 et J13 p.i. ont suffi à induire la baisse.

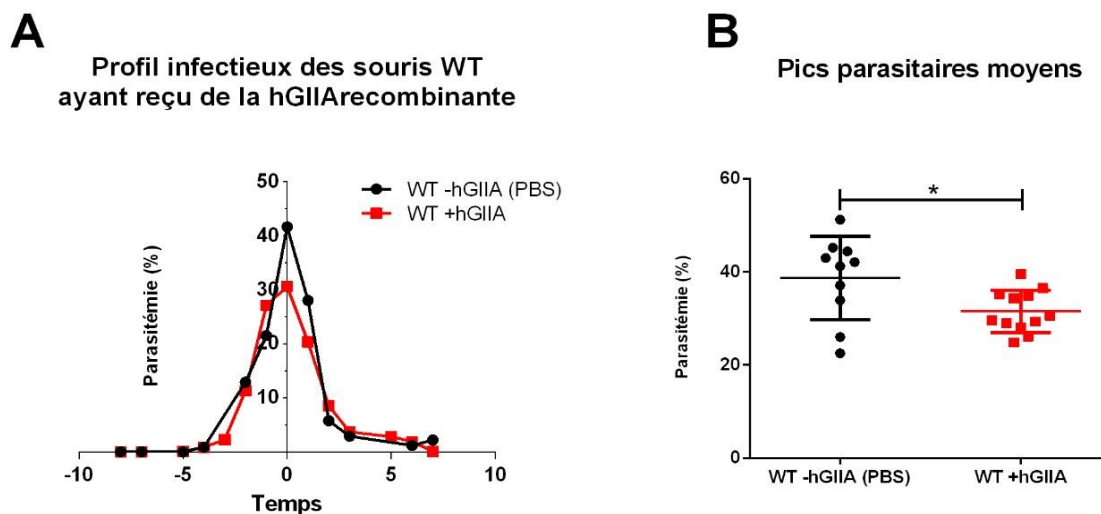


FIGURE 18 : EFFET DE L'INJECTION DE HGIIA RECOMBINANTE SUR LE DEVELOPPEMENT PARASITAIRE CHEZ DES SOURIS C57BL/6 WT INFECTÉES PAR P. C. CHABAUDI 864VD.

2 expériences indépendantes ont été réalisées (1 expérience avec 5 souris Tg- contrôles injectées PBS et 6 souris Tg- injectées hGIIA, et 1 expérience avec 5 souris WT contrôles injectées PBS et 7 souris WT injectées hGIIA). Les souris ont reçu deux injections de 100 µL par voie IP par jour (une le matin et une le soir) aux jours 12, 13 et 14 p.i. de l'infection. 100µL de PBS-sérum (souris contrôles) ou 100µL d'une solution de hGIIA à 1,8µM en PBS-sérum ont été injectés. Les résultats des deux expériences ont été regroupés. (A) Profil infectieux médian des souris contrôles (en noir) et des souris ayant reçu une injection de hGIIA (en rouge). Le jour « 0 » sur l'axe des abscisses correspond au jour de parasitémie maximum ; « -5 » à 5 jours avant le pic et « 5 » à 5 jours après le pic. Souris Tg- (●), souris Tg+ (■). (B) Valeurs maximales de parasitémie (%) atteintes chez les souris Tg- et Tg+. Les résultats sont présentés sous forme de « boîte à moustache », avec valeurs des médianes, des interquartiles et des minimum et maximum. Unpaired t-test, *p = 0,0238.

Ces résultats montrent que la hGIIA exogène peut induire une diminution de la parasitémie chez des souris WT infectées. Ceci a permis d'avancer l'hypothèse que chez les souris Tg+, c'est bien la hGIIA circulante, et non le fond génétique de la souris, qui est responsable du phénotype parasitaire observé.

2. Caractérisation des paramètres sanguins de l'infection à *P. c. chabaudi* 864VD chez la souris C57BL/6 transgénique pour la hGIIA

Les paramètres sanguins de l'infection à *P. chabaudi* sont très bien décrits dans la littérature (Stephens et al., 2012). Une de nos interrogations était de savoir si la présence de l'enzyme humaine pouvait influencer ces paramètres.

Les analyses ont été réalisées sur de petits volumes ($\approx 20 \mu\text{L}$) de sang caudal prélevé à intervalles de temps courts (2-3 jours) au cours de l'infection d'une même souris. Les paramètres sanguins d'intérêt ont été analysés manuellement.

2.1. Quantification des globules rouges et des leucocytes au cours de l'infection

La quantification des GR et des leucocytes au cours de l'infection a été réalisée à partir de 3 expériences indépendantes. Au total, 22 souris Tg- et 18 souris Tg+ ont été incluses dans les analyses. Les résultats présentés ici portent sur l'ensemble des expériences.

2.1.1. La concentration sanguine érythrocytaire diminue avec le développement du parasite chez les souris Tg- et Tg+, mais dure plus longtemps chez les Tg+

A notre connaissance, la concentration en GR du sang des souris Tg+ naïves n'a jamais été comparée à celle des souris Tg-. Les résultats présentés en [figure 19](#) semblent indiquer que la quantité de GR/ μL de sang chez les Tg+ serait plus basse que chez les Tg- (voir à J0), cependant, à cause de la variabilité des valeurs mesurées au sein de chaque groupe, l'analyse statistique n'a pas permis ici de confirmer cette observation. Comme on le verra par la suite, l'analyse NFS automatisée portant sur 5000 à 10 000 GR, a permis de confirmer la différence entre les deux souris.

L'évolution du nombre de GR/ μL de sang au cours de l'infection est présentée sur la [figure 19](#). Chez les Tg-, le nombre de GR/ μL de sang est en moyenne de $5,66 \times 10^6 \pm 3,69 \times 10^6$ avant l'inoculation. Entre J12 p.i. et J16 p.i., le nombre de GR/ μL chute brutalement pour atteindre un minimum de $1,20 \times 10^6 \pm 0,75 \times 10^6$ GR/ μL , et commence à remonter légèrement à J18 p.i. Entre J18 p.i. et J20 p.i., la concentration en GR augmente rapidement, jusqu'à retrouver son niveau initial.

Chez les souris Tg+, le nombre de GR/ μL de sang est en moyenne de $5,04 \times 10^6 \pm 4,40 \times 10^6$. Comme dans le cas des souris Tg-, une forte chute de la concentration érythrocytaire s'observe à partir de J12 p.i. pour atteindre un minimum à J18 p.i. avec $1,54 \times 10^6 \pm 0,84 \times 10^6$ GR/ μL , chiffre équivalent à celui que l'on observe chez les Tg- aux mêmes temps. Mais contrairement à ce que l'on observe chez les souris Tg-, la concentration en GR se maintient à un niveau bas jusqu'à J22 p.i., puis on note une augmentation franche des GR à J24 p.i..

La concentration sanguine en érythrocytes est dépendante du développement parasitaire. La forte chute observée aux alentours de J14 p.i. est parallèle à l'augmentation de la parasitémie chez les souris infectées à la même période. Ceci s'observe chez les souris Tg+ comme chez les souris Tg-. En revanche, la récupération en GR qui accompagne la résolution de l'infection après J16 p.i. chez les souris Tg- semble plus difficile chez les souris Tg+.

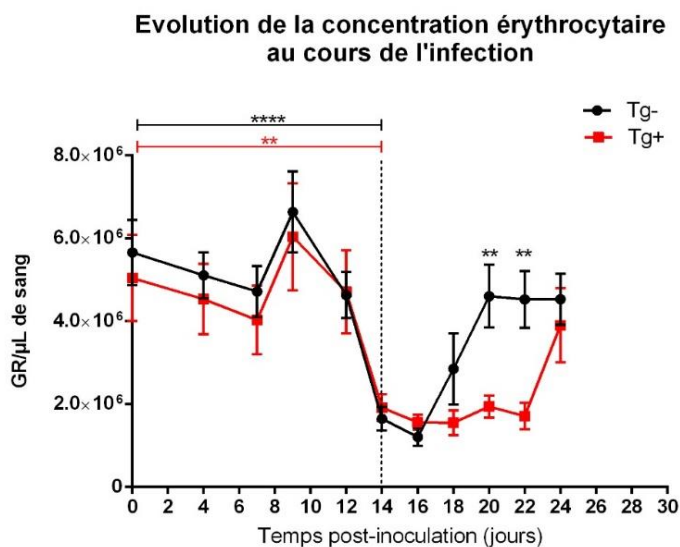


FIGURE 19 : EVOLUTION MOYENNE DU NOMBRE DE GLOBULES ROUGES PAR μL DE SANG AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+.

3 expériences indépendantes, comprenant respectivement 7 Tg- et 6 Tg+, 10 Tg- et 8 Tg+, 5 Tg- et 4 Tg+, ont été réalisées. Les souris ont été inoculées avec 1×10^6 GRi par voie IP. Un prélèvement caudal a été effectué tous les 2-3 jours et les GR ont été dénombrés sur cellule de comptage KovaSlide®. Les résultats des 3 expériences ont été regroupés. Souris Tg- (●), souris Tg+ (■).

Test de Wilcoxon : J0 vs J14 p.i., Tg- : ****p < 0,0001, Tg+ : **p = 0,0034. Mann-Whitney : J20 p.i. Tg- vs Tg+, **p = 0,0025 ; J22 p.i. Tg- vs Tg+, **p = 0,0023.

2.1.2. Le nombre de leucocytes augmente au pic parasitaire chez les deux types de souris

Chez les souris Tg+ naïves le nombre de leucocytes est naturellement plus important que chez les souris Tg- naïves (Laine et al., 2000a). D'autre part, le type de prélèvement (sang de la queue ou sang artériel) a une influence sur la quantité de leucocytes récoltés. En effet, le sang caudal est très riche en leucocytes et contient également plus de PNN (Pressac, 2006).

En accord avec ces données, nos comptages montrent que le nombre de leucocytes/ μL de sang avant inoculation est en moyenne de $1,79 \times 10^4 \pm 0,72 \times 10^4$ chez les Tg- et de $2,61 \times 10^4 \pm 1,36 \times 10^4$ chez les souris Tg+.

Le suivi du nombre de leucocytes/ μL de sang durant l'infection chez les deux types de souris est présenté en figure 20. Dans les deux cas, une légère baisse du nombre de leucocytes/ μL de sang est visible entre J7 et J11 p.i.. Puis la concentration en leucocytes augmente jusqu'à J16 p.i., avec un maximum de $3,71 \times 10^4 \pm 1,35 \times 10^4$ leucocytes/ μL de sang en moyenne chez les souris Tg- et de $6,13 \times 10^4 \pm 2,89 \times 10^4$ leucocytes/ μL de sang en

moyenne chez les souris Tg+. A partir de J16 p.i., la concentration diminue et retourne à la normale chez les deux types de souris.

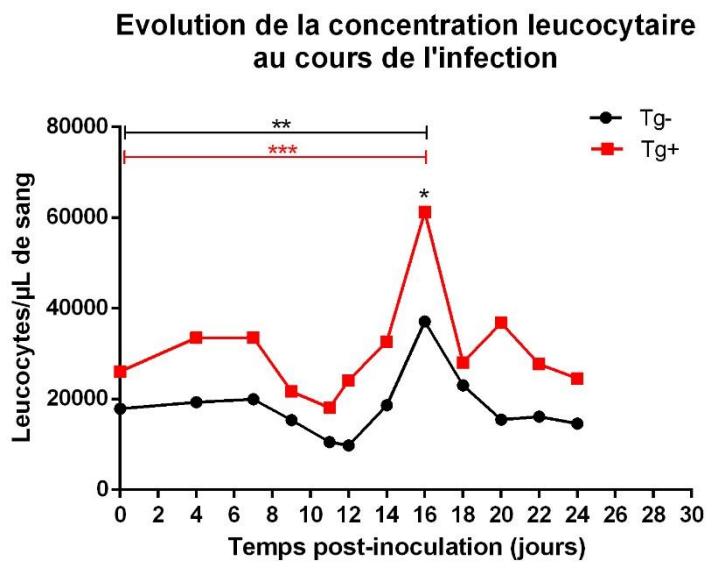


FIGURE 20 : CONCENTRATION SANGUINE MEDIANE EN LEUCOCYTES AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+.

3 expériences indépendantes (avec respectivement 7 souris Tg- et 6 souris Tg+ ; 10 souris Tg- et 8 souris Tg+, 5 souris Tg- et 4 souris Tg) ont été réalisées. Les souris ont reçu 1×10^6 GRI par voie IP. Un prélèvement caudal a été effectué tous les 2-3 jours et le nombre de leucocytes/μL de sang a été déterminé sur Kovalslide® après la lyse des érythrocytes. Les résultats des 3 expériences ont été regroupés. (●) : souris Tg-, (■) : souris Tg+. Test de Wilcoxon : J0 vs J16 p.i. : $**p = 0,0012$. Test de Mann-Whitney : J16 Tg- vs J16 Tg+ : $*p = 0,0344$.

L'évolution du nombre de leucocytes/μL de sang chez les souris Tg- et Tg+ au cours de l'infection nous informe que : (1) le nombre de leucocytes/μL de sang reste constamment supérieur chez les souris Tg+ comparé aux souris Tg- et (2) le maximum de la concentration leucocytaire est atteint deux jours après le pic de crise chez les 2 types de souris, ce qui indique que la production de leucocytes se prolonge au-delà de la diminution du nombre de parasites sanguins.

2.2. Distribution des sous-populations leucocytaires au cours de l'infection

La distribution des lymphocytes, des monocytes, des PNN et des PNE a été analysée chez les souris Tg+ infectées. Les pourcentages ont été établis par comptage optique des cellules sur frottis sanguin coloré au Diff-Quik™. Un ensemble de frottis provenant de 5 expériences d'infection indépendantes (soit 36 souris Tg- infectées et 34 souris Tg+ infectées), et établis tous les jours ou tous les 2-3 jours selon l'expérience considérée, a été analysé. Les résultats sont présentés sur la [figure 21](#).

Il a été rapporté que les souris Tg+ ont un sang plus riche en PNN et en lymphocytes (Laine et al., 2000a) que les souris Tg-, ce qui aboutit à une distribution différente des sous-populations leucocytaires chez les deux souris. Nous avons établi que les leucocytes totaux chez les souris Tg- naïves comprennent en moyenne 66,9% de lymphocytes, 28,1% de PNN, 2,4% de PNE et 2,6% de monocytes ([Figure 21 \[A\]](#), distribution à J-14), tandis que chez les souris Tg+ on trouve 48,8% de lymphocytes, 43% de PNN, 4% de PNE et 4,2% de monocytes ([Figure 21 \[B\]](#), distribution à J-14). Comme attendu, les deux types de souris présentent donc des distributions leucocytaires différentes ([Figure 21 \[C\] et \[D\]](#)), les lymphocytes étant largement majoritaires chez les souris Tg-, alors que les PNN sont presque aussi nombreux que les lymphocytes chez les Tg+. La proportion des monocytes et des PNE est aussi légèrement augmentée chez les souris Tg+.

L'évolution de la distribution des sous-populations leucocytaires au cours de l'infection est différente entre les souris Tg- et Tg+. Chez les souris Tg- infectées, on observe une diminution de la proportion de lymphocytes et une augmentation de la proportion de PNN qui débute environ 5 jours avant le pic de crise parasitaire, et se poursuit jusqu'à J+1. L'augmentation de la proportion de PNN à J+1 est statistiquement significative ([Figure 21 \[E\]](#)), et la distribution est d'en moyenne 35% de lymphocytes, 60% de PNN, 0% de PNE et 5% de monocytes. Les proportions reviennent à la normale trois jours environ après le pic de crise parasitaire. En ce qui concerne les souris Tg+ infectées, la distribution des sous-populations leucocytaires ne montre pas de variation statistiquement significative au cours de l'infection ([Figure 21 \[F\]](#)), même si l'on peut observer sur la [figure 21 \[B\]](#) une tendance à l'augmentation chez les PNN et à la diminution chez les lymphocytes aux alentours du pic de crise.

Dans la mesure où nous avons vu que le nombre de leucocytes totaux est au plus haut à J16 p.i. chez les deux souris infectées, les résultats de la distribution leucocytaire indiquent que 1) chez les souris Tg-, les PNN sont largement responsables de cette augmentation, 2) chez les souris Tg+, les deux sous-populations de PNN et lymphocytes augmentent conjointement.

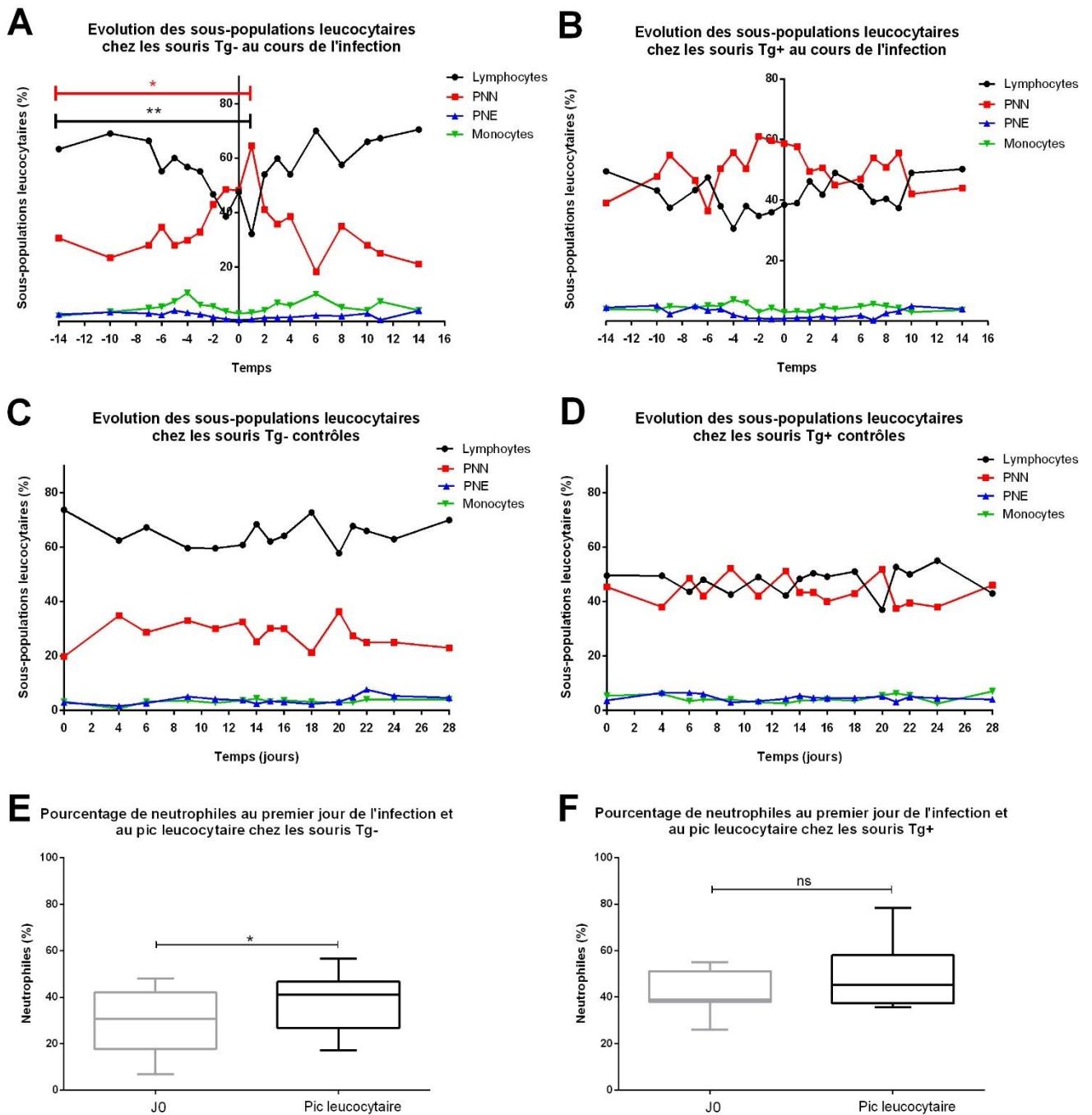


FIGURE 21 : ÉVOLUTION MOYENNE DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES.

5 expériences indépendantes ont été réalisées (respectivement, 3 souris Tg- / 7 souris Tg+ ; 7 souris Tg- / 6 souris Tg+ ; 12 souris Tg- / 9 souris Tg+ ; 5 souris Tg- / 4 souris Tg+ et 9 souris Tg- / 8 souris Tg+). Les souris ont reçu 1×10^6 GRI par voie IP. Un prélèvement caudal a été effectué tous les jours ou tous les 2/3 jours en fonction de l'expérience et un frottis sanguin a été réalisé afin de compter la distribution des sous-populations leucocytaires. Evolution des sous-populations leucocytaires (valeurs médianes) chez (A) les souris Tg- (le jour « 0 » sur l'axe des abscisses correspond au jour de parasitémie maximum) ; (B) les souris Tg+ ; (C) les souris Tg- contrôles (non infectées) ; (D) les souris Tg+ contrôles (non infectées). En noir sont représentés les lymphocytes, en rouge les polynucléaires neutrophiles, en bleu les polynucléaires éosinophiles et en vert les monocytes. Les résultats des 5 expériences sont regroupés.

Comparaison du pourcentage neutrophilique au premier jour de l'expérience et au jour du pic de leucocytes chez (E) les souris Tg- ; une différence significative est observée (Mann-Whitney ; $*p = 0,0413$) ; (F) chez les souris Tg+ ; aucune différence significative n'est observée (Mann-Whitney).

Points forts – Discussion

En conclusion de cette première partie concernant l'analyse hématologique de l'infection des souris Tg+ par *P. c. chabaudi* 864VD, nous retiendrons que :

- (1) La parasitémie maximale atteinte est en moyenne de 27% plus basse chez les souris Tg+ comparée aux souris Tg- ;
- (2) La baisse de parasitémie peut être obtenue par injection de hGIIA recombinante 2 jours avant le pic de crise chez des souris WT infectées ;
- (3) L'activité enzymatique de la sPLA2 dans le sang des souris Tg+ augmente avec la parasitémie ;
- (4) Aucune variation significative de la protéinémie n'est observée dans le plasma des souris Tg+ et Tg- au cours de l'infection, ce qui indique que l'augmentation de l'activité sPLA2 ne résulte pas d'une augmentation globale des protéines plasmatiques mais plutôt d'une augmentation nette de la quantité d'enzyme et/ou d'une activation des capacités d'hydrolyse de l'enzyme ;
- (5) Le développement parasitaire chez les deux types de souris s'accompagne d'une forte diminution de la concentration sanguine en GR. Lors de l'élimination des parasites, le retour à une concentration normale des GR est plus lent chez les souris Tg+ ;
- (6) Le nombre de leucocytes/ μ L de sang est naturellement plus important chez les souris Tg+ et reste plus important que chez les Tg- tout au long de l'infection ;
- (7) La distribution des sous-populations leucocytaires indique une inversion des proportions lymphocytes/PNN chez les souris Tg- au moment du pic de leucocytes, tandis qu'il n'y a pas de variation statistiquement significative de leurs proportions chez les souris Tg+ au cours de l'infection.

Les profils parasitaire, érythrocytaire et leucocytaire observés chez les souris Tg- infectées par *P. c. chabaudi* 864VD sont en accord avec les données bibliographiques sur le modèle C57BL/6 WT / *P. c. chabaudi* (Lamb et al., 2006) ce qui permet d'appuyer la validité des différences observées avec les souris Tg+ pour la hGIIA. Nous discuterons ici de quelques points importants.

(1) **Baisse parasitaire induite par la hGIIA exogène** : nous avons vu qu'il était possible de reproduire la baisse de parasitémie au pic de crise par des injections de hGIIA recombinante à des souris WT infectées. Ce résultat a permis de mettre en évidence un effet « direct » sur la parasitémie de la PLA2 circulante.

On constate que la baisse après injection est moins forte (18,6%) que celle qu'on observe chez les souris Tg+ infectées (27%). Cette différence pourrait être attribuée aux faits que (i) la hGIIA est sécrétée de manière constitutive chez la souris Tg+, et peut donc agir dans la durée, tandis que l'enzyme injectée est présente

transitoirement dans la circulation ; (ii) les injections ont été réalisées par voie IP et non par voie intraveineuse. En théorie, la hGIIA, petite molécule d'environ 14 kDa, peut diffuser librement entre le sang, le tissu interstitiel et la lymphe. Cependant, nous ne savons rien d'un éventuel « détournement » de l'enzyme sur son parcours (métabolisation, fixation sur des héparanes-sulfates etc.). Il est important de noter aussi que la concentration sanguine en hGIIA injectée, si l'on tient compte de sa capacité à diffuser dans les fluides corporels de la souris, ne sera pas de 100 nM mais plutôt 10 nM (soit une dilution au 1/10^{ème} si l'on compte grossièrement 2 mL de sang pour 20 mL d'H₂O chez une souris de 20g). Ce qui suggère que l'enzyme pourrait agir sur le parasite sanguin à des concentrations relativement basses, proches de celles que l'on mesure chez des patients présentant un paludisme simple (Vadas et al., 1993; et manuscrit en annexe 1).

(2) **Activité enzymatique de la sPLA2 plasmatique** : nous avons pu mesurer une augmentation de l'activité sPLA2 dans le sang des souris Tg+ infectées. L'activité sPLA2 circulante peut être attribuée à la hGIIA et pas à une sPLA2 murine dans la mesure où nous n'avons pas mesuré d'activité dans le plasma des souris Tg- infectées. Aux plus fortes parasitémies, l'activité sPLA2 chez les souris Tg+ double en moyenne par rapport à l'activité initiale ; chez l'Homme, elle augmente en moyenne d'un facteur x10 lors d'un paludisme chronique, et peut augmenter d'un facteur x50, voire plus, lors d'un accès palustre sévère (Vadas et al., 1993). Chez la souris Tg+, le transgène de la hGIIA contient les régions promotrices humaines. L'expression du gène est induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF α (Oka and Arita, 1991). Dans la mesure où les cytokines de souris présentent des différences structurales avec leurs homologues humaines, il est probable que la régulation du gène humain est moins efficace dans le contexte murin. Ceci explique sans doute aussi le fait que la protéine est présente à un niveau de base relativement élevé dans le plasma des souris Tg+.

(3) **Quantification des GR et des leucocytes au cours de l'infection chez les souris transgéniques :**

a. On constate que chez les souris Tg+ infectées comme chez les Tg- infectées, la multiplication parasitaire provoque une diminution importante de la quantité de GR, maximum au pic parasitaire. Chez les souris Tg-, la concentration en GR retrouve son niveau initial rapidement après que la parasitémie ait chuté, alors que chez les souris Tg+, la concentration en GR reste basse pendant encore 4 jours. Ceci pose la question de l'influence de la hGIIA sur la capacité de régénération du sang (l'érythropoïèse) des souris Tg+. Cette observation peut aussi être mise en relation avec le fait que les souris Tg- infectées présentent souvent une recrudescence parasitaire après le pic de crise, mais pas les souris Tg+ infectées. La régénération sanguine rapide des Tg- pourrait fournir un terrain favorable au re-développement du parasite, que ne fourniraient pas les souris Tg+.

b. Une augmentation significative du nombre de leucocytes totaux est observée en même temps que l'augmentation de la parasitémie chez les souris Tg+ et Tg- infectées. Les leucocytes continuent à augmenter jusqu'à J16 p.i., après le pic parasitaire (J14 p.i.), alors que la parasitémie a commencé à diminuer. Nous avons vu que chez les Tg-, ce sont les PNN qui augmentent majoritairement, alors que chez les Tg+, déjà hyper-neutrophiliques, il semble que PNN et lymphocytes augmentent conjointement. Ces résultats posent la question d'une réponse leucocytaire à l'infection qui serait différente et plus efficace en termes de contrôle parasitaire

chez la souris Tg+ comparé à la souris Tg-. Ceci pose aussi l'importante question de savoir si la hGIIA exogène injectée aux souris WT infectées au moment de la montée en nombre des leucocytes serait susceptible d'orienter la réponse leucocytaire de ces souris vers une réponse de type Tg+.

PARTIE 2 : Données histologiques et immunohistochimiques

1. Analyse des organes et des tissus chez les souris infectées

Parallèlement à l'étude des paramètres sanguins, la caractérisation de l'infection par *P. chabaudi* des souris transgéniques pour la hGIIA a été poursuivie par une étude comparée des aspects anatomo-pathologiques et des lésions histopathologiques induites par l'infection.

Dans un premier temps, l'évolution du poids total et des organes des animaux infectés a été suivie à intervalles de temps choisis. Il est connu que l'infection des souris C57BL/6 WT par *P. chabaudi* induit une perte de poids de l'animal ainsi qu'un accroissement du volume de la rate (splénomégalie) et du foie (hépatomégalie) (Dumont et al., 1988; Stephens et al., 2012). Afin de vérifier si les mêmes phénomènes étaient observés chez la souris Tg+, nous avons pesé les animaux au long de l'infection, et pesé le foie, la rate et les reins des souris Tg- et Tg+ infectées, à J0, J8, J14 et J21 p.i..

1.1. Evolution du poids des souris au cours de l'infection

Le poids des souris Tg- et Tg+ a été mesuré à intervalles de 2-3 jours au cours de 4 expériences d'infection indépendantes, incluant au total 37 souris Tg- et 26 souris Tg+. Les souris Tg+ sont d'emblée moins lourdes (et moins grosses) que les souris Tg- au même âge (Figure 22 [A]). Les deux génotypes murins ont présenté le même profil de poids au cours de l'infection (Figure 22 [B]). Globalement, le poids n'est pas affecté jusqu'à J12 p.i. puis une baisse de poids est observée chez les deux types de souris à J14 p.i. et jusqu'à J16 p.i., après quoi les souris récupèrent un poids normal. Cette baisse est significative chez les souris Tg-.

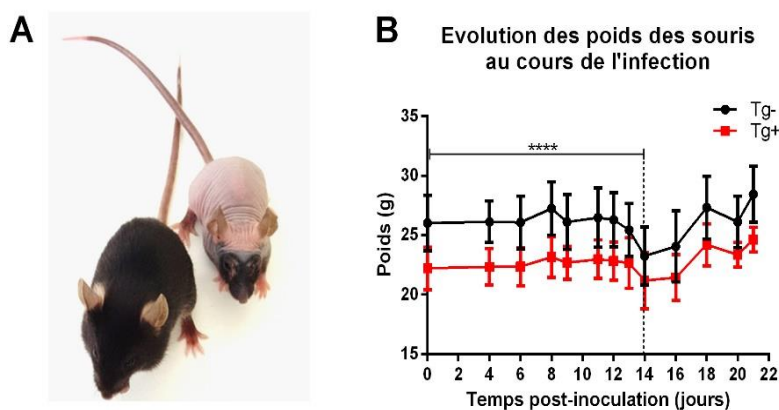


FIGURE 22 : EVOLUTION DU POIDS DES SOURIS AU COURS DE L'INFECTION.

(A) Photographie d'une souris Tg- (à gauche) et d'une souris Tg+ (à droite) au même âge (2 mois). (B) Les poids des souris Tg- et Tg+ ont été mesurés sur 4 expériences indépendantes (respectivement, 10 Tg-/ 8 Tg+ ; 11 Tg-/ 4 Tg+ ; 9 Tg-/ 7 Tg+ et 11 Tg- / 10 Tg+, âgées de 60 à 170 jours). Les souris ont été inoculées avec 1×10^6 GRi par voie IP puis pesées tous les 2-3 jours. Les résultats des 4 ont été groupés. (●) : souris Tg-, (■) : souris Tg+. Test de Wilcoxon Tg- : ***p < 0,0001 ; Tg+ : ns.

Au pic de crise parasitaire, c'est-à-dire à J14 p.i., on note une perte de poids chez environ 85% des souris parasitées. Cette perte pondérale est de 6,7% en moyenne, par rapport au poids avant infection chez les souris

Tg-, et de 5,8% en moyenne chez les souris Tg+. On observe que le pourcentage de baisse du poids des souris infectées peut aller jusqu'à 18% chez les Tg- et jusqu'à 17% chez les Tg+. Les souris récupèrent leur poids initial 4 jours environ après le pic de crise. Cette perte de poids s'observe lors de la phase critique de l'infection, pendant laquelle les souris cessent de se nourrir et peuvent présenter des symptômes physiques tel qu'un poil hirsute, signe d'un manque de toilettage, un isolement, une prostration et/ou une absence de réaction aux stimuli du manipulateur. Bien que ces signes soient des indices d'un mal-être animal, ils ne durent que quelques jours, après quoi les souris retrouvent un comportement et une alimentation totalement normaux.

1.2. Hépatomégalie et splénomégalie au cours de l'infection

Le foie, la rate, le cœur, les poumons, les reins et le cerveau des souris ont été prélevés en vue d'analyses histologiques (description des lésions) et moléculaires (expression au niveau transcriptionnel de la hGIIA chez les souris Tg+ parasitées). Pour certains organes, des observations d'ordre macroscopique (couleur et poids) ont été relevées.

Trois expériences d'infection indépendantes totalisant 48 souris Tg- et 42 souris Tg+ ont été réalisées. Le nombre de souris par jour de sacrifice est rapporté dans le [tableau 8](#). Les observations macroscopiques des organes ont porté sur le foie, la rate et les reins.

TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DU NOMBRE DE SOURIS Tg- ET Tg+ UTILISEES POUR L'OBSERVATION DES PARAMETRES MACROSCOPIQUES.

	Non infectées	Infectées J8	Infectées J14	Infectées J21	Total
Souris Tg-	19	11	10	8	48
Souris Tg+	16	10	9	7	42
Total	35	21	19	15	90

Les organes ont été prélevés (1) le jour de l'inoculation sur des souris naïves ; (2) 8 jours après inoculation, soit au début de la phase patente, moment où les premiers parasites sont visibles sur frottis sanguin ; (3) à J14 p.i., au moment des plus fortes parasitémies (pic de crise parasitaire), et (4) au jour 21 p.i., où la parasitémie est très faible ou nulle ([Figure 23](#)).

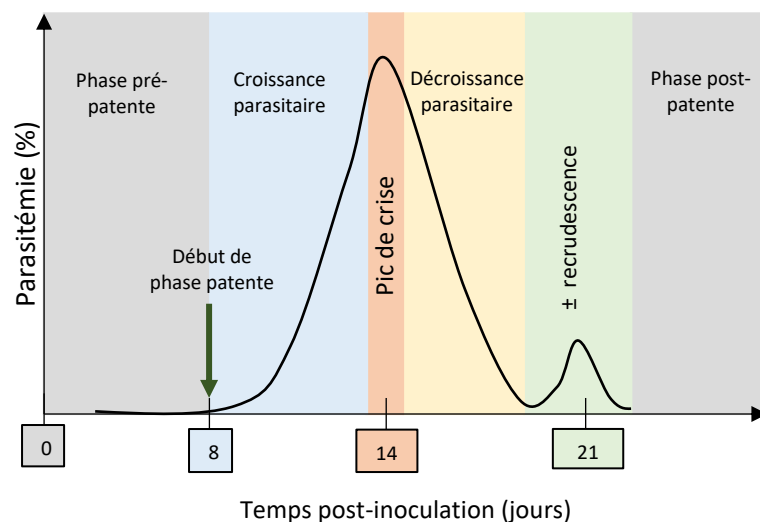


FIGURE 23 : SCHEMA REPRESENTATIF DU PROFIL INFECTIEUX « TYPE » DANS LE MODELE P. CHABAUDI / C57BL/6.

Les 4 temps de prélèvement des organes ont été choisis sur la base du profil infectieux. J0 : prélèvement avant inoculation ; J8 p.i. : début de la phase patente ; J14 p.i. : pic de crise (parasitémie de 30 à 45%) ; J21 p.i. : phase de résolution du pic de crise, avec ou sans recrudescence parasitaire.

1.2.1. L'hépatomégalie est plus précoce chez les souris Tg+ infectées

A J0, le poids moyen du foie d'une souris Tg- est de 940 ± 271 mg (Figure 24 [A]), et de 997 ± 127 mg chez la souris Tg+ (Figure 24 [B]). Ces valeurs ne sont pas statistiquement différentes (testées avec Mann-Whitney). Au 14^{ème} jour de l'infection, chez les deux types de souris, le foie a pris une coloration brun foncé, due à l'accumulation d'hémozoïne (Figure 25) et son poids a augmenté : pour les Tg-, on mesure un poids moyen de 1151 ± 126 mg et pour les Tg+, un poids moyen de 1382 ± 202 mg, soit une augmentation nette de 22,4% et 38,5%, respectivement. L'augmentation du poids du foie, chez chaque type de souris, à ce moment de l'infection est statistiquement significative (test Mann-Whitney *p = 0,0185 [Tg-] et **p = 0,0023 [Tg+]). A J21 p.i., en moyenne, le poids du foie a encore augmenté chez les souris Tg- (1228 ± 282 mg, soit 30,6% d'augmentation par rapport au poids initial de l'organe), alors qu'il n'a pas évolué chez les souris Tg+ (1369 ± 355 mg).

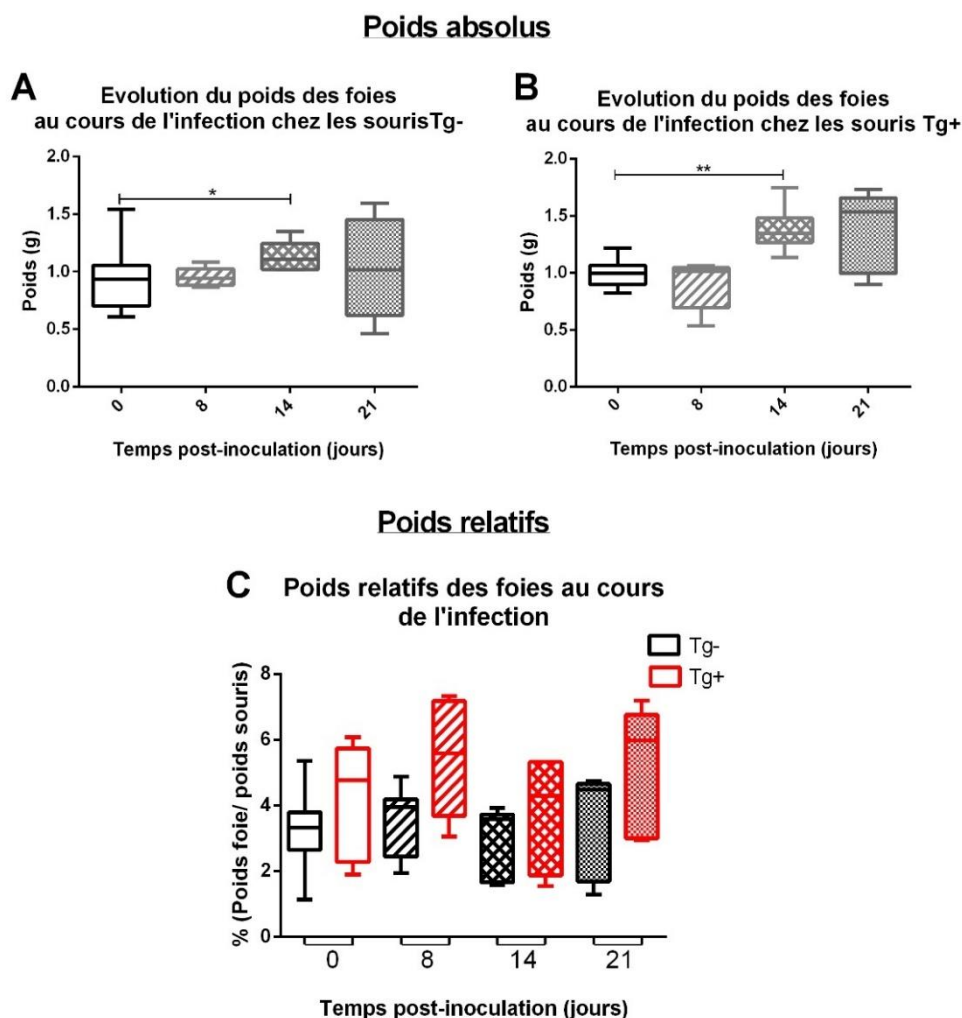
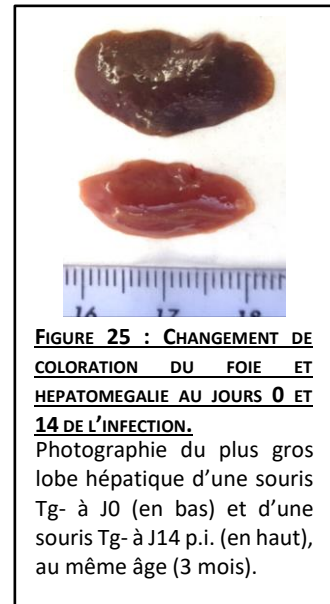


FIGURE 24 : EVOLUTION DU POIDS DU FOIE AU COURS DE L'INFECTION, CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR P. C. CHABAUDI 864VD.

3 expériences indépendantes ont été réalisées (totalisant respectivement, 20 souris Tg-/ 14 souris Tg+ ; 19 souris Tg-/ 19 souris Tg+ et 9 souris Tg-/ 9 souris Tg+) (Tableau 8). Les souris ont été inoculées par voie IP avec 1×10^6 GRi. A J0, J8, J14 et J21 p.i., le foie a été prélevé et pesé. Les résultats, regroupant les 3 expériences, sont présentés sous forme de « boîte à moustache », avec valeurs des médianes, des interquartiles et des minimum et maximum. (A) Poids des foies des souris Tg- (test Mann-Whitney, J0 vs J14 p.i. *p = 0,0185). (B) Poids des foies des souris Tg+ (J0 vs J14 p.i., **p = 0,0023 ; Mann-Whitney). (C) Rapport : poids du foie / poids de la souris (%). En noir : souris Tg-, en rouge : souris Tg+.

On constate donc que l'hépatomégalie est plus importante à J14 p.i. chez les souris Tg+. On observe aussi que chez les deux types de souris, l'hépatomégalie est nette mais n'atteint pas le niveau décrit dans des études antérieures sur le modèle C57BL/6 / *P. chabaudi*, de deux fois le poids de l'organe initial (Dumont et al., 1988).

Par ailleurs, lorsque le poids de l'organe est rapporté au poids total de la souris (poids relatif), on observe une répartition des valeurs beaucoup plus dispersée, que ce soit pour les souris Tg- ou les souris Tg+ (Figure 24 [C]). Ceci semble indiquer que la variation de poids total est différente d'une souris à l'autre. Dans ce cas, aucune différence significative n'est mesurée entre les différents temps de l'infection. Cependant, on peut noter que le poids relatif médian du foie est plus important chez les souris Tg+ naïves comparées aux souris Tg-, et que cette différence se maintient au cours de l'infection.

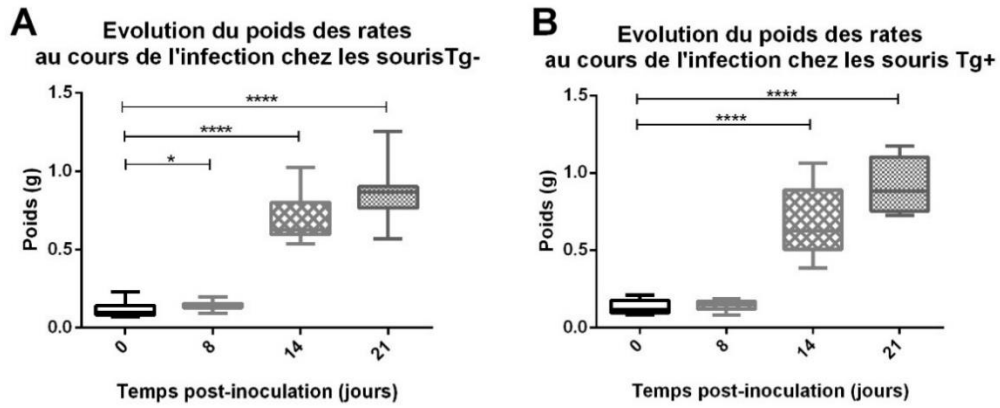


1.2.2. Une splénomégalie comparable à celle des souris Tg- est observée chez les souris Tg+ au cours de l'infection

A J0, le poids moyen (brut) de la rate chez les souris Tg- est de 118 ± 47 mg (Figure 26 [A]) et de 137 ± 44 mg chez les souris Tg+ (Figure 26 [B]), sans différence significative. Chez les souris Tg-, une légère augmentation du poids est décelée dès J8 p.i. avec un poids moyen de 147 ± 32 mg. Au même jour, on ne mesure pas de différence chez les souris Tg+. Au 14^{ème} jour de l'infection, le poids a augmenté de façon spectaculaire chez les deux types de souris (693 ± 156 mg chez les Tg-, et 671 ± 226 mg chez les Tg+). A J21 p.i., on constate que le poids des rates a encore augmenté, avec un poids moyen de 864 ± 192 mg chez les souris Tg- et 902 ± 175 mg chez leurs homologues transgéniques, soit respectivement, une augmentation d'un facteur x 7,3 chez les souris Tg- et d'un facteur x 6,6 chez les Tg+. Aucune différence significative n'est décelée entre les poids des rates des souris Tg- et Tg+ à ces différents points de sacrifices.

Le rapport poids de la rate/ poids de la souris indique que les souris Tg+ ont un poids relatif de l'organe plus important que les souris Tg- (Figure 26 [C]), ce qui est en accord avec le fait que les souris Tg+ sont plus légères que les souris Tg-. Cette particularité s'efface au plus fort de l'infection et se retrouve à J21 p.i., lorsque la résolution de l'infection est à un stade avancé.

Poids absolus



Poids relatifs

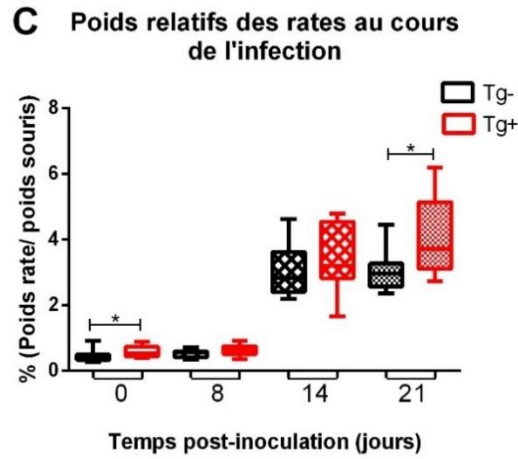
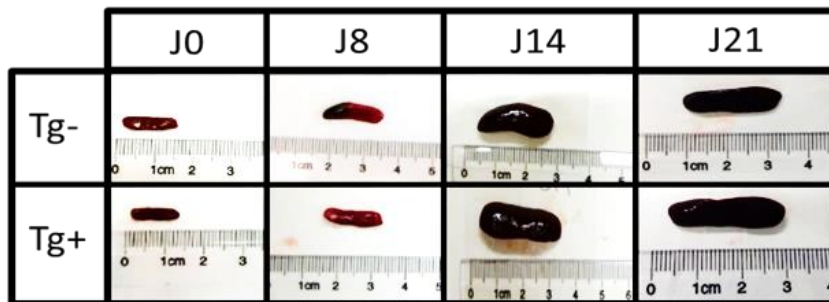


FIGURE 26 : EVOLUTION DU POIDS DE LA RATE AU COURS DE L'INFECTION, CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR P. CHABAUDI 864VD.

3 expériences indépendantes ont été réalisées (Tableau 8). Les souris ont été inoculées par voie IP avec 1×10^6 GRi. A J0, J8, J14 et J21 p.i., la rate a été prélevée et pesée. Les résultats, regroupant les 3 expériences, sont présentés sous forme de « boîte à moustache ». (A) Poids des rates des souris Tg- (test Mann-Whitney, J0 vs J8 p.i., * $p = 0,0228$; J0 vs J14 p.i. *** $p < 0,0001$; J0 vs J21 p.i. $p < 0,0001$). (B) Poids des rates des souris Tg+ (test Mann-Whitney, J0 vs J14 p.i. *** $p < 0,0001$; J0 vs J21 p.i. *** $p < 0,0001$). (C) Pourcentage du poids de la rate par rapport au poids de la souris Tg- (en noir) et de la souris Tg+ (en rouge) (test Mann-Whitney, J0 Tg- vs Tg+ * $p = 0,0132$; J21 Tg- vs Tg+ * $p = 0,0401$).

Par ailleurs, à partir de J14 p.i., la rate prend une coloration brun/noir chez les deux types de souris, et l'augmentation de poids s'accompagne d'une augmentation importante de la taille de l'organe ([Figure 27](#)).

FIGURE 27 : SPLENOMEGALIE ET CHANGEMENT DE COLORATION DE LA RATE AU COURS DE L'INFECTION.



En conclusion, les souris Tg+, comme les souris Tg-, présentent une splénomégalie très marquée au 14^{ème} jour de l'infection, qui se poursuit au 21^{ème} jour p.i.. L'augmentation de taille et de poids se fait globalement au même rythme dans les deux cas.

1.2.3. Les reins ne présentent pas de modification macroscopique au cours de l'infection

Le poids des reins est comparable chez les souris Tg- et Tg+ naïves (test Mann-Whitney, ^{ns}p > 0,05). Chez les souris Tg+ comme chez les souris Tg-, la couleur et la taille des reins ne changent pas au cours de l'infection. Sur la [figure 28 \[A\] et \[B\]](#), on note que le poids médian des reins tend à augmenter au cours de l'infection, cependant ceci n'est pas confirmé par l'analyse statistique. Lorsque l'on compare les poids relatifs des reins, on n'observe pas de différence entre les deux génotypes ([Figure 28 \[C\]](#)). Chez les souris Tg+, une différence apparaît entre le poids relatif des reins à J0 et à J14 p.i., ce qui pourrait indiquer que le poids de l'organe augmente légèrement au cours de l'infection et/ou refléter l'amaigrissement important des souris.

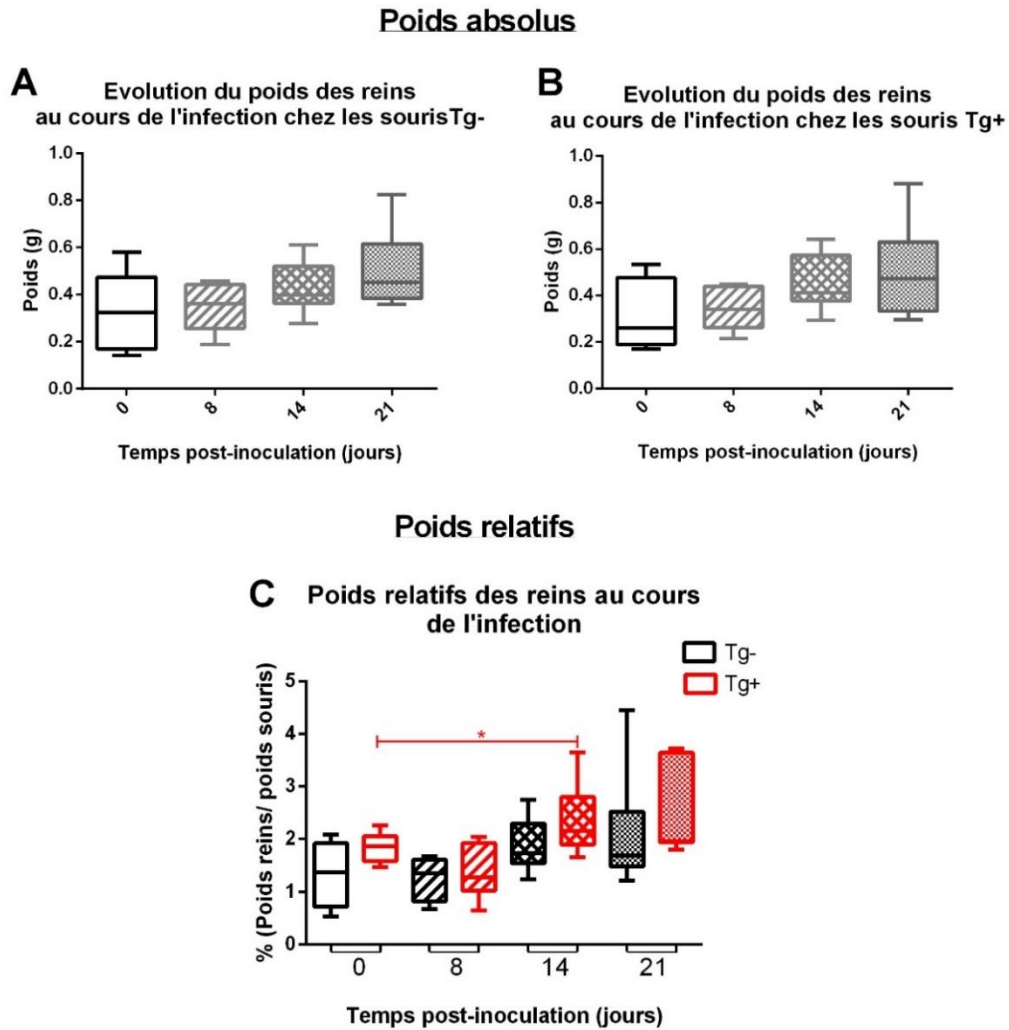


FIGURE 28 : EVOLUTION DU POIDS DES REINS AU COURS DE L'INFECTION, CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR P. CHABAUDI 864VD.

3 expériences indépendantes ont été réalisées (Tableau 8). Les souris ont été inoculées par voie IP avec 1×10^6 GRi. A J0, J8, J14 et J21 p.i., les reins ont été prélevés et pesés. Les résultats, regroupant les 3 expériences, sont présentés sous forme de « boîte à moustache ». (A) Poids des reins des souris Tg-. (B) Poids des reins des souris Tg+. (C) Pourcentage du poids des reins par rapport au poids de la souris Tg- (en noir) et de la souris Tg+ (en rouge) (test Mann-Whitney, Tg+ J0 vs J14 p.i. *p = 0,0172).

2. Analyses histologiques

Dans le but d'analyser d'éventuelles différences histopathologiques liées à la présence de la hGIIA, nous avons comparé les atteintes aux organes chez les souris C57BL/6 Tg- et Tg+ infectées. Notre étude s'est focalisée sur le foie, le poumon, la rate et le rein, 4 organes impliqués dans différents aspects du développement de *P.chabaudi* chez son hôte murin. Le foie et les poumons sont les organes où a lieu la séquestration des stades matures du parasite (trophozoïtes âgés, schizontes) et la rate est l'organe de clairance et de rétention des GRi (Brugat et al., 2014; Cox et al., 1987). Par ailleurs, une série d'études a montré des lésions anatomo-pathologiques chez les souris infectées par *P. c. chabaudi*, dans les reins (Brugat et al., 2014; Vuong et al., 1999), les poumons (Brugat et al., 2014), le foie et la rate (Brugat et al., 2014; Dumont et al., 1988; Stevenson and Kraal, 1989).

Deux expériences indépendantes ont été réalisées, utilisant au total 39 souris Tg- et 33 souris Tg+ (Tableau 9). La fixation et la coloration des coupes d'organes ont été faites pour partie au MNHN et pour partie à l'Institut Pasteur de Paris, au laboratoire de Neuropathologie Expérimentale. L'observation des coupes et l'interprétation des résultats ont été menées en collaboration et sous l'expertise du Dr. Grégory JOUVION, vétérinaire et spécialiste en anatomo-pathologie du petit animal à l'Institut Pasteur (Paris).

TABLEAU 9 : NOMBRE DE SOURIS Tg- ET Tg+ UTILISEES POUR LES ANALYSES HISTOLOGIQUES.

	Non infectées	Infectées J8	Infectées J14	Infectées J21	Total
Souris Tg-	17	9	7	6	39
Souris Tg+	14	8	6	5	33
Total	31	17	13	11	72

2.1. Analyse histologique des poumons au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

2.1.1. Généralités

Chez la souris, le poumon droit est divisé en 4 lobes et le poumon gauche a un lobe unique (Figure 29). Chaque poumon est alimenté en oxygène par deux bronches qui se subdivisent en bronchioles dans le tissu. Chaque bronchiole se termine par une bronchiole terminale qui se divise en bronchioles respiratoires, elles-mêmes divisées en canaux alvéolaires qui contiennent les sacs alvéolaires. Les parois alvéolaires, entourées d'un réseau de capillaires, sont formées d'un épithélium, constitué de pneumocytes (I et II), d'un tissu conjonctif formé de fibres de réticuline, de collagène et d'élastine, et de macrophages (Figure 30).

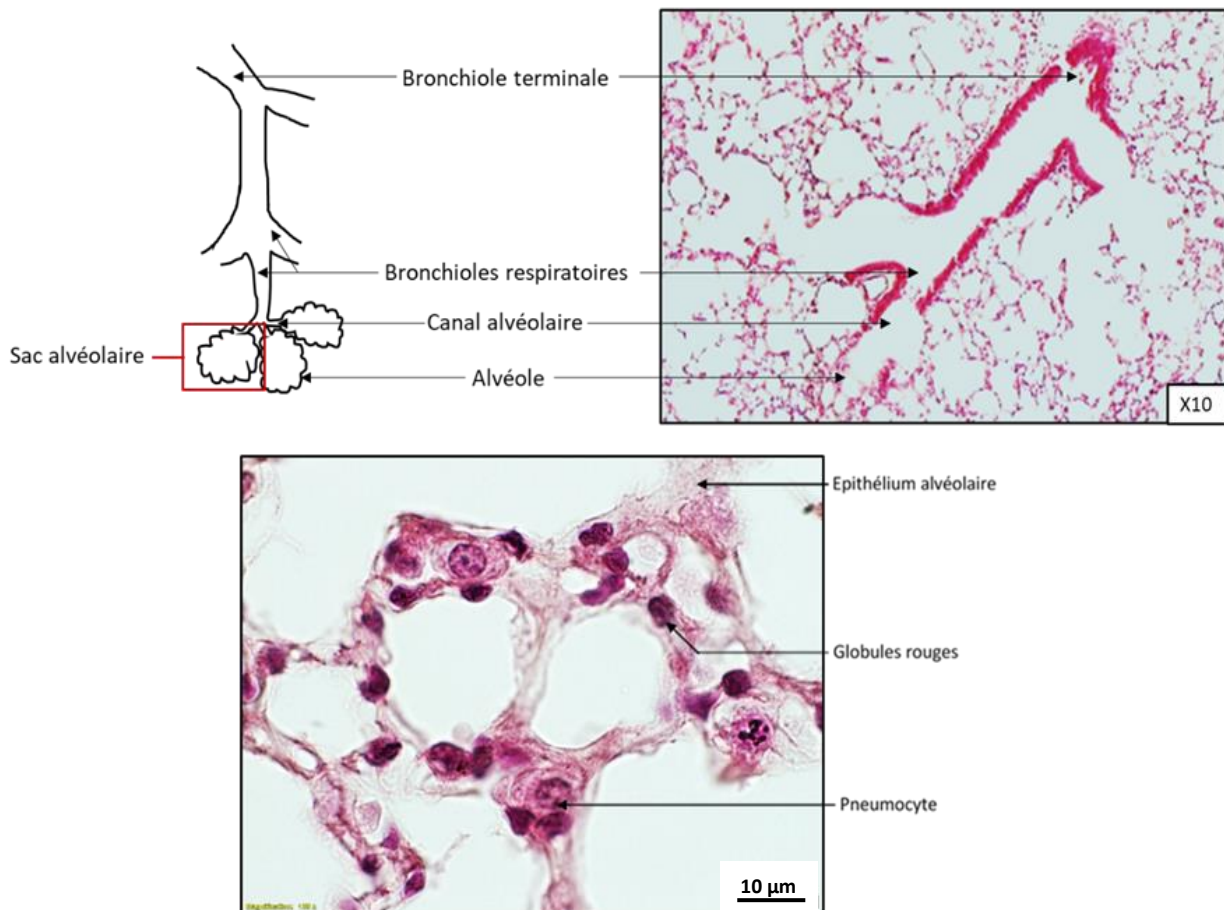
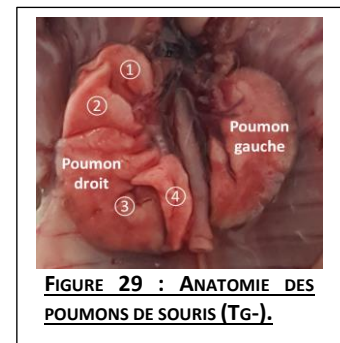


FIGURE 30 : ORGANISATION HISTOLOGIQUE DU POUMON DE SOURIS SAINE.
Coloration Hématoxyline-Eosine.

2.1.2. Les souris Tg+, comme les souris Tg-, présentent de légères lésions histopathologiques du poumon au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

En accord avec les études présentant les premières descriptions de la lignée transgénique pour la hGIIA (Grass et al., 1996) utilisée ici, nous avons pu observer que les poumons de souris Tg+ saines ne présentaient pas de différence histologique avec ceux des souris Tg- saines ([Figure 31 \[A, B et C\]](#)).

Chez les souris infectées Tg- et Tg+, le développement de rares zones d'infiltrations inflammatoires polymorphes périvasculaires (probablement dues à des lymphocytes, plasmocytes, macrophages et PNN) a été relevé au 8^{ème} jour de l'infection ([Figure 31 \[D et E\]](#)). Au 14^{ème} jour de l'infection, les poumons semblent normaux ([Figure 31 \[F et G\]](#)), seule une souris Tg- (sur 7) a présenté un phénotype histopathologique plus sévère avec une destruction des parois bronchiolaires, de l'inflammation diffuse et un œdème ([Figure 31 \[H et I\]](#)). A J21 p.i., aucune lésion n'a été observée ([Figure 31 \[J et K\]](#)). Au final, il semble donc que les atteintes au poumon dues à l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD soient très modérées, plutôt précoces (J8 p.i.) et similaires chez les deux types de souris C57BL/6, Tg- et Tg+.

Il faut noter que la publication de Brugat *et al.* faisait état de lésions beaucoup plus marquées dans les poumons de souris C57BL/6 WT infectées par *P. chabaudi* AS (Brugat et al., 2014). La différence avec ce que nous observons ici pourrait tenir aux caractéristiques respectives des souches de *P. chabaudi* (respectivement AS et 864VD) utilisées dans les deux études.

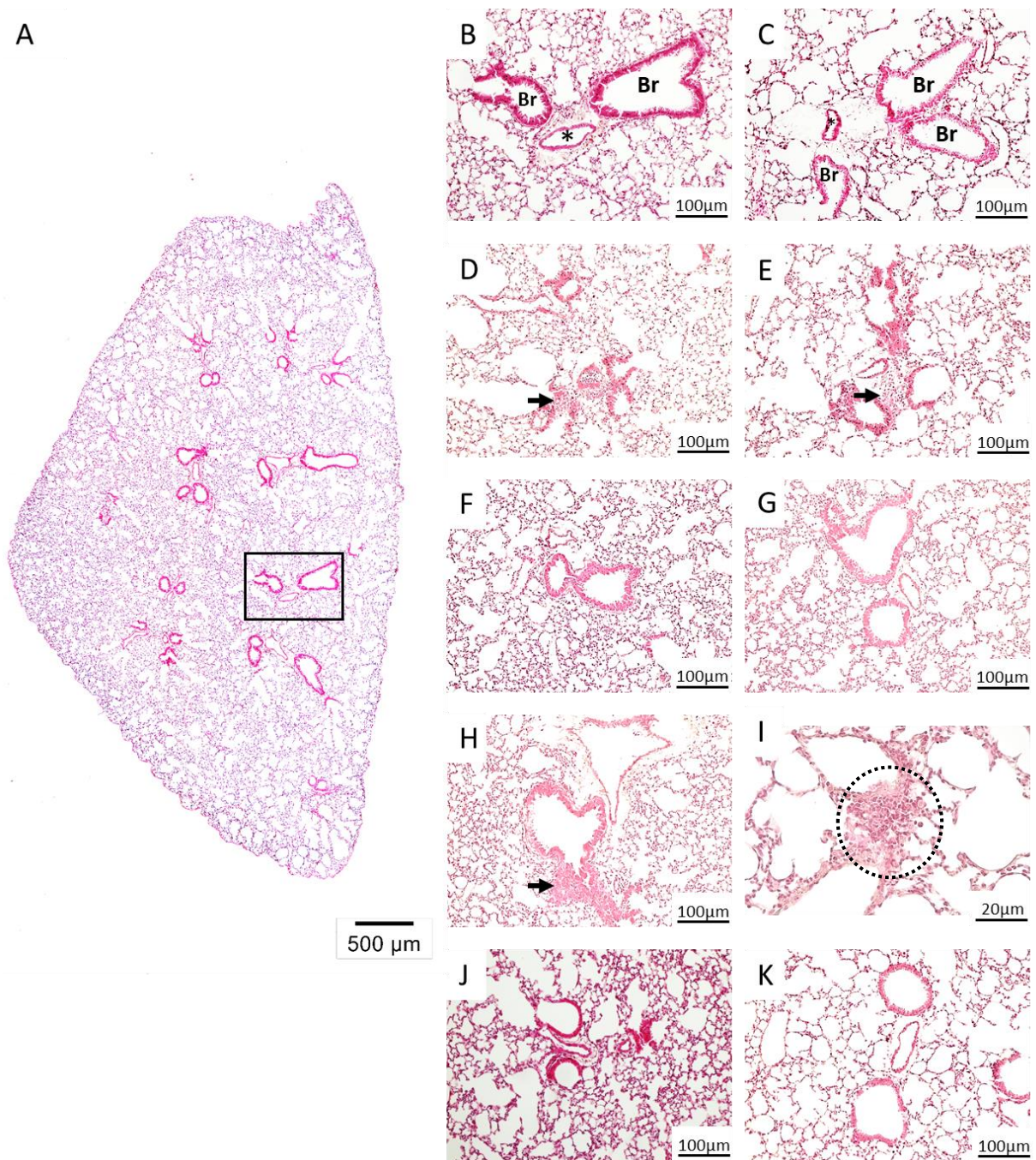


FIGURE 31 : OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES DU POUMON AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+.

Coupes de poumon d'épaisseur 5 µm colorées à l'HE. (A) Aspect histologique général normal d'un poumon de souris Tg- non infectée. Le rectangle noir cible la zone d'observation des coupes. (B) Aspect normal d'une artère [*] et d'une bronchiole [Br], chez la souris Tg- non infectée. L'épithélium bronchique est riche en cellules caliciformes, ce qui lui donne un aspect vilieux ; tandis que l'endothélium vasculaire se reconnaît à ses cellules aplaties, donnant un aspect lisse. (C) Aspect normal d'une artère et d'une bronchiole, chez la souris Tg+ non infectée. (D) souris Tg- infectée à J8 p. i. (E) souris Tg+ infectée à J8 p.i.. Les flèches noires indiquent les zones d'infiltrats inflammatoires périvasculaires. (F) Aspect normal de poumon de souris Tg- infectée à J14 p.i.. (G) Aspect normal de poumon de souris Tg+ infectée à J14 p.i.. (H) Aspect pathologique du poumon chez une souris Tg- infectée à J14 p.i.. La flèche noire indique une zone d'infiltration périvascular. (I) Zone d'inflammation chez la même souris Tg- infectée à J14 p.i. (cercle pointillé). (J) Aspect histologique normal d'un poumon de souris Tg- infectée à J21 p.i.. (K) Aspect histologique normal chez une souris Tg+ infectée à J21 p.i.

2.2. Analyse histologique des reins au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

2.2.1. Généralités

Le rein est un organe pair situé derrière le tube digestif. Il est enveloppé d'une capsule et divisé en un cortex et une médullaire. Le rein a pour rôle la filtration du sang, la réabsorption hydraulique et l'élimination des déchets *via* les urines. Il assure également l'équilibre du milieu intérieur, la régulation de la pression artérielle et la sécrétion d'érythropoïétine, qui stimule la production de GR.

D'un point de vue histologique, l'unité fonctionnelle du rein est le néphron, constitué d'un glomérule, un tube contourné proximal (dont les cellules épithéliales sont caractérisées par de très nombreuses microvillosités allongées qui forment une bordure en brosse à leur pôle apical), une anse de Henlé et un tube contourné distal (caractérisé par des cellules épithéliales cubiques présentant peu de microvillosités) qui se jette dans le tubule collecteur (ou canal collecteur) (Figure 32).

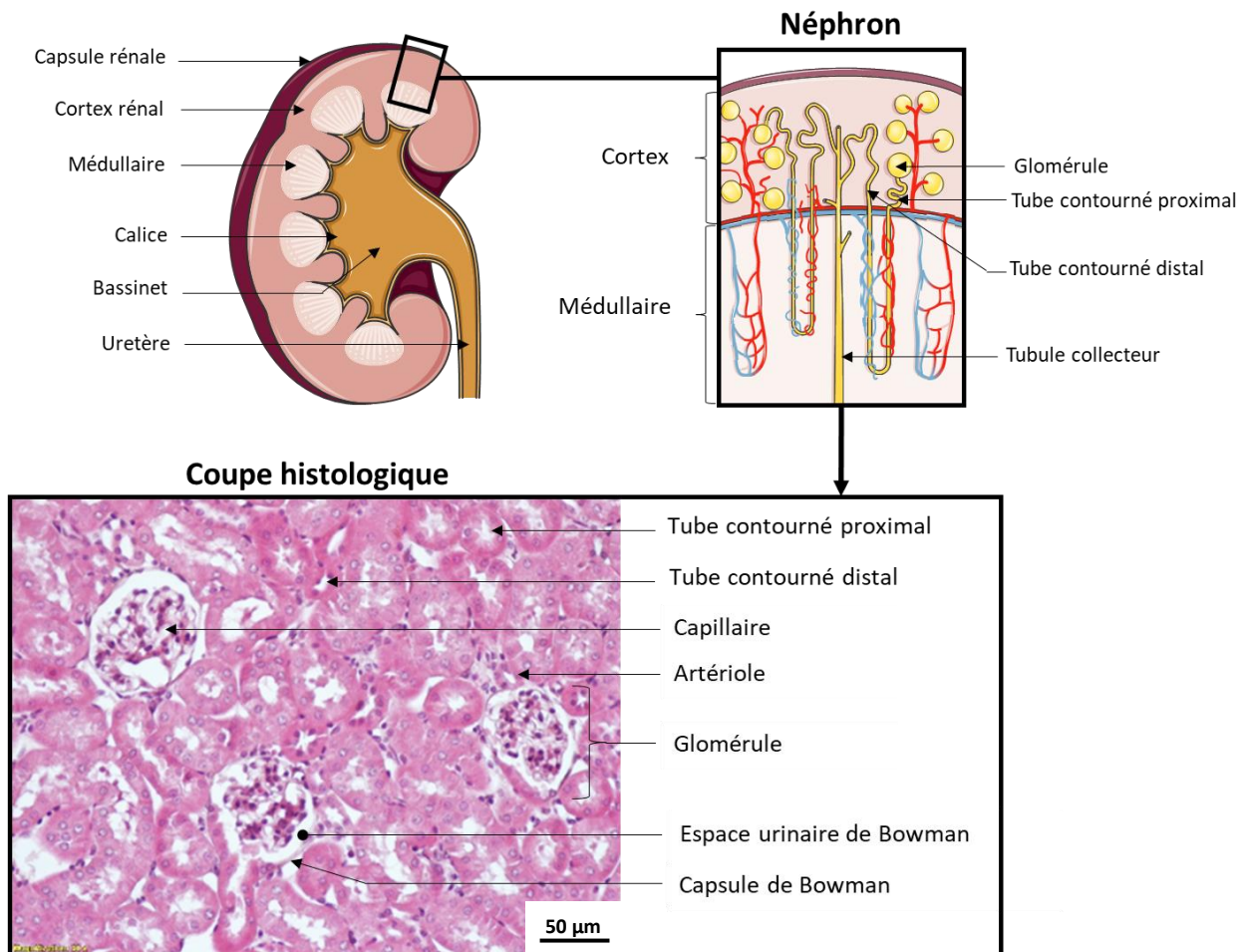


FIGURE 32 : ORGANISATION ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU REIN.
Coloration HE d'une coupe de rein de souris Tg- naïve.

2.2.2. Les souris Tg+, comme les souris Tg-, ne présentent pas de lésions histopathologiques du rein au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

Les reins des souris Tg- et Tg+ naïves ne présentent pas de différence histologique (Figure 33 [A, B et C]). Chez les souris infectées des deux types, aucune lésion n'a été observée à J8 et J14 (Figure 33 [D à G]). A J21 p.i., aucune lésion histologique n'est observée au niveau des glomérules ou des tubes contournés distaux et proximaux (Figure 33 [H et I]). Cependant, on observe chez les deux génotypes murins de rares infiltrats cellulaires (probablement de lymphocytes et de plasmocytes) péri-vasculaires. Tout au long de l'infection, la capsule rénale ne montre pas de modification et l'organisation générale du parenchyme reste conservée.

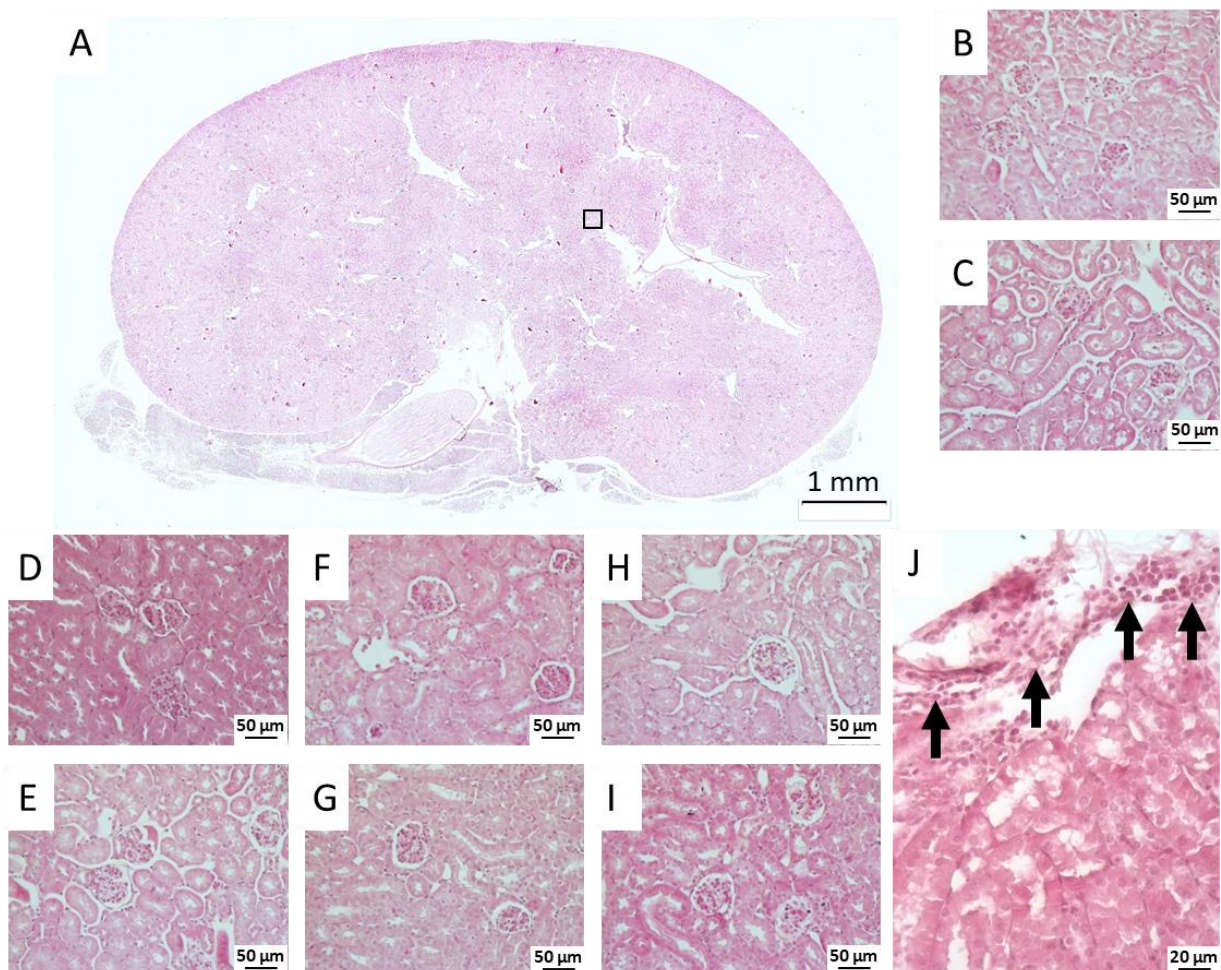


FIGURE 33 : OBSERVATION HISTOLOGIQUE DU REIN CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR *P. c. CHABAUDI* 864VD.

Coloration HE de coupes de rein d'épaisseur 5 µm. (A) Coupe d'épaisseur 5 µm d'un rein entier sain (J0) de souris Tg+. Le rectangle noir cible la zone d'observation des coupes. (B) Souris Tg- J0. (C) Souris Tg+ J0. (D) Souris Tg- J8 p.i.. (E) Souris Tg+ J8 p.i.. (F) Souris Tg- J14 p.i.. (G) Souris Tg+ J14 p.i.. (H) Souris Tg- J21 p.i.. (I) Souris Tg+ J21 p.i.. (J) Souris Tg- à J21 p.i. présentant de l'infiltration péri-vasculaire (flèches noires). (Les souris Tg+ présentent le même phénotype). Toutes les coupes de A à I présentent un aspect normal des glomérules et des tubes contournés distaux et proximaux.

La publication de Vuong *et al.* (1999), fait état de congestion (n = 2/2) dès le début de l'infection dans le modèle *P. c. chabaudi* 864VD – souris Swiss. Au pic de crise, entre J14 et J17 p.i., en plus de la congestion (n = 2/4), des lésions plus sévères apparaissent (n = 2/4) avec des hémorragies, des œdèmes et une prolifération des cellules mésangiales. Puis, entre J23 et J116 p.i. la moitié des souris infectées (n = 4/9) présentent les mêmes lésions sévères qu'au pic de crise ; tandis que les autres souris ont des atteintes plus graves (n = 5/9) (nécrose glomérulaire, nécrose tubulaire, thrombose glomérulaire, granulome lymphoïde et infiltrat lymphocytaire) (Vuong *et al.*, 1999). Dans ce modèle, les lésions rénales sont donc importantes, avec un caractère progressif, les lésions les plus graves étant les plus tardives. Il est bien connu que l'infection dans chaque modèle est spécifique du couple *Plasmodium*/ souris qui le constitue. La différence avec ce que nous observons pourrait venir du fait que les souches murines ne sont pas les mêmes et/ ou que dans notre modèle, les lésions rénales apparaîtraient encore plus tardivement.

2.3. Analyse histologique du foie au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

2.3.1. Généralités

Chez la souris, le foie occupe une grande partie de la cavité péritonéale et est protégé par la cage thoracique. Il est constitué de 4 lobes de couleur rouge brun délimités par une capsule fibreuse appelée capsule de Glisson (Figure 34, « Lobes du foie »). D'un point de vue fonctionnel, il a pour rôle la détoxification des déchets métaboliques, la destruction des GR altérés, la synthèse de protéines, de lipoprotéines plasmatiques et de glycogène, et assure le métabolisme des hormones et de la bilirubine. Le tissu hépatique est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques. Ces lobules, de forme plus ou moins hexagonale et constitués en leur centre d'une veine centro-lobulaire, sont délimités par des espaces portes (Figure 34, « Lobule hépatique »). Chaque espace porte est composé d'une veine porte, d'un canal biliaire et d'une artère hépatique, formant une triade. Au sein des lobules se trouvent des hépatocytes, des sinusoides et des cellules de Kupffer (Figure 34, « Grossissement x20 »).

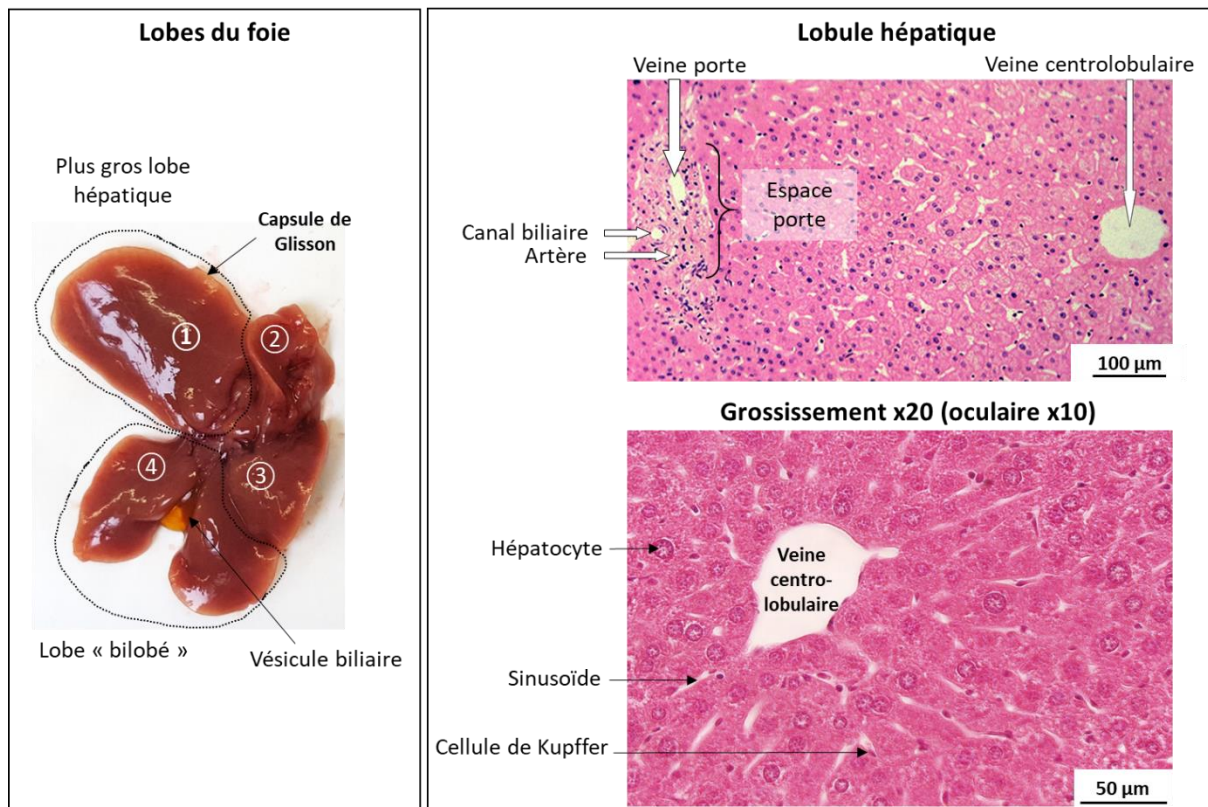


FIGURE 34 : ORGANISATION HISTOLOGIQUE DU FOIE.
Coloration HE d'une coupe de foie de souris Tg- naïve.

2.3.2. Les souris Tg+ présentent les mêmes lésions du foie que les souris Tg- au cours de l'infection par P. c. chabaudi 864VD

Le tissu hépatique des souris saines Tg+ ne présente pas d'anomalie comparé au foie des souris saines Tg- (Figure 35 [A, B et C]). Toutefois, on note chez les souris Tg- une stéatose modérée (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes) qui donne un aspect « microvacuolisé » aux cellules. Cette stéatose visible chez les Tg- est une particularité de la lignée C57BL/6, ce qui en fait un modèle dans les études sur l'obésité et les troubles du métabolisme hépatique (Liao et al., 2013). La quasi-absence de stéatose chez les Tg+ pourrait être la conséquence de la présence de la hGIIA, qui module la sensibilité des hépatocytes à l'insuline et le métabolisme des triglycérides (Kuefner et al., 2017).

La capsule de Glisson et l'architecture lobulaire du foie ne présentent pas de modifications au cours de l'infection chez les deux groupes de souris. Huit jours après l'inoculation, le foie des souris Tg- et Tg+ infectées ne présentent pas de signes lésionnels. Les souris Tg- présentent toujours de la stéatose. (Figure 35 [D et E]).

Au pic de crise parasitaire, à J14 p.i., le foie chez les souris Tg- et Tg+ présente de nombreuses lésions tissulaires sévères : un envahissement diffus des sinusoides est observé de manière homogène dans le parenchyme, sans localisation particulière. L'envahissement peut être attribué à la fois à de l'hématopoïèse extra-médullaire (EMH)¹, mise en place pour compenser la destruction massive de GR, et à la présence de nombreux conglomerats bruns, correspondant à de l'hémozoïne déposée lors de la rupture des GRi ; on note aussi la présence de macrophages (Figure 35 [I et K]). On peut également observer des foyers nécrotiques non ischémiques, à prédominance sous-capsulaire et préférentiellement entourés d'infiltrats inflammatoires (Figure 35 [H et J]). Les deux groupes de souris ne semblent pas présenter de différences physiopathologiques.

En fin d'infection, à J21 p.i., les lésions ont quasiment disparu chez toutes les souris Tg- (n = 6). On observe encore chez 2 souris quelques rares foyers d'EMH (Figure 35 [F]). Chez les souris Tg+, 2 individus sur 5 présentent quelques foyers d'EMH (Figure 35 [G]) et des atteintes encore sévères (Figure 35 [L et M]). Les 3 autres souris ont totalement récupéré et ne présentent plus de lésions tissulaires. En première approximation, la récupération des lésions à J21 p.i. pourrait être meilleure chez les souris Tg- que chez les souris Tg+.

¹ EMH = l'hématopoïèse extramédullaire est un mécanisme de compensation de la baisse de production de cellules sanguines par la moelle osseuse ou d'une destruction importante de GR. Ce mécanisme compensatoire se produit principalement dans le foie ou la rate (organes hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire).

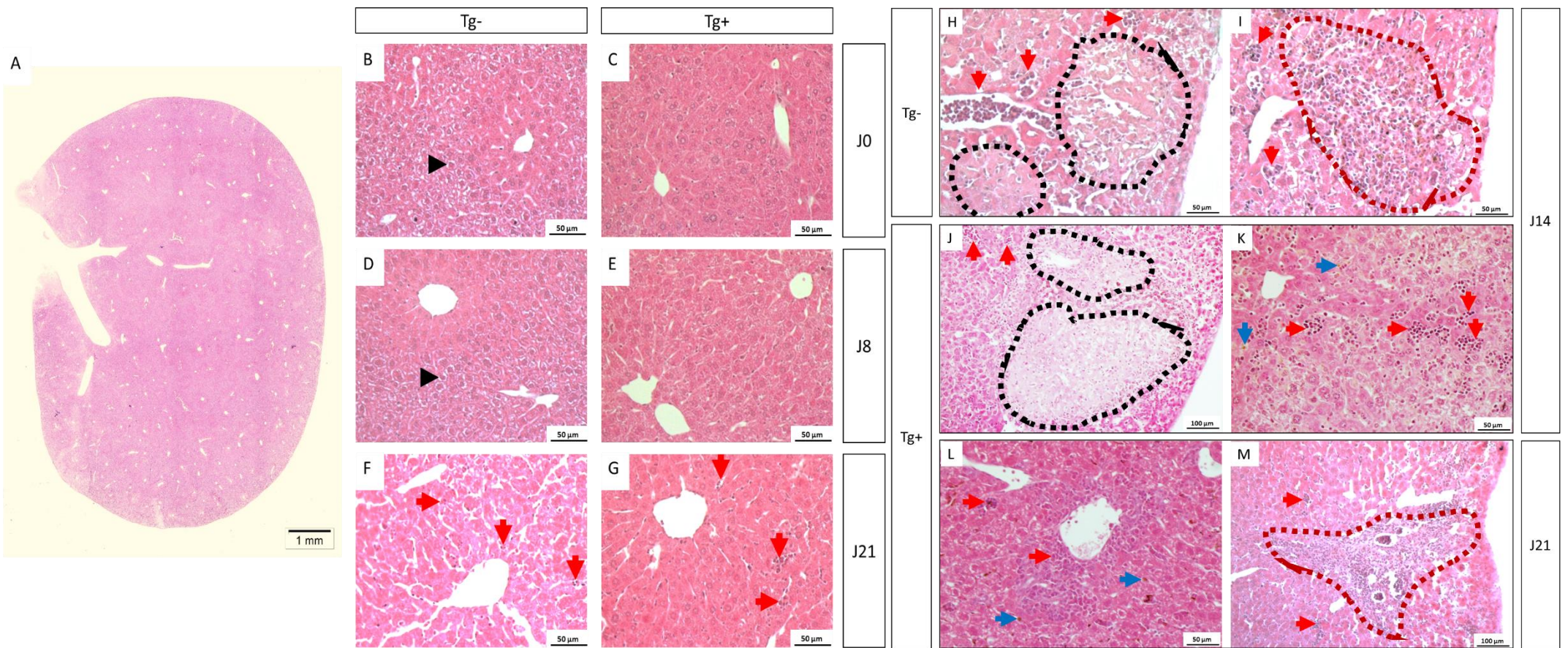


FIGURE 35 : OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES DU FOIE AU COURS DE L'INFECTION A P. C. CHABAUDI 864VD DE SOURIS C57BL/6 Tg- ET Tg+.

Coloration HE de coupes de foie d'épaisseur 5 µm. (A) Coupe d'un foie entier de souris Tg- non infectée. (B) coupe de foie de souris Tg- à J0 (non infectée) ; (C) coupe de foie de souris Tg+ à J0 (non infectée) ; (D) coupe de foie Tg- à J8 p.i.. Les triangles noirs pointent un hépatocyte contenant une accumulation de triglycérides (stéatose). (E) coupe de foie de souris Tg+ à J8 p.i.. (H) Nécrose sous-capsulaire chez la souris Tg- à J14 p.i. (cercle pointillé noir). (I) Zone inflammatoire chez la souris Tg- à J14 p.i. (cercle pointillé rouge). (J) Nécrose sous-capsulaire entourée d'un infiltrat inflammatoire chez la souris Tg+ à J14 p.i.. (K) Parenchyme hépatique présentant des envahissements des sinusoides chez la souris Tg+ à J14 p.i.. Les flèches rouges indiquent les zones d'envahissements des sinusoides. Les flèches bleues indiquent les pigments d'hémozoinés. A J21 p.i., l'aspect général du foie est normal mais présente quelques infiltrats d'EMH : (F) chez les souris Tg- (2/6) ; (G) chez les souris Tg+ (2/5). (L) Infiltration périvasculaire observée chez deux souris Tg+ (sur 5) à J21 p.i.. (M) Zone d'inflammation observée chez deux souris Tg+ (sur 5) à J21 p.i..

2.4. Analyse histologique de la rate au cours de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD

2.4.1. Généralités

La rate est un organe lymphoïde secondaire de couleur rouge foncé situé contre la partie postérieure de l'estomac. D'un point de vue fonctionnel, elle a pour rôle l'activation des lymphocytes naïfs et la purification du sang par la filtration des GR non viables.

Le tissu splénique est entouré d'une capsule conjonctive et est structuré par deux zones distinctes : la pulpe rouge, ensemble composé de sinus veineux, de macrophages, de granulocytes, de GR, de plaquettes, de LB dispersés et de capillaires qui contiennent le sang ; et la pulpe blanche, composée de LT qui entourent les artérioles, et de LB organisés en follicules. Les LB naïfs forment les follicules primaires ; puis, lors de la rencontre avec l'antigène, apparaissent les follicules secondaires contenant un clone B spécifique. Le follicule secondaire est une zone anatomique particulière où les LB activés se différencient en plasmocytes et LB mémoires, et qui constitue le centre germinatif. A la périphérie de la pulpe blanche se trouve une zone riche en macrophages appelée zone marginale ([Figure 36](#)).

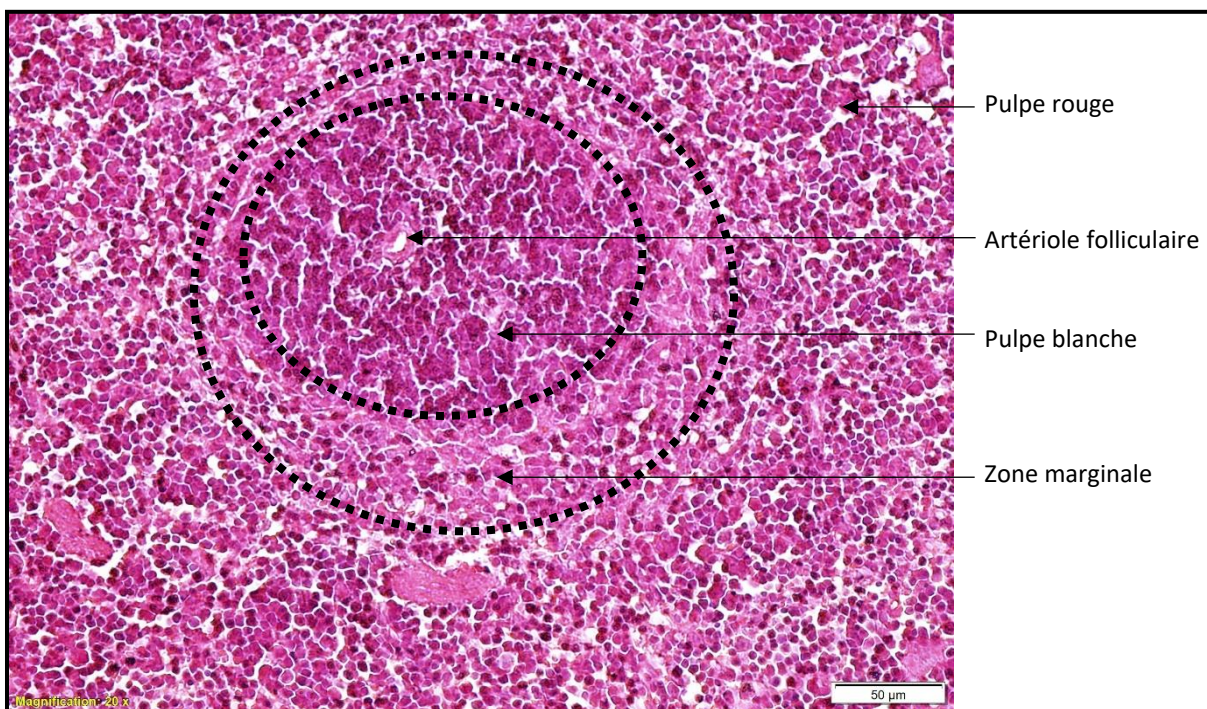


FIGURE 36 : COUPE HISTOLOGIQUE D'UNE RATE DE SOURIS C57BL/6 (TG-) NAÏVE.

2.4.2. Les souris Tg+ présentent une désorganisation tissulaire de la rate plus précoce que les souris Tg- au cours de l'infection *P. c. chabaudi* 864VD

Les rates des souris Tg- et Tg+ à J0 (souris naïves) ont un aspect histologique normal et ne présentent pas de différences (Figure 37 [A, B et C]). Au 8^{ème} jour de l'infection, on n'observe pas de modification au sein des deux groupes (Figure 37 [D et E]).

Au 14^{ème} jour de l'infection, les souris Tg+ présentent toutes (6 sur 6) une désorganisation de l'architecture splénique, se caractérisant par une perte de distinction entre pulpe blanche et pulpe rouge (Figure 37 [G]). Chez les Tg- (n = 7), ce phénomène est beaucoup moins marqué, il ne s'observe que partiellement chez 2 souris (leur rate présente encore des follicules visibles). La rate des 5 autres souris Tg- conserve une architecture normale (Figure 37 [F]).

A J21 p.i., 3 souris sur 6 du groupe Tg- (Figure 37 [H]) et 2 souris sur 5 du groupe Tg+ montrent une désorganisation de l'architecture splénique. Les autres souris ont retrouvé une architecture normale, bien qu'elles présentent toujours une hyperplasie de la pulpe rouge (Figure 37 [I]).

En conclusion, l'atteinte splénique consécutive à l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD semble plus précoce chez les souris Tg+ comparée aux souris Tg-. Elle est concomitante aux fortes parasitémies chez les animaux infectés. Puis, on observe, chez la moitié des souris Tg+ un retour à une architecture tissulaire normale en même temps que le parasite est éliminé.

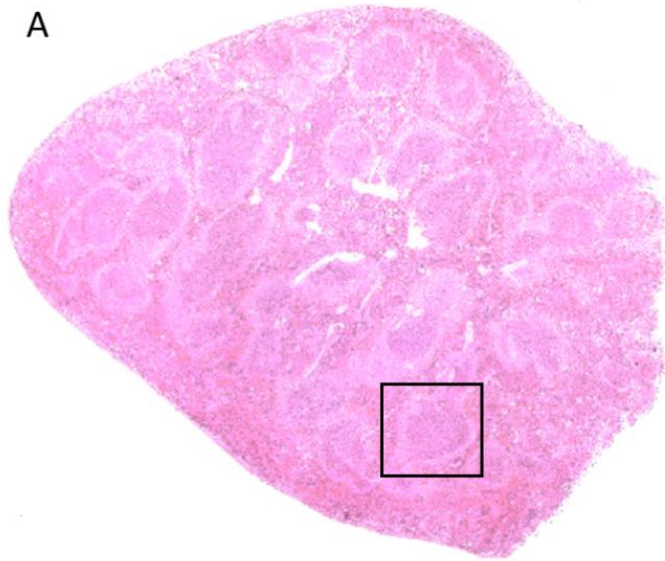
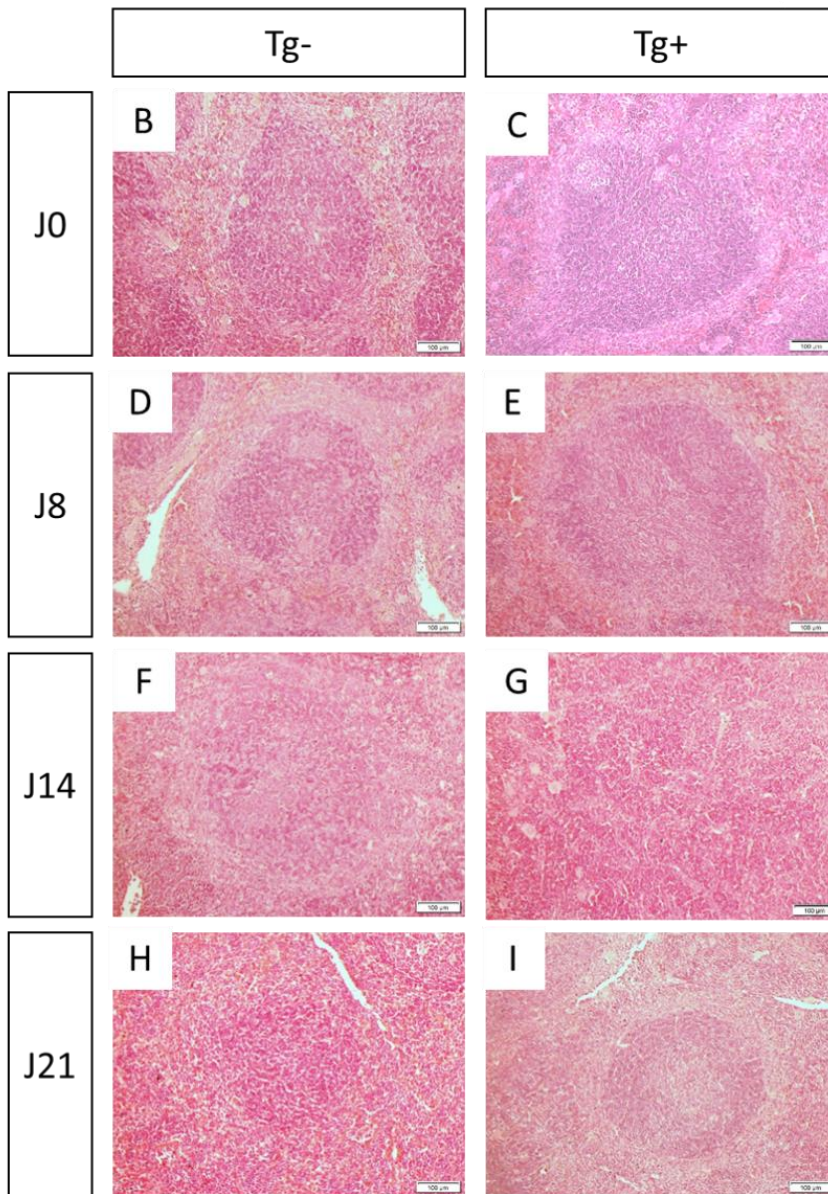


FIGURE 37 : OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA RATE AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+.

Coloration HE. (A) Coupe entière de rate chez la souris Tg+ saine (J0). Les follicules lymphoïdes (pulpe blanche) baignent dans la pulpe rouge. Ils sont répartis au niveau du cortex superficiel splénique (sous la capsule) et du cortex profond. La zone centrale de la coupe correspond à la zone médullaire. Le rectangle noir encadre un follicule lymphoïde et correspond à la zone d'observation des coupes. Rate de souris à J0 : Tg- (B), Tg+ (C) ; à J8 p.i. : Tg- (D), Tg+ (E) ; à J14 p.i. : Tg- (F), Tg+ (G) ; à J21 p.i. : Tg- (H), Tg+ (I).

Les images sélectionnées sont celles de la désorganisation de l'architecture splénique chez la souris Tg+ à J14 p.i. (G) ; de la récupération d'une architecture splénique normale chez la souris Tg+ à J21 p.i. (I) ; et du maintien de la désorganisation à J21 p.i. chez une souris Tg- (H).



2.4.3. Caractérisation de la désorganisation splénique par immunomarquage des lymphocytes B et T.

Afin de caractériser de manière plus fine la désorganisation de la rate chez les souris infectées, le marquage des LT et des LB avec, respectivement, les anticorps anti-CD3 et anti-B220, a été réalisé.

Les souris non infectées des deux génotypes présentent la même répartition des LT, localisés dans les follicules lymphoïdes (Figure 38 [A et I]), et des LB, localisés dans la pulpe rouge et à la lisière des follicules lymphoïdes, où ils sont disposés en « croissant » (Figure 38 [B et J]). Nous avons noté que la pulpe rouge des souris Tg⁺ semblait un peu plus riche en LB que celles des souris Tg⁻.

A J8 p.i., l'immunomarquage des rates des souris infectées ne montre pas de différence avec celui des rates de souris saines (Figure 38 [C, D, K et L]).

En revanche, on observe au pic de crise (J14 p.i.) une hyperplasie très marquée des zones LB chez les souris Tg⁻ (Figure 38 [F]). Chez les souris Tg⁺ au même temps, on observe une forte EMH (Figure 38 [N]), dont les cellules ne présentent ni marquage CD3, ni marquage B220². A noter que dans les deux cas Tg⁻ et Tg⁺, le niveau de marquage avec les anticorps anti-CD3 est faible (Figure 38 [E et M]).

Au 21^{ème} jour de l'infection, le marquage CD3 n'est pas très modifié par rapport au 14^{ème} jour (Figure 38 [G et O]). Le marquage B220 montre encore chez les Tg⁻ une hyperplasie des zones LB, respectant les follicules (Figure 38 [H]), tandis que chez les Tg⁺, il indique beaucoup d'EMH, sans formation lymphoïde (Figure 38 [P]).

En conclusion, les immunomarquages sur coupe de rate nous indiquent que la splénomégalie observée chez les souris Tg⁻ est due à une hyperplasie de la pulpe rouge et de la pulpe blanche, probablement due à une prolifération des LB. En revanche, chez les souris Tg⁺, les résultats du marquage indiquent que la splénomégalie et la désorganisation tissulaire seraient plutôt associées à une forte EMH

² Contrairement à l'EMH, qui correspond au développement de cellules sanguines en dehors de la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques non différenciées (ici, pas de marquages CD3 ni B220), l'hyperplasie correspond à une prolifération anormale de cellules normales différenciées. Ici l'hyperplasie concerne les LB.

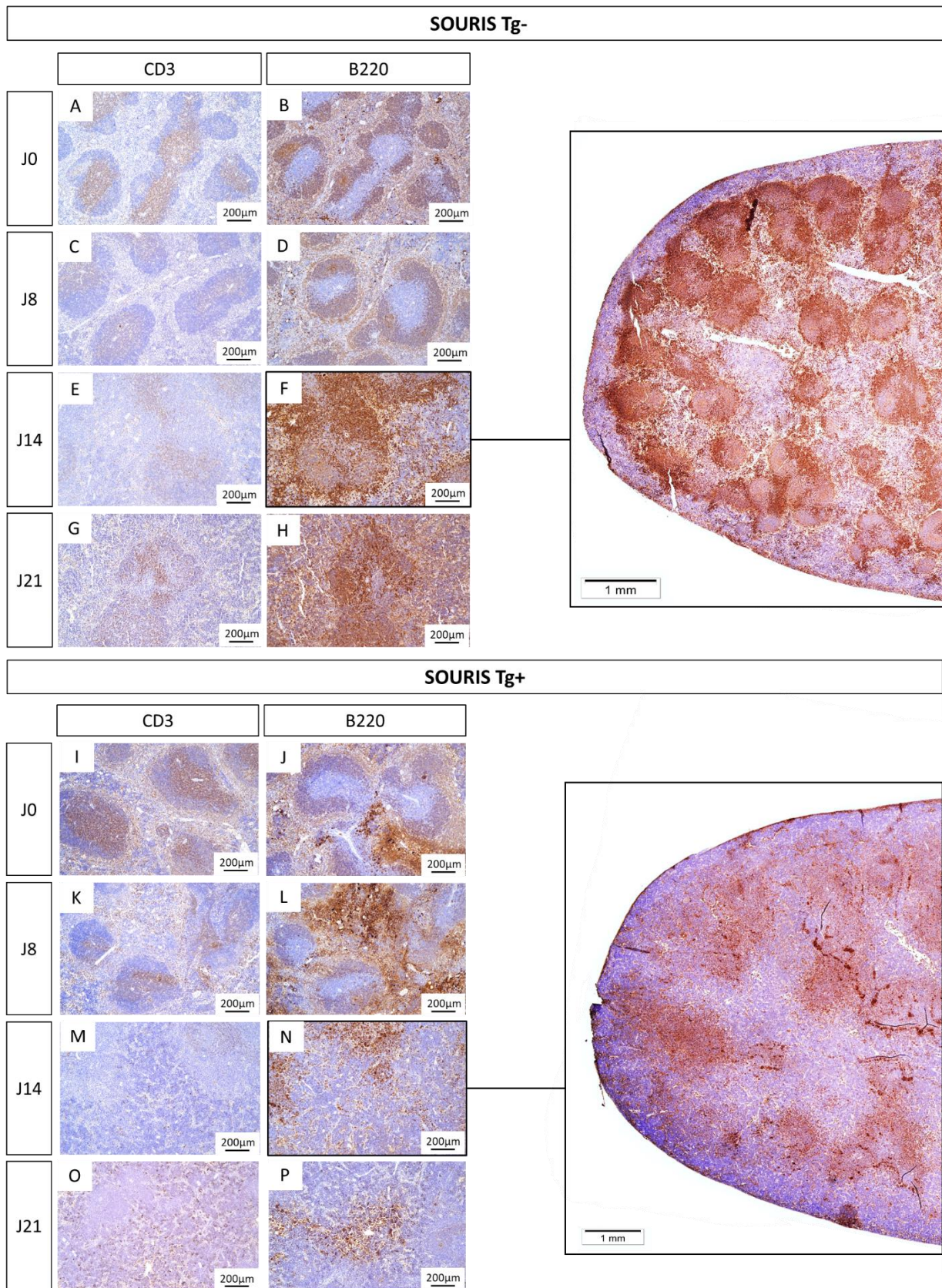


FIGURE 38 : IMMUNOMARQUAGES ANTI-CD3 ET ANTI-B220 SUR COUPES DE RATES DE SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR P. C. CHABAUDI 864VD. Pour les deux anticorps, le marquage apparaît en marron. Deux images à faible grossissement d'une coupe de rate de souris Tg- (cadre haut à droite) et Tg+ (cadre bas à droite) à J14 p.i. après immunomarquage anti-B220, sont présentées. Détails des marquages : Souris Tg- : à J0, marquage anti-CD3 (A), anti-B220 (B) ; à J8 p.i., marquage anti-CD3 (C), anti-B220 (D) ; à J14 p.i., marquage anti-CD3 (E), anti-B220 (F) ; à J21 p.i., marquage anti-CD3 (G), anti-B220 (H). Souris Tg+ : à J0, marquage anti-CD3 (I), anti-B220 (J) ; à J8 p.i., marquage anti-CD3 (K), anti-B220 (L) ; à J14 p.i., marquage anti-CD3 (M), anti-B220 (N) ; à J21 p.i., marquage anti-CD3 (O), anti-B220 (P).

3. Analyses moléculaires

Globalement, les analyses histopathologiques ont mis en avant un profil lésionnel du poumon et du rein léger et similaire entre les souris Tg- et Tg+, des atteintes au foie avec une récupération plus tardive des lésions chez les souris Tg+ et pour la rate, un profil différent et plus sévère chez les souris Tg+, comparé à celui des souris Tg-. Dans le but d'approfondir ces données et analyser davantage l'implication potentielle de l'enzyme dans l'infection par *P. c. chabaudi* chez la souris Tg+, nous avons mesuré l'expression/ présence de la hGIIA dans les organes et tissus des souris infectées (1) au niveau transcriptionnel (mesure de la quantité d'ARNm de la hGIIA par RT-qPCR) et (2) au niveau protéique (par immunohistochimie (IHC) sur coupes d'organes). Le foie, la rate et les reins ont été analysés par IHC. L'ARNm a été quantifié à partir d'extraits tissulaires du foie, de la rate et du sang. En prolongement de l'étude, l'expression des ARNm de quelques sPLA2 murines susceptibles d'être sollicitées par l'infection a été analysée à partir des mêmes extraits.

3.1. Immunomarquage de la hGIIA dans les organes des souris Tg+ infectées par *P. c. chabaudi* 864VD

Les immunomarquages de la hGIIA ont été réalisés sur le foie de souris Tg+ prélevés à J0 (n = 3), J8 p.i. (n = 3) et J14 p.i. (n = 3), la rate de souris Tg+ prélevée à J14 p.i. (n = 2), et sur les reins de souris Tg+ prélevés à J0 (n = 4) et à J14 p.i. (n = 4). L'absence de marquage par les anticorps anti-hGIIA, d'organes issus de souris n'exprimant pas la hGIIA, a été vérifiée sur des coupes d'organes de souris Tg- à J0 (n = 3) et J14 p.i. (n = 4).

Foie : un marquage diffus et hétérogène de la hGIIA dans le tissu hépatique des souris Tg+ est observé à tous les temps analysés ([Figure 39 \[A, B et C\]](#)). La localisation de la protéine semble être la même aux temps J0 et J8 p.i. de l'infection, où on la retrouve au niveau de certains hépatocytes. A J14 p.i., le marquage se retrouve préférentiellement à la périphérie des veines portes ([Figure 39 \[C\]](#)) et concentré au niveau des zones nécrotiques ([Figure 39 \[D et E\]](#)).

La hGIIA n'est pas détectée dans le foie des souris Tg- à J0 ([Figure 39 \[F\]](#)). En revanche, à J14 p.i., on observe un marquage au niveau des foyers nécrotiques uniquement ([Figure 39 \[H et I\]](#)), mais pas dans le tissu environnant ([Figure 39 \[G\]](#)). Ceci indique que le marquage des zones de nécrose chez les souris Tg+ peut être artéfactuel.

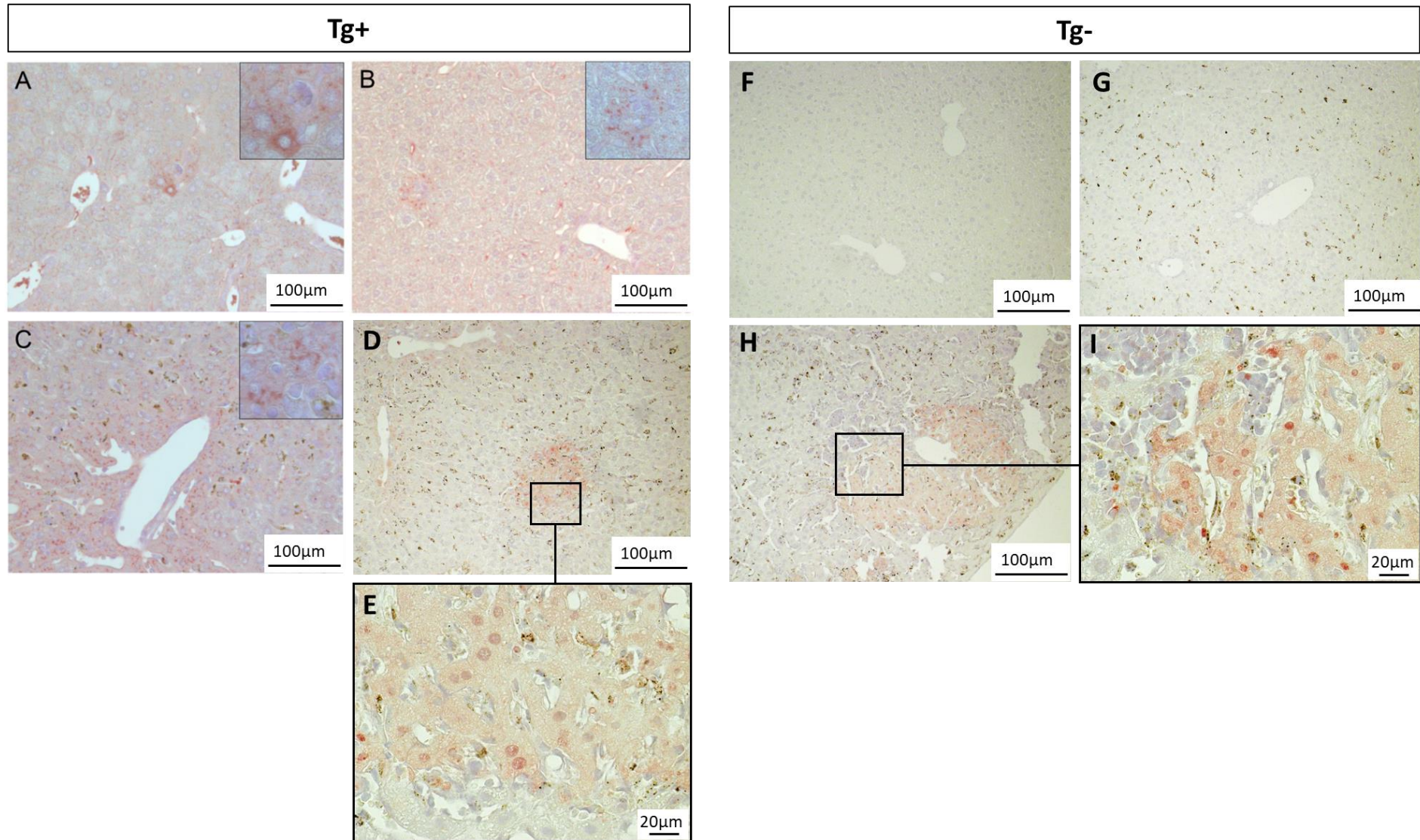


FIGURE 39 : IMMUNOMARQUAGE DE LA HGIIA DANS LE FOIE DES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR *P. c. CHABAUDI* 864VD.

Le marquage apparaît en rouge. Souris Tg+ (grossissement x10) : (A) à J0 ; (B) à J8 p.i. ; (C) à J14 p.i. ; (D) foyer nécrotique à J14 p.i. et (E) grossissement du foyer nécrotique (x40) à J14 p.i.. Souris Tg- (grossissement x10) : (F) à J0 (marquage négatif) ; (G) à J14 p.i. (marquage négatif) ; (H) foyer nécrotique à J14 p.i. et (I) grossissement du foyer nécrotique (x40) à J14 p.i..

Rate : Aucun marquage de la hGIIA n'a été décelé dans la rate à J14 p.i. (pour des raisons pratiques, seul ce temps d'infection a pu être analysé).

Rein : La présence de hGIIA est décelée dans le rein des souris Tg+ saines (à J0) et au 14^{ème} jour de l'infection, les deux temps qui ont été analysés (Figure 40). Le marquage de l'enzyme est net au niveau de l'urothélium, de la capsule de Bowman de quelques glomérules et au niveau de la face apicale des cellules des tubes contournés proximaux. A ce stade de l'étude, rien ne permet d'indiquer si le marquage est ou non de même intensité aux deux temps.

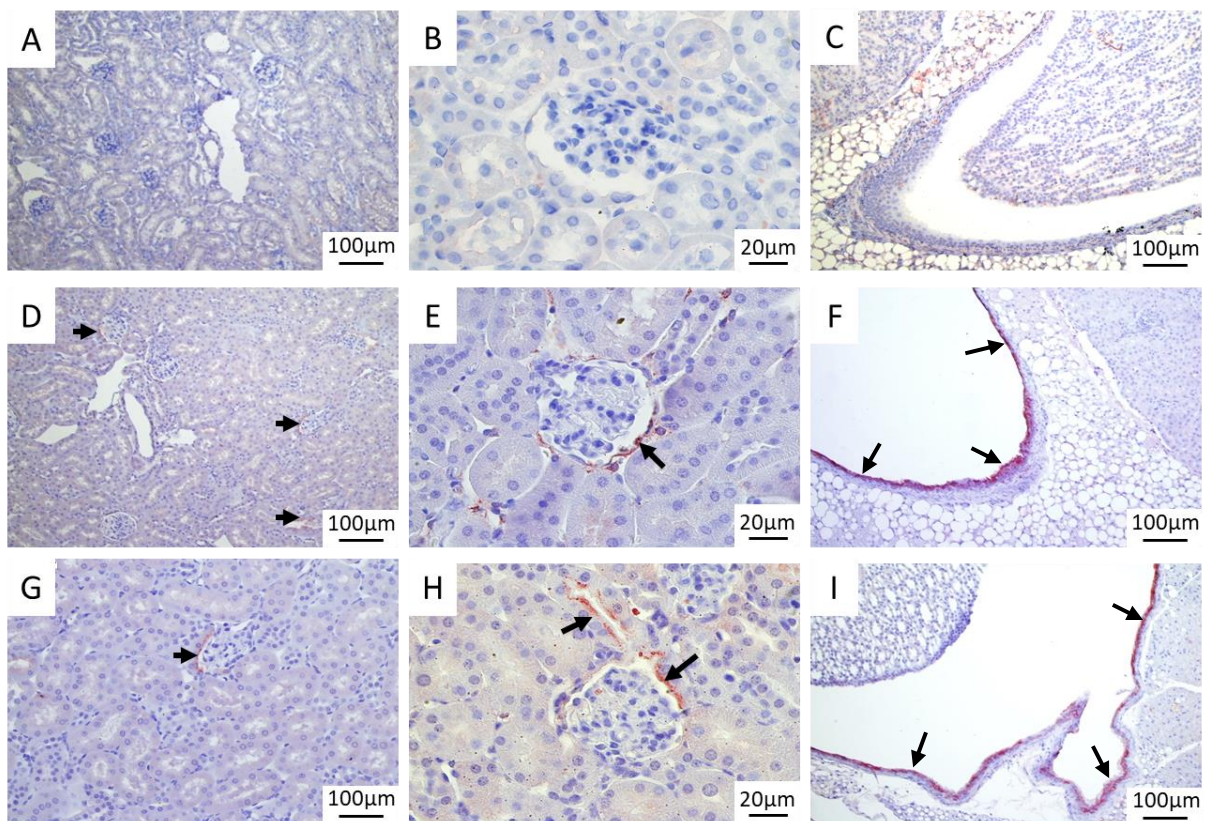


FIGURE 40 : IMMUNOMARQUAGE DE LA SPLA2 hGIIA SUR DES COUPES DE REIN DE SOURIS INFECTÉES PAR *P. C. CHABAUDI* 864VD.

Le marquage apparaît en marron-rouge sur les images (flèches noires). Contrôles négatifs du marquage : (A) coupe de rein d'une souris Tg- à J0 (faible grossissement), (B) Glomérule x40 d'une souris Tg- à J0, (C) Urothélium x10 d'une souris Tg- à J0. Marquages positifs : (D) Coupe de rein x20 d'une souris Tg+ à J0. (E) Glomérule x40 d'une souris Tg+ à J0. (F) Urothélium x10 d'une souris Tg+ à J0. (G) Coupe de rein x20 d'une souris Tg+ à J14. (H) Glomérule x40 d'une souris Tg+ à J14. (I) Urothélium x10 d'une souris Tg+ à J14.

3.2. Analyse par RT-qPCR

Les analyses moléculaires par immunomarquage ont été complétées par des analyses en RT-qPCR d'extraits du foie, de la rate et des cellules du sang des souris infectées, afin de mesurer les niveaux d'expression de l'ARNm de la hGIIA dans ces organes et tissu au cours de l'infection. En parallèle, une analyse quantitative des ARNm des sPLA₂ murines de groupe IIF, III, V et X, a été réalisée sur les mêmes extraits. Ces sPLA₂ ont été choisis par analogie avec leurs homologues humains, dont l'activité contre *P. falciparum* en culture *in vitro* a été démontrée (Guillaume et al., 2015). Le but était de voir si au sein des organes présentant des lésions histopathologiques en coloration HE (foie et rate), et au sein du compartiment dans lequel le parasite se développe (sang), la présence de sPLA₂ susceptibles de participer à la défense de l'hôte contre le parasite pouvait être détectée et si une variation de leur expression au niveau transcriptionnel à 3 moments différents de l'infection (début de phase patente, pic de crise, résolution/recrudescence) pouvait être observée.

Le matériel utilisé pour ces analyses était issu de deux expériences indépendantes et a été préparé à partir des échantillons d'organes conservés dans du RNA later® à -80°C. A ce jour, tous les échantillons n'ont pas été analysés. Le [tableau 10](#) récapitule, pour chaque organe et par jour de sacrifice, le nombre de souris utilisées dans les expériences de RT-qPCR présentées. Aucune amplification de l'ARNm de la hGIIA n'ayant été observé (comme attendu) dans les extraits tissulaires des souris Tg-, seuls les résultats obtenus avec les extraits tissulaires des souris Tg+ sont présentés ici.

TABLEAU 10 : NOMBRE DE SOURIS UTILISEES PAR JOUR DE SACRIFICE ET PAR ORGANE.

	Non infectées		J8		J14		J21		Total
	Tg-	Tg+	Tg-	Tg+	Tg-	Tg+	Tg-	Tg+	
Foie	3	3	3	3	1	3	2	2	20
Rate	3	3	3	3	2	4	3	3	24
Sang	3	4	2	2	3	4	3	2	23
Total	9	10	8	8	6	11	8	7	67

3.2.1. Le foie

Les extraits tissulaires contenant les ARN totaux ont été préparés à partir de 50 à 100 mg de foie de souris Tg- et Tg+ sacrifiées à J0, J8 p.i., J14 p.i. et J21 p.i..

L'ARNm de la hGIIA est détecté par RT-qPCR dans le foie des souris Tg+ naïves, mais pas dans le foie des souris Tg-. Après inoculation des parasites, le niveau de l'ARNm chez les souris Tg+ reste stable jusqu'à J8 p.i., puis une augmentation de la quantité d'ARNm d'un facteur x1,5 est mesurée à J14 p.i.. A J21 p.i. au contraire, l'ARNm est à la moitié de sa quantité initiale (Figure 41). L'augmentation et la diminution du niveau d'ARNm sont de faible amplitude, et le nombre d'échantillons analysés par point (n = 2 ou 3) ne permettant pas d'analyse statistique solide, il est difficile de conclure à un résultat définitif. Cependant, la faible variabilité entre les mesures effectuées à partir de foies provenant de souris différentes (n = 3 à J0, J8 p.i. et J14 p.i., n = 2 à J21 p.i.), laisse penser que le niveau de transcription du gène humain de la *Pla2g2a* dans le foie serait effectivement modulé au cours de l'infection.

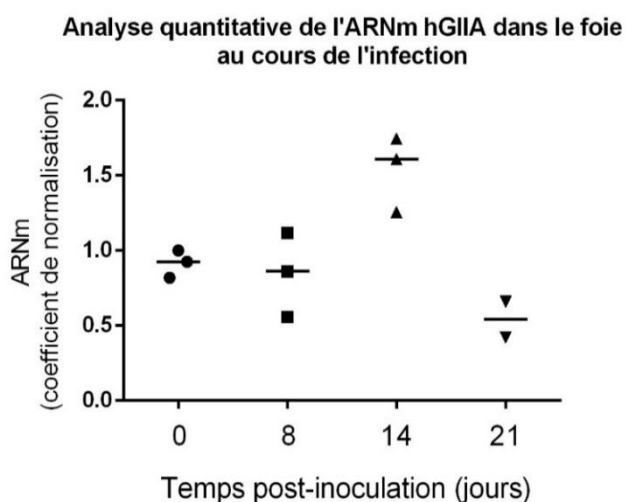


FIGURE 41 : MESURE DE LA QUANTITE D'ARNM HGIIA DANS LE FOIE DES SOURIS Tg+ AU COURS DE L'INFECTION.

Les résultats obtenus à partir des échantillons provenant de 2 expériences indépendantes ont été regroupés. Au total, 9 souris Tg- et 11 souris Tg+ infectées par voie IP avec 1×10^6 GRI ont été sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i. (respectivement, 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 1 Tg-/ 3 Tg+ et 2 Tg-/ 2 Tg+). A chaque temps de sacrifice, une extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de 50 à 100 mg de foie environ. Puis une amplification du gène de la *Pla2g2a* humaine a été réalisée par RT-qPCR en utilisant les amorces suivantes :

F : CCGCACTCAGTTATGGCTTCT

R : GGTGCCACATCCACGTTTC

La quantification a été normalisée par rapport aux gènes de références : *Pgk-1*, *Actb*, *Hprt-1*, *Tbp*. (Amorces *Pgk-1* (3), *Actb* (4), *Hprt-1* et *Tbp* du tableau 6 partie « **Matériel et Méthodes** »).

Chaque point correspond à un réplicat biologique. La barre horizontale représente la médiane.

3.2.2. La rate

Les extraits tissulaires contenant les ARN totaux ont été préparés à partir de 50 à 100 mg de rate de souris Tg- et Tg+ sacrifiées à J0, J8 p.i., J14 p.i. et J21 p.i.. Le nombre de souris sacrifiées par jour de prélèvement est indiqué dans le tableau 10.

L'ARNm de la hGIIA est détecté par RT-qPCR dans la rate des souris Tg+ naïves et pas dans la rate des souris Tg-, comme attendu. Huit jours après l'inoculation des parasites, on observe une grande dispersion des niveaux d'ARNm parmi les trois souris analysées. A J14 p.i. et J21 p.i., les quantités d'ARNm sont plus homogènes

entre souris. La mesure des niveaux médians d'ARNm au cours de l'infection semble indiquer que la quantité d'ARNm de la hGIIA dans la rate pourrait baisser progressivement entre J0 et J21 p.i., jusqu'à atteindre un niveau environ 6 fois plus bas qu'à J0 (Figure 42). Toutefois, le faible nombre d'échantillons analysés à chaque point, ne permet pas de confirmer statistiquement cette observation. Ces résultats devront être confirmés par un élargissement des effectifs.

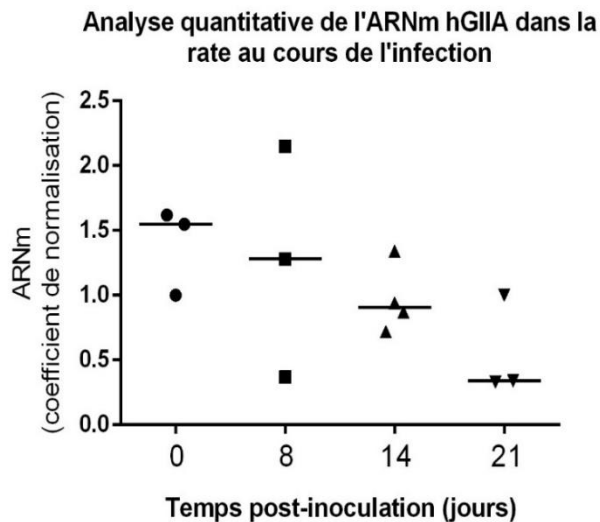


FIGURE 42 : MESURE DE LA QUANTITE D'ARNM hGIIA DANS LA RATE DES SOURIS Tg+ AU COURS DE L'INFECTION.

Les résultats obtenus à partir des échantillons provenant de 2 expériences indépendantes ont été regroupés. Au total, 11 souris Tg- et 13 souris Tg+ infectées par voie IP avec 1×10^6 GRI ont été sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i. (respectivement, 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 2 Tg-/ 4 Tg+ et 3 Tg-/ 3 Tg+). A chaque temps de sacrifice, une extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de 50 à 100 mg de rate environ. Puis une amplification du gène de la *Pla2g2a* humaine a été réalisée par RT-qPCR en utilisant les amorces suivantes :
 F : CCGCACTCAGTTATGGCTTCT
 R : GGTGCCACATCCACGTTTC
 La quantification a été normalisée par rapport aux gènes de références : *Gusb*, *Hprt-1*, *Tbp*. (Amorces *Gusb* (3), *Hprt-1* et *Tbp* du [tableau 6](#) partie « **Matériel et Méthodes** »).
 Chaque point correspond à un réplicat biologique. La barre horizontale représente la médiane.

3.2.3. Le sang

Les extraits de sang contenant les ARN totaux ont été préparés à partir de sang récupéré par le sinus rétro-orbital des souris Tg- et Tg+ sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i.. Le nombre de souris sacrifiées par jour de prélèvement est indiqué dans le [tableau 10](#). Le sang a été centrifugé, plasma et cellules ont été séparés et congelés. Les extractions d'ARN ont été réalisées à partir des cellules.

L'ARNm de la hGIIA est détecté par RT-qPCR dans le sang des souris Tg+ naïves, mais pas dans celui des souris Tg-. On remarque que les 3 souris Tg+ analysées présentent des niveaux d'ARNm différents (Figure 43). A J14 p.i., on observe une diminution de la quantité d'ARNm chez 3 souris sur les 4 analysées. Le niveau reste très bas à J21 p.i.. Là-aussi, les effectifs devront être élargis pour que ces résultats puissent être confirmés statistiquement.

Le niveau variable d'ARNm mesuré dans les cellules du sang à J0 (Figure 43) est sans doute à mettre en parallèle avec le niveau variable d'activité sPLA2, mesuré dans les plasmas des souris Tg+ naïves (Laine et al., 2000a ; et ce travail). Malgré cette variabilité de départ, nos résultats montrent une diminution de la quantité d'ARNm à J14 et J21 p.i. chez la plupart des souris (5 souris sur 6). Ce qui suggère que l'expression du gène *Pla2g2a* dans le sang tend à diminuer au cours de l'infection. Le niveau médian d'ARNm est divisé environ par 6

entre J0 et J21 p.i.. Il est donc vraisemblable que l'augmentation de l'activité sPLA2 au moment du pic de crise ne provienne pas des cellules du sang.

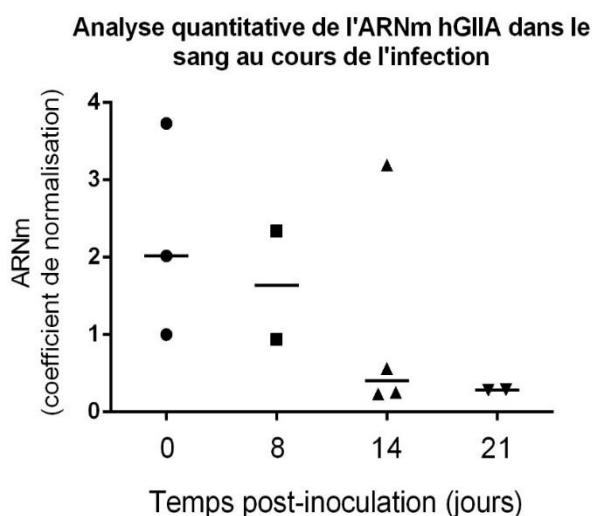


FIGURE 43 : MESURE DE LA QUANTITE D'ARNM hGIIA PAR LES CELLULES DU SANG DES SOURIS Tg+ AU COURS DE L'INFECTION.

Les résultats obtenus à partir des échantillons provenant de 2 expériences indépendantes ont été regroupés. Au total, 11 souris Tg- et 12 souris Tg+ infectées par voie IP avec 1×10^6 GRI ont été sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i. (respectivement, 3 Tg- / 4 Tg+ ; 2 Tg- / 2 Tg+ ; 3 Tg- / 4 Tg+ et 3 Tg- / 2 Tg+). A chaque temps de sacrifice, une extraction des ARN totaux a été réalisée à partir du sang total. Puis une amplification du gène de la *Pla2g2a* humaine a été réalisée par RT-qPCR en utilisant les amorces suivantes :

F : CCGCACTCAGTTATGGCTTCT

R : GGTGCCACATCCACGTTTC

La quantification a été normalisée par rapport aux gènes de références : *Actb*, *Gusb*, *Hprt-1*, *Tbp*. (Amorces *Actb* (4), *Gusb* (3), *Hprt-1* et *Tbp* du [tableau 6](#) partie « **Matériel et Méthodes** »).

Chaque point correspond à un réplicat biologique. La barre horizontale représente la médiane.

3.2.4. Analyse quantitative des ARNm des sPLA2 murines de groupe IIF, III, V et X dans le foie, la rate et le sang des souris Tg- et Tg+ infectées par *P. c. chabaudi* 864VD

A partir des extraits préparés pour l'analyse quantitative de l'ARNm de la hGIIA ([tableau 10](#)), une recherche des ARNm des sPLA2-IIF, -III, -V et -X murines a été réalisée.

Les RT-qPCR sur le foie, la rate et le sang des souris Tg- et Tg+ naïves, ou au cours de l'infection, n'ont pas permis de détecter l'ARNm de la sPLA2 mGIII (F : TGGCCAAAACATCAAAGTG ; R : GGCTTGATCTGGTGCTCACA) ni de la sPLA2 mGX (F : GGCTGTTATTGTGGCCTTGTTG ; R : TCCTGAGCCCGAGAGTAGCA). De même, les ARNm des sPLA2-IIF et -V murines n'ont pas été détectés dans le sang et le foie des souris Tg- et Tg+. En revanche, ils ont pu être mesurés dans la rate (les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont données dans la légende de la [figure 44](#)).

Au cours de l'infection, on observe une diminution de la quantité d'ARNm de la mGIIF chez les deux génotypes, avec diminution nette à J14 p.i. et J21 p.i. ([Figure 44 \[A\]](#)). On observe à peu près le même schéma pour l'ARNm de la mGV chez les deux types de souris ([Figure 44 \[B\]](#)). Les effectifs, faibles, ne permettent pas l'application d'un test statistique.

Les résultats montrent donc que les quantités d'ARNm des mGIIF et mGV diminuent dans la rate au cours de l'infection. Les profils quantitatifs sont globalement les mêmes entre souris Tg- et Tg+, ce qui suggère que la hGIIA n'influe pas sur l'expression des gènes des sPLA2 murines.

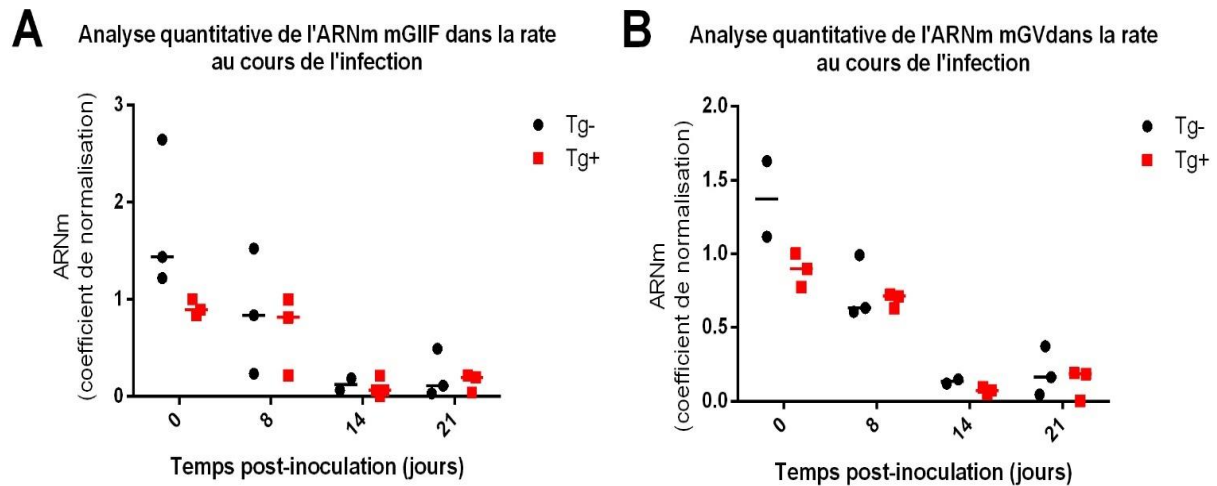


FIGURE 44 : ANALYSE QUANTITATIVE DES ARNm DES sPLA2 MURINES mGIIF ET mGV PAR LES CELLULES DE LA RATE DES SOURIS Tg- ET Tg+ AU COURS DE L'INFECTION.

Les résultats obtenus à partir des échantillons provenant de 2 expériences indépendantes ont été regroupés. Au total, 13 souris Tg- et 13 souris Tg+ infectées par voie IP avec 1×10^6 GRi ont été sacrifiées à J0, J8, J14 et J21 p.i. (respectivement, 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 3 Tg-/ 3 Tg+ ; 2 Tg-/ 4 Tg+ et 3 Tg-/ 3 Tg+). A chaque temps de sacrifice, une extraction des ARN totaux a été réalisée à partir du sang total. (A) une amplification du gène de la *Pla2g2f* murine a été réalisée par RT-qPCR en utilisant les amorces suivantes : F : TCAGGGCCTCTCCCTCTAAAA ; R : GGACTGCGATGGCAAAGAAT. (B) une amplification du gène de la *Pla2g5* murine a été réalisée par RT-qPCR en utilisant les amorces suivantes : F : CCCAAGGATGGCACTGAT ; R : GCACAGTCTTTTCTCCAGTTG. (●) : souris Tg-, (■) : souris Tg+.

Pour les deux gènes, la quantification a été normalisée par rapport aux gènes de références : *Gusb*, *Hprt-1*, *Tbp*. (Amorces *Gusb* (3), *Hprt-1* et *Tbp* du [tableau 6](#) partie « **Matériel et Méthodes** »).

Chaque point correspond à un réplicat biologique. La barre horizontale représente la médiane.

Points forts – Discussion

Les données macroscopiques montrent que si les souris Tg+ sont naturellement plus petites que les souris Tg-, leurs organes ont des poids comparables. Par ailleurs, l'infection induit de la même façon chez les deux groupes de souris une perte de poids corporel au moment des plus fortes parasitémiés.

Les souris Tg+ parasitées présentent au plus fort de l'infection une splénomégalie importante et une légère augmentation du poids hépatique. L'atteinte hépatique tend à se résorber après le pic de crise, mais pas la splénomégalie, qui augmente encore. Ce schéma est globalement le même que celui qui est observé chez les souris Tg- infectées. Chez les deux types de souris, le poids des reins tend peut-être à augmenter au cours de l'infection, mais aucune différence statistiquement significative ne vient soutenir cette observation. Il faut noter que la néphromégalie est connue dans certains cas de paludisme aviaire mais n'a jamais été observée dans les modèles murins.

Les résultats de l'analyse histopathologique comparative des organes chez les souris Tg+ et Tg- infectées par *P. c. chabaudi* 864VD ont permis de mettre en évidence que dans les deux cas, les poumons et les reins sont peu touchés par l'infection. En revanche, le foie et la rate présentent un fort taux de lésions chez les deux types de souris. Ces lésions sont de même nature, mais leur intensité et/ou leur précocité diffèrent entre les souris Tg- et Tg+.

Plus en détail, il ressort que :

- (1) Les souris Tg+, comme les souris Tg-, présentent des lésions pulmonaires minimales avec quelques rares infiltrats périvasculaires au 8^{ème} jour de l'infection, qui ne sont plus observés par la suite ;
- (2) Des lésions rénales légères (infiltrations périvasculaires) apparaissent tardivement chez les deux types de souris ;
- (3) Dans le foie, de nombreuses lésions apparaissent à J14 p.i., conjointement à l'hépatomégalie. Ces lésions sont les mêmes chez les deux génotypes murins : un envahissement diffus des sinusoides par de l'EMH (cellules indifférenciées) et des cellules inflammatoires, une répartition homogène de pigments d'hémozoïne dans tout le parenchyme hépatique, des zones nécrotiques à préférence sous-capsulaire entourées d'un infiltrat inflammatoire. La différence liée au génotype s'observe à J21 p.i. avec chez les Tg- une bonne récupération tissulaire, seules 2 souris sur 6 présentent encore de rares foyers d'EMH diffus dans le tissu ; tandis que chez les Tg+, 2 souris sur 5 montrent encore un niveau sévère de lésions, avec des zones nettes d'infiltration et d'inflammation. Ces observations laissent penser que les souris Tg+ récupèrent moins vite des atteintes au foie liées à l'infection par *Plasmodium* que les souris Tg-. La présence de la hGIIA dans le foie des souris Tg+ a été confirmée par immunomarquage. Les images ont permis de visualiser la dispersion hétérogène de l'enzyme dans le foie à J0, J8 p.i. Puis, à J14 p.i., le marquage se concentre préférentiellement au niveau des veines centrolobulaires et de foyers nécrotiques. Le marquage des zones de nécrose est toutefois douteux dans la mesure où les souris Tg- ont présenté le même marquage en absence de hGIIA, ce qui suggère une absence de spécificité du marquage. Au même temps, à J14 p.i., on mesure une augmentation des transcrits du gène de la hGIIA dans le foie. Ceci indique que des cellules présentes dans les zones de nécrose (?) et au niveau des veines centro-

lobulaires pourraient être sollicitées et sécréter plus de hGIIA. Le niveau d'ARNm baisse à J21 p.i., en parallèle avec un début de régénération du tissu hépatique. La question se pose donc de savoir si la présence de l'enzyme pourrait freiner la régénération de l'organe, qui, à J21 p.i., est moins avancée que chez les souris Tg- sans hGIIA.

(4) Dans la rate, parallèlement à la splénomégalie, on observe à J14 p.i., chez toutes les souris Tg+, une désorganisation de l'architecture splénique avec effacement des limites entre pulpe blanche et pulpe rouge, désorganisation qui persiste encore au 21^{ème} jour de l'infection chez 2 souris sur 5, tandis que ce phénotype ne s'observe que chez la moitié des souris et uniquement à J21 p.i. chez les souris Tg-. L'analyse immunohistochimique des coupes de rate aux différents temps de l'infection montre que la désorganisation du tissu splénique chez les souris Tg- correspond à une hyperplasie de la pulpe rouge et de la pulpe blanche avec prolifération des LB, alors que chez les souris Tg+, la multiplication cellulaire serait due préférentiellement à de l'EMH. L'analyse de la distribution des LT et B au sein des lésions spléniques indique donc que les phénomènes de prolifération cellulaire pourraient impliquer des cellules différentes chez les souris Tg- et Tg+.

Par ailleurs, la hGIIA n'a pas été décelée par IHC dans la rate des souris Tg+ infectées, ce qui indique que la protéine est absente ou en quantité trop faible pour être détectée, et suggère que la désorganisation particulière de la rate chez les Tg+, en particulier l'EMH, ne serait pas liée à la présence physique de l'enzyme dans l'organe.

Enfin, ni le rein ni le poumon n'ont montré d'atteintes significatives lors de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD, tout au moins dans les limites de temps de nos expériences. Il est toutefois intéressant de noter que la hGIIA a été détectée dans des régions très spécifiques du rein : au niveau de la capsule de Bowman, des cellules des tubes contournés proximaux et de l'urothélium. La distribution de la protéine et l'intensité du marquage ne semblent pas modifiées par l'infection (J14 p.i. vs J0).

Activité enzymatique plasmatique en relation avec l'expression de la hGIIA dans les organes et tissus

Nous avons vu que l'activité enzymatique de type sPLA2 mesurée dans le plasma des souris Tg+ parasitées augmente avec la parasitémie jusqu'à J14 p.i., puis diminue brutalement dans les deux jours qui suivent, en même temps que la parasitémie baisse. Le niveau de l'activité enzymatique n'est pas directement assimilable à la quantité de protéine ou d'ARNm : la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'enzyme peuvent moduler son activité sans que la quantité d'enzyme change. De même, la protéine peut être stockée et libérée à la demande sans qu'il soit besoin d'augmenter la quantité d'ARNm, ou c'est l'ARN qui peut être stocké et traduit à la demande. Il est donc difficile ici de savoir quel phénomène rend compte de l'augmentation de l'activité plasmatique, ou de sa diminution.

Les résultats obtenus par l'analyse quantitative de l'ARNm de la hGIIA dans les organes sont encore préliminaires, dans la mesure où ils ont été établis à partir d'effectifs trop petits pour permettre une analyse statistique. L'analyse d'un nombre plus grand d'échantillons sera faite à partir des organes congelés, actuellement stockés au laboratoire. La discussion qui suit reste donc spéculative.

Le foie est, parmi les organes et tissu analysés, le seul à montrer une augmentation de la quantité d'ARN entre J8 et J14 p.i. Il pourrait donc être en partie responsable de l'augmentation d'activité enzymatique dans le plasma, par une augmentation de la sécrétion de sPLA2 dans le sang. Toutefois, on ne peut pas exclure que d'autres organes que ceux étudiés ici pourraient surexprimer la hGIIA au cours de l'infection. La rate et les cellules du sang voient leur quantité d'ARNm diminuer au cours de l'infection, ce qui les rend peu susceptibles de rendre compte de l'augmentation d'activité. En revanche, la diminution de l'activité plasmatique après le pic de parasitémie est en accord avec le faible niveau d'ARNm mesuré à J21 p.i. dans les trois tissus étudiés : le foie, la rate et les cellules du sang.

Il semble clair aussi que dans les tissus qui ont pu être analysés, l'infection par *Plasmodium* ne sollicite pas l'expression des sPLA2 murines IIF, III, V et X. Au contraire, on constate une diminution de la quantité d'ARNm des seules deux sPLA2 (mGIIF et mGV) qui ont pu être détectées dans la rate. On retrouve donc le même profil quantitatif que celui de l'ARNm de la hGIIA dans la rate des souris Tg+ infectées. La question se pose de savoir si la diminution générale des ARNm des sPLA2 dans la rate est un phénomène actif en lien avec la physiopathologie de l'infection, ou une conséquence « collatérale » de la splénomégalie. En effet, dans la deuxième situation, dans l'hypothèse où les cellules néo-formées responsables de l'augmentation du volume de la rate n'exprimeraient pas le gène de la hGIIA, on observerait une diminution de la quantité d'ARNm mesuré.

PARTIE 3 : Etude du mécanisme d'action anti-*Plasmodium* de la hGIIA

Nous avons montré que la hGIIA recombinante est capable d'induire une baisse de parasitémie lorsqu'elle est injectée à des souris WT infectées. Cependant, le(s) mécanisme(s) d'action antiparasitaire de l'enzyme *in vivo* est (sont) inconnu(s). Une partie du travail de thèse a été consacré à l'étude de ce(s) mécanisme(s).

Nous avons choisi deux voies d'approche pour essayer de décrypter le(s) mécanisme(s) d'action de la hGIIA. La première approche s'est appuyée sur des données récentes obtenues *in vitro*, montrant que la hGIIA est capable d'inhiber la croissance de *P. falciparum* en culture par un mécanisme indirect mettant en jeu l'hydrolyse des lipoprotéines plasmatiques contenues dans le milieu de culture. Dans la deuxième approche, nous nous sommes intéressés aux propriétés de médiateur de l'immunité de la hGIIA, en supposant que la présence de l'enzyme chez la souris transgénique pouvait modifier la réponse immunitaire de la souris vis-à-vis du parasite.

Hypothèse 1 : L'hydrolyse enzymatique des lipoprotéines oxydées libère des acides gras toxiques pour *Plasmodium*

1.1. L'injection précoce de hGIIA recombinante à des souris C57BL/6 WT infectées par *P. c. chabaudi* 864VD ne modifie pas le profil infectieux

Dans un premier temps, nous avons vérifié si le moment de l'infection choisi pour l'injection de hGIIA était déterminant dans l'effet produit : en effet, la baisse de parasitémie à J14 p.i. a été observée après une série d'injections pratiquée à J12 p.i. et J13 p.i., période que nous avons sélectionnée pour les raisons expliquées dans la partie 1 des résultats (« **1.3.1 L'injection de hGIIA recombinante à des souris WT infectées par *P. chabaudi* induit une baisse de parasitémie au pic de crise** »). Nous avons testé si l'effet inhibiteur de la hGIIA pouvait être obtenu par une injection de l'enzyme plus tôt dans l'infection, au début de la phase patente.

La hGIIA recombinante a été injectée aux souris dès que les premiers parasites sont apparus sur frottis, et selon le protocole décrit précédemment pour l'injection plus tardive. 11 souris C57BL/6 WT ont été inoculées avec 1×10^6 GR infectés par *P. c. chabaudi* 864VD par voie IP. Au début de la phase patente, soit à J8, J9 et J10 p.i., 5 souris ont reçu des injections de PBS et les 6 autres souris ont reçu des injections de hGIIA recombinante. Le suivi quotidien de la parasitémie chez les souris n'a montré ni retard dans la survenue du pic de crise, ni baisse du niveau de parasitémie chez les souris ayant reçu l'enzyme par rapport aux souris contrôles. Les profils de parasitémie des deux groupes de souris sont présentés en [figure 45](#).

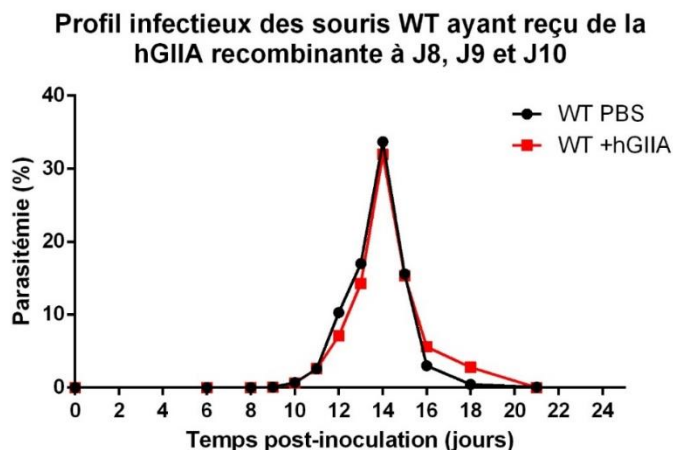


FIGURE 45 : PROFIL INFECTIEUX DES SOURIS C57BL/6 WT APRES INJECTION PRECOCE DE HGIIA RECOMBINANTE.

1 expérience a été réalisée totalisant 5 souris WT contrôles injectées PBS et 6 souris WT injectées hGIIA. Les souris ont reçu deux injections de 100 μ L par voie IP par jour (une le matin et une le soir) aux jours 8, 9 et 10 de l'infection. 100 μ L de PBS-sérum (souris contrôles) ou 100 μ L d'une solution de hGIIA à 1,8 μ M en PBS-sérum ont été injectés. En noir est représenté le profil infectieux médian des souris contrôles et en rouge, celui des souris ayant reçu une injection de hGIIA. (●) : souris WT infectées + injectées PBS, (■) : souris WT infectées + injectées hGIIA. (▼) : jour d'injections.

Ce résultat montre que l'activité anti-*Plasmodium* de la hGIIA exogène s'exerce tardivement au cours de l'infection. Or, dans l'hypothèse où l'enzyme exercerait une action directement sur le parasite, le fait que le nombre de parasites circulants soit beaucoup plus faible au début de la phase patente qu'avant le pic de crise, aurait dû conduire la même quantité d'enzyme à être plus efficace lors de l'injection précoce.

L'absence d'effet au début de l'infection tendait donc à montrer que l'action antiparasitaire de la hGIIA exogène dépend de facteurs ou d'événements physiopathologiques apparaissant plus tardivement au cours de l'infection.

Nos données les plus récentes ont montré que la hGIIA inhibe la croissance de *P. falciparum* en culture lorsque des lipoprotéines plasmatiques humaines (HDL, LDL ou lipoprotéines totales purifiées) ayant préalablement subi un traitement oxydatif *in vitro*, sont ajoutées au milieu de culture ([Annexe 1](#)). La hGIIA a une faible affinité pour les lipoprotéines natives, non oxydées, qui, de même que les membranes cellulaires eucaryotes, ont une surface globale électriquement neutre. Les surfaces phospholipidiques neutres ou chargées positivement sont peu attractives pour l'enzyme, alors que son affinité est forte pour les surfaces chargées négativement (Murakami et al., 2003). L'oxydation augmente la charge négative des lipoprotéines, qui deviennent substrats de la hGIIA. L'hydrolyse des phospholipides présents à la surface des particules conduit à la libération de lysoPL et d'acides gras. Or, les acides gras longs et insaturés, principalement l'AA, sont des inhibiteurs de la croissance de *Plasmodium in vitro* et *in vivo* (Guillaume et al., 2006; Kumaratilake et al., 1992). D'autre part, l'oxydation des lipoprotéines est un phénomène qui se rencontre dans de nombreuses pathologies, et notamment dans le paludisme humain (Das et al., 1993; Memon et al., 2000).

Ceci nous a conduit à formuler l'hypothèse que la hGIIA pourrait agir chez les souris Tg+ infectées selon ce mécanisme d'hydrolyse des lipoprotéines plasmatiques oxydées et de libération d'acides gras toxiques entraînant une diminution de la parasitémie.

1.2. Mesure de l'oxydation lipidique chez les souris parasitées

Dans le cadre de cette hypothèse, nous avons vérifié si l'infection par *P. c. chabaudi* induisait une augmentation du niveau d'oxydation des lipoprotéines plasmatiques chez les souris Tg- et Tg+.

Les échantillons de plasma recueillis lors des expériences d'histologie et conservés à -80°C ont été utilisés pour le dosage du MDA par la méthode des TBARS. Les plasmas prélevés à J0, J8, J14 et J21 p.i. au cours de deux expériences indépendantes incluant respectivement 33 (18 Tg- et 15 Tg+) souris et 27 (13 Tg- et 14 Tg+) souris, ont été analysés. L'ensemble des résultats des deux expériences est présenté dans la [figure 46](#).

Chez les souris Tg- ([Figure 46 \[A\]](#)), on observe une dispersion importante des valeurs de la peroxydation plasmatique à J0. Aucune différence statistiquement significative n'est mesurée entre J0 et un autre point de l'infection. On peut toutefois noter une augmentation significative du niveau d'oxydation lipidique entre J8 et J14 p.i. (**p = 0,0012, Mann-Whitney), qui se maintient à J21 p.i. (**p = 0,0076, Mann-Whitney). Chez les souris Tg+ ([Figure 46 \[B\]](#)), comme chez leurs homologues non transgéniques, on observe une forte dispersion des niveaux d'oxydation à J0 et aucune différence significative n'est mesurée par rapport à J0 après infection. Là-encore, une augmentation significative est toutefois observée entre J8 et J14 p.i. (*p = 0,0476, Mann-Whitney). Le niveau d'oxydation est comparable chez les souris Tg- et Tg+ naïves.

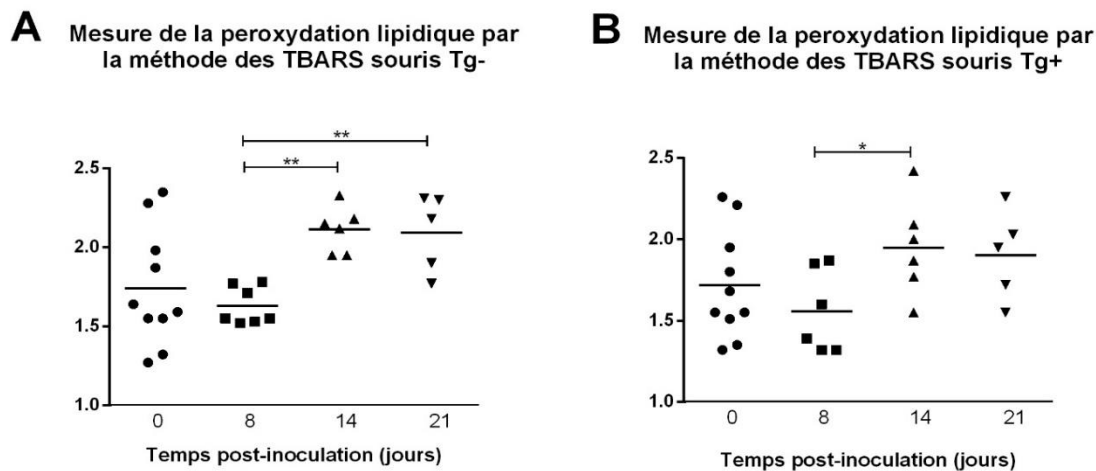


FIGURE 46 : MESURE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE PAR LA METHODE DES TBARS AU COURS DE L'INFECTION.

2 expériences indépendantes ont été réalisées totalisant à J0 : 10 souris Tg-/ 10 souris Tg+ ; à J8 p.i. : 7 souris Tg-/ 6 souris Tg+ ; à J14 p.i. : 6 souris Tg-/ 6 souris Tg+ et à J21 p.i. : 5 souris Tg-/ 5 souris Tg+. (A) Mesure des TBARS au cours de l'infection chez les souris Tg-. Une différence statistiquement significative est notée entre J8 p.i. et J14 p.i. : **p = 0,0012 et entre J8 p.i. et J21 p.i. : **p = 0,0076 (test Mann-Whitney). (B) Mesure des TBARS au cours de l'infection chez les souris Tg+. Une différence statistiquement significative est notée entre J8 p.i. et J14 p.i. : *p = 0,0476 (test Mann-Whitney). La barre horizontale correspond à la médiane des valeurs.

En conclusion, l'absence de différence entre J0 et les autres moments de l'infection ne permet pas de conclure à une augmentation claire du niveau d'oxydation plasmatique chez les souris Tg- et Tg+. Cependant, les variations apparues au cours de l'infection, particulièrement chez les souris Tg-, signalent qu'une telle oxydation pourrait avoir lieu.

Il faut noter que le dosage des TBARS à partir de plasma plutôt que de lipoprotéines purifiées est peu fiable dans la mesure où des composés plasmatiques autres que le MDA sont susceptibles de réagir avec l'acide thiobarbiturique. Ici, la présence d'un « bruit de fond » important pourrait masquer la variation du niveau d'oxydation. Malheureusement, les volumes de plasma disponibles étaient trop faibles pour envisager de purifier les lipoprotéines avant le dosage.

Dans la poursuite de l'hypothèse mettant en jeu l'hydrolyse de lipoprotéines oxydées, nous avons élaboré une stratégie consistant à synthétiser des liposomes enrichis en phospholipides anioniques et en AA, et à les injecter à des souris Tg+ infectées, de façon à vérifier si ces particules-substrats pouvaient augmenter l'effet antiparasitaire de la hGIIA.

1.3. La hGIIA inhibe la multiplication de *P. falciparum* en culture *in vitro* en présence de liposomes anioniques riches en acide arachidonique

Quatre types de liposomes ont été synthétisés à l'IPMC de Nice Sophia-Antipolis, par le Dr. Bruno ANTONNY et le Dr. Gérard LAMBEAU. Leur composition est rapportée dans « 2.1. Préparation des liposomes » (Matériel et Méthodes). Les 4 types de liposomes ont été élaborés de façon à présenter les caractéristiques suivantes, respectivement : anionique avec PUFA (riche en AA), anionique sans PUFA, zwitterionique avec PUFA (riche en AA), zwitterionique sans PUFA.

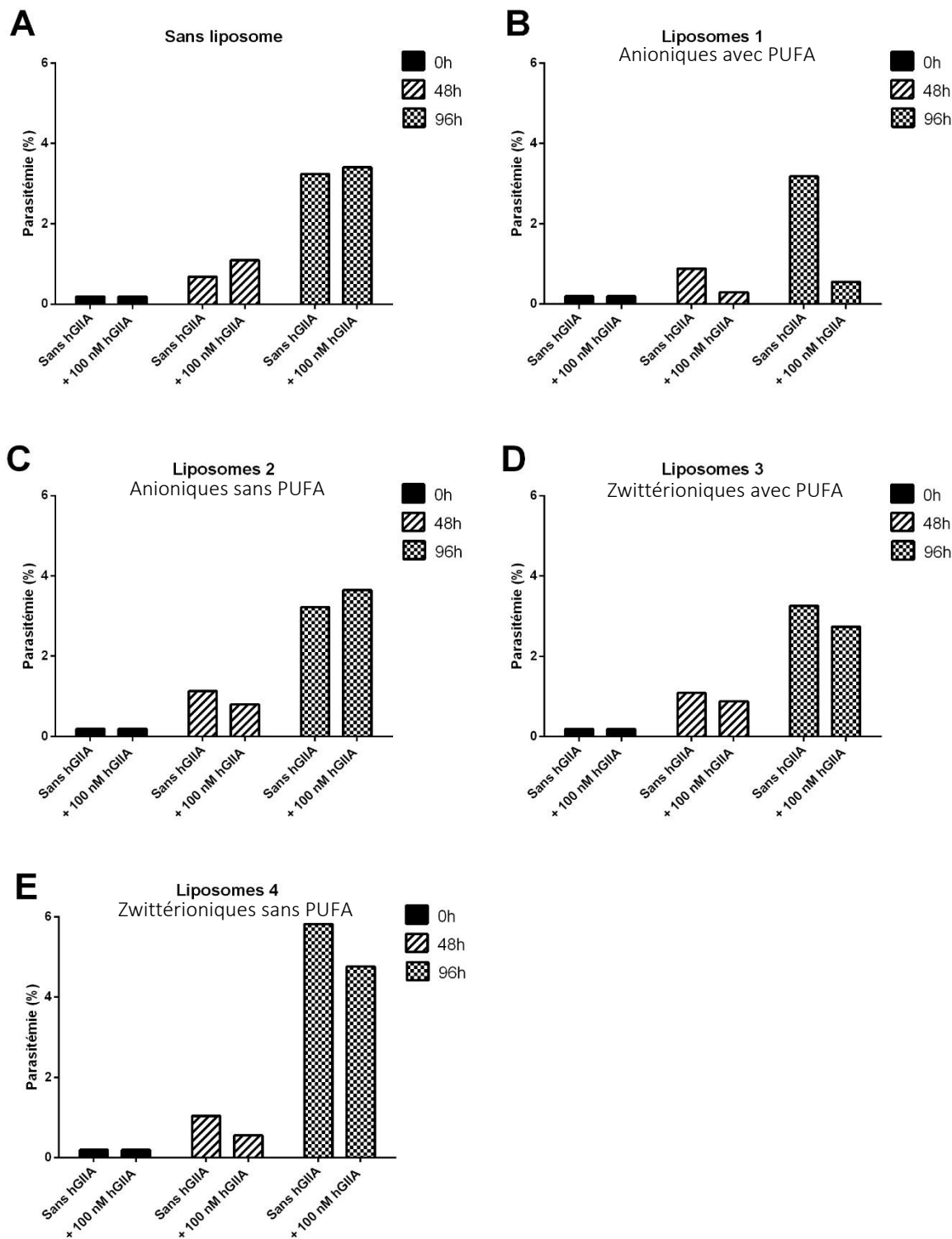
Avant de tester l'effet des liposomes sur le développement parasitaire *in vivo*, leur capacité à médier l'activité anti-*Plasmodium* de la hGIIA a été testée *in vitro*. Une culture de *P. falciparum* (souche FcB1) en RPMI 8% plasma et sur GR humains, a été amenée à une parasitémie de 0,2% environ au temps zéro de l'incubation. Les liposomes (0,02 mg/mL de phospholipides concentration finale) et la hGIIA recombinante (100 nM concentration finale) ont été ajoutés. La multiplication parasitaire a été mesurée sur frottis à 48h et 96h, soit sur deux cycles de développement intraérythrocytaire.

Les résultats présentés en [figure 47](#) montrent que la hGIIA inhibe le développement de *P. falciparum* seulement en présence des liposomes anioniques contenant de l'AA ([Figure 47 \[B\]](#)). L'enzyme n'inhibe pas le parasite en présence des liposomes anioniques ne contenant pas de PUFA ([Figure 47 \[C\]](#)) ou en présence des liposomes zwitterioniques (avec ou sans PUFA) ([Figure 47 \[D\]](#) et [\[E\]](#)). D'autre part, aucun des liposomes ajoutés seul au milieu de culture ne freine la croissance parasitaire. Ces résultats validaient donc le choix des compositions lipidiques des liposomes et démontraient sans ambiguïté l'efficacité des liposomes anioniques-AA en tant que cible et substrat de la hGIIA dans l'optique d'une utilisation anti-*Plasmodium in vivo*.

Par ailleurs, nous avons mesuré l'efficacité et la sélectivité de l'hydrolyse des liposomes par la hGIIA. Le dosage des acides gras libérés par l'hydrolyse enzymatique des phospholipides des 4 types de liposomes a montré que seuls les liposomes anioniques étaient substrats de la hGIIA, confirmant la sélectivité de l'enzyme pour les surfaces anioniques.

Ces expériences d'inhibition parasitaire et d'hydrolyse enzymatique ont été réalisées une fois chacune en duplicata. Dans la mesure où les liposomes, relativement instables, ne devaient pas être stockés trop longtemps, elles n'ont pas été répétées et nous avons procédé rapidement à l'injection aux souris.

L'expérience *in vivo* a mis en jeu 17 souris Tg- et 21 souris Tg+. Toutes les souris ont été inoculées à J0 par voie IP avec 1×10^6 GR infectés par *P. c. chabaudi* 864VD. Le rendement en souris de l'élevage ne nous a pas permis de disposer d'assez d'animaux pour tester un éventuel effet toxique des liposomes sur des souris saines, ni celui des liposomes zwitterioniques ne contenant pas de PUFA (liposomes 4).



Anionique avec PUFA
FIGURE 47 : TEST D'INHIBITION DE *P. FALCIPARUM* IN VITRO EN PRESENCE DE LIPOSOMES.

Une culture de *P. falciparum*, souche FcB1, en RPMI 8% plasma et GR humains à 0,19% de parasitémie a été cultivée sur 96h, en présence de (A) PBS (sans liposome) ou PBS + 100 nM de hGIIA ; (B) Liposomes 1 (20% de PC 16:0-18:1, 30% de PC 18:0-20:4, 10% de PG 18:0-18:1, 20% PG 18:0-20:4 et 20% de cholestérol = liposomes anioniques contenant des PUFA) ou liposomes 1 + 100 nM de hGIIA ; (C) Liposomes 2 (50% de PC 16:0-18:1, 30% de PG 18:0-18:1 et 20% de cholestérol = liposomes anioniques sans PUFA) ou liposomes 2 + 100 nM de hGIIA ; (D) Liposomes 3 (30% de PC 16:0-18:1, 50% de PC 18:0-20:4, et 20% de cholestérol = liposomes zwitterioniques contenant des PUFA) ; (E) Liposomes 4 (80% de PC 16:0-18:1 et 20% de cholestérol = liposomes zwitterioniques sans PUFA). Pour chaque culture, un frottis a été réalisé à 0h, 48h et 96h, puis les parasitémies ont été comptées.

La parasitémie a été suivie tous les jours sur frottis sanguin entre J10 et J16 p.i. puis tous les 2 jours jusqu'à J24 p.i.. Lorsque les souris présentaient une parasitémie avoisinant les 5%, elles ont reçu deux injections, à un jour d'intervalle, de 50µL de PBS ou de 50µL d'une solution de liposomes 1, liposomes 2 ou liposomes 3, à 5 mg/mL de phospholipides, par voie IP. Soit une concentration sanguine finale en phospholipides attendue chez les souris de 0,125 mg/mL (correspond à une injection de phospholipides aux souris de 12,5 mg/kg). Ne connaissant pas les effets d'une forte dose de PL, nous avons choisi de procéder à deux injections de 50µL plutôt qu'une seule de 100µL.

Les résultats n'ont montré aucune différence statistiquement significative entre les groupes de souris ayant reçu une injection de PBS ou une injection de liposomes (quels qu'ils soient).

Points forts – Discussion

Cette première approche de la compréhension du mécanisme antiparasitaire de la hGIIA a mis en évidence que l'enzyme a un effet anti-*Plasmodium* à une période « seuil » de l'infection : au-delà de la phase patente, entre J12 et J14 p.i.. En effet, les expériences d'injection de hGIIA sous forme recombinante ont montré qu'il était possible d'induire une baisse de parasitémie chez des souris WT infectées en injectant l'enzyme à l'approche du pic infectieux (J12, J13 p.i.), tandis que des injections plus précoces au début de la phase patente (J8, J9, J10 p.i.) ne modifient pas le profil infectieux. Un éventuel effet de la hGIIA, plus tardif, c'est-à-dire au-delà du pic parasitaire et touchant à la phase de résolution, n'a pas été testé. C'est pourquoi à ce stade, nous parlerons de période « seuil » en ce qui concerne l'effet antiparasitaire de l'enzyme.

La mise en évidence d'une période seuil pour l'activité antiparasitaire de la hGIIA exogène laissait penser qu'un (des) événement(s) tardif(s), lié(s) à l'infection, entrai(ent) en jeu dans le mécanisme d'action de l'enzyme. Par analogie avec des résultats précédemment obtenus *in vitro*, nous avons testé l'hypothèse où l'événement déclencheur de cette activité serait l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques. La mesure des TBARS n'a pas permis de tirer de conclusion claire quant à une éventuelle oxydation des lipides plasmatiques chez les souris parasitées. La dispersion importante des valeurs d'oxydation chez les souris naïves, ajoutée à la faible spécificité de la méthode des TBARS, peut expliquer ce résultat. L'augmentation statistiquement significative du niveau d'oxydation entre J8 et J14 p.i. chez les deux types de souris plaide cependant en faveur d'une augmentation de l'oxydation lipidique du plasma au cours de l'infection.

La mise en concordance d'une possible augmentation de l'oxydation lipidique et de l'augmentation de l'activité enzymatique circulante nous a conduits à proposer une stratégie susceptible à la fois de préciser le mécanisme d'action de la hGIIA chez les souris Tg+ infectées, et de fournir un outil thérapeutique potentiel pour lutter contre le paludisme humain. Des liposomes anioniques comportant des phospholipides estérifiés en position *sn-2* du glycérol par l'AA, ont ainsi été conçus pour être des substrats hydrolysables par la hGIIA, et pour être secondairement toxiques pour *Plasmodium*.

Les propriétés exigées des liposomes ont été testées *in vitro*. Nous avons montré qu'en présence des liposomes anioniques riches en AA (anioniques-AA), la hGIIA recombinante est clairement inhibitrice de la croissance de *P. falciparum* en culture, alors que dans les mêmes conditions, des liposomes de surface électriquement neutre enrichis en AA (zwitterioniques-AA), ou sans AA (zwitterioniques), ou des liposomes anioniques sans AA (anioniques), sont inefficaces. Ceci démontre que les particules synthétisées présentent les qualités requises pour les tests *in vivo*.

A ce jour, une seule expérience d'injection *in vivo* a été menée. Le profil infectieux des souris Tg+ n'a pas été modifié par l'injection des liposomes anioniques-AA, ni par les liposomes zwitterioniques-AA ou anioniques. Un résultat négatif est toujours difficile à interpréter. L'échec peut tenir à une hypothèse de départ erronée aussi bien qu'à de mauvaises conditions expérimentales : quantités injectées, mode d'administration choisi, moment choisi pour l'injection etc.

Concernant le mode d'administration, nous avons choisi ici par voie IP plutôt que par voie intraveineuse pour des raisons de commodités de manipulations des souris. En théorie, rien ne s'oppose à ce que des particules de 400 nm de diamètre rejoignent la circulation systémique à partir de la cavité péritonéale par les voies du drainage lymphatique. Cependant, nous ignorons si des interactions possibles des liposomes avec l'environnement peuvent se produire au cours de leur chemin vers la circulation systémique. Si l'expérience devait être répétée, il faudrait envisager de procéder à des injections par voie intraveineuse, pour que les liposomes se retrouvent directement dans le compartiment cible.

Concernant les quantités de liposomes injectées, nous avons opté pour 2 injections de 0,25 mg de phospholipides chacune, soit une concentration sanguine finale théorique de 0,125 mg/mL de phospholipides (en comptant un volume sanguin total de 2 mL par souris). Ces quantités ont été choisies en se référant aux techniques publiées d'injection de liposomes à des souris, et en tenant compte du fait que des injections de quantités élevées et/ou d'injections trop répétées peuvent induire des phénomènes de toxicité, en particulier au niveau du foie (Bozzuto and Molinari, 2015; Kermanizadeh et al., 2017; Knudsen et al., 2015).

Une stratégie alternative peut être envisagée : celle qui consiste à injecter des lipoprotéines de souris plutôt que des liposomes. Notre premier choix s'était porté sur les liposomes parce qu'ils ont une composition et une taille connue et calibrée, ce sont des produits « standardisés », alors que les lipoprotéines se présentent comme un ensemble hétérogène de particules de composition, de taille et de propriétés physico-chimiques différentes. Cependant, l'absence de résultat suite à l'injection des liposomes anioniques-AA à des souris Tg+ parasitées, nous pousse maintenant à tenter l'injection de lipoprotéines purifiées issues du plasma de souris Tg- infectées, en faisant l'hypothèse que ces particules seront similaires à celles que rencontre la hGIIA chez les souris Tg+ receveuses infectées.

Hypothèse 2 : Le profil cellulaire de la réponse immunitaire est modifié chez la souris Tg+ parasitée

Les propriétés pro-inflammatoires de la hGIIA ont été largement étudiées. Elles sont généralement attribuées à sa capacité à hydrolyser les phospholipides et à libérer des médiateurs lipidiques de l'inflammation, lysoPL et acides gras. La souris C57BL/6 Tg+ pour la hGIIA, utilisée ici, a un taux anormalement élevé de PNN et lymphocytes circulants (Laine et al., 2000a), ce qui a été attribué aux capacités des médiateurs lipidiques, en particulier les lysoPL, à recruter ces cellules depuis la moelle osseuse. La distribution des sous-populations leucocytaires et leurs rôles respectifs dans l'infection par *Plasmodium* chez ces souris n'ont jamais été étudiés. Dans l'hypothèse où une réponse cellulaire spécifique serait impliquée dans la baisse de parasitémie observée chez les souris Tg+ infectées, nous avons analysé systématiquement les paramètres cellulaires sanguins des souris Tg- et Tg+ infectées par *P. c. chabaudi*. Dans cette étude, les temps étudiés ont été : J0, J7, J12-13, et J15 p.i.. Comme nous l'avons vu dans la partie 1, le phénotype parasitaire diffère au moment du pic de crise entre les deux génotypes, c'est pourquoi nous avons fait le choix de concentrer nos points d'analyses sur cette période. L'étude a été menée en collaboration avec le Dr. Isabelle LAGRANGE, de l'ENVA, spécialiste en hématologie.

Numération de la formule sanguine (NFS) et analyse des frottis

La numération de la formule sanguine des souris infectées a été réalisée sur un automate de type Sysmex XT-2000iV paramétré pour le sang de souris. Une expérience d'infection incluant 23 souris Tg- et 24 souris Tg+ a été menée. Les souris ont été inoculées à J0 par voie IP avec 1×10^6 GR infectés par *P. c. chabaudi* 864VD. Des frottis de sang caudal ont été établis tous les 2-3 jours à la fois pour établir la parasitémie, et pour fournir au Dr. LAGRANGE un support d'analyses hématologiques complémentaires à la NFS automatisée. Les échantillons de sang pour l'analyse NFS ont été recueillis au niveau de la veine maxillaire par volume minimum de 150 μ L, sur EDTA. Les souris ont été sacrifiées après le prélèvement. Au jour zéro de l'infection, 6 souris Tg- et 6 souris Tg+ ont été prélevées. Après l'inoculation, certaines souris n'ont pas développé l'infection, ce qui n'a pas permis de maintenir des groupes de 6 individus à chaque temps de prélèvement. Les prélèvements ont eu lieu : à J7 p.i., début de la phase patente (3 souris Tg+ et 5 souris Tg-) ; à J12/13 p.i., relevé des fortes parasitémies (J12 (4 Tg+) / J13 (5 Tg-)) ; à J15 p.i. phase de décroissance parasitaire (3 Tg+ et 5 Tg-).

Les valeurs des différentes variables sanguines analysées sont présentées ici par catégorie : hémoglobine, érythrocytes/réticulocytes, leucocytes/ sous-populations leucocytaires, et plaquettes.

2.1. Mesure de l'anémie

L'anémie se mesure par la concentration en hémoglobine du sang. Les souris Tg+ naïves ont le même taux moyen d'hémoglobine sanguine que les souris Tg- ($n^s p > 0,05$, test Mann-Whitney). Le taux moyen chute fortement à J12-13 p.i. chez les deux types de souris, au moment des plus fortes parasitémies (parasitémie \approx

30%), signant une forte anémie (Figure 48). L'anémie est encore très marquée à J15 p.i. dans les deux cas, bien que la parasitémie soit en forte régression (\approx 5-10%).

Mesure de l'anémie au cours de l'infection

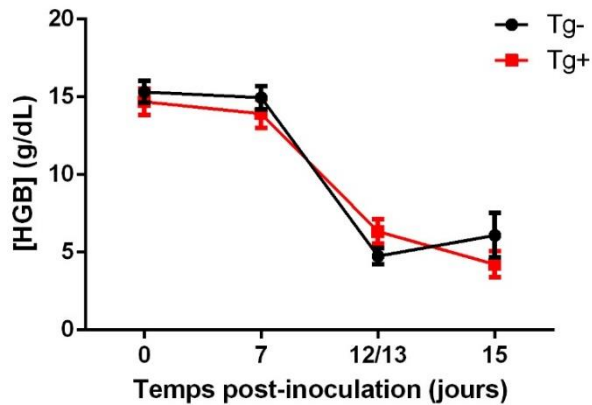


FIGURE 48 : MESURE DE L'ANEMIE AU COURS DE L'INFECTION CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTEES.

Une expérience totalisant 21 souris Tg- et 16 souris Tg+ a été réalisée (respectivement, J0 : 6 Tg-/ 6 Tg+ ; J7 p.i. : 5 Tg-/ 3 Tg+ ; J12 p.i. : 4 Tg+ ; J13 p.i. : 5 Tg- ; J15 p.i. : 5 Tg-/ 3 Tg+). Au premier jour de l'infection, les souris ont été inoculées avec 1×10^6 GR parasités par *P. c. chabaudi* 864VD par voie IP. A chaque temps, 150 μ L environ de sang ont été prélevés à la veine maxillaire. La mesure de l'hémoglobine (HGB) a été réalisée à l'aide de l'analyseur Sysmex XT-2000iV. (●) souris Tg- (■) souris Tg+. Les valeurs présentées sont celles des moyennes \pm SD.

2.2. Erythrocytes et réticulocytes

La numération des GR totaux par l'analyseur Sysmex a montré que les souris Tg+ naïves ont en moyenne un peu moins de GR/ μ L de sang que les Tg- naïves ($9,72 \times 10^6 \pm 0,54 \times 10^6$ (médiane $9,72 \times 10^6$) chez les Tg+ vs $10,67 \times 10^6 \pm 0,59 \times 10^6$ (médiane $10,51 \times 10^6$) chez les Tg-). La différence est significative (test Mann-Whitney, *p = 0,0152) (tableau en annexe 2 et Figure 49 [A], temps « 0 »). En accord avec ces données, l'hématocrite des souris Tg+ est plus faible que celui des souris Tg- (45,15% vs 47,27%, respectivement) (annexe 2 et Figure 49 [B], temps « 0 »). Il est apparu aussi que le volume globulaire moyen (VGM) des GR chez les souris Tg+ est un peu plus élevé que chez les souris Tg- (environ 5% de supplément de volume ; *p = 0,0103, test Mann-Whitney) (annexe 2).

L'évolution de l'hématocrite au cours de l'infection chez les deux types de souris est globalement comparable. Jusqu'à la phase patente de l'infection (J7 p.i.), la quantité de GR par volume de sang et l'hématocrite restent stables (Figure 49 [A]). Les hautes parasitémies, mesurées à J12-13 p.i., s'accompagnent d'une chute de l'hématocrite, qui diminue jusqu'aux alentours de 20% (Figure 49 [B]). En accord avec les données sur l'hémoglobine, l'hématocrite mesuré à J15 p.i. reste bas, bien que la parasitémie ait fortement baissé (Figure 49 [B]).

Chez les deux types de souris Tg+ et Tg-, on constate une augmentation progressive du VGM entre J7 et J12-13 p.i., et jusqu'à J15 p.i., avec une augmentation totale moyenne de 78% chez les souris Tg+, et de 63% chez les souris Tg- (annexe 2). Ce déplacement vers des formes plus volumineuses peut sans doute s'expliquer par la présence du parasite à l'intérieur des GR, mais aussi par l'augmentation du nombre de réticulocytes, de plus grand diamètre que le normocyte (\approx 8-9 μ m vs \approx 6-7 μ m). La relative stabilisation de l'hématocrite entre J12-13 et J15 p.i., alors que le nombre de GR/ μ L de sang continue à baisser (Figure 49 [A]), résulte sans doute de ce phénomène.

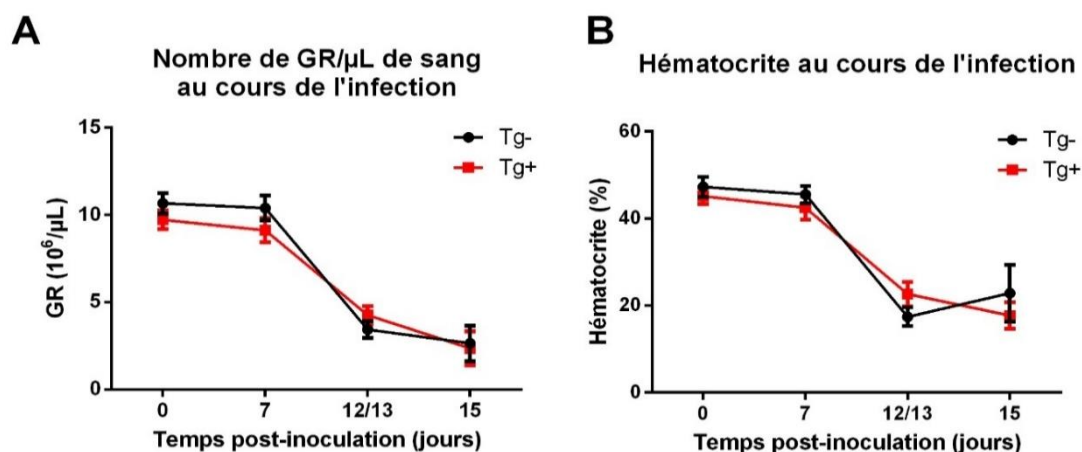


FIGURE 49 : VARIATION DU NOMBRE DE GLOBULES ROUGES ET DE L'HÉMATOCRITE AU COURS DE L'INFECTION.

Une expérience totalisant 21 souris Tg- et 19 souris Tg+ a été réalisée (respectivement, J0 : 6 Tg- / 6 Tg+ ; J7 p.i. : 5 Tg- / 5 Tg+ ; J12 p.i. : 4 Tg+ ; J13 p.i. : 5 Tg- ; J15 p.i. : 5 Tg- / 3 Tg+). Au premier jour de l'infection, les souris ont été inoculées avec 1×10^6 GR parasités par *P. c. chabaudi* 864VD par voie IP. A chaque temps, 150 μL environ de sang ont été prélevés à la veine maxillaire. Les mesures du nombre de GR/ μL de sang et de l'hématocrite ont été réalisées à l'aide de l'analyseur Sysmex XT-2000iV paramétré pour le sang de souris. (A) Concentration en GR/ μL de sang au cours de l'infection chez les souris Tg- (en noir) et les souris Tg+ (en rouge). (B) Hématocrite (%) au cours de l'infection chez les souris Tg- (●) et les souris Tg+ (■). Les valeurs présentées sont celles des moyennes \pm SD.

L'évolution de la concentration sanguine en réticulocytes au cours de l'infection est présentée dans le [tableau 11](#). Les réticulocytes sont les précurseurs du GR, leur présence dans le sang périphérique témoigne d'une activité érythropoïétique. Les réticulocytes issus de la moelle osseuse contiennent des acides nucléiques (ARN des ribosomes), qui vont être progressivement éliminés jusqu'à la maturation finale en normocyte, vide d'acides nucléiques. L'automate utilise un marqueur fluorescent spécifique des acides nucléiques pour distinguer les réticulocytes des normocytes, qui sont proches en taille. On distingue 3 sous-populations de réticulocytes selon leur niveau de maturation, correspondant au contenu en ARN : les réticulocytes de faible fluorescence (LFR), de moyenne fluorescence (MFR) et de haute fluorescence (HFR), les derniers étant les plus jeunes, nouvellement issus de la moelle osseuse.

TABEAU 11 : MESURE DE LA CONCENTRATION SANGUINE EN RETICULOCYTES AU COURS DE L'INFECTION.

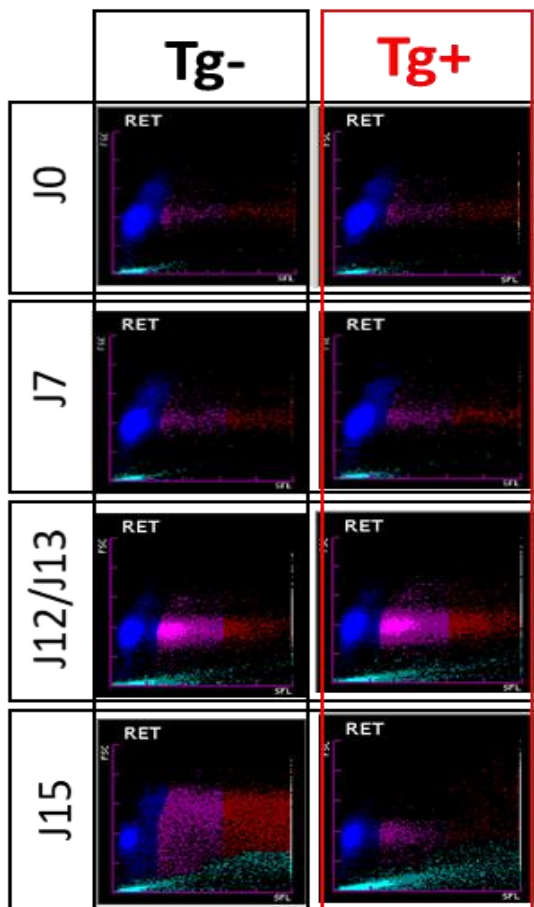
J post-inoculation	Tg-				Tg+			
	0	7	13	15	0	7	12	15
Nombre de souris analysées	6	5	5	4	6	3	4	1
Réticulocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	0,53 \pm 0,09 (0,51)	0,60 \pm 0,08 (0,59)	0,83 \pm 0,53 (0,71)	2,25 \pm 1,75 (1,80)	0,46 \pm 0,07 (0,45)	0,66 \pm 0,06 (0,65)	1,86 \pm 0,45 (1,73)	0,44
LFR (%)	47,9 \pm 2,4 (48,4)	49,6 \pm 2,0 (49,3)	84,1 \pm 7,9 (86,7)	30,9 \pm 4,1 (29,1)	45,6 \pm 3,1 (45,2)	50,9 \pm 2,5 (51,3)	84,7 \pm 2,1 (85,6)	63,1
MFR (%)	20,1 \pm 1,7 (20,7)	19,5 \pm 2,2 (19,5)	7,4 \pm 2,0 (7,3)	19,0 \pm 1,6 (18,9)	18,5 \pm 1,8 (18,6)	19,2 \pm 1,8 (19,5)	10,5 \pm 2,6 (9,25)	9,7
HFR (%)	32,0 \pm 3,4 (31,1)	30,9 \pm 1,9 (31,7)	8,4 \pm 6,6 (6,0)	50,9 \pm 1,7 (50,9)	35,8 \pm 2,8 (36,4)	29,9 \pm 0,9 (29,6)	4,8 \pm 0,6 (4,6)	27,2

Les valeurs sont représentées en : moyenne \pm SD (médiane)

LFR : low fluorescence reticulocytes ; MFR : median fluorescence reticulocytes ; HFR : high fluorescence reticulocytes.

Il est connu que le comptage des réticulocytes par les analyseurs automatisés est perturbé par la présence du parasite dans les GR. En effet, les GRi sont reconnus comme des réticulocytes, du fait que le fluorochrome qui se lie à l'ARN des réticulocytes va se fixer aussi à l'ADN/ARN du parasite. Dans une expérience contrôle, nous avons pu vérifier que les GRi par les stades anneaux de *P. falciparum* sont reconnus par l'automate comme des LFR. Les stades plus âgés, trophozoïte et schizonte, sont respectivement assimilés aux MFR et aux HFR. En accord avec ces données, nous avons pu observer que le nombre de LFR et la parasitémie à J12 p.i. pour l'ensemble des souris Tg- et Tg+ sont corrélés positivement (Pearson $r = 0,8695$; 95% CI : 0,4859 à 0,9722 ; ** $p = 0,0023$).

Les images fournies par l'analyseur Sysmex sur le canal RET (réticulocytes) sont présentées en [figure 50](#).



L'observation des graphiques RET montre que la population des érythrocytes chez les deux souris est normale jusqu'à J7 p.i.. Les érythrocytes augmentent en nombre à J12/13 p.i., spécialement en ce qui concerne les LFR parmi lesquels l'automate comptabilise les GRi par les formes anneaux de *Plasmodium*. A J15 p.i., l'image chez les Tg- est très perturbée, les tailles des cellules sont très hétérogènes et des éléments à haut niveau de fluorescence sont détectés. En particulier, des éléments de volume similaire à celui des plaquettes, ou un peu plus gros, apparaissent très fluorescents. Chez les Tg+, l'image est nettement moins perturbée, les différentes populations de normocytes, réticulocytes et plaquettes apparaissent distinctement. Des éléments reconnus comme des plaquettes de grande taille et fortement fluorescents sont présents, comme chez les Tg-.

FIGURE 50 : CANAL RET : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU SANG TOTAL DE SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR *P. C. CHABAUDI*.

Scattergramme RET : ordonnée FSC (forward scatter) ; indique le volume cellulaire ; abscisse SFL (side fluorescence) : indique la quantité d'ADN/ARN présente dans la cellule. Normocytes (bleu) ; réticulocytes LFR (rose), MFR (violet), HFR (rouge). Plaquettes (turquoise).

Au vu des résultats du tableau 11, on note que chez les souris Tg-, la concentration en réticulocytes augmente jusqu'à J15 p.i. (x3,5). Les pourcentages LFR/MFR/HFR ne montrent pas d'évolution entre J0 et J7. Les LFR sont majoritaires à J13 p.i., dû à la présence des GRi, puis à J15 p.i. les HFR augmentent et les LFR diminuent, ce qui peut s'expliquer par une régénération érythrocytaire parallèle à la baisse de parasitémie.

Chez les souris Tg+, l'augmentation de la concentration en réticulocytes du sang est importante à J12 p.i. (x3,8) et majoritairement due aux LFR, donc sans doute aux GR parasités. A J15 p.i., l'automate n'ayant donné de valeurs que pour 1 échantillon, il est impossible à ce stade de tirer de conclusions quant à l'évolution de la répartition des LFR/MFR/HFR chez les souris Tg+.

Analyse sur frottis

Les frottis réalisés au cours de l'expérience ont été analysés par le Dr. I. LAGRANGE. Le détail des comptages est présenté en annexe 3.

Chez les souris Tg-, à J0 et J7 p.i. la distribution des GR sur les frottis est normale. A J13 p.i. elle est diminuée, c'est-à-dire que la dispersion des GR sur le frottis est plus grande, signe d'anémie ; la polychromatophilie, liée à la présence de réticulocytes, est plus importante à J15 p.i. que sur les prélèvements précédents (J0, J7, J13 p.i.), ce qui va dans la sens de l'augmentation forte des réticulocytes mesurée par l'automate entre J13 et J15 p.i. ; des érythroblastes, érythrocytes immature nucléés, sont décelés chez quelques souris à J13 et J15 p.i.. On observe des corps de Howell-Jolly (HJ) (résidus d'ADN dans les érythrocytes) en plus grand nombre à J15 p.i., ce qui indique que la rate, qui normalement opère leur expulsion de la cellule, est très sollicitée, ce qui entraîne une dysfonction légère, habituelle dans les cas de forte anémie. La polychromatophilie, la présence d'érythroblastes et de corps de HJ rendent compte de la régénération active de la lignée érythroïétique mise en place suite à l'anémie.

Chez les souris Tg+, à J0 et J7 p.i. la distribution des érythrocytes est normale, puis elle apparaît diminuée à J12 et J15 p.i, en accord avec la baisse de la concentration en GR mesurée aux mêmes temps, cependant que la polychromatophilie augmente clairement à J12 p.i. et est maximum à J15 p.i.. Des érythroblastes et des corps de HJ sont nombreux à J15 p.i. alors qu'on en observe peu lors des prélèvements de sang précédents. Globalement, il semble que les souris Tg+ présentent une forte régénération sanguine, particulièrement visible à J15 p.i., avec des érythroblastes en plus grand nombre que chez les souris Tg-.

2.3. Leucocytes

Le nombre de leucocytes totaux par volume de sang indique que les souris Tg+ naïves ont 1,5 fois plus de leucocytes que leurs homologues Tg- ($10,15 \pm 1,56 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $6,08 \pm 1,81 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivement. Test Mann-Whitney, $**p = 0,0022$) (Annexe 4). Globalement, toutes les sous-populations leucocytaires sont augmentées : les PNN sont augmentés d'un facteur : x2,9, les lymphocytes : x1,35 ($**p = 0,0043$), les monocytes : x3,19 ($**p =$

0,0022), les PNE : $\times 3,14$ (**p = 0,0022) et les PNB : $\times 4$ (Figure 33). En conséquence, la distribution (%) des sous-populations leucocytaires se trouve modifiée chez les souris Tg+ (Figure 51).

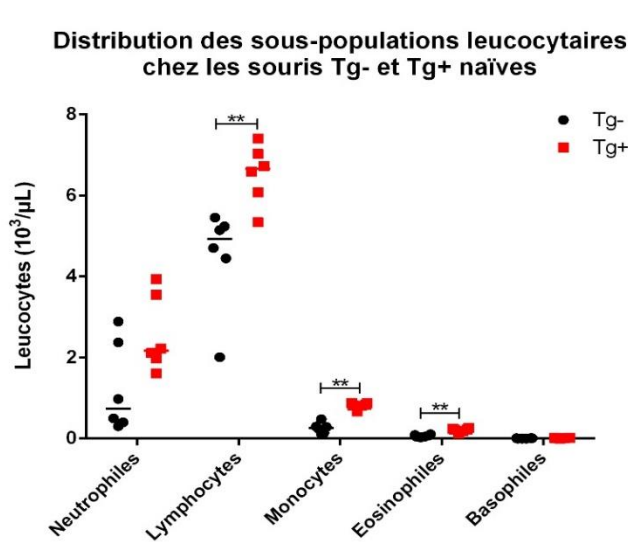


FIGURE 51 : CONCENTRATION SANGUINE DES LEUCOCYTES (SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES) CHEZ LES SOURIS Tg- ET Tg+ NAÏVES.

6 souris Tg- et 6 souris Tg+ naïves ont été prélevées de 150μL environ de sang à la veine maxillaire, sur tube EDTA, pour comptage NFS sur Sysmex 2000iV.

(●) souris Tg-, (■) souris Tg+. Barre horizontale = médiane des valeurs. Une différence significative entre souris Tg- et Tg+ est observée pour les lymphocytes **p = 0,0043 ; les monocytes **p = 0,0022 et pour les PNE **p = 0,0022 (test Mann-Whitney).

Bien que les souris Tg+ présentent clairement plus de PNN que les souris Tg- et que leur hyperneutrophilie ait été rapportée lors des premières études sur la lignée (Laine et al., 2000a; voir résultats partie 1), nous n'avons pas ici mis en évidence de différence statistiquement significative entre les deux types de souris. Ceci s'explique sans doute par la dispersion des valeurs dans les 2 effectifs. Un plus grand nombre de valeurs serait donc nécessaire pour affirmer une différence entre les deux génotypes.

2.3.1. Evolution de la concentration sanguine en leucocytes au cours de l'infection

Le comptage du nombre total de leucocytes dans le sang des souris au cours de l'infection montre une augmentation de la quantité de leucocytes chez les souris Tg+, d'un facteur x2 à J12 p.i. et x4 à J15 p.i. par rapport à J0 (Figure 52 [B]). Chez les souris Tg- infectées, l'augmentation du nombre de leucocytes n'est visible qu'à J15 p.i. et est de plus faible ampleur (x1.6) (Figure 52 [A]). Ces résultats pourraient indiquer que la présence du parasite stimule la production de leucocytes chez les souris Tg+ plus précocement et plus fortement que chez les souris Tg-. Cependant, à ce stade de l'étude, qui devra être répétée, les faibles effectifs en souris Tg+ infectées ne permettent pas de conclure à une différence entre souris Tg- et Tg+.

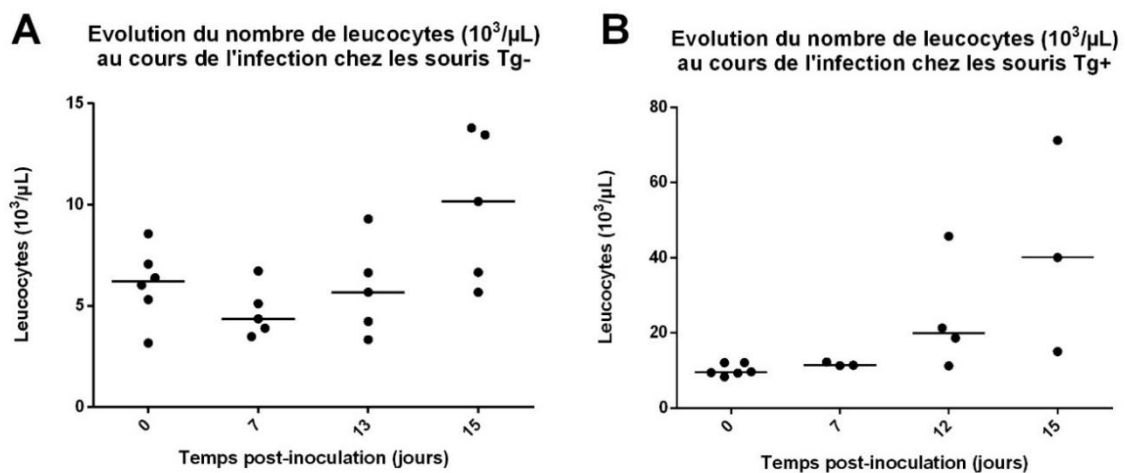


FIGURE 52 : EVOLUTION DU NOMBRE DE LEUCOCYTES ($10^3/\mu\text{L}$ DE SANG) AU COURS DE L'INFECTION.

(A) chez les souris Tg-. (B) chez les souris Tg+. Chaque résultat a été obtenu à partir de l'analyse de $150\mu\text{L}$ de sang prélevé à partir de la veine maxillaire et récupéré sur EDTA, aux jours 0, 7, 12 ou 13 et 15 de l'infection. La barre horizontale correspond à la médiane.

2.3.2. Distribution des sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux

La représentation graphique DIFF de la répartition des sous-populations leucocytaires, basée sur le graphique de référence pour la souris éditée par la société Sysmex, montre chez les souris naïves des deux types une répartition conforme des nuages de points (voir J0 Figure 53).

En revanche, la comparaison des images des souris Tg- et Tg+ parasitées fait apparaître dès le début de la phase patente (à J7 p.i.) une anomalie chez les souris Tg+. En effet, chez 2 souris Tg+ sur 3, l'analyseur n'a pas pu discriminer les lymphocytes des neutrophiles (il n'identifie plus les cellules). Le phénomène s'est généralisé et amplifié à J12 p.i. (4/4 souris) et maintenu à J15 p.i. (3/3 souris). Par comparaison, aucune des souris Tg- parasitées n'a présenté le même phénomène, ni à J7 p.i. (5/5 souris), ni à J13 p.i. (5/5 souris). A J15 p.i., 1 seule des 5 souris Tg- parasitées a présenté un nuage non-identifié au niveau des neutrophiles, qui pour autant est resté distinct de celui des lymphocytes.

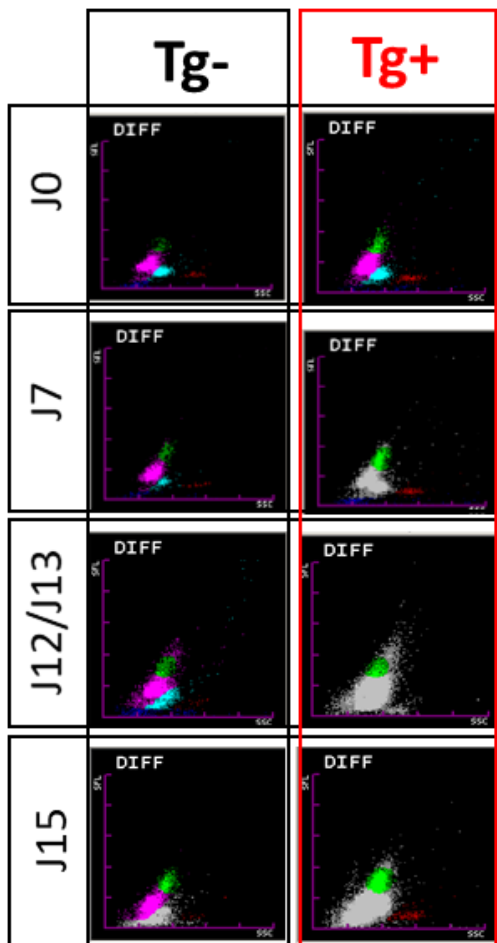


FIGURE 53 : CANAL DIFF : ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU SANG TOTAL DE SOURIS Tg- ET Tg+ INFECTÉES PAR *P. C. CHABAUDI*.

Scattergramme DIFF : ordonnée SFL (side fluorescence) : indique la quantité d'ADN/ARN présente dans la cellule ; abscisse SSC (side scatter) : informe sur le contenu cellulaire (noyau, granules...); Monocytes (en vert); lymphocytes (en rose), PNN (en bleu), PNE (en rouge). Cellules non identifiées (en gris).

Chez les souris Tg-, l'augmentation des leucocytes a pu être attribuée prioritairement aux lymphocytes, qui forment la sous-population majoritaire des leucocytes, et dont la quantité est augmentée d'un facteur $\approx x2$ à J15 p.i.. Chez les Tg+, du fait de l'impossibilité à distinguer les sous-populations de leucocytes entre elles à partir de J12 p.i., il n'a pas été possible par ce moyen d'identifier la ou les sous-population(s) augmentée(s). Cependant, l'analyse des frottis ayant permis de mesurer la distribution des sous-populations au sein des leucocytes (Tableau 12), la quantité de cellules appartenant à chaque sous-population a été calculée (voir valeurs en bleu dans tableau 12). Ceci a permis de voir que les PNN étaient les plus nombreux à J15 p.i., avec une augmentation de la population d'un facteur $x8$ par rapport au jour de l'inoculation. On notera qu'à J15 p.i., il y a à peu près autant de PNN que de lymphocytes dans le sang des souris Tg+, et que les PNN sont 15 fois plus nombreux et les lymphocytes 2 fois plus nombreux que chez les souris Tg- infectées.

TABLEAU 12 : COMPTAGES DES LEUCOCYTES TOTAUX ET DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES.

LEUCOCYTES TOTAUX (10 ³ /μL)									
	TG-					TG+			
J post-inoculation	0	7	13	15		0	7	12	15
Nb de souris analysées	6	5	5	5		6	3	4	3
WBC total	6,08 ± 1,81 (6,2)	4,71 ± 1,28 (4,36)	5,83 ± 2,32 (5,67)	9,94 ± 3,75 (10,15)		10,15 ± 1,56 (9,56)	11,63 ± 0,52 (11,37)	24,23 ± 14,95 (19,97)	42,09 ± 28,15 (40,05)
SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES (10 ³ /μL)									
J post-inoculation	0	7	13	15		0	7	12	15
Nb de souris analysées	6	5	5 (5)	3 (3)		6	3 (3)	4	3 (3)
Neutrophiles	1,24 ± 1,11 (0,74)	0,41 ± 0,12 (0,40)	1,15 ± 0,66 (1,38) 1,28	1,33 ± 0,68 (1,66) 1,39		2,57 ± 0,94 (2,17)	6,39	15,38	21,46
Lymphocytes	4,50 ± 1,28 (4,93)	3,85 ± 1,21 (3,53)	4,16 ± 1,74 (3,23) 4,31	8,83 ± 3,65 (10,51) 8,15		6,53 ± 0,73 (6,66)	3,48	7,14	19,36
Monocytes	0,26 ± 0,13 (0,26)	0,36 ± 0,07 (0,39)	0,46 ± 0,21 (0,56) 0,23	0,71 ± 0,30 (0,71) 0,39		0,82 ± 0,08 (0,83)	1,57 ± 0,21 (1,64) 1,28	1,45	1,26
Eosinophiles	0,07 ± 0,03 (0,06)	0,08 ± 0,04 (0,06)	0,03 ± 0,01 (0,03) 0	0,05 ± 0,04 (0,05) 0		0,22 ± 0,05 (0,23)	0,28 ± 0,06 (0,30) 0,46	N=2 0,11 ± 0,06 (0,11) 0,24	0,42
Basophiles	0,01 ± 0,01 (0,005)	0,01 ± 0,01 (0,01)	0,02 ± 0,02 (0,02) 0	N=5 0,07 ± 0,05 (0,05) 0		0,01 ± 0,01 (0,02)	0,04 ± 0,01 (0,04) 0	N=3 0,06 ± 0,03 (0,07) 0	0,46 ± 0,61 (0,17) 0

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (médiane).

Les valeurs en noir sont celles obtenues à partir du comptage Sysmex.

Les valeurs en bleu sont les médianes des valeurs calculées à partir de la distribution des sous-populations leucocytaires (en %), établie sur frottis.

Les anomalies relevées lors de l'analyse de sang par le Sysmex nous ont conduits à rechercher la présence sur frottis de cellules atypiques, susceptibles de ne pas être reconnues par l'analyseur. En particulier, les leucocytes présentant des modifications morphologiques caractéristiques d'une activation cellulaire ont été recherchés. Les résultats sont rapportés dans le [tableau 13](#).

Chez les souris Tg+, la présence d'un pourcentage important de lymphocytes réactionnels dans la population de lymphocytes est notée dès J7 p.i. (médiane : 11%) ([Figure 54 \[A\]](#)). Leur proportion augmente à J12 (médiane : 19,5%) et diminue à J15 p.i.. On note aussi la présence à J12 et J15 p.i. de monocytes activés ([Figure 54 \[B\]](#)). Quelques PNN hyper-segmentés sont vus à J15 p.i, en revanche aucun PNN hypo-segmenté n'est jamais décelé.

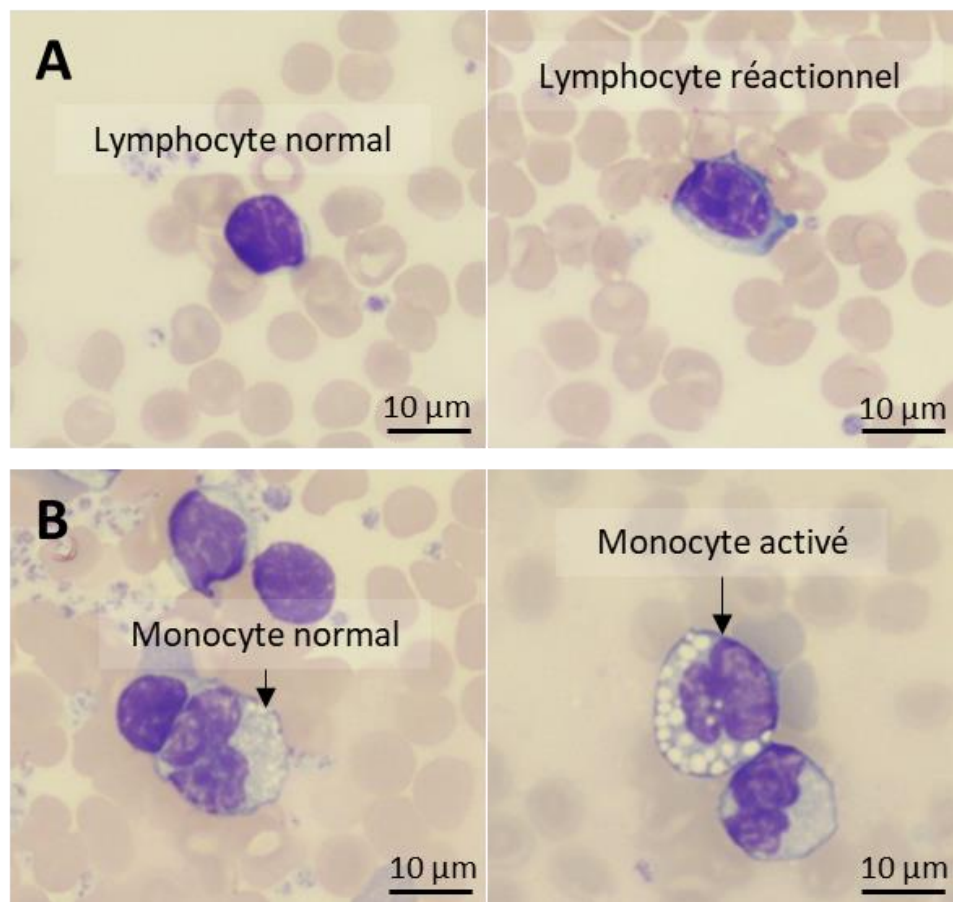


FIGURE 54 : ASPECT DES LYMPHOCYTES ET MONOCYTES NORMAUX ET ACTIVES SUR FROTTIS SANGUIN.

(A) A gauche : lymphocyte normal circulant, caractérisé par une chromatine dense ne présentant quasiment pas de cytoplasme visible. A droite : lymphocyte réactionnel circulant, caractérisé par une taille augmentée, plus de cytoplasme (basophile) et une chromatine plus fine. (B) A gauche : la flèche noire indique un monocyte normal circulant, caractérisé par un noyau en forme de « haricot » et un cytoplasme homogène. A droite : la flèche noire indique un monocyte activé, caractérisé par un cytoplasme rempli de vacuoles.

Les souris Tg- montrent aussi une augmentation de lymphocytes réactionnels, mais plus tardive à J15 p.i. et qui reste à des niveaux faibles (médiane = 0,5%) comparé aux souris Tg+. Aucun monocyte activé n'a été identifié sur les frottis de sang Tg-, à aucun moment de l'infection. De même, aucun PNN hyper-segmenté ou hypo-segmenté n'a été décelé.

TABEAU 13 : RECHERCHE DE LEUCOCYTES ATYPIQUES SUR FROTTIS.

J post-inoculation	TG+ J0							TG+ J7					TG+ J12					TG+ J15							
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5		m	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	m	1.11	1.12	1.13	1.14		m	1.15	1.16	1.17			m
N° souris																									
Parasitémie (%)	0	0	0	0	0			0	0,71	0	0,27	0,81		39,1	31,1	40,1	24,7			9,5	11,3	8,0			
L+ (%)	0,09	0,08	0,19	0,04	0,07		0,09 (0,08)	11	0,09	11	10	25	11,4 (11,0)	45	26	7	13		22,75 (19,5)	0,3	0	10			3,43 (0,3)
M+	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0		+++	+	+	+			+++	++	++			
Neutrophiles segmentation	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N		N	N	N	N			H	H	N			
J post-inoculation	TG- J0							TG- J7					TG- J13					TG- J15							
	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	m	2.7	2.8	2.9	2.10	2.11	m	2.12	2.13	2.14	2.15	2.16	m	2.17	2.18	2.19	2.20	2.21	
N° souris																									
Parasitémie (%)	0	0	0	0	0	0		0,01	0,33	0,25	0,20	0,05		13,5	4,1	19,3	34,8	14,6		18,1	7,1	6,1	2,7	1,4	
L+ (%)	0	0,09	0,09	0,13	0,07	0,2	0,09 (0,09)	0,01	0,01	0,06	0,09	0,03	0,04 (0,03)	0	3	3	0,01	0	1,2 (0,01)	0,4	0,5	0,7	0,5	0,4	0,5 (0,5)
M+	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
Neutrophiles segmentation	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N		N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	

m = moyenne (médiane)

L+ = lymphocytes réactionnels ou activés (signe d'une stimulation antigénique des lymphocytes). Valeurs en % de la population totale de lymphocytes.

M+ = monocytes activés. Valeurs en gradient de densité de + à ++++.

Neutrophiles (segmentation des neutrophiles) : H = noyau hyper-segmenté, N = noyau hypo-segmenté. Un neutrophile est considéré comme hyper-segmenté lorsque le nombre de segments dépasse cinq. L'hyper-segmentation est un indice de sénescence. Les fonctions de ces neutrophiles ne sont pas altérées. Un noyau hypo-segmenté est observé chez les neutrophiles immatures. Le passage de neutrophiles hypo-segmentés dans le sang a lieu dans les cas d'inflammation, où la moelle osseuse est fortement sollicitée.

Le bilan des profils d'activation leucocytaire chez les souris Tg- et Tg+ est donc le suivant :

- (1) On n'observe pas de PNN hypo-segmentés chez les souris Tg- ou Tg+ infectées, ce qui suggère que le contexte infectieux chez les deux types de souris n'est pas inflammatoire. Des PNN hyper-segmentés sont observés à J15 p.i. sur les frottis sanguins des souris Tg+ infectées, mais pas des souris Tg- infectées.
- (2) Une proportion importante de lymphocytes réactionnels est observée, dès J7 p.i., sur les frottis des souris Tg+ comparés à ceux des souris Tg-. La proportion augmente à J12 p.i. au moment des fortes parasitémies et baisse à J15 p.i. après le pic.
- (3) Chez les souris Tg+, des monocytes activés, absents des frottis J0 et J7 p.i., apparaissent à J12 p.i. et sont toujours visibles à J15 p.i.. En revanche, aucun monocyte activé n'est décelé sur les frottis sanguins des souris Tg- de J0 à J15 p.i.

2.4. Numération des plaquettes

Le sang des souris Tg- et Tg+ naïves contient un nombre statistiquement équivalent de plaquettes ($1494 \pm 186 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (Tg-) et $1694 \pm 234 \cdot 10^3$ (Tg+), $n^s p = 0,1320$, test Mann-Whitney) ([Tableau 6](#)). Leur volume moyen est identique (médiane à 7,2 fL) chez les 2 types de souris. La proportion de plaquettes de grande taille (P-LCR) ainsi que l'indice d'anisocytose (distribution des volumes des plaquettes, IDP) chez les souris Tg+ sont identiques à ceux des souris Tg-. Ces données indiquent que la population plaquettaire est normale chez les souris Tg+.

Après l'inoculation des parasites, l'analyse des variables plaquettaires montre qu'elles restent stables jusqu'au début de la phase patente (J7 p.i.) chez les deux types de souris. Au moment du pic infectieux, à J12-13 p.i., on observe une chute d'environ 50% du nombre de plaquettes, chez les Tg- comme chez les Tg+. Cette chute s'accompagne d'une augmentation très significative du volume moyen des plaquettes, de la proportion de plaquettes de grande taille et de l'anisocytose. L'absence de sphérocytes et de schizocytes sur les frottis laisse penser qu'il ne s'agit pas d'une lecture erronée de l'automate (confusion avec d'autres éléments de volume comparable).

La thrombopénie pourrait résulter d'une activation artéfactuelle des plaquettes lors du prélèvement, conduisant à la formation d'agrégats plaquettaires non reconnus comme plaquettes par l'analyseur. Des agrégats plaquettaires ont été vus sur la plupart des frottis., indépendamment du temps de prélèvement ou du niveau de parasitémie, ce qui laisse penser que la thrombopénie mesurée spécifiquement à J12-13 p.i. résulterait bien d'une diminution du nombre de plaquettes, et non d'un engagement des plaquettes dans des agrégats. Cependant, la quantification des agrégats plaquettaires étant impossible à partir de frottis, nous ne pouvons éliminer l'hypothèse qu'une activation forte des plaquettes ait conduit à une formation accrue d'agrégats à J12 p.i., entraînant une baisse apparente du nombre de plaquettes individualisées.

Trois jours après (à J15 p.i.), lors de la phase de décroissance parasitaire, le volume et la distribution des tailles des plaquettes sont sensiblement les mêmes qu'au pic infectieux chez les deux types de souris. L'augmentation du nombre de plaquettes de grande taille est un indice de la régénération des plaquettes. On constate aussi que la baisse des plaquettes se maintient chez les souris Tg-, tandis que leur nombre augmente chez les souris Tg+ et retrouve sa valeur initiale (Tableau 14). Bien que le faible effectif des souris Tg+ infectées analysées à J15 p.i. (n = 3) ne permette pas de valider statistiquement la différence de récupération entre souris Tg- et Tg+, il faut noter que toutes les souris du lot Tg+ (3/3) présentent un nombre de plaquettes > 1000 x 10³/μL à J15 p.i., avec 2 souris à plus de 2000 x 10³/μL, alors que chez les Tg-, seulement 2 souris sur 5 atteignaient les 1000 x 10³/μL plaquettes. La restauration plus rapide du nombre de plaquettes chez les Tg+ pourrait être attribuée soit à une production accrue, soit à une diminution du nombre d'agrégats potentiels. Ceci reste à confirmer.

TABLEAU 14 : ANALYSE DES PLAQUETTES AU COURS DE L'INFECTION PAR NFS.

J post-inoculation	TG-				TG+			
	0	7	13	15	0	7	12	15
Nb de souris analysées	6	5	5	5	6	3	3	3
PLT total (10 ³ /μL)	1494 ± 186 (1484)	1491 ± 209 (1543)	700 ± 288 (720)	854 ± 483 (733)	1694 ± 234 (1607)	1432 ± 232 (1554)	869 ± 215 (883)	1789 ± 671 (2119)
VPM (fL)	7,13 ± 0,36 (7,2)	7,04 ± 0,23 (7,0)	9,34 ± 0,61 (9,2)	8,98 ± 0,46 (9,15)	7,27 ± 0,46 (7,2)	7,00 ± 0,36 (6,9)	9,03 ± 0,47 (9,2)	9,33 ± 0,21 (9,4)
P-LCR (%)	7,00 ± 1,81 (7,35)	6,72 ± 0,94 (6,80)	22,94 ± 3,94 (21,30)	19,45 ± 3,06 (20,55)	8,13 ± 2,62 (7,75)	6,57 ± 1,81 (6,3)	20,70 ± 3,12 (21,7)	21,73 ± 2,01 (22,00)
IDP (PDW) (%)	8,12 ± 0,50 (8,1)	7,98 ± 0,43 (7,9)	12,82 ± 1,44 (12,7)	10,75 ± 0,60 (10,9)	8,15 ± 0,61 (8,1)	7,90 ± 0,56 (7,8)	11,17 ± 1,45 (11,9)	11,27 ± 0,90 (11,2)

Les valeurs sont celles de la moyenne ± SD (médiane)

VPM = volume plaquettaire moyen

P-LCR (platelet large cell ratio) (en %) = pourcentage de plaquettes de volume > 12 fL et < 30 fL (soit, de volume supérieur à la norme)

IDP (indice de distribution plaquettaire) ou PDW (platelet distribution width) (en %) = largeur de la courbe de distribution à 20% de sa hauteur.

Points forts – Discussion

La réalisation des hématogrammes des souris Tg+ saines (naïves J0) et infectées a permis de mettre en évidence que :

Souris saines

- (1) Les souris Tg+ saines ont un hémocrite légèrement plus bas que les souris Tg- (45,15% vs 47,27%, respectivement), en accord avec une concentration en GR plus basse ($9,72 \times 10^6$ vs $10,51 \times 10^6$, respectivement). Pour autant, le taux d'hémoglobine est le même chez les deux types de souris, ce qui se traduit par des GR légèrement plus gros (46,80 fL au lieu de 44,25 fL) et plus chargés en hémoglobine (15,2 pg au lieu de 14,3 pg) chez les souris Tg+.
- (2) Le nombre de leucocytes par μL de sang est beaucoup plus élevé chez les souris Tg+ que chez les souris WT (Tg-) ($10,15 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $6,08 \times 10^3/\mu\text{L}$). Ceci avait déjà été relevé lors des premières études sur la lignée transgénique, par la numération des PNN et des lymphocytes (Laine et al., 2000a). Nous montrons ici que l'augmentation concerne aussi les monocytes et les PNE.
- (3) La numération des plaquettes indique que les souris Tg+ ont le même nombre de plaquettes que les souris Tg-, confirmant ce qui avait été rapporté par (Laine et al., 2000a). L'analyse des indices plaquettaires par l'automate Sysmex (plaquettocrite, volume plaquettaire moyen et indice de distribution de taille) montre de plus que la population plaquettaire est normale chez les souris Tg+.

L'image globale des cellules sanguines chez les souris Tg+ est donc celle d'une production accrue de leucocytes, d'une production diminuée d'érythrocytes, et d'une production normale en plaquettes. Ceci permet de supposer que la hGIIA, sécrétée et circulant de manière constitutive chez ces souris, est un élément perturbateur de l'hématopoïèse. Dans la mesure où leur formule sanguine est modifiée, aussi bien en termes d'érythrocytes, qui sont les cellules hôtes de *Plasmodium*, que de leucocytes, qui sont acteurs de la réponse immunitaire au parasite, il paraissait probable que la réponse cellulaire au cours de l'infection parasitaire puisse être différente de celle des souris Tg-.

Souris infectées par *P. c. chabaudi* 864VD

- (1) L'analyse des données recueillies sur l'hémoglobine, les érythrocytes et les réticulocytes, montre que la multiplication du parasite dans le compartiment sanguin s'accompagne d'une diminution du nombre de GR et d'une anémie, maximums aux plus fortes parasitémies. Les signes d'une régénération active des

érythrocytes due à l'anémie sont visibles sur les frottis sanguins à J15 p.i.. Le phénomène est similaire chez les souris Tg+ et Tg-.

- (2) Une chute d'environ 50% du nombre initial de plaquettes est observée chez les souris des deux types à J12-13 p.i., au moment des fortes parasitémiés. A J15 p.i., la baisse de parasitémie s'accompagne chez les souris Tg+ d'un retour à la concentration initiale en plaquettes, alors que la thrombocytopénie se maintient chez les souris Tg-. Dans les deux cas, au même moment, la proportion de plaquettes néo-formées est la même (indice P-LCR, pourcentage de plaquettes de grande taille), ce qui suggère que la production à partir de la moelle osseuse ou des organes hématopoïétiques secondaires (rate, foie) a lieu chez les deux souris, mais pourrait être ralentie chez les souris Tg-. Toutefois, l'absence de données sur les phénomènes d'agrégation plaquettaire est susceptible de fausser l'interprétation des résultats.
- (3) Une augmentation des leucocytes totaux est observée à J15 p.i., en accord avec les données précédentes sur le suivi leucocytaire de l'infection, qui a montré que le maximum est atteint peu après le pic de parasitémie. Le comptage absolu des sous-populations leucocytaires montre que chez les souris Tg-, les lymphocytes, les PNN et les monocytes augmentent globalement chacun d'un facteur x1,5 à 2, alors que chez les souris Tg+, les PNN augmentent d'un facteur x10, les lymphocytes d'un facteur x3, les monocytes d'un facteur x1,5 et les PNE d'un facteur x2. On voit donc que la sollicitation des PNN est majeure chez les souris Tg+ infectées. Pour autant, aucun PNN hypo-segmenté, caractéristique d'une différenciation récente, n'a été détecté sur les frottis des souris à J12 ou J15 p.i., ce qui semble indiquer que l'augmentation du pool circulant de PNN n'est pas due à une production accrue de ces cellules à partir de la moelle osseuse (ou de la rate). Il est peu probable aussi que cette augmentation résulte du « décollement » du pool de PNN marginés (collés à la paroi de l'endothélium vasculaire). En effet, le pool marginal concerne environ 50% de la population des PNN du compartiment sanguin chez la souris (Doyle et al., 1997), donc sa libération ne conduirait qu'à doubler le nombre de PNN. Ceci amène à penser que l'augmentation massive des PNN dans le sang pourrait provenir d'un défaut d'élimination de ces cellules, dont la $\frac{1}{2}$ vie chez la souris est normalement de 7,4 heures (Basu et al., 2002). Cette possibilité est appuyée par le fait que des PNN hyper-segmentés ont été vus sur les frottis à J15 p.i. des souris Tg+ infectées, mais pas sur les frottis des souris Tg- infectées au même temps. L'hyper-segmentation est une anomalie morphologique du PNN, qui correspond au vieillissement de la cellule par le prolongement de son temps de transit dans le sang. Des cas de neutrophilie prolongée ont été associés aux infections chroniques. Il est important de noter que les PNN âgés restent fonctionnels.

Deux autres éléments importants ressortent de l'observation des frottis :

- (1) Une forte augmentation de la proportion de lymphocytes activés (réactionnels), liée à l'infection, est observée sur les frottis des souris Tg+. A J0, le sang des souris Tg+ contient la même proportion de lymphocytes activés que le sang des souris Tg-, en moyenne 0,09%. A J7 p.i., cette proportion est de 11,4%

et à J12 p.i., aux fortes parasitémies, elle est de 22,7%. A J15 p.i., en même temps que décroît la parasitémie, elle baisse à 3,4%. Chez les souris Tg-, on constate aussi une augmentation de la proportion de lymphocytes activés, mais plus tardive, elle n'apparaît qu'à J13 p.i., et de beaucoup plus faible ampleur, puisque la proportion est de 1,2% à J13 p.i. et de 0,5% à J15 p.i.. Les lymphocytes stimulés ou activés (grands lymphocytes hyperbasophiles) sont généralement des LT régulateurs, rarement des LT cytotoxiques, qui réagissent au contact de cellules infectées ou anormales. Ils sont inconstamment détectés par les automates : ils se localisent sur le scattergramme leucocytaire comme un nuage étalé plus ou moins proche de celui des lymphocytes et des monocytes (Zandecki and Ugo, 2012), et ils pourraient donc être responsables des anomalies du scattergramme DIFF chez les souris Tg+ infectées.

- (2) Des monocytes activés sont aussi repérés sur les frottis des souris Tg+ infectées, mais plus tardivement que les lymphocytes, puisqu'on les détecte à J12 et J15 p.i., mais pas à J7 p.i. ni à J0. Contrairement aux lymphocytes activés, aucun monocyte activé n'est observé sur les frottis des souris Tg- (quel que soit le temps considéré).

L'ensemble de ces éléments indique que la réponse immunitaire vis-à-vis de *Plasmodium* est fortement perturbée chez la souris Tg+ pour la hGIIA. Il est intéressant de constater que les monocytes activés sont décelés au moment du pic de parasitémie, car dans la mesure où les monocytes sont des cellules phagocytaires, ils pourraient participer à la destruction des GRi et/ou des mérozoïtes.

Le lien entre les phénomènes leucocytaires observés et la hGIIA reste à élucider. Nous avons montré que l'activité enzymatique du plasma sanguin augmente en même temps que la parasitémie chez les Tg+. Dans le même intervalle de temps, on constate une augmentation des PNN et une apparition des monocytes activés. C'est aussi à cette période de l'infection que la hGIIA recombinante injectée à des souris WT infectées est active contre le parasite. Il serait important de vérifier si l'injection de hGIIA exogène conduit aux mêmes effets sur les leucocytes que ceux qui ont lieu chez la souris qui exprime constitutivement l'enzyme.

IV. DISCUSSION GENERALE

1. Discussion du modèle expérimental choisi

Le développement de l'infection chez les modèles murins du paludisme dépend à la fois de la souche palustre, de l'espèce murine, de la voie d'inoculation et de la quantité de parasites inoculée. Par exemple, dans l'infection par *P. c. chabaudi* AS chez la souris C57BL/6, la phase patente débute dès le 3^{ème} jour post-inoculation lorsque l'inoculation est réalisée à partir d'un passage préalable dans une souris et que 1×10^5 GRi sont administrés par voie IP (Achtman et al., 2003; Brugat et al., 2014). Le pic de crise est atteint à J9-J10 p.i. avec une parasitémie maximale allant jusqu'à 30%. Un léger pic de recrudescence peut être observé entre les jours 20 et 25 de l'infection avec une parasitémie moyenne de 1%. Dans le cas de l'infection par *P. c. chabaudi* 864VD chez la souris BALB/c lors d'une inoculation par voie IP à partir d'un stock congelé de GRi, les premiers parasites s'observent à partir du 5^{ème} jour post-inoculation. Le pic de crise arrive entre le 12^{ème} et le 13^{ème} jour de l'infection avec une parasitémie pouvant aller jusqu'à 35%. Aucun pic de recrudescence n'est observé (Karadjian et al., 2014). Enfin, lors d'une infection par *P. c. chabaudi* 864VD chez la souris Swiss OF1 (injection par voie IP de 1×10^6 GRi provenant d'une souris parasitée), le pic de parasitémie est atteint vers le jour 16 p.i. avec une parasitémie pouvant aller jusqu'à 44%. Une recrudescence peut être observée entre les jours 24 et 48 de l'infection (Vuong et al., 1999). Dans cette étude, nous avons utilisé la souche 864VD et la souris C57BL/6, le profil de l'infection n'avait encore jamais été établi dans ce modèle. Nous avons pu observer, suite à l'inoculation par voie IP de 1×10^6 GRi issus d'un stock congelé, que les premiers parasites apparaissent sur frottis à partir du 8^{ème} jour p.i. puis le pic de crise survient vers le 14^{ème} jour de l'infection, avec une parasitémie maximale pouvant aller jusqu'à 45%. Une recrudescence, non systématique, peut s'observer vers J20 p.i..

Les résultats histologiques obtenus à partir de la souris C57BL/6 WT (Tg-) infectée par *P. c. chabaudi* 864VD ont montré quelques différences avec les modèles connus de la littérature, notamment au niveau des poumons et des reins. En effet, dans l'infection des souris C57BL/6 par *P. c. chabaudi* clone AS, des cas d'inflammation ont été décrits, dus à l'hémozoïne dans les cellules phagocytaires pulmonaires (Deroost et al., 2013), ainsi que des œdèmes et une augmentation de la cellularité des parois alvéolaires (Brugat et al., 2014). Dans le rein, de la dilatation tubulaire est observée au cours de l'infection (Brugat et al., 2014). Lors de l'infection de la souris Swiss OF1 par *P. c. chabaudi* 864VD, les reins présentent des lésions légères dès la phase exponentielle de développement des parasites et des lésions sévères tardives (entre les 23^{ème} et 116^{ème} jours de l'infection) (Karadjian et al., 2014; Vuong et al., 1999). Dans notre modèle expérimental, les poumons des souris infectées ne présentent que rarement des anomalies tissulaires, seulement dans un cas sur 6 souris, statistiquement non représentatif. D'autre part, les lésions observées dans les reins sont minimes, consistant en de rares infiltrats inflammatoires au 21^{ème} jour de l'infection. En revanche, les lésions observées dans la rate des animaux infectés coïncident avec celles déjà décrites (Achtman et al., 2003; Cadman et al., 2008; Del Portillo et al., 2012), et il en est de même pour le foie (Deroost et al., 2014; Dumont et al., 1988; Scaccabarozzi et al., 2018). Par ailleurs, bien que l'espèce *P. chabaudi* ne cause pas de paludisme cérébral chez les souris C57BL/6, il est à signaler que la souche 864VD peut induire des lésions dans le cerveau, ainsi que dans le cœur, chez la souris Swiss OF1 (Vuong et al., 1999). Le cœur et le cerveau des souris utilisées dans notre étude ont été prélevés en

même temps que les autres organes, et sont en attente pour analyse. Un tableau histologique plus complet de l'infection pourra être réalisé à partir de ces échantillons.

Notre choix s'est porté sur la souris C57BL/6 dans la mesure où la lignée transgénique pour la hGIIA a été établie sur ce fond génétique. Les premières descriptions de la souris C57BL/6 Tg+, ont fait état de modifications au niveau de la peau, se traduisant par une alopecie et un épaissement, et de modifications de la formule sanguine avec une augmentation du nombre de PNN et de lymphocytes (Grass et al., 1996). Pour autant, la souris Tg+ ne présente pas de fond inflammatoire (pas d'infiltrats de cellules inflammatoires dans les tissus) et les études histologiques n'ont décelé aucune différence dans l'organisation tissulaire entre les génotypes sauvage et transgénique. Nos résultats ont montré que les souris Tg+ contrôlent plus efficacement le développement parasitaire que les souris WT. En effet, la souris Tg+ a présenté une diminution de la parasitémie de 27% au moment du pic de crise, par rapport à la souris Tg-. Dans la mesure où certains paramètres physiologiques, en particulier hématologiques, sont modifiés chez la souris Tg+, l'une des premières étapes de notre travail a été d'établir si la baisse parasitaire était due à ces modifications physiologiques ou si elle pouvait être attribuée à l'enzyme elle-même. Afin d'écarter l'hypothèse de la responsabilité du fond physiologique de la souris Tg+ dans la baisse de parasitémie, nous avons vérifié que l'injection de hGIIA sous forme recombinante à des souris WT parasitées pouvait produire le même effet. Nos résultats ont montré qu'il était possible de reproduire le même phénotype de baisse parasitaire, ce qui indiquait que l'enzyme circulante est, au moins en partie, responsable de la baisse de parasitémie chez les souris Tg+. Le résultat de cette expérience permettait de valider le modèle expérimental choisi.

Dans la mesure où il ne pouvait pas être envisagé de mener l'ensemble des études prévues chez les souris en procédant systématiquement à des injections d'enzyme recombinante, dont la production est coûteuse (en temps, en bras et en argent), le travail de thèse s'est donc poursuivi avec la souris Tg+.

Avant d'aborder la question du (des) mécanisme(s) cellulaire(s) et moléculaire(s) impliqué(s) dans l'effet antiparasitaire de la hGIIA, nous nous sommes attachés à mieux caractériser certains aspects de la biologie/physiologie de la souris Tg+ naïve, en particulier ceux concernant le compartiment sanguin, lieu du développement parasitaire lors d'une infection par les stades sanguins de *P. c. chabaudi*.

2. hGIIA et hématogramme chez la souris Tg+ naïve

A notre connaissance, seule l'étude de Laine *et al.*, (2000) a rapporté les concentrations sanguines en PNN, lymphocytes et plaquettes des souris Tg+. Notre étude complète ces chiffres en y ajoutant les concentrations en monocytes, PNE et PNB, et en GR. Nos données ont été obtenues par deux méthodes : (1) une méthode manuelle (comptage en hémacytomètre) et (2) une méthode par impédance et cytométrie en flux au moyen de l'analyseur Sysmex 2000iV. Dans le premier cas, le sang analysé était du sang caudal, dans la méthode automatisée, le sang provenait de la veine faciale (sous-maxillaire). Dans la publication de Laine, le sang caudal a été analysé au moyen d'un automate. Comme il a été mentionné dans la partie résultats, des différences dans

le comptage des leucocytes peuvent apparaître selon le mode de prélèvement sanguin. Ainsi, le sang provenant de la queue est décrit comme contenant plus de PNN que le sang artériel (Pressac, 2006).

Les deux approches ont permis de confirmer que la souris Tg+ présente un nombre de leucocytes plus important que la souris Tg-. Cependant, des différences importantes dans les valeurs absolues du nombre de leucocytes/ μL de sang sont apparues selon les techniques de comptage et/ou l'origine corporelle du prélèvement, le sang caudal apparaissant effectivement plus riche en leucocytes que le sang facial.

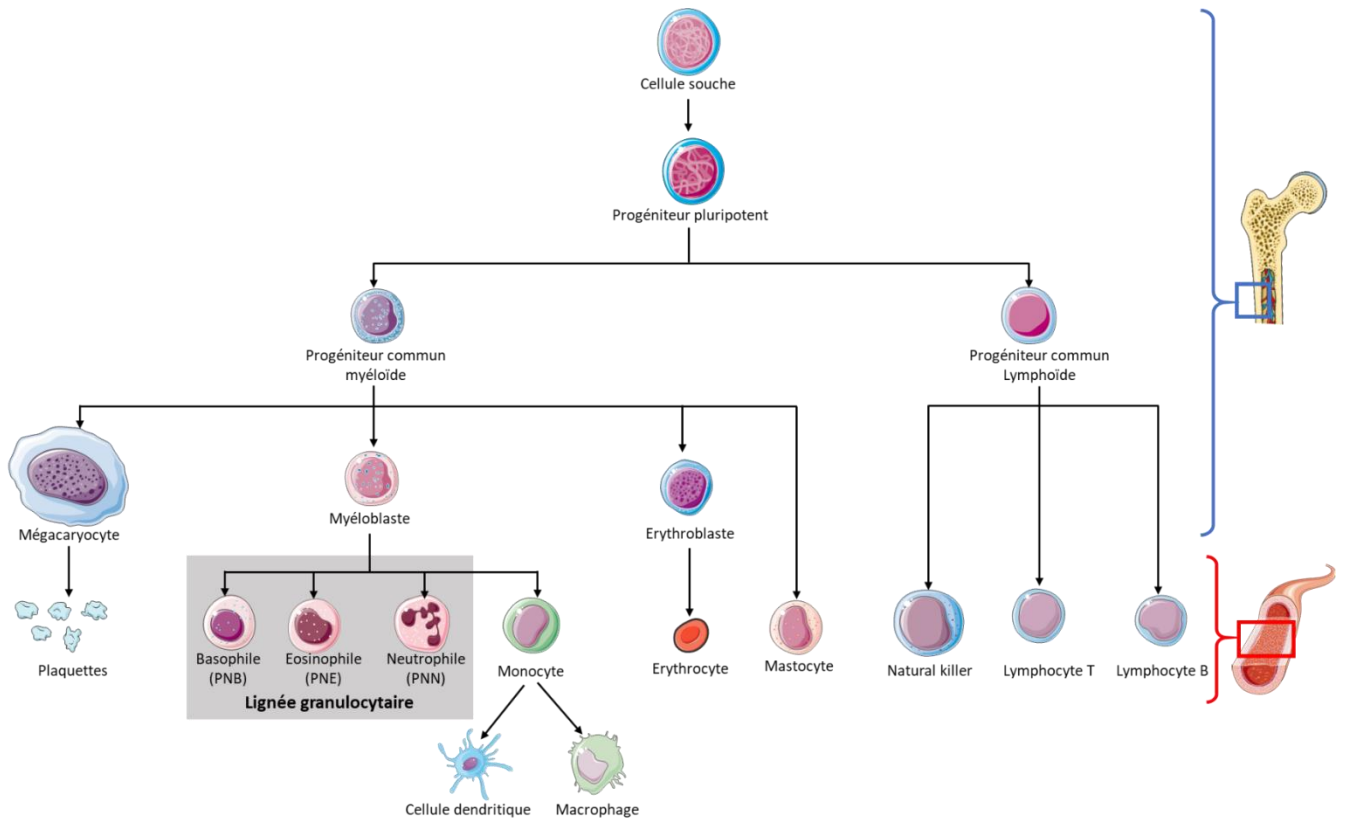
Nb leucocytes/ μL	Hémacytomètre - <i>Sang caudal</i>	Sysmex 2000iV - <i>Sang facial</i>
Tg-	$17,9 \times 10^3$	$6,08 \times 10^3$
Tg+	$26,1 \times 10^3$	$10,15 \times 10^3$

L'analyse de la distribution des sous-populations au sein des leucocytes a montré que, en valeurs absolues tirées du comptage Sysmex, sur la base d'un comptage de 5 000 à 10 000 cellules, les souris Tg+ comptent 1,35 fois plus de lymphocytes, 2,9 fois plus de PNN, 3,19 fois plus de monocytes, 3,14 fois plus de PNE et 4 fois plus de PNB que les souris Tg-, par volume de sang (valeurs médianes).

Par ailleurs, le comptage Sysmex montre que la souris Tg+ a un nombre total de GR/ μL de sang inférieur à celui de la souris Tg-, à savoir $9,7 \times 10^6$ (Tg+) vs $10,5 \times 10^6$ (Tg-), soit environ 8% de moins. De plus, les GR chez la souris Tg+ ont un VGM plus important que celui des Tg-. Il est intéressant de noter que les résultats d'une expérience que nous avons faite au laboratoire, visant à mesurer la résistance à l'osmolyse des GR des souris Tg+, a montré qu'ils sont plus résistants que ceux des souris Tg-. Ceci indique que les érythrocytes chez les souris Tg+ présentent des caractéristiques morphologiques et structurales qui les distinguent des GR des souris Tg- ; dans la mesure où les érythrocytes sont les cellules-hôtes de *Plasmodium*, ces observations posent la question de l'invasion, du développement, et de la libération du parasite, en lien avec la baisse de parasitémie constatée chez les souris Tg+.

Les plaquettes, en revanche, sont en nombre comparable chez les deux souris, ce qui confirme les données publiées antérieurement (Laine et al., 2000a). De plus, nous montrons que les plaquettes des souris Tg+ sont normales, dans la mesure où elles présentent le même volume moyen et le même indice anisotrope que les plaquettes des souris Tg-.

La présence de l'enzyme humaine semble donc modifier spécifiquement certaines caractéristiques hématologiques. En particulier, l'augmentation des leucocytes semble toucher plus spécifiquement la lignée granulocytaire que la lignée lymphoïde ou érythroïde. L'augmentation des sous-populations concernées (PNN, monocytes, PNE et PNB) est relativement homogène, d'un facteur x3 à x4. Cette observation est intéressante, dans la mesure où elle pourrait indiquer que la hGIIA accélère le processus de différenciation/multiplication de ces cellules, peut-être au niveau d'un progéniteur commun aux 4 sous-populations concernées (voir schéma de l'hématopoïèse ci-dessous).



3. Expression de la hGIIA dans les tissus de la souris Tg+ infectée

Lors d'une infection par *P. c. chabaudi* 864VD, on observe chez les souris Tg+ une augmentation maximum de la parasitémie 14 jours après l'inoculation des parasites, puis une diminution. La mesure de l'activité enzymatique sPLA2 dans le plasma des souris Tg+ infectées montre que, globalement, son profil est calqué sur celui de la parasitémie. L'activité augmente et atteint un maximum au pic infectieux, où l'activité est deux fois plus importante que celle observée à J0, puis elle décroît rapidement pour retrouver son niveau initial. Nous avons cherché au niveau de quelques tissus (hépatique, splénique et sanguin), si une modulation de la quantité de protéine, évaluée par immunomarquage et mesure de l'ARNm, pouvait expliquer ce profil d'activité.

Nos expériences ont montré que l'expression transcriptionnelle du gène *Pla2g2a* humain semble augmenter dans le foie des souris Tg+ parasitées au moment des plus fortes parasitémies (à J14 p.i.). C'est aussi

le moment où l'activité enzymatique sPLA2 mesurée dans le plasma est la plus forte. L'expression transcriptomique s'accompagne de la visualisation de la protéine dans le tissu hépatique par immunomarquage. Le marquage est le plus fort à J14 p.i., avec une répartition hétérogène au sein du tissu, plus un marquage accentué au niveau de zones nécrotiques entourées d'infiltrats inflammatoires qui apparaissent à ce moment-là. Bien qu'un marquage par les anticorps anti-hGIIA ait pu également être visualisé dans les zones de nécrose du foie chez les souris Tg-, mettant en cause la spécificité du marquage chez les Tg+, il est intéressant de noter que chez l'Homme, la hGIIA est retrouvée au niveau des cellules nécrotiques dans les plaques d'athérome (Menschikowski et al., 1995). L'enzyme pourrait être synthétisée par les cellules inflammatoires présentes sur les sites de nécrose. Ceci suggère aussi que le foie pourrait participer à la production de l'enzyme retrouvée dans le plasma sanguin.

Plusieurs explications sont possibles concernant le marquage de zones de nécrose dans le foie des souris Tg- infectées à J14 p.i. : la plus probable est qu'il s'agisse d'un marquage non-spécifique du tissu nécrotique ; cependant, une réaction croisée des anticorps anti-hGIIA avec la protéine murine tronquée (mGIIA) ne peut pas être totalement exclue. En effet, il a été rapporté que le gène muté peut être exprimé et traduit (en fragments protéiques) chez la souris *Pla2g2a* -/- lorsque des mesures extrêmes sont utilisées pour l'induire (carraghénane + LPS) (Kennedy et al., 1995).

Il faut noter que l'augmentation d'activité sPLA2 chez la souris Tg+ lors d'infections bactériennes a été rapportée dans le cas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou *Bacillus anthracis*. L'augmentation a été mesurée à la fois dans le sérum des souris, en termes d'activité enzymatique, et dans le foie, au niveau de l'expression de l'ARNm (Laine et al., 2000a; Laine et al., 1999; Laine et al., 2000b; Piris-Gimenez et al., 2005). Nos résultats indiquent donc que la parasitose chez la souris Tg+ pourrait solliciter l'expression de la hGIIA de la même manière que les infections bactériennes.

Contrairement à ce qui se passe dans le foie, la quantité d'ARNm de la hGIIA dans la rate et les cellules du sang diminue au cours de l'infection. L'augmentation de l'activité enzymatique circulante à J14 p.i. ne peut donc pas être attribuée à une surexpression du gène/sur-production de la protéine dans ces deux tissus. Il faut noter que la diminution de la quantité d'ARN dans la rate des souris Tg+ s'accompagne de l'apparition d'EMH, ce qui suggère qu'elle pourrait être due à un phénomène de dilution de l'ARNm plutôt qu'à sa sous-expression, les cellules exprimant l'ARNm étant « diluées » par des cellules nouvellement formées n'exprimant pas le gène. Dans le sang, à J14 p.i., l'augmentation du nombre de leucocytes pourrait peut-être de la même façon expliquer la baisse d'ARNm. La diminution des quantités d'ARNm des sPLA2-IIF et-V dans la rate pourrait correspondre au même phénomène. En tout état de cause, nos travaux ne sont pas assez avancés sur ce point pour émettre plus d'hypothèses.

Cependant, le fait que la quantité d'ARNm de hGIIA dans les trois tissus, foie, rate et sang, soit la plus basse à J21 p.i., alors que la parasitémie a fortement diminuée et que les tissus sont en cours de réorganisation (retour à une concentration normale en leucocytes dans le sang, résorption de l'EMH dans le foie), suggère que

la synthèse d'ARNm pourrait effectivement être réprimée à ce stade. A J21 p.i., on constate aussi que l'activité sPLA2 du plasma a fortement diminué.

4. hGIIA et anémie chez la souris Tg+ infectée

L'anémie, caractéristique de la plupart des infections palustres murines (Lamb et al., 2006), est observée dans notre modèle pour les deux génotypes murins. Au pic parasitaire, on voit une chute brutale de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine. Chez la souris Tg+, cette diminution du nombre de GR dure plusieurs jours, bien que les parasites aient été éliminés du sang. L'anémie est en partie due à la destruction des GRi lors du développement des parasites. Toutefois, on sait que dans d'autres modèles murins, plusieurs facteurs participent à ce phénomène : la dysérythropoïèse (anomalie de la maturation des érythroblastes), l'érythrophagocytose des GR sains (Evans et al., 2006) et une érythropoïèse non efficace (Yap and Stevenson, 1992). Dans l'infection par *P. c. chabaudi* AS, l'érythropoïèse est rendue inefficace par la diminution de la capacité des précurseurs érythrocytaires à répondre à l'érythropoïétine, ce qui empêche le renouvellement des GR (Chang et al., 2004). Par ailleurs, Lamb & Langhorne ont montré que dans l'infection de la souris BALB/c par *P. c. chabaudi*, *P. c. chabaudi* CB induisait une anémie plus forte que *P. c. chabaudi* AS indépendamment du nombre de parasites circulants (Lamb and Langhorne, 2008). Dans notre étude, la prolongation du niveau bas d'hématocrite chez les souris Tg+ pourrait s'expliquer par un défaut d'érythropoïèse. Ceci est à mettre en lien avec l'observation faite précédemment d'un hématocrite plus bas chez la souris Tg+ naïve, comparée à la souris Tg-. La difficulté des souris Tg+ à renouveler la population d'érythrocytes participe sans doute au même processus, lié à l'expression du transgène.

L'érythropoïèse est régulée par le microenvironnement et par des facteurs de croissance qui contrôlent la survie, la prolifération et/ou la différenciation des progéniteurs érythroïdes, et par des facteurs nucléaires qui régulent la transcription des gènes impliqués dans l'établissement du phénotype érythroïde. La production d'érythrocytes (réticulocytes) est contrôlée principalement par le taux d'érythropoïétine et par la disponibilité du fer dans le plasma. Il existe un certain nombre de situations pathologiques dans lesquelles l'érythropoïèse est inhibée. Certaines cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α , l'IFN γ , le TGF β , ou d'autres (Vandekerckhove et al., 2009), sont surproduites dans certaines maladies chroniques anémiantes. Certaines d'entre elles peuvent par exemple être responsables d'une diminution de la production d'érythropoïétine par le rein.

L'hepcidine, une hormone impliquée dans la régulation du fer, et synthétisée par le foie, est elle-aussi régulée par différentes cytokines. Elle a été impliquée dans le développement de l'anémie au cours de maladies chroniques ou inflammatoires, où elle diminue la disponibilité des stocks de fer nécessaire à l'érythropoïèse (Nemeth et al., 2003). Dans l'infection palustre murine, cette hormone peut être régulée par l'IL-6 (Langhorne et al., 2002) et l'IL-10 (Huang et al., 2014), induisant une déficience en fer, ce qui participe à l'anémie. Par ailleurs, une forte concentration d'IL-12 pourrait également participer à la dysérythropoïèse (Crutcher et al., 1995; Luty

et al., 2000). La hGIIA pourrait participer au prolongement de l'anémie par sa capacité à induire la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12 par les monocytes (Triggiani et al., 2002).

Par son activité d'hydrolyse des phospholipides, la hGIIA peut libérer des lysoPL, médiateurs lipidiques impliqués dans la régulation des cytokines. Elle pourrait de cette façon induire des dérèglements de la production d'érythropoïétine et/ou d'hepcidine. Dans cette hypothèse, la présence de la hGIIA dans le rein des souris Tg+ va dans le sens d'une possible interférence avec la production d'érythropoïétine, de même que sa présence dans le foie soutient l'idée qu'elle pourrait interférer avec la production d'hepcidine. Au niveau tissulaire, la réponse à l'anémie se traduit dans la rate et le foie des souris Tg+ par l'apparition d'EMH. Chez la souris Tg-, c'est une hyperplasie des deux pulpes qui est observée, avec majoritairement une expansion des LB. Une désorganisation tissulaire est visible plus tardivement, chez la moitié des souris. Nos observations chez la souris Tg- sont en accord avec celles décrites dans la littérature chez la souris WT parasitée. Une hyperplasie de la pulpe rouge se met en place et la rate devient un site d'hématopoïèse (Achtman et al., 2003; Alves et al., 1996; Freeman and Parish, 1978). Il apparaît une perte transitoire des zones marginales (Beattie et al., 2006) et les zones lymphocytaires T et B peuvent devenir non distinguables avec le développement extrafolliculaire de plasmocytes (Achtman et al., 2003). Ces changements participent à la génération d'une réponse immunitaire robuste, et notamment à la formation d'un centre germinatif important (Achtman et al., 2003) ainsi que la génération d'une réponse B- et T CD4-mémoire, de plasmocytes et d'anticorps protecteurs de longue durée de vie (Ndungu et al., 2009; Stephens and Langhorne, 2010). Or, chez la souris Tg+, la réponse à l'infection est différente. Tout d'abord, une désorganisation de l'architecture splénique se met en place précocement et les immunomarquages ne permettent pas d'identifier de LT ou de LB dans les zones d'hyperplasie, ce qui indique que l'hyperplasie est majoritairement causée par de l'EMH et non par une prolifération de cellules différenciées comme chez les Tg-. Le fait que l'anémie ne soit pas compensée chez les Tg+, pourrait indiquer que la fabrication de précurseurs hématopoïétiques est dévolue préférentiellement à une différenciation en leucocytes (granulocytes ?) plutôt qu'en érythrocytes. Cependant, nous avons vu plus haut que la situation peut être plus complexe et la différenciation éventuelle en érythrocytes pourrait elle-même être perturbée par la dérégulation des hormones nécessaires à cette différenciation/prolifération.

5. hGIIA et réponse leucocytaire chez la souris Tg+ infectée

Nous avons vu que l'infection par *P. c. chabaudi* induit chez la souris Tg+ comme chez la souris Tg- une augmentation du nombre de leucocytes circulants au moment des fortes parasitémies. L'augmentation est moins marquée chez les Tg-. Chez les Tg+, le nombre de PNN est multiplié par 10, c'est la sous-population leucocytaire qui augmente le plus. Il se pourrait, au vu de figures de PNN sénescents sur les frottis, que l'élimination (apoptose) des PNN soit compromise. L'infection chez les souris Tg+ induit également une activation spécifique des monocytes (on voit des monocytes activés exclusivement sur les frottis Tg+), et une augmentation du nombre de lymphocytes activés par rapport aux souris Tg-. On voit donc que la réponse leucocytaire à l'infection chez les Tg+ est beaucoup plus marquée que chez les Tg-, et qu'elle est différente.

On sait que l'activité de la hGIIA entraîne une augmentation de la synthèse de prostaglandines par le biais de la production de précurseurs lipidiques (AA, DHA). D'une manière générale, les eicosanoïdes interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire. Par exemple, *in vivo*, les PNN peuvent être mobilisés par l'ajout dans la circulation d'analogues de prostaglandines (Ulich et al., 1986) ; dans le modèle de l'asthme, les prostaglandines D2 sont capables d'activer et de recruter les PNE (Monneret et al., 2001). Il est donc possible que la présence de hGIIA chez la souris Tg+ entraîne une augmentation de la production de prostaglandines et par conséquent, mobilise une quantité plus importante de leucocytes dans la circulation sanguine. Par ailleurs, l'apparition des lymphocytes réactionnels dès le 7^{ème} jour de l'infection est en accord avec le fait que, en condition inflammatoire, la hGIIA est capable d'activer les LT afin de propager la réponse immunitaire cellulaire (Asaoka et al., 1993). De même, dans d'autres modèles pathologiques, la hGIIA a été décrite comme un stimulateur de l'activation des monocytes, contribuant à l'augmentation de la production des cytokines TNF α et IL-6 (Triggiani et al., 2002).

La réponse leucocytaire globale chez les souris Tg+ semble donc créer un contexte favorable à l'élimination du parasite. La mise en place de cette réponse par la hGIIA pourrait faire partie des mécanismes antiparasitaires de l'enzyme.

6. Hypothèses mécanistiques sur l'activité antiparasitaire *in vivo* de la hGIIA

Deux hypothèses mécanistiques ont été proposées au cours de cette thèse : (1) la hGIIA aurait une action anti-*Plasmodium* via un mécanisme indirect impliquant l'hydrolyse de lipoprotéines oxydées, libérant des PUFA toxiques pour le parasite et (2) la hGIIA aurait une action anti-*Plasmodium* via le recrutement et/ou l'activation des cellules immunitaires par l'intermédiaire de médiateurs lipidiques.

Les deux hypothèses sous-entendent que l'activité catalytique de l'enzyme serait impliquée dans son mécanisme d'action. Afin de vérifier ce prérequis, il est prévu d'injecter à des souris WT parasitées la protéine sous une forme mutée, catalytiquement inactive. Chez la protéine mutée, le site catalytique a été inactivé par remplacement de l'histidine de la dyade catalytique par une glutamine (mutant H48Q). L'activité enzymatique résiduelle de la hGIIA H48Q est d'environ 0,5% de celle de l'enzyme WT (Edwards et al., 2002). Si l'activité sPLA2 est impliquée dans le contrôle de la parasitémie, le résultat attendu de l'injection de H48Q aux souris infectées est une absence d'effet sur la parasitémie.

L'injection de hGIIA recombinante au début de la phase patente n'a pas d'effet sur la parasitémie, alors que la parasitémie baisse lorsque l'enzyme est injectée plus tardivement. Nous avons donc formulé l'hypothèse qu'un élément/ évènement intermédiaire, nécessaire à l'activité antiparasitaire de l'enzyme, n'est pas présent au début de la phase patente et apparaît plus tardivement au cours de l'infection. Dans le cadre de cette hypothèse, nous avons voulu vérifier si le niveau d'oxydation des lipoprotéines plasmatiques augmentait au cours de l'infection. En effet, l'oxydation des lipoprotéines et l'augmentation concomitante de l'activité sPLA2 créeraient les conditions nécessaires à l'hydrolyse des lipoprotéines, entraînant la libération de lipides toxiques

pour *Plasmodium*, et/ou de médiateurs lipidiques susceptibles d'activer la réponse immunitaire. Cependant, le dosage des TBARS dans le plasma des souris infectées n'a pas mis en évidence d'oxydation significative des lipoprotéines. De même, l'injection de liposomes anioniques riches en AA aux souris Tg+ infectées n'a pas entraîné de baisse accrue de la parasitémie. Ces résultats ne vont donc pas dans le sens d'une implication des lipoprotéines oxydées en tant que médiateurs de l'effet anti-*Plasmodium* de la hGIIA. Cependant, nous prévoyons de reprendre l'expérience avec des lipoprotéines issues de souris parasitées plutôt que des liposomes, afin d'évaluer plus directement la validité de l'hypothèse.

Le substrat à l'origine de la production d'acides gras toxiques et/ou de médiateurs lipidiques pourrait être les lipoprotéines oxydées, mais aussi les vésicules extracellulaires émises par les cellules endothéliales, les plaquettes et/ou les GRi. Ces types de vésicules, endosomes ou microparticules, ont des surfaces riches en PE, qui les rendent attractives pour l'enzyme. Dans le paludisme humain et murin, le nombre de microparticules circulantes augmente avec la parasitémie, et elles ont été impliquées dans le niveau de gravité de la maladie (Pankoui Mfonkeu et al., 2010). Elles pourraient être substrats de la hGIIA chez l'homme et avoir, par son intermédiaire, un rôle encore insoupçonné dans la défense de l'hôte contre le parasite du paludisme.

Concernant l'hypothèse 2, les résultats de l'analyse des populations leucocytaires vont dans le sens d'une implication possible de la réponse cellulaire dans l'effet antiparasitaire de la hGIIA chez la souris Tg+. En effet, nous avons vu que le profil leucocytaire des souris Tg+ naïves est différent de celui des souris Tg-, et que la réponse cellulaire à l'infection en termes d'activation des lymphocytes et des monocytes est beaucoup plus marquée chez les souris Tg+. L'activation des lymphocytes est visible dès la phase patente, ce qui indique que le processus d'activation a été enclenché rapidement après l'inoculation des parasites chez les souris Tg+, contrairement aux souris Tg-, chez lesquelles l'activation est plus tardive et moins forte. L'activation des monocytes ne s'observe que chez les Tg+ et apparaît plus tard dans l'infection (J12 p.i.). L'efficacité de l'injection tardive de hGIIA recombinante pourrait s'expliquer par la capacité de l'enzyme à induire l'activation des monocytes, cellules phagocytaires susceptibles de participer à la diminution de la population parasitaire. Il est important de noter que la hGIIA peut induire la prolifération des monocytes par liaison aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ à la surface des cellules (Saegusa et al., 2008). Cet effet est indépendant de l'activité catalytique de l'enzyme.

7. Quel rôle pourrait jouer la hGIIA dans le neuropaludisme ?

Nous ne discuterons pas ici en détail du rôle possible de la hGIIA dans le neuropaludisme. Nous rappellerons seulement que des travaux récents ont mis en évidence que chez des patients atteints de neuropaludisme et présentant un œdème cérébral, la quantité de métabolites lipidiques, produits d'une activité sPLA2, est significativement augmentée dans le plasma (Pappa et al., 2015). Ceci suggère que la hGIIA, dont le taux circulant est largement augmenté chez les mêmes patients, pourrait être responsable de la production des métabolites. Ces métabolites lipidiques sont potentiellement impliqués dans la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique et l'apparition de zones d'hémorragies cérébrales.

V. PERSPECTIVES

Ce travail de thèse ouvre sur des perspectives à court et à long terme.

Perspectives de court terme

Elles visent à finaliser le tableau d'ensemble de l'infection à *P. c. chabaudi* 864VD chez la souris transgénique C57BL/6 par la validation des résultats acquis. En effet, comme on a pu le voir, certains résultats restent préliminaires, dans la mesure où ils ont été insuffisamment répétés pour permettre une analyse statistique robuste. En particulier, les expériences d'analyse quantitative de l'ARNm de la hGIIA au cours de l'infection par RT-qPCR sur les extraits de foie, de rate et de cellules du sang devront être répétées. Du matériel biologique issu de deux expériences d'infection indépendantes, et stocké à -80°C, est disponible pour ces analyses.

Les analyses par histologie, immunohistologie et RT-qPCR pourront potentiellement être élargies à tous les organes prélevés lors des expériences réalisées en cours de thèse (cerveau, cœur, foie, poumons, rate et reins), ce qui permettrait d'avoir une vision comparative plus large de l'infection à *P.c. chabaudi* 864VD chez les souris Tg- et Tg+.

Nous envisageons aussi de faire rapidement une deuxième analyse du sang des souris parasitées sur automate et frottis, en collaboration avec l'ENVA, afin de disposer d'un jeu de données plus large sur les variables d'intérêt. Ceci permettra en particulier d'appuyer les observations concernant l'activation des lymphocytes et des monocytes. D'autre part, le dosage d'un ensemble de cytokines d'intérêt (IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, KC-GRO, IL-10, IL-12p70, TNF α , IL-13) dans le plasma des souris Tg- et Tg+ parasitées, a été programmé à l'IPMC de Nice-Sophia Antipolis (collaboration Dr. G. LAMBEAU). Ce dosage fait appel à la méthodologie multiplex : Kit U-Plex Th1/Th2 Combo (ms) de Mesoscale (Ref : K1507K-1). Il permettra de connaître le profil d'expression cytokinique mis en jeu dans la réponse au parasite chez la souris Tg+ et de mettre en avant d'éventuelles différences avec la réponse chez la souris Tg-.

Perspectives de long terme

Ces perspectives touchent principalement à l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'activité anti-*Plasmodium* de la hGIIA. Pour pouvoir orienter de futures recherches, il faut d'abord savoir si l'activité catalytique de l'enzyme est engagée dans le processus anti-parasitaire. L'injection de la forme mutée catalytiquement inactive de la hGIIA (hGIIA H48Q) à des souris WT infectées, devrait permettre de répondre à cette question. Si l'enzyme mutée n'induit pas de baisse de parasitémie, l'hypothèse d'un mécanisme faisant intervenir l'hydrolyse d'un substrat phospholipidique sera privilégiée. Au contraire, si l'enzyme mutée induit une baisse de parasitémie, c'est l'hypothèse impliquant le couplage de la hGIIA à un récepteur cellulaire qui sera étudiée.

Mécanisme impliquant l'hydrolyse d'un substrat phospholipidique :

Dans le cas où l'activité catalytique serait impliquée, plusieurs volets de recherche pourront être envisagés, tels que 1) l'identification du (ou des) substrat(s) potentiel(s) de l'enzyme ; 2) l'identification du (ou des) produit(s) d'hydrolyse actif(s) dans le contrôle du développement parasitaire ; 3) l'identification des cellules-cibles des produits d'hydrolyse, cellules effectrices de l'effet anti-*Plasmodium* (cellule phagocytaire ou cytotoxique), ou, plus directement, GR parasité.

Nous avons montré que l'effet antiparasitaire de la hGIIA exogène ne se manifeste que tardivement, aux alentours du pic de crise. Par analogie avec l'effet anti-*Plasmodium* de la hGIIA observé *in vitro* en présence de lipoprotéines oxydées (Annexe 1), nous avons supposé que les lipoprotéines oxydées pouvaient être substrat de la hGIIA *in vivo* et médier l'effet anti-parasitaire. Nous avons donc, d'une part, cherché chez les souris infectées si le niveau d'oxydation lipidique du plasma augmentait au cours de l'infection, et d'autre part testé la capacité de liposomes anioniques chargés en AA à amplifier la baisse de parasitémie chez les souris Tg+ infectées. Aucune de ces expériences n'ayant été concluante, nous prévoyons de les modifier/améliorer de la façon suivante : 1) la mesure des TBARS sera faite à partir de lipoprotéines purifiées plutôt qu'à partir de plasma, de façon à optimiser les capacités du test ; 2) l'expérience d'injection de substrat sera reprise en utilisant des lipoprotéines purifiées à partir de plasma de souris plutôt que des liposomes. Ajouté à la pertinence biologique de ce type de substrat, cela permettra de comparer les effets sur la parasitémie de lipoprotéines purifiées à partir de plasma prélevé à J0 (non oxydées), J8 p.i (potentiellement non oxydées) et à J14 p.i. (potentiellement oxydées), lorsqu'elles sont injectées à des souris Tg+ infectées.

La recherche des substrats potentiels de l'enzyme pourrait être élargie aux micro-vésicules extracellulaires (EV) circulantes, dont la production est amplifiée au cours de l'infection chez l'Homme et la souris. *Plasmodium*, comme d'autres parasites et comme les cellules de l'hôte, a la capacité de sécréter des EV, qui peuvent jouer un rôle dans la multiplication et la transmission du parasite, et moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Mantel and Marti, 2014). Certaines EV, riches en phospholipides anioniques, pourraient être des substrats de la hGIIA, et à ce titre intervenir dans le développement du parasite chez la souris Tg+.

Afin d'identifier les molécules actives dans le mécanisme de contrôle parasitaire, une analyse lipidomique du plasma par spectrométrie de masse (Quehenberger et al., 2010) pourrait permettre de vérifier si la quantité d'acides gras et de lysoPL circulants augmente au cours de l'infection chez les souris Tg+. Par cette technique, les lipides pourraient, de plus, être identifiés, ce qui permettrait dans un second temps d'utiliser les molécules commerciales pour tester leur effet inhibiteur vis-à-vis du développement de *P. falciparum* en culture *in vitro*. Les mêmes lipides pourraient être testés pour leur capacité à activer des cultures primaires de leucocytes de souris, en particulier les lymphocytes et les monocytes. La caractérisation des cellules et de leur niveau d'activation pourrait se faire par immuno-cytofluorométrie en flux.

Mécanisme impliquant la liaison de la hGIIA à un récepteur cellulaire :

Des publications récentes ont rapporté que la hGIIA ne se fixerait pas au récepteur M sur les leucocytes, mais aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$. La fixation entraîne l'activation des intégrines (changement conformationnel), qui par voie de signalisation, induit la prolifération cellulaire et l'inflammation (Takada and Fujita, 2017). Cet événement ne met pas en jeu l'activité catalytique de la hGIIA. Par différentes approches (*in vitro* et *ex-vivo*), il serait possible de vérifier si l'enzyme H48Q est capable d'activer des leucocytes humains ou murins, avec une attention particulière portée aux lymphocytes et monocytes. Ce travail pourrait être réalisé avec du sang prélevé à différents temps de l'infection chez des souris Tg-, ce qui permettrait de mettre en évidence une éventuelle modification des capacités de réponse des leucocytes à l'enzyme au cours du processus infectieux.

L'injection de hGIIA à des souris WT parasitées produit-elle les mêmes effets que ceux observés chez les souris Tg+ parasitées ?

Nous avons vu que l'injection de hGIIA recombinante active à des souris Tg- infectées induit une baisse de parasitémie lorsque l'injection est pratiquée juste avant le pic de crise, mais n'a pas d'effet lorsqu'elle est faite plus tôt. Ce résultat sous-entend que l'activité anti-*Plasmodium* de l'enzyme est indirecte et dépend de facteurs survenant tardivement dans l'infection. C'est dans ce cadre que nous avons cherché si le mécanisme faisait intervenir les lipoprotéines oxydées. Il serait important aussi de vérifier si la réponse leucocytaire est modifiée après injection de l'enzyme. Ceci pourrait se faire par observation des frottis et comptage des leucocytes activés, mais aussi par dosage de cytokines dont l'intérêt aura été mis en avant par le dosage effectué chez les souris Tg+ infectées.

Par ailleurs, la caractérisation de l'infection nous a permis de mettre en évidence une différence histologique au niveau de la rate avec des sites d'EMH importants chez les souris Tg+. Une des interrogations que ces données soulèvent est de savoir si l'injection de hGIIA exogène administrée aux souris WT est susceptible d'instaurer rapidement une réorientation vers une EMH plutôt qu'une hyperplasie des LB dans la rate des souris infectées. Une nouvelle expérience d'infection/injection d'hGIIA dédiée à l'analyse histologique des organes, à une mesure de l'hématocrite et à un suivi de l'activation des leucocytes post-injection pourrait répondre à cette question.

Il serait important aussi de recueillir des données sur le devenir de la hGIIA injectée en mesurant son taux d'activité dans le plasma des souris Tg- après injection. Dans ce sens, une expérience a déjà été réalisée en cours de thèse, qui a consisté à mesurer l'activité sPLA2 dans les plasmas de souris WT naïves (n = 3) après une injection de hGIIA (0,125mg/kg/injection). Après injection, 4 prélèvements sanguins ont été réalisés à t = 5 minutes, t = 15 minutes, t = 30 minutes et t = 1 heure. Aucune activité sPLA2 n'a été décelée dans les échantillons plasmatiques, indiquant que l'enzyme est soit rapidement métabolisée par l'organisme, soit qu'elle est captée à la surface des endothéliums vasculaires ou dans les tissus et organes. Etant donné que l'injection exogène de hGIIA induit une baisse de parasitémie chez les souris infectées, il semble plus probable que l'enzyme soit captée mais reste

active. Il serait nécessaire de comparer les résultats obtenus chez les souris naïves au devenir de l'enzyme injectée chez des souris WT infectées. Dans l'hypothèse d'une rétention de l'enzyme, afin de déterminer sa localisation, il pourrait être envisagé de mesurer l'activité sPLA2 au niveau des cellules sanguines et dans des broyats d'organes récupérés après injection de la hGIIA aux souris.

Conclusion

Comme dans d'autres pathologies infectieuses, la hGIIA augmente dans le sérum des patients impaludés. Ceci a été rapporté au début des années 1990, cependant, son rôle dans le paludisme reste inconnu à ce jour. L'étude présentée ici a permis de dresser un tableau large de l'infection non létale à *Plasmodium chabaudi* chez un hôte murin exprimant la hGIIA de manière constitutive.

Nos résultats font soupçonner que l'enzyme pourrait être impliquée dans des aspects importants de la physiopathologie chez l'hôte infecté, comme la régulation de l'érythropoïèse, la mise en place et la récupération des lésions aux organes, ou la réponse immunitaire. Dans d'autres pathologies, son rôle en tant que molécule anti-bactérienne et pro-inflammatoire est bien documenté. Nos travaux pourraient permettre d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche dans le cadre des études sur le paludisme, en considérant le rôle d'acteur à part entière d'une molécule engagée dans les processus complexes de la réponse de l'hôte au parasite.

L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer le scénario suivant :

La hGIIA produit des médiateurs lipidiques à bas bruit chez la souris Tg+. Pas suffisamment pour induire une inflammation chronique, mais suffisamment pour dérégler la production de leucocytes et réprimer légèrement la production d'érythrocytes. Lors de l'infection, l'apparition progressive de substrats idoines pour la hGIIA (surfaces anioniques, telles que des lipoprotéines oxydées, des vésicules extra-cellulaires ou des corps apoptotiques), augmente d'autant la production de lipides directement toxiques pour le parasite, et/ou de médiateurs lipidiques. Ces médiateurs vont provoquer des réactions en termes de recrutement cellulaire et production de cytokines. Parallèlement, la capacité de la hGIIA à se lier aux intégrines à la surface des leucocytes peut elle aussi entraîner une réaction cellulaire. On voit augmenter le nombre de PNN, apparaître une activation des lymphocytes, puis (réaction en cascade ?), une activation des monocytes. Ces monocytes, comme les PNN, sont susceptibles de phagocyter les GRi et/ou les mérozoïtes, et l'élimination du parasite qui s'ensuit se traduit par une baisse du pic de parasitémie.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PUBLICATION SOUMISE

Concerted action of human secreted group IIA phospholipase A₂ and oxidized lipoproteins inhibits the *in vitro* growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Christiane Deregnacourt^{a#}, Mélanie Dacheux^a,
Véronique Sinou^b, Christine Payré^c, Daniel Parzy^d,
Philippe Grellier^a and Gérard Lambeau^{c#}

^a Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, CP52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France.

^b UMR_MD1, Inserm U-1261, Faculty of Pharmacy, Aix-Marseille University, Marseille, France.

^c Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Valbonne Sophia Antipolis, France

^d K-plan, Department of Biology, Marseille, France

Running Head: *In vitro* antimalarial activity of hGIIA sPLA₂

KEYWORDS: Malaria, secreted phospholipase A₂, lipoprotein, oxidation, *Plasmodium*

Address correspondence to Christiane Deregnacourt, christiane.deregnacourt@mnhn.fr and Gérard Lambeau, lambeau@ipmc.cnrs.fr

ABSTRACT

The human group IIA secreted phospholipase A₂ (hGIIA sPLA₂) is increased in the serum of malaria patients but its role is unknown. In *in vitro* culture with normal plasma, hGIIA is inactive against *Plasmodium falciparum*, contrasting with hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s that readily hydrolyze lipoproteins, release polyunsaturated fatty acids and inhibit parasite growth at nM concentrations. Here, we revisited the anti-*Plasmodium* activities of sPLA₂s in conditions closer to malaria physiopathology where lipoproteins are oxidized. hGIIA and hGIIF, but not other sPLA₂s, hydrolyzed more efficiently oxidized than non-oxidized lipoproteins. In medium containing oxidized lipoproteins, hGIIA sPLA₂ became inhibitory with an IC₅₀ value of 150.0 ± 40.8 nM, whereas hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s were more potent by 4.6-, 2.1- and 1.9-fold, respectively. Using sensitive immunoassays, we found that hGIIA sPLA₂ is increased in the plasma from 41 patients with uncomplicated *falciparum* malaria over healthy donors (median (IQR): 1.55 (0.69-3.37) nM, *versus*

0.00 (0.00-0.08) nM, respectively; *P* < 0.0001). Other sPLA₂s were not detected. Malaria plasma also contained oxidized lipoproteins but was not inhibitory to *P. falciparum*. However, when spiked with 100 nM recombinant hGIIA sPLA₂, malaria but not normal plasma showed release of free fatty acids and inhibition of *P. falciparum*. In conclusion, we propose that malaria-induced oxidation of lipoproteins converts these latter into a preferential substrate of hGIIA sPLA₂, promoting its parasite killing effect. Our findings might be relevant *in vivo*, in the inflammatory microenvironment of uncomplicated or severe malaria where hGIIA concentrations is likely very high.

INTRODUCTION

Human group IIA secreted phospholipase A₂ (hGIIA sPLA₂), also known as the inflammatory-type sPLA₂-IIA is a strong bactericidal agent present in inflammatory fluids (1-3) and in the plasma of patients with sepsis at very high concentrations (several nM) (4, 5). It belongs to the family of secreted PLA₂s, structurally-conserved enzymes with a small molecular mass (14-19 kDa) which catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the *sn*-2 position to release free fatty acids and lysophospholipids (6-8).

As in many infectious diseases, malaria induces the elevation of hGIIA sPLA₂ activity in the plasma of infected patients, an observation originally made by Vadas and colleagues in the early 90s' (9, 10). The circulating activity was attributed to hGIIA sPLA₂ based on immunological tests in serum and the absence of sPLA₂ activity in *in vitro* culture medium of the malaria parasite. However, at the time those studies were published, only hGIB (group IB or pancreatic-type sPLA₂) and hGIIA were known in humans. Since then, additional genes coding for sPLA₂s have been identified in the human genome and up to 11 sPLA₂s are now known (IB, IIA, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIIB and otoconin-95) (11). Human sPLA₂s exhibit different enzymatic properties as well as unique tissue and cellular distributions (12), suggesting distinct physiological roles for each enzyme. Besides a possible role in the production of lipid mediators such as eicosanoids and lysophospholipids, accumulating evidence indicates that sPLA₂s participate in innate immunity, especially in the first line of host defense against bacteria and other pathogens (13, 14). In malaria, it has been recently suggested that lipid products of the PLA₂ pathway might be involved in brain swelling in children with cerebral malaria (15), supporting a role of sPLA₂ in the inflammatory events of malaria physiopathology. Furthermore,

we have shown that the release of lipid products from lipoproteins by human sPLA₂s can be deleterious to the *in vitro* development of *Plasmodium* (16), suggesting that sPLA₂ activity in the infected host might have pleiotropic effects.

Protozoan parasites of the genus *Plasmodium* are transmitted to vertebrates by mosquitoes. In mammalian hosts, *Plasmodium* spends most of its life-time in the red blood cells (17). In humans, the intra-erythrocytic parasite is responsible for the clinical symptoms associated with malaria. The vast majority of clinical cases present as non-specific febrile illnesses that are relatively easily terminated (uncomplicated malaria), but a minority of cases progress to a severe life-threatening disease. The major complications of severe malaria include cerebral malaria, pulmonary edema, acute renal failure and severe anemia. According to the WHO World Malaria Report 2015 (<http://www.who.int/gho/malaria/en/>) there were 214 million cases of malaria globally in 2015, and 438,000 malaria deaths attributed to major complications. Interestingly, in their pioneering work, Vadas *et al* observed a positive correlation between the level of circulating hGIIA sPLA₂ and the disease severity (10).

In previous studies, we demonstrated that recombinant hGIIF, hGIII, hGV and hGX but not hGIIA sPLA₂s display potent *in vitro* antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*, the most virulent species of human parasites (16). In typical *in vitro* infection assays of red blood cells by *P. falciparum* where normal human serum is used, hGX sPLA₂ was found to be the most active with an IC₅₀ value of 3 nM, hGV the least active with an IC₅₀ of 95 nM whereas hGIIA was fully inactive. We depicted a mechanism by which human sPLA₂s exert their killing effect against *P. falciparum* indirectly, by hydrolyzing phospholipids from human native lipoproteins present in the parasite culture medium and generating lipid products such as non-esterified polyunsaturated fatty acids (PUFAs) which appeared as the key lipid components toxic to the parasite and responsible for sPLA₂-dependent parasite death (16). In these *in vitro* conditions, hGIIA sPLA₂, even at very high concentrations ($\geq 1.25 \mu\text{M}$) was ineffective against *P. falciparum* (16).

Interestingly, it has been shown that hGIIA sPLA₂ hydrolyzes more efficiently oxidized lipoproteins than their native counterparts (18-21). Furthermore, oxidation of lipoproteins is observed in multiple pathological situations including atherosclerosis, inflammatory syndromes and infectious diseases (22, 23). In malaria, abnormally elevated levels of lipoprotein oxidation have been reported (24). Since our above experimental *in vitro*

conditions using native human lipoproteins were likely not reflecting the *in vivo* malaria physiopathological conditions, we sought to analyze whether hGIIA and the other human sPLA₂s would be more active against *Plasmodium* in the presence of oxidized lipoproteins.

We found that *in vitro* oxidation of human lipoproteins converts these latter into a readily hydrolyzable substrate for hGIIA sPLA₂, revealing its toxic effect towards the parasite. Oxidation of lipoproteins also enhances the inhibitory effects of hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s. To provide further *in vivo* relevance of these results, plasmas from healthy and *P. falciparum*-infected people were analyzed for sPLA₂ content, lipoprotein oxidation and capacity to inhibit *P. falciparum in vitro* growth. hGIIA sPLA₂ was increased in plasma from infected people, whereas the other sPLA₂s were not detected. The level of lipoprotein oxidation was higher in malaria plasma as compared to normal plasma, and only the malaria plasma was able to enhance the *in vitro* inhibitory activity of exogenously added hGIIA sPLA₂ against *P. falciparum*. Together, our results suggest that the combined presence of high levels of oxidized lipoproteins and hGIIA sPLA₂ might synergize to help controlling parasite growth in human malaria.

RESULTS

Oxidative modification of lipoproteins enhances hydrolysis by hGIIA and hGIIF but not other sPLA₂s — We previously reported the specific activities of different sPLA₂s on native lipoproteins (table 1 and (16)). To analyze the anti-*Plasmodium* activity of human sPLA₂s in a context more relevant to malaria where lipoproteins are oxidized (24), we examined the capacity of various human sPLA₂s to hydrolyze LDL and HDL particles after *in vitro* oxidation.

Hydrolysis of lipoproteins was assessed by measuring the release of non-esterified fatty acids (NEFAs). Seven of the 9 recombinant human sPLA₂s hydrolyzed oxidized and native LDL and HDL particles with the same specific activities (Table 1). In contrast, hGIIA, and hGIIF to a lower extent, exhibited significantly higher activity on oxidized lipoproteins. Oxidation of both LDL and HDL increased the activity of hGIIA sPLA₂ whereas oxidation of LDL but not HDL increased the activity of hGIIF. A slight fold-change was also observed for hGIB on LDL and HDL, but this change did not reach significance. However, the specific activity of hGIIA on oxidized LDL and HDL remained markedly lower than that of hGIIF, hGIII, hGV and hGX sPLA₂s, which are highly active on both native and oxidized lipoproteins.

Oxidized LDL and HDL pretreated with human sPLA₂s including hGIIA are active *in vitro* against *P. falciparum* — We next compared the anti-*Plasmodium* activity of oxidized lipoproteins before and after hydrolysis by the full set of recombinant human sPLA₂s. Inhibitory concentrations of sPLA₂-hydrolyzed LDL and HDL against *P. falciparum* growth are presented in Table 2. Without sPLA₂ pretreatment, oxidized LDLs were barely inhibitory toward *Plasmodium*, whereas oxidized HDLs were not. Pretreatment with 20 nM hGIIF, hGIII, hGV and hGX sPLA₂s, but not other sPLA₂s, increased the toxicity of oxidized LDL and rendered them toxic to the parasite. However, oxidized lipoproteins were not more potent than their native counterparts after hydrolysis. Interestingly, oxidized LDLs were less potent than native LDL after hydrolysis by hGIII sPLA₂.

Pretreatment of oxidized lipoproteins with 20 nM of hGIIA was ineffective against *P. falciparum*. Since the circulating levels of hGIIA sPLA₂ can be very high in severe cases of malaria (10), we evaluated the anti-*Plasmodium* potency of oxidized lipoproteins when treated at higher concentrations of hGIIA sPLA₂. Pretreatment with 100 nM of hGIIA sPLA₂ moderately increased the toxicity of oxidized LDL but 250 nM induced a marked toxicity of both oxidized LDL and HDL and rendered native lipoproteins slightly toxic (Table 3).

The anti-*Plasmodium* activity of human sPLA₂s including hGIIA is enhanced in culture medium containing oxidized lipoproteins — To further analyze the effects of human sPLA₂s in pathophysiological conditions of *Plasmodium* infection where all classes of lipoproteins are present, total lipoprotein fraction (oxidized or not) instead of purified LDL or HDL was used in our *in vitro* assays. As expected, hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s were inhibitory in culture medium containing native lipoproteins (Table 4). hGIIF and hGX sPLA₂s exhibited IC₅₀ values of 19.8 and 1.5 nM, close to the IC₅₀ values previously measured in human plasma (10.7 nM and 2.9 nM, respectively (16)). hGV sPLA₂ was found to be more active, with an IC₅₀ value of 21.9 nM *versus* 94.2 nM in plasma (16). hGIIA sPLA₂ was not inhibitory in plasma (16) nor with native lipoproteins (Table 4) but was clearly inhibitory in the presence of oxidized lipoproteins with an IC₅₀ value of 150 nM. Remarkably, all four sPLA₂s had enhanced inhibitory activities in the presence of oxidized lipoproteins. hGV and hGX sPLA₂s were 2-fold more active, and hGIIF sPLA₂ was 4.6-fold more active, consistent with its increased capacity to hydrolyze oxidized lipoproteins.

Lipoproteins from *P. falciparum*-infected plasma are oxidized — To add further support to our hypothesis that the anti-*Plasmodium* activity of hGIIA sPLA₂, and may be of other sPLA₂s, is promoted by the presence of oxidized lipoproteins in the plasma from infected patients, we evaluated the level of lipoproteins and their oxidative status in malaria plasma *versus* controls. In accordance with previous observations reporting a drop in HDL content (25, 26), the level of lipoproteins, as measured by total PC concentration was found to be lower in plasma from malaria patients as compared to healthy donors (median (IQR): 1.20 (1.00-1.46) mg/mL vs 1.36 (1.19-1.68) mg/mL, *P* value = 0.0158) (Figure 1A). Oxidation of lipoproteins in plasma was estimated using the Mercodia oxidized LDL immunoassay kit (see methods). The ELISA was chosen instead of the TBARS methodology, because this latter is not appropriate for plasma peroxidation assays. LDL oxidation was clearly increased in the plasma from malaria patients as compared to healthy donors (median (IQR): 33.13 (25.65-39.79) vs 15.41 (12.13-18.69) U/L, *P* < 0.001) (Figure 1B).

Circulating levels of hGIIA but not hGIIF, hGV or hGX sPLA₂s are increased in uncomplicated *P. falciparum* malaria — To provide a pathophysiological relevance of our *in vitro* results, plasma from 41 *P. falciparum*-infected Vietnamese adults were analyzed for the presence of hGIIA, hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s and compared to those of 28 non-parasitized, healthy donors from the same geographic area. None of the parasitized individuals presented signs of complicated malaria at the time of blood sampling. As shown in figure 2A, sPLA₂ enzymatic activity was dramatically increased in the plasma of *P. falciparum*-infected patients relative to healthy donors (median (interquartile range: IQR): 260.0 (148.5-367.1) vs 16.20 (10.46-29.06) cpm/min × μL respectively, *P* value < 0.0001). No correlation was found between the level of enzymatic activity and the parasitaemia (*P* value = 0.8079, Spearman's *r* = 0.03969, not shown).

Plasma samples were next analyzed for the presence of hGIIA, hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s by a sandwich ELISA-like method (Time-resolved fluoroimmunoassay, TR-FIA) using specific antibodies for each sPLA₂. Protein level of hGIIA sPLA₂ was significantly increased in the plasma from parasitized patients (median (IQR): 1.55 (0.69-3.37) nM, with a maximum value of 9.09 nM, as compared to the plasma from healthy donors (median (IQR): 0.00 (0.00-0.08) nM) (*P* value < 0.0001) (figure 2B). In contrast, hGIIF, hGV and

hGX sPLA₂s were not detected in the parasitized plasma (not shown), indicating that these enzymes do not circulate, at least at detectable levels, in uncomplicated malaria. In the parasitized plasma, sPLA₂ enzymatic activity, as measured by hydrolysis of *E. coli* membranes as a substrate, and hGIIA concentration were highly correlated (Figure 2C; *P* value <0.0001, Spearman's *r* = 0.9542), indicating that hGIIA sPLA₂ is the predominant sPLA₂ responsible for the circulating enzymatic activity. No correlation was found between hGIIA concentration in plasma and the parasitaemia from infected donors (Figure 2D; *P* value = 0.6684, Spearman *r* = 0.0689).

Endogenous levels of hGIIA sPLA₂ in uncomplicated malaria plasma is not sufficient to inhibit the *in vitro* growth of *P. falciparum* — To test whether the endogenous levels of hGIIA sPLA₂ present in plasma from parasitized patients would be sufficient to inhibit *P. falciparum*, we performed cultures of the parasite in RPMI supplemented with 8% malaria plasma from 20 patients containing various levels of hGIIA sPLA₂ up to 9 nM. *P. falciparum* exhibited very different growth rates depending on the different plasma. Some plasma samples did not sustain parasite growth at all, whereas others sustained quite high growth (≈ 20-fold multiplication rate within 96 h (not shown)). We evaluated the role of hGIIA sPLA₂ present in the plasma by adding to the culture medium LY311727, a highly specific inhibitor of hGIIA (27). Addition of LY311727 did not modify the parasite growth rate in the plasma samples (96 h multiplication factor: median (IQR): 7.08 (2.87-17.5) without LY311727 vs 6.65 (4.14-10.7) with LY311727, *P* = 0.1550) (Figure 3). In line with the absence of effect of LY311727, no correlation was found between the parasite multiplication rate and the levels of hGIIA in the various plasma of the 20 patients tested (*P* <0.3565, Spearman's *r* = 0.2177, not shown).

Exogenously added hGIIA sPLA₂ inhibits the growth of *P. falciparum* in plasma from malaria patients but not healthy donors — We next evaluated whether the inability of endogenous hGIIA sPLA₂ to impair *Plasmodium* development might result from limiting amounts of oxidized lipoproteins as a substrate or low concentrations of endogenous enzyme. *P. falciparum* was grown for 96 h in plasma from malaria patients versus healthy donors spiked with 100 nM recombinant hGIIA sPLA₂. This concentration was chosen based on hGIIA plasma concentrations reported in some severe cases of malaria (10). As shown in Figure 4A, exogenous hGIIA inhibited parasite development in malaria but not normal plasma, demonstrating that

the absence of inhibition resulted from the low concentration of enzyme and not from oxidized lipoproteins as a limiting substrate. Supplementation of malaria plasma with 10 nM hGIIIF or 0.5 nM hGX sPLA₂s was also tested for comparison. Both enzymes were inhibitory for *P. falciparum* in malaria plasma and more active than hGIIA sPLA₂ (Figure 4B), as anticipated from the *in vitro* results with human native plasma. Together, our results demonstrate that malaria-induced modifications of plasma including oxidation of lipoproteins can promote the anti-*Plasmodium* activity of hGIIA sPLA₂ and enhance the inhibitory capacities of hGIIIF and hGX sPLA₂s.

The anti-*Plasmodium* activity of hGIIA sPLA₂ in malaria plasma requires its catalytic activity — To demonstrate that the anti-*Plasmodium* activity of hGIIA sPLA₂ in malaria plasma requires enzymatic hydrolysis of oxidized lipoproteins, we first assessed the enzyme's ability to hydrolyze PLs from plasma. Plasma samples were incubated with hGIIA sPLA₂ and also with hGX sPLA₂, since this latter actively hydrolyzes both native and oxidized lipoproteins. hGIIA sPLA₂ did not release NEFAs from healthy plasma, whereas small but significant release occurred from malaria plasma (*P* = 0.0093) (Figure 5A). As expected, hGX sPLA₂ induced a net increase in NEFAs from both malaria (*P* = 0.0020) and healthy donor (*P* = 0.0019) plasma (Figure 5A).

Second, we tested whether the enzymatic activity is essential for the anti-*Plasmodium* effect of hGIIA sPLA₂. Parasite growth inhibition assays were performed using the H48Q catalytically-inactive mutant of hGIIA (<0.5% of WT enzymatic activity (28)). The parasite development was not affected in malaria plasma spiked with the mutated hGIIA enzyme, indicating that hydrolysis of plasma phospholipids is required for parasite inhibition (Figure 5B). Together, these results indicate that the anti-*Plasmodium* activity of hGIIA sPLA₂ observed in the plasma from malaria patients is mediated by hydrolysis of oxidized lipoproteins.

DISCUSSION

Since the discovery in the early 90's of an increase of hGIIA sPLA₂ in the plasma from malaria patients (9, 10), no comprehensive study on the role of this enzyme has been made in the context of malaria physiopathology. Interestingly, one recent study has shown an association of plasma PLA₂ enzymatic activity and related phospholipid products with brain swelling in pediatric cerebral malaria (15), suggesting a role of hGIIA sPLA₂ in the inflammatory events operating in cerebral malaria. Besides this possible involvement of hGIIA in

malaria inflammatory processes, we provide here the first evidence that hGIIA sPLA₂ may contribute as a host defense factor to control *Plasmodium* development, through hydrolysis of lipoproteins, and more precisely oxidized lipoproteins that are present in malaria (10). This was demonstrated by combining a series of *in vitro* studies on parasite infection assays and analysis of plasma from malaria patients.

In line with the hypothesis of human sPLA₂s being host defense factors in malaria, we previously demonstrated that hGIIF, hGIII, hGV and hGX sPLA₂s inhibit the *in vitro* growth of *P. falciparum* through hydrolysis of native lipoproteins present in human plasma (16). We now show that oxidized lipoproteins are also substrates of these enzymes and participate to the inhibition of parasite growth. We also show that i) hGIIA sPLA₂ hydrolyzes more potently oxidized LDL and HDL than their native counterparts, a finding in line with previous results (18, 20, 21), and ii) hGIIA exhibits anti-*Plasmodium* activity only in the presence of oxidized lipoproteins.

Importantly, addition of hGIIA sPLA₂ to plasma from *P. falciparum*-infected patients containing oxidized LDL induced significant parasite inhibition, whereas addition of hGIIA to normal plasma was ineffective. Using the catalytically-inactive H48Q mutant of hGIIA, we demonstrated that the enzymatic activity of hGIIA sPLA₂ is essential for inhibition when spiked in plasma from malaria patients.

In normal culture conditions, the anti-*Plasmodium* activity of hGIIF, hGIII, hGV and hGX sPLA₂s results from hydrolysis of lipoprotein phospholipids that produces toxic free fatty acids, mainly long chain polyunsaturated fatty acids (16). It is known that hGIIA sPLA₂ has little activity on native lipoproteins but higher activity on oxidized counterparts (18, 20, 21 and this study). We found that hGIIA sPLA₂ can generate NEFAs from plasma collected from malaria patients but not healthy donors, in accordance with the increase in lipoprotein oxidation in malaria plasma. hGIIA sPLA₂ enzymatic activity on oxidized lipoproteins generates oxidized lipids (18). Antimalarial properties of native as well as oxidized lipids, especially PUFAs, has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (29, 30). Identification and quantification of the lysophospholipids and fatty acids produced upon hydrolysis of native lipoproteins by hGIIA sPLA₂ have been reported elsewhere by us and others (16, 18, 19), but as far as we know, no attempt has been made to identify lipids produced upon hydrolysis of malaria plasma lipoproteins by hGIIA sPLA₂.

We found concentrations of hGIIA sPLA₂ up to 9 nM in the plasma from a Vietnamese cohort of 41 patients with uncomplicated malaria. These concentrations are consistent with the previous study by Peter Vadas *et al* on Canadian adults with uncomplicated malaria (9), where the mean level of hGIIA sPLA₂ was 12.1 ± 4.8 nM (169.7 ± 67.3 ng/mL). However, in a subsequent study on Malawian children with severe malaria, the mean level of hGIIA sPLA₂ was found to be around 73 nM, with the most severe cases exhibiting levels higher than 100 nM (10). Furthermore, it should be considered that hGIIA sPLA₂ has high affinity for heparan sulfate proteoglycans lining the vascular endothelium (31, 32). Consequently, as shown in the study by Nakamura *et al.* (33) that measured sPLA₂ activity in blood collected from heparinized and non-heparinized patients, conventional collection without heparin pretreatment leaves behind numbers of hGIIA molecules, likely leading to an underestimation of the actual concentration of hGIIA in blood. With these data in mind, the 100 nM concentration of hGIIA sPLA₂ used in our *in vitro* experiments may not be so far from the concentration in the vascular compartment of malaria patients, especially in severe cases of malaria.

There is considerable evidence that hGIIA sPLA₂ is an important effector of the innate immune response (34, 35). The production of lipid mediators by sPLA₂s, as an integral component of the inflammatory reaction, plays a major role in protecting the host against invading pathogens. hGIIA sPLA₂ also plays a direct host defense role against bacteria. Its mode of action depends on whether bacteria are Gram-positive or Gram-negative and may be enhanced by cofactors such as complement or bactericidal/permeability-increasing (BPI) protein (36, 37). Bactericidal activity against Gram-positive bacteria requires enzymatic activity to degrade bacterial membranes (3, 38, 39), whereas activity against Gram-negative bacteria is more complex, resulting from the synergistic action between hGIIA and BPI produced by neutrophils (40). Beyond its role as an antibacterial host defense factor, we show here that hGIIA sPLA₂ might also exert a parasitocidal role based on an original mechanism involving degradation of lipoprotein particles in their oxidized state.

Concerning the other human sPLA₂s, we showed that exogenous hGIIF and hGX sPLA₂s are active against *Plasmodium* in plasma from malaria patients as well as healthy donors, in accordance with their ability to hydrolyze lipoproteins under native or oxidized states. These sPLA₂s were however not detected in the plasma of *P. falciparum*-infected or healthy subjects. In line with

their absence in serum, there is now considerable evidence that hGIIA sPLA₂ is strongly induced in the circulation under pathological conditions associated with inflammation, tissue injury or infection, while there is little evidence that other sPLA₂ isoforms are present in serum, except for hGIB (30, 41, 42, 43). Thus, it seems reasonable that sPLA₂s other than hGIIA exert their effects in diverse pathologies locally, within the microenvironment of the disease, and either in an autocrine or paracrine manner, as supported by studies on the role of hGIII and hGX sPLA₂s in cancer (44), or hGV and hGX sPLA₂s in cardiovascular diseases and asthma (45, 46, 47). It is also interesting to note that hGX sPLA₂ has been found in atherosclerotic plaques but not in the plasma of patients with coronary heart disease risk (48), suggesting that the enzyme is produced locally but not systemically.

Considering our data, we hypothesize that in *falciparum* malaria, sPLA₂s other than hGIIA might be expressed locally at sites of sequestration. Sequestration is defined by the adhesion of red blood cells infected by the mature stages of *P. falciparum* to the endothelium of capillary venules of various organs in the mammalian host. *P. falciparum* can sequester in brain, lung, liver, kidney and spleen. When the organ is brain, sequestration is thought to contribute to the neurological symptoms of the so-called cerebral malaria. It is tempting to speculate that human sPLA₂s are recruited to these microenvironments and act locally where parasitized erythrocytes are retained. Besides a direct action on parasitized blood cells, sPLA₂s might contribute to inflammation at these sites by releasing lipid mediators. This is supported by recent metabolomics analyses showing a positive association between lipid products of the PLA₂ pathway and brain swelling in pediatric cerebral malaria (15).

In summary, we have shown that the concomitant presence of high concentrations of hGIIA sPLA₂ and oxidation of lipoproteins, as found in the serum of malaria patients, might provide a new host defense mechanism against *P. falciparum*. The mechanism of action would be based on a synergistic effect between the enzyme and its capacity to hydrolyze oxidized lipoproteins serving as a preferred substrate to release toxic lipids for *Plasmodium*. Such a mechanism should now be demonstrated in *in vivo* studies using mouse models of malaria infection. By extrapolation, this mechanism might also be involved in other pathological conditions where both hGIIA sPLA₂ and oxidized lipoproteins are present, including atherosclerosis or other infection diseases.

MATERIALS AND METHODS

Materials — The FcB1 strain of *P. falciparum* (Columbia), from the Eukaryotic Unicellular Collection from the National Museum of Natural History (MNHN-CEU-224-PfFcB1), was used throughout the work. RPMI 1640 and Albumax II® were from Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Diff-Quick staining reagents were from Medion Diagnostics AG. The NEFA-C and the Phospholipid B kits, respectively used for quantitative determination of non-esterified fatty acids (NEFAs) and phospholipids measurement, were from WAKO Chemicals (Oxoid S.A., Dardilly, France). The oxidized LDL ELISA kit was from Mercodia SAS sales in France. Purified recombinant human sPLA₂s and the hGIII sPLA₂ domain were prepared as described (27, 49). The sPLA₂ inhibitor LY311727 [3-[[3-(2-Amino-2-oxoethyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1*H*-indol-5-yl]oxypropyl]-phosphonic acid] that targets hGIIA sPLA₂ catalytic site was from Sigma. Plasma and red blood cells from the O- or A+ blood groups were supplied by the French National Agency for Blood (Établissement Français du Sang (EFS)), convention reference: C CPSL UNT 13/EFS/126. High quality grade biochemical reagents were from Sigma.

Methods

***P. falciparum* cultivation** — In routine culture conditions, *P. falciparum* was grown in red blood cells from the A+ group at 2% haematocrit and 2-4% parasitaemia, in RPMI supplemented with 11 mM glucose, 27.5 mM NaHCO₃, 100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, adjusted to pH 7.4 (basic medium), supplemented with 8% heat-inactivated human A+ plasma (complete medium), according to the procedure of Trager and Jensen (50). When specified, the serum substitute Albumax II® (0.5% w/v final) was used in culture medium instead of heat-inactivated human plasma. Culture flasks were gassed with 91% N₂, 6% O₂ and 3% CO₂ before being incubated at 37°C. In those conditions, the intraerythrocytic cycle of the FcB1 strain was 48-h long. Parasitaemia (%) was established by optical examination of Diff-Quik-stained smears from the formula = [infected erythrocytes nb / total erythrocytes nb] × 100.

Purification of lipoproteins and oxidation — Non-fasted human plasma was split into aliquots and frozen at -20°C. One aliquot was thawed to prepare LDL and HDL by differential centrifugation, according to Havel et al. (51). Briefly, chylomicrons and VLDL were removed by a first round of centrifugation at 1.006 g/mL density, then LDL and

HDL were purified separately by successive centrifugations at 1.053 g/mL and 1.210 g/mL densities, respectively. Before use, total lipoproteins were purified by a single run of plasma at 1.210 g/mL density. Lipoproteins were dialyzed at 4°C against NaCl 9 g/L, then against RPMI, and sterilized by 0.2 µm filtration. Oxidation was achieved by storing lipoproteins in a transparent flask at room temperature under sterile air exchange for 14 days. Native lipoproteins were prepared from another aliquot of the plasma just prior assays. Experiments were performed within 1 week of lipoprotein storage at 4°C under N₂ in the dark. Phosphatidylcholine (PC) content of lipoproteins was measured by using the Phospholipid B dosage kit from WAKO Chemicals, according to the manufacturer's instructions.

Measurement of lipid oxidation in lipoproteins and plasma — The level of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) was determined as a marker of lipid peroxidation (52) in purified lipoproteins. Briefly, 150 µL of diluted sample containing 0.2% butylated hydroxytoluene was mixed with an equal volume of 0.25 N HCl containing 15% trichloroacetic acid and 0.4% thiobarbituric acid. The mixture was heated at 85°C for 15 minutes and then cooled on ice. 150 µL of butanol was added, the sample was vortexed, and then let stand on ice for phase separation to occur. The butanol phase was taken for TBARS determination at 515 nm excitation and 550 nm emission wavelengths on a spectrofluorometer (AMINCO-Bowman series 2). 1,1,3,3-tetraethoxypropane was used as an external standard. Three independent measurements with plasma lipoproteins from different donors were performed. Before oxidation, TBARS ranged between 0.30-0.50 and 0.05-0.15 nmoles of malondialdehyde (MDA)/mg of protein in LDL and HDL, respectively. After two weeks of air-light oxidation, TBARS concentration had raised to 1.50-2.50 (LDL) and 0.30-0.50 (HDL) nmoles of MDA/mg of protein. For comparison, TBARS in LDL and HDL purified from the serum of malaria cases were reported to be around 1.0 and 0.2 nmol/mg of protein, respectively (24).

Due to the presence in plasma of other substances than MDA susceptible to react with thiobarbituric acid, the level of lipoprotein oxidation in human plasma was determined by quantifying oxidized LDL using the Ox-LDL ELISA kit from Mercodia, a sandwich ELISA based on the mouse monoclonal antibody 4E6, which is directed against a conformational epitope in oxidized ApoB-100. The ELISA assay was performed according to the manufacturer's instructions.

Hydrolysis of lipoproteins and plasma by sPLA₂ — Native and oxidized LDL and HDL purified from the same batch of human plasma were adjusted to 1 mg phospholipid/mL in RPMI supplemented with 1 mM CaCl₂. They were incubated with and without recombinant sPLA₂ for various times at 37°C. sPLA₂s were used at different concentrations. hGIB was used at 100 nM (number of independent experiments, n = 4), hGIIA was used at 50, 100 and 250 nM (n = 7), hGIID was used at 100 and 200 nM (n = 2), hGIII was used at 200 and 250 nM (n = 2), hGIIF was used at 30 and 40 nM (n = 6), hGIII was used at 50 and 100 nM (n = 4), hGV was used at 10, 40 and 50 nM (n = 6), hGX was used at 5, 10 and 20 nM (n = 7), hGXIIA was used at 100 and 200 nM (n = 2). NEFAs were measured at different time points using the NEFA-C kit (WAKO) following manufacturer's instructions. Values were normalized by subtracting NEFAs measured from lipoproteins incubated without sPLA₂. Specific activity was deduced from the linear part of the curve [NEFA] = f (t).

To assess the ability of hGIIA and hGX sPLA₂s to hydrolyze phospholipids in plasma from *P. falciparum*-infected patients versus healthy donors, 1 mM final CaCl₂ was added to each plasma sample and then enzymes were added at 400 nM (hGIIA) and 8 nM (hGX) final concentration. Samples were incubated overnight at 37°C. Control for endogenous release of NEFAs was without added sPLA₂. NEFA content before and after incubation was determined using the NEFA-C kit, according to manufacturer's instructions.

Anti-Plasmodium activity assays with sPLA₂-hydrolyzed lipoproteins — The ability of human sPLA₂s to promote the toxicity of lipoproteins was tested in dose-response assays as described (16). Briefly, LDL and HDL (0.6 mg phospholipid/mL in RPMI) were incubated overnight at 37°C with 20 nM sPLA₂ or alone, then tested for parasite inhibition in RPMI 0.5% Albumax II® for 48h in normal culture conditions. Albumax II® instead of human plasma was used throughout the test to avoid any contribution of lipoproteins from human plasma. Incubations with each sPLA₂ added alone were also performed to check for lipoprotein-independent toxicity of sPLA₂s in these conditions. Assays dedicated to the anti-*Plasmodium* effect of lipoproteins pretreated with high concentrations of hGIIA sPLA₂ (100 nM and 250 nM) were performed similarly.

Human plasma collection in Vietnam — Venous whole blood samples were collected in Acid Citrate Dextrose (ACD) (BD, India) vacutainers from

patients attending commune health centers in the Binh Phuoc province, Viet Nam. Malaria positivity was evaluated by using the rapid diagnostic test OptiMAL-IT (DiaMed AG, Switzerland). All infected patients had *P. falciparum* malaria. The final study population included 41 individuals with malaria and 28 healthy donor controls from the same area. From the malaria-infected cohort, there were 33 men and 8 women, with an average age of 27.1 years (range 16-58 years).

Blood samples were centrifuged at $2,400 \times g$ for 5 min at room temperature and the plasma was immediately stored at -80°C . Plasma samples were then shipped to the Museum (Paris, France) where they were thawed on ice, aliquoted and stored at -80°C until use.

The study was approved by the Viet Nam People's Army Department of Military Medicine. The purpose of the study was explained to participants in their own language, and oral consent was obtained. Positive patients were treated with dihydroartemisinin-piperaquine combination in accordance with the national drug policy of Viet Nam.

Time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) — TR-FIA assays for hGIIA, hGIIF, hGV and hGX sPLA₂s in plasma were performed as described earlier (53). The assays use rabbit polyclonal anti-sPLA₂ antibodies to set up ELISA-like sandwiches, which were shown to be highly specific for each sPLA₂ isoform (54). hGIII sPLA₂ could not be measured, due to the lack of specificity of the corresponding immune serum.

Enzymatic assays on *E. coli* membranes — sPLA₂ activity in plasma was measured by hydrolysis of *E. coli* membranes radiolabeled with [³H]-oleic acid and autoclaved (Singer et al., 2002)). Briefly, 40 μL of radiolabeled *E. coli* membranes (100,000 dpm in activity buffer consisting of 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.1% BSA) were incubated with plasma (20 μL , diluted 1:150 in activity buffer) at 37°C for 30 minutes. Enzymatic assays were stopped by adding 80 μL of 0.1 M EDTA/0.2% fatty acid-free BSA. Reactions were spun down for 5 min at $10,000 \times g$, and the supernatant was collected and counted in a 1450 Microbeta counter (Wallac, Perkin Elmer).

***P. falciparum* cultivation in malaria plasma and related assays** — To analyze the anti-*Plasmodium* effect of endogenous sPLA₂ in plasma from infected people, the FcB1 strain was grown in red blood cells of the O- group, brought to 0.1-0.2% parasitaemia, washed and then transferred at 2% haematocrit into basic RPMI supplemented with 2.5

μM hypoxanthine and 1 mM CaCl₂ (RPMI-calcium). The cell suspension was distributed into wells of a 96-well microplate (100 μL /well) and then 8 μL of plasma from an infected donor or control normal plasma was added per well. To avoid thermal denaturation of the endogenous sPLA₂ (55), plasma samples were not heat-inactivated prior to parasite cultivation. The microplate was incubated in a candle jar for 96 h, then parasitaemia in each well was determined from Diff-Quik-stained smears.

To assess for parasite inhibition by exogenously added hGIIA sPLA₂, experiment was carried out as above, with recombinant hGIIA added at a concentration of 100 nM at the start of incubation. To evaluate the contribution of hGIIA catalytic activity, recombinant hGIIA sPLA₂ in its native (WT) or catalytically inactive form (H48Q mutant) (28), and/or the specific hGIIA inhibitor LY311727, were added to the culture at 100 nM (hGIIA WT and H48Q) and 10 μM (LY311727) at the start of incubation.

Statistical analysis — Data were analyzed using GraphPad InStat 3 software (San Diego, CA). Normality of groups with a n number superior to 6 was tested using the Shapiro-Wilk test. When sampling distribution was normal, the parametric unpaired or paired t-test with a two-tailed *P* value was applied. When sampling distribution was not normal and/or the n number was too small (≤ 6), the non-parametric Mann-Whitney U test for independent samples or the Wilcoxon matched-pair test for dependent samples were used. *P* values of <0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***) were considered statistically significant, very significant and extremely significant, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding. This work was supported by the ATM blanche 2016-2017 to C. Deregnaucourt from the National Museum of Natural History (Paris, France) and by grants to GL from CNRS, the National Research Agency (MNaïms ANR-17- CE17-0012-01) and the Fondation de la Recherche Médicale (DEQ20180339193).

REFERENCES

1. Grönroos JO, Laine VJO, Nevalainen TJ. 2002. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis* 185: 1767-1772.
2. Franson R, Dobrow R, Weiss J, Elsbach P, Weglicki WB. 1978. Isolation and characterization of a phospholipase A2 from inflammatory exudate. *J Lipid Res* 19: 18-23.
3. Weinrauch Y, Elsbach P, Madsen LM, Foreman A, Weiss J. 1996. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of

- a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. *J Clin Invest* 97: 250-257.
4. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Kahn F, Touqui L, Areschoug T. 2013. Secreted group IIA phospholipase A2 protects humans against the group B *Streptococcus*: experimental and clinical evidence. *J Infect Dis* 208: 2025-2035.
 5. Tan TL, Ahmad NS, Nasuruddin DN, Ithnin A, Tajul Arifin AK, Zaini IZ, Wan Nqah WZ. 2016. CD64 and group II secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as biomarkers for distinguishing adult sepsis and bacterial infections in the emergency department. *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0152065.
 6. Lambeau G, Gelb MH. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 77: 495-520.
 7. Burke JE, Dennis EA. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signalling. *J Lipid Res* 50: S237-S242.
 8. Murakami M, Kudo I. 2004. Secretory phospholipases A2. *Biol Pharm Bull* 27: 1158-1164.
 9. Vadas P, Keystone J, Stefanski E, Scott K, Pruzanski W. 1992. Induction of circulating group II phospholipase A2 expression in adults with malaria. *Infect Immun* 60: 3928-3931.
 10. Vadas P, Taylor TE, Chimsuku L, Goldring D, Stefanski E, Pruzanski W, Molyneux ME. 1993. Increased serum phospholipase A2 activity in Malawian children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 49: 455-459.
 11. Murakami M, Yamamoto M, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y. 2016. The Roles of the Secreted Phospholipase A2 Gene Family in Immunology. *Adv Immunol* 132: 91-134.
 12. Masuda S, Murakami M, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. 2005. Diverse cellular localizations of secretory phospholipases A2 enzymes in several human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1736: 200-210.
 13. Kim JO, Chakrabarti BK, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Ganesh L, Nabel GJ. 2007. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J Virol* 81: 1444-1450.
 14. Piris-Gimenez A, Paya M, Lambeau G, Chignard M, Mock M, Touqui L, Goossens PL. 2005. In vivo protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax. *J Immunol* 175: 6786-6791.
 15. Pappa V, Seydel K, Gupta S, Feintuch CM, Potchen MJ, Kampondeni S, Goldman-Yassen A, Veenstra M, Lopez L, Kim RS, Berman JW, Taylor T, Daily JP. 2015. Lipid metabolites of the phospholipase A2 pathway and inflammatory cytokines are associated with brain volume in paediatric cerebral malaria. *Malar J* 14:513.
 16. Guillaume C, Payré C, Jemel I, Jeamment L, Bezzine S, Naika GS, Bollinger J, Grellier P, Gelb MH, Schrével J, Lambeau G, Deregnacourt C. 2015. In vitro anti-*Plasmodium falciparum* properties of the full set of human secreted phospholipases A2. *Infect Immun* 83: 2453-65.
 17. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. 2016. Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167: 610-624.
 18. Pruzanski W, Stefanski E, de Beer FC, de Beer MC, Vadas P, Ravandi A, Kuksis A. 1998. Lipoproteins are substrates for human secretory group IIA phospholipase A2: preferential hydrolysis of acute phase HDL. *J Lipid Res* 39: 2150-2160.
 19. Pruzanski W, Lambeau G, Lazdunski M, Cho W, Kopilov J, Kuksis A. 2005. Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* 1736: 38-50.
 20. Korotaeva AA, SamoiloVA EV, Pirkova AA, Ameliushkina VA, Prokazova NV, Tkachuk VA, Chazov EI. 2009. Opposite effects of native and oxidized lipoproteins on the activity of secretory phospholipase A(2) group IIA. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 90: 37-41.
 21. Korotaeva AA, SamoiloVA EV, Piksina GF, Prokazova NV. 2010. Oxidized phosphatidylcholine stimulates activity of secretory phospholipase A2 group IIA and abolishes sphingomyelin-induced inhibition of the enzyme. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91: 38-41.
 22. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45: 1169-1196.
 23. Jairam V, Uchida K, Narayanaswami V. 2012. Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. *In Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, "Lipoproteins - Role in Health and Diseases"*, book edited by Sasa Frank and Gerhard Kostner, ISBN 978-953-51-0773-6.
 24. Sibmooh N, Yamanont P, Krudsood S, Leowattana W, Brittenham G, Loareesuwan S, Udomsangpetch R. 2004. Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids Health Dis* 3: 15.
 25. Krishna AP, Chandrika, Kumar S, Acharya M, Patil SL. 2009. Variation in common lipid parameters in malaria infected patients. *Indian J Physiol Pharmacol* 53: 271-274.
 26. Visser BJ, de Vries SG, Vingerling R, Gritter M, Kroon D, Aguilar LC, Kraan RBJ, Wieten RW, Danion F, Sjouke B, Adegnika AA, Agnandji ST, Kremsner PG, Hänscheid T, Mens PF, van Vugt M, Grobusch MP. 2017. Serum Lipids and Lipoproteins During Uncomplicated Malaria: A Cohort Study in Lambaréné, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 96: 1205-1214.
 27. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem* 277: 48535-48549.
 28. Edwards SH, Thompson D, Baker SF, Wood SP, Wilton DC. 2002. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* 41: 15468-76.
 29. Krugliak M, Deharo E, Shalmiev G, Sauvain M, Moretti C, Ginsburg H. 1995. Antimalarial effects of C18 fatty acids on *Plasmodium falciparum* in culture and on *Plasmodium vinckei petteri* and *Plasmodium yoelii nigeriensis* in vivo. *Exp Parasitol* 81: 97-105.
 30. Kumaratilake LM, Robinson BS, Ferrante A, Poulos A. 1992. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on

Plasmodium falciparum and in vivo effects on *P. berghei*.
J Clin Invest 89: 961-967.

31. Sartipy P, Johansen B, Gasvik K, Hurt-Camejo E. 2000. Molecular basis for the association of group IIA phospholipase A2 and decorin in human atherosclerotic lesions. Circ Res 86: 707-714.
32. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I. 1999. Functional association of type IIA secretory phospholipase A2 with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. J Biol Chem 274: 29927-29936.
33. Nakamura H, Kim DK, Philbin DM, Peterson MB, Debros F, Koski G, Bonventre JV. 1995. Heparin-enhanced plasma phospholipase A2 activity and prostacyclin synthesis in patients undergoing cardiac surgery. J Clin Invest 95: 1062-1070.
34. Ibeas E, Fuentes L, Martín R, Hernández M, Nieto ML. 2009. Secreted phospholipase A2 type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. Cardiovasc Res 81: 54-63.
35. Menschikowski M, Hagelgans A, Siegert G. 2006. Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? Prostaglandins Other Lipid Mediat 79: 1-33.
36. Weiss JP. 2015. Molecular determinants of bacterial sensitivity and resistance to mammalian group IIA phospholipase A2. Biochim Biophys Acta 1848: 3072-3077.
37. Suwa Y, Kudo I, Imaizumi A, Okada M, Kamimura T, Suzuki Y, Wook Chang H, Hara S, Inoue K. 1990. Proteinaceous inhibitors of phospholipase A2 purified from inflammatory sites in rats (complement/lipocortin/inflammation/glucocorticoid). Proc Natl Acad Sci USA 87: 2395-2399.
38. Harwig SSL, Tan L, Qu XD, Cho Y, Eisenhauer PB, Lehrer RI. 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. J Clin Invest 95: 603-610.
39. Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J. 1999. Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. J Clin Invest 103: 715-721.
40. Weiss J, Inada M, Elsbach P, Crowl RM. 1994. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 269: 26331-26337.
41. Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. 2015. A new era of secreted phospholipase A2. J Lipid Res 56: 1248-1261.
42. Aufenanger J, Samman M, Quintel M, Fassbender K, Zimmer W, Bertsch T. 2002. Pancreatic phospholipase A2 activity in acute pancreatitis: a prognostic marker for early identification of patients at risk. Clin Chem Lab Med 40: 293-297.
43. Funakoshi A, Yamada Y, Migita Y, Wakasugi H. 1993. Simultaneous determinations of pancreatic phospholipase A2 and pro-phospholipase A2 in various pancreatic diseases. Dig Dis Sci 38: 502-506.
44. Brglez V, Lambeau G, Petan T. 2014. Secreted phospholipases A2 in cancer: diverse mechanisms of action. Biochimie. 107: 114-123.
45. Karabina SA, Gora S, Atout R, Ninio E. 2010. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. Biochimie. 92: 594-600.
46. Henderson WR Jr, Ye X, Lai Y, Ni Z, Bollinger JG, Tien YT, Chi EY, Gelb MH. 2013. Key role of group v secreted phospholipase A2 in Th2 cytokine and dendritic cell-driven airway hyperresponsiveness and remodeling. PLoS One. 8: e56172.
47. Hallstrand TS, Lai Y, Ni Z, Oslund RC, Henderson WR Jr, Gelb MH, Wenzel SE. 2011. Relationship between levels of secreted phospholipase A2 groups IIA and X in the airways and asthma severity. Clin Exp Allergy 41: 801-810.
48. Karabina SA, Brocheriou I, Le Naour G, Agrapart M, Durand H, Gelb M, Lambeau G, Ninio E. 2006. Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. Faseb J. 20: 2547-2549.
49. Sin BA, Akdis M, Zumkehr J, Bezzine S, Bekpen C, Lambeau G, Akdis CA. 2011. T-cell and antibody responses to phospholipase A2 from different species show distinct cross-reactivity patterns. Allergy 66: 1513-1521.
50. Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675.
51. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 34: 1345-1353.
52. Asakawa T, Matushita S. 1980. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide. Lipids 15:134-140.
53. Nevalainen TJ, Eerola LI, Rintala E, Laine VJO, Lambeau G, Gelb MH. 2005. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. Biochim Biophys Acta 1733: 210-223.
54. Degousee N, Ghomashchi F, Stefanski E, Singer A, Smart BP, Borregaard N, Reithmeier R, Lindsday TF, Lichtenberger C, Reinisch W, Lambeau G, Arm J, Tischfield J, Gelb MH, Rubin BB. 2002. Groups IV, V, and X phospholipases A2 in human neutrophils. Role in eicosanoid production and Gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. J Biol Chem 277: 5061-5073.
55. Grönroos JO, Salonen JH, Viander M, Nevalainen TJ, Laine VJO. 2005. Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. Scand J Immunol 62:413-419.

TABLE 1. Specific activities of sPLA₂s on lipoproteins.

Specific activities ($\mu\text{mole NEFA} / \text{min} \times \text{mg sPLA}_2$)											
sPLA ₂	n	Oxidized		Native		Fold-change		P values		P values	
		LDL	HDL	LDL	HDL	(oxidized/native)		oxidized vs native		LDL vs HDL	
		LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL	native	oxidized
hGIB	4	0.06 ± 0.03	0.45 ± 0.39	0.05 ± 0.02	0.25 ± 0.22	1.2	1.8	0.1133	0.1250	0.0625	0.0625
hGIIA	7	0.16 ± 0.09	0.10 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.03	8.0	3.3	0.0156*	0.0313*	0.5982	0.0156*
hGIID	2	0.04	0.03	0.03	0.04	-	-	-	-	-	-
hGIIIE	2	0.03	0.02	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-
hGIIF	6	1.04 ± 0.28	1.56 ± 0.64	0.74 ± 0.21	1.58 ± 0.59	1.4	1.0	0.0313*	0.8438	0.0139*	0.1563
hGIIL	4	4.29 ± 3.84	0.82 ± 0.51	6.29 ± 5.37	1.06 ± 0.70	0.7	0.7	0.2297	0.0961	0.0447*	0.0931
hGV	6	0.99 ± 0.37	3.27 ± 2.57	1.05 ± 0.44	3.88 ± 2.20	0.9	0.8	0.8438	0.1563	0.0313*	0.0625
hGX	7	2.66 ± 1.27	5.31 ± 2.12	2.58 ± 1.60	7.92 ± 5.08	1.0	0.6	0.6875	0.1094	0.2188	0.0313*
hGXIIA	2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	-	-	-	-	-	-

Values are mean \pm SD ($\mu\text{mole NEFA} / \text{min} \times \text{mg sPLA}_2$). For statistical analysis, the nonparametric Wilcoxon matched-pair test was used. * $P < 0.05$. n, number of independent experiments. (-): not determined.

TABLE 2. Anti-*P. falciparum* activities of sPLA₂-hydrolyzed lipoproteins

	Oxidized lipoproteins			Native lipoproteins			
	IC ₅₀ (µg PC/mL)		P value	IC ₅₀ (µg PC/mL)		P value	
Pre-treatment with 20 nM sPLA ₂	LDL	HDL	Oxidized LDL vs oxidized HDL	LDL	HDL	LDL (oxidized vs native)	HDL (oxidized vs native)
none	220.1 ± 61.7	> 250.0	-	> 250.0	> 250.0	-	-
hGIB	207.5 ± 59.5	185.2 ± 56.6	-	> 250.0	> 250.0	-	-
hGIIA	220.7 ± 59.3	> 250.0	-	> 250.0	> 250.0	-	-
hGIID	222.3 ± 60.6	> 250.0	-	226.6 ± 40.7	> 250.0	-	-
hGII E	224.7 ± 54.8	> 250.0	-	> 250.0	238.7 ± 43.3	-	-
hGIIF	151.4 ± 49.7	147.6 ± 49.7	0.8447	190.0 ± 89.5	157.4 ± 68.9	0.3970	0.4375
hGIII	166.4 ± 63.1	196.8 ± 77.5	0.0209 *	115.0 ± 43.9	210.2 ± 99.9	0.0498 *	0.6747
hGV	195.6 ± 67.9	141.6 ± 45.5	0.0089 **	241.6 ± 133.8	181.2 ± 84.5	0.2604	0.1198
hGX	101.8 ± 16.5	75.6 ± 11.2	0.0355 *	111.6 ± 37.3	81.8 ± 13.3	0.5155	0.4294
hGXIIA	228.2 ± 54.1	≥ 250.0	-	> 250.0	≥ 250.0	-	-

Values are mean ± SD of 5 independent experiments. For statistical analysis, the nonparametric Wilcoxon matched pairs test was applied, with: **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. (-): not determined.

TABLE 3. Anti-*Plasmodium* activities of LDL and HDL pretreated with hGIIA sPLA₂

Anti- <i>Plasmodium</i> activities of LDL and HDL IC ₅₀ values (µg PC/mL)				
Pretreatment hGIIA sPLA ₂ (nM)	Native LDL	Oxidized LDL	Native HDL	Oxidized HDL
None	> 250	220.1 ± 61.7	> 250	> 250
100	± 250	162.3 ± 22.4	> 250	> 250
250	215.3 ± 26.4	87.0 ± 39.2	216.6 ± 23.5	87.3 ± 9.2

Values are mean ± SD of 3 independent experiments

Table 4. Anti-*P. falciparum* activities of sPLA₂s in the presence of native or oxidized total lipoprotein fraction

Anti- <i>P. falciparum</i> activities of sPLA ₂ s				
IC ₅₀ values (nM)				
Total lipoproteins	hGIIA	hGIIF	hGV	hGX
w/o	> 250.0	> 50.0	> 80.0	> 3.0
native	> 250.0	19.8 ± 13.3	21.9 ± 3.3	1.52 ± 0.74
oxidized	150.0 ± 40.8	4.3 ± 4.0	10.2 ± 2.7	0.78 ± 0.26

Values are mean ± SD of 4 independent parasite growth inhibition assays. The lipoprotein fraction was 0.2 mg PC /mL in culture medium.

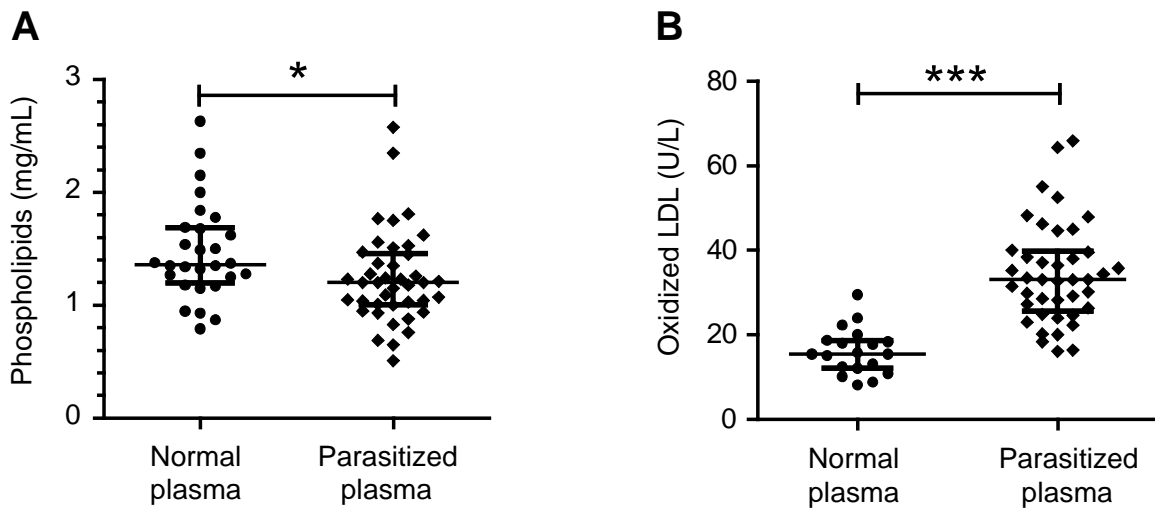


Figure 1. Phospholipid content and LDL oxidation in malaria plasma. Malaria (n = 41) and healthy (n = 28 for phospholipid analysis, n = 19 for oxidation analysis) plasma samples were analyzed for **(A)** phospholipid content using the phospholipid B-kit from WAKO Chemicals, and **(B)** lipoprotein oxidation using the Ox-LDL kit (Merckodia), following manufacturers' instructions. Median with IQR is shown. The Mann-Whitney test was applied; **P* < 0.05 and ****P* < 0.001.

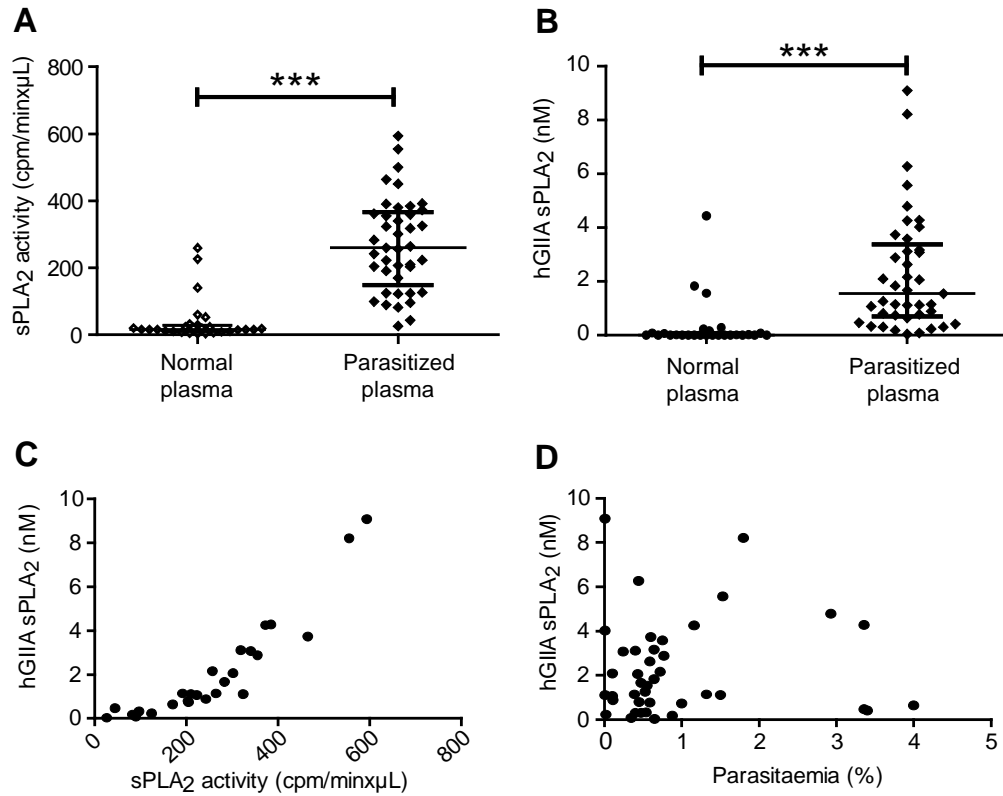


Figure 2. Secreted PLA₂ activity and hGIIA sPLA₂ concentration are increased in malaria plasma. Plasma from 41 *P. falciparum*-parasitized patients (parasitized plasma) and 28 non-parasitized healthy donors (normal plasma) were analyzed for (A) sPLA₂ activity using the ³H-oleate *E. coli* membrane assay; (B) hGIIA sPLA₂ content by quantitative TR-FIA using hGIIA-specific antibodies. Median with interquartile range (IQR) is shown. The non-parametric Mann-Whitney U test for independent samples was applied, ****P* < 0.0001. (C): correlation between plasma hGIIA sPLA₂ concentration and plasma sPLA₂ enzymatic activity (Spearman *r* = 0.9542; ****P* < 0.0001). (D): correlation between plasma hGIIA sPLA₂ concentration and parasitaemia from donors (Spearman *r* = 0.06894; ns).

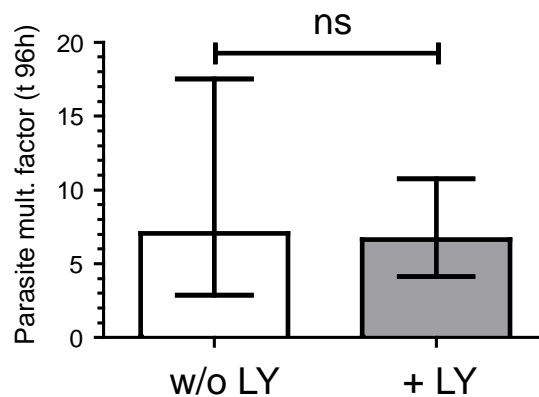


Figure 3. Inhibition of endogenous hGIIA sPLA₂ does not impact *P. falciparum* development in malaria plasma. Parasite was grown in RPMI supplemented with 8% plasma from infected patients, in the absence (w/o LY) or presence (+ LY) of 10 µM LY311727, a specific inhibitor of hGIIA sPLA₂. Parasitaemia was determined from Diff-Quik-stained smears before and after 96 h (i.e. two intraerythrocytic cycles) of incubation in culture conditions. Multiplication factor was established according to parasitaemia at time zero of incubation. Plasma samples from 20 malaria patients were tested. Values are median with IQR. Statistical significance was assessed by using the Wilcoxon signed rank test.; ns = non-significant, *P* = 0.1550.

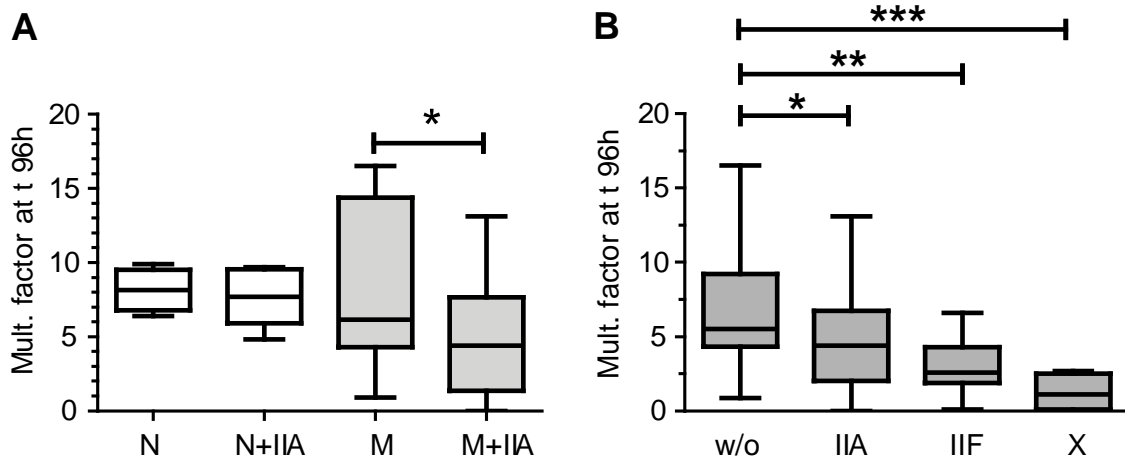


Figure 4. A) Exogenous hGIIA inhibits *P. falciparum* in malaria but not normal plasma. *P. falciparum* was grown for two intraerythrocytic cycles (96 h) in RPMI containing 8% malaria (M) or normal plasma (N) in the presence (+IIA) or absence of 100 nM recombinant hGIIA sPLA₂. Parasitaemia at time zero and 96 h was established from Giemsa-stained smears. Multiplication factor was expressed as Parasitaemia_{t96h} / Parasitaemia_{t0h}. Experiment was performed with 8 normal uninfected and 10 malaria plasma samples. Paired t test was applied, with **P* < 0.05. **B) hGIIIF and hGX sPLA₂s are inhibitory to *P. falciparum* in malaria plasma.** Parasites were grown for 96 h in RPMI containing 8% malaria plasma supplemented with either 100 nM hGIIA (IIA), 10 nM hGIIIF (IIF), 0.5 nM hGX (X), or without sPLA₂ (w/o). Experiment was performed with 14 (w/o, hGIIA) and 11 (hGIIIF, hGX) malaria plasma samples. The nonparametric Wilcoxon signed rank test was applied for statistical analysis. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

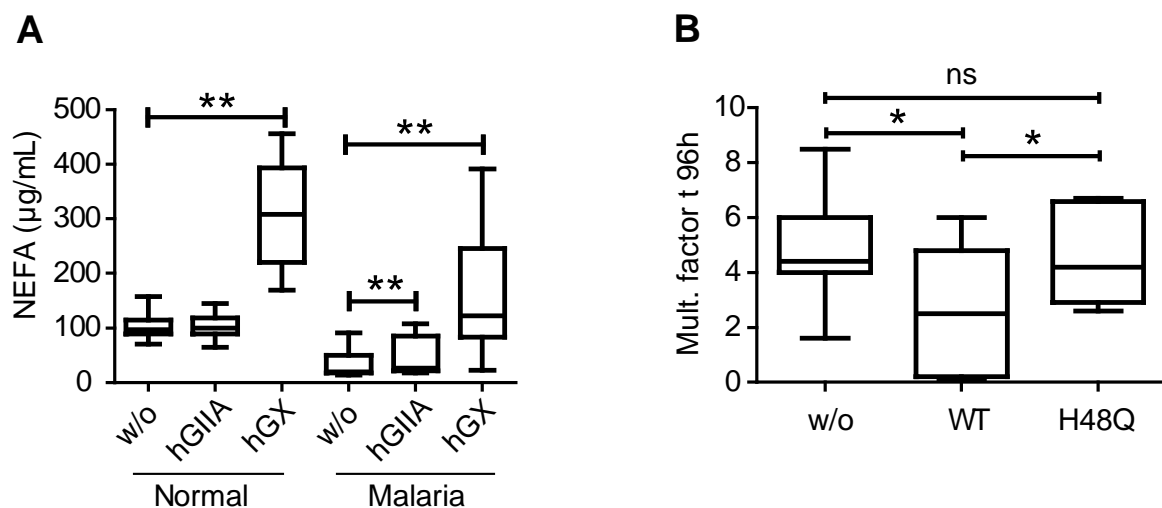


Figure 5. A) Exogenous hGIIA sPLA₂ hydrolyzes phospholipids from malaria but not normal plasma. Plasma from parasitized (n = 11, **Malaria**) and non-parasitized, non-ill subjects (n = 10, **Normal**) were incubated at 37°C for 18 h with 400 nM hGIIA sPLA₂ (hGIIA) or 8 nM hGX sPLA₂ (hGX), or without sPLA₂ (w/o). NEFA content (µg/µL of plasma) before and after incubation was measured by using the NEFA-C kit. NEFA release was established by subtracting NEFAs at time zero of incubation from NEFAs after 18 h incubation. For statistical analysis, the non-parametric Wilcoxon signed rank test was applied. ***P* < 0.01. **B) Parasite inhibition by hGIIA sPLA₂ depends on its catalytic activity.** *P. falciparum* was tested for growth in 7 malaria plasma samples supplemented with 100 nM hGIIA sPLA₂, either WT (WT) or catalytically-inactive (H48Q mutant). Growth control was without sPLA₂ (w/o). Multiplication factor after 96 h of incubation in culture conditions was established from parasitaemia at time zero and 96 h of incubation. For statistical analysis, paired t test was applied. **P* < 0.05, ns = *P* > 0.05.

**ANNEXE 2 : NUMERATION DES GR/ μ L DE SANG, HEMATORITE ET VOLUME GLOBULAIRE MOYEN AU COURS DE
L'INFECTION (HEMATOGRAMME)**

J post-inoculation	TG-				TG+			
	0	7	13	15	0	7	12	15
Nb de souris analysées	6	5	5	5	6	3	4	3
GR (10⁶/μL)	10,67 \pm 0,59 (10,51)	10,39 \pm 0,71 (10,71)	4,76 \pm 0,51 (4,5)	2,64 \pm 1,02 (2,59)	9,72 \pm 0,54 (9,72)	9,57 \pm 0,35 (9,49)	6,35 \pm 0,77 (6,25)	2,36 \pm 0,96 (2,25)
HCT (%)	47,27 \pm 2,33 (47,4)	45,5 \pm 2,23 (46,3)	17,40 \pm 2,12 (17,7)	25,30 \pm 7,92 (26,6)	45,15 \pm 1,86 (45,4)	44,07 \pm 1,42 (43,8)	22,63 \pm 2,80 (22,6)	17,67 \pm 3,06 (17,0)
VGM (ou MCV) (fL)	44,30 \pm 0,78 (44,25)	43,82 \pm 1,34 (43,6)	50,84 \pm 2,20 (49,7)	72,50 \pm 3,81 (72,00)	46,47 \pm 0,85 (46,8)	46,07 \pm 0,23 (46,2)	53,25 \pm 2,12 (53,2)	82,83 \pm 8,50 (81,30)
RDW-CV (%)	21,45 \pm 0,96 (21,65)	21,24 \pm 0,76 (21,3)	19,78 \pm 1,90 (19,8)	-	20,97 \pm 0,40 (20,85)	21,80 \pm 0,95 (22,3)	21,95 \pm 3,05 (22,8)	-
HGB	15,33 \pm 0,70 15,55	14,96 \pm 0,75 (15,1)	4,76 \pm 0,51 (4,45)	6,10 \pm 1,44 (5,90)	14,68 \pm 0,86 14,85	14,50 \pm 0,56 (14,4)	6,35 \pm 0,77 (6,25)	4,23 \pm 0,84 (3,80)

Les valeurs sont présentées sous la forme : moyenne \pm SD (médiane). Le tiret « - » indique une valeur non déterminée par la machine.

GR = globules rouges

HCT= hématocrite

VGM (ou MCV) = volume globulaire moyen (en fL)

RDW-CV (en %) = pourcentage de globules rouges de taille anormal

HGB = hémoglobine

ANNEXE 3 : CARACTERISATION DES ERYTHROCYTES ET RETICULOCYTES

Analyse sur frottis sanguin coloré au Diff-Quik™

	TG+ J0						TG+ J7					TG+ J12					TG+ J15				
N° souris	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5		1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14		1.15	1.16	1.17		
Distribution	norm	norm	norm	augm	augm		norm	norm	norm	norm	norm	dim	dim	dim	dim		dim	dim	dim		
PKP	+	+	+	++	++		++++	+	+	+++	+	++++	+++	++++	?		++++	++++	++++		
EA (érythroblastes)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0		++++	+	+++		
SCH (schizocytes)	0	0	0	0	0		+	rare	0	0	0	0	0	0	0		+	0	0		
CHJ (corps de Howell-Jolly)	rare	rare	0	++	rare		++	++	++	+	+	+	0	0	0		+++	+++	+++		
Sphérocytes								-	-	-		-	-	-	-		-	-	?		
	TG- J0						TG- J7					TG- J13					TG- J15				
N° souris	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	2.10	2.11	2.12	2.13	2.14	2.15	2.16	2.17	2.18	2.19	2.20	2.21
Distribution	norm	norm	augm	augm	augm	augm	norm	norm	norm	norm	norm	dim	dim	dim	dim	dim	dim	dim	dim	dim	dim
PKP	+	++	+	++	+++	+++	++	++++	++	+	+	?	++++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++
EA (érythroblastes)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++	+	0	0	0	+	0	0	+
SCH (schizocytes)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHJ (corps d'Howell-Jolly)	rare	rare	rare	rare	+	rare	rare	+++	+	0	rare	0	0	0	0	0	+++	++	+++	0	+++
Sphérocytes												-	-	-			-	?	?	?	?

Distribution = densité des globules rouges sur le frottis. La distribution des érythrocytes est évaluée dans la couche mince du frottis sanguin. Dans cette zone, les érythrocytes sont le plus souvent disposés isolément et il est plus facile d'estimer leur densité. Chez un animal qui présente une anémie modérée ou sévère, comparé à un animal sain, la densité des érythrocytes de la couche mince apparaît en général nettement diminuée (plus d'espace entre les cellules). Norm : normale ; augm : augmentée ; dim : diminuée.

PKP : polychromatophilie = indice de la richesse en réticulocytes, plus bleus. Des macrocytes (érythrocytes de taille augmentée) s'observent typiquement lors d'anémie régénérative en raison de la présence de polychromatophiles dont le volume cellulaire est supérieur à celui des érythrocytes matures. Les polychromatophiles sont reconnaissables à leur couleur légèrement basophile qui s'explique par la présence de ribosomes qui se colorent en bleu.

Schizocyte = critère de forme des érythrocytes. Les schizocytes sont des érythrocytes de morphologie fortement altérée ; ils apparaissent comme des fragments d'érythrocytes aux extrémités pointues. La présence de schizocytes sur un frottis sanguin évoque tout d'abord une hémolyse mécanique qui peut être l'expression d'une microangiopathie thrombotique.

Sphérocytes = Les sphérocytes sont des érythrocytes de petit diamètre qui apparaissent plus foncés et sans pâleur centrale, comparés aux érythrocytes matures.

Corps d'Howell-Jolly = ce sont des fragments de noyau qui n'ont pas été éliminés des érythrocytes. Ils sont rencontrés lors d'anémie régénérative ou de splénectomie. Ils sont aussi observés à l'état normal, en faible pourcentage.

Erythroblastes = Les érythroblastes sont des GR nucléés qui représentent des stades immatures d'érythrocytes. En général, ils sont libérés par la moelle osseuse lors d'un important effort de régénération chez un animal anémique. Toutefois, ils peuvent également indiquer un trouble de la moelle osseuse ou un désordre splénique.

ANNEXE 4 : DISTRIBUTION DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES AU COURS DE L'INFECTION

J post-inoculation	TG+ J0						TG+ J7					TG+ J12					TG+ J15				
N° souris	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5		1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14		1.15	1.16	1.17		
Neutrophiles (%)	60	31	57	41	49		50	57	60	53	45	63	62	64	64		41	51	53		
Lymphocytes (%)	32	57	37	50	43		35	27	29	31	31	22	35	28	31		55	46	39		
Monocytes (%)	4	6	4	6	4		11	12	9	11	16	13	2	8	4		3	3	6		
Eosinophiles (%)	4	6	2	3	4		4	4	2	5	8	2	1	0	1		1	0	2		
Basophiles (%)	0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0		
J post-inoculation	TG- J0						TG- J7					TG- J13					TG- J15				
N° souris	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	2.10	2.11	2.12	2.13	2.14	2.15	2.16	2.17	2.18	2.19	2.20	2.21
Neutrophiles (%)	9	9	21	22	8	15	23	33	27	30	37	13	22	36	32	44	13	14	4	15	18
Lymphocytes (%)	85	87	67	70	87	74	70	58	63	57	57	86	74	60	58	46	85	82	90	79	79
Monocytes (%)	3	1	4	5	5	6	4	9	9	11	8	1	4	4	10	10	1	4	6	5	3
Eosinophiles (%)	3	3	8	3	0	5	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Basophiles (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ANNEXE 5 : VALORISATION DES RESULTATS, MISSIONNARIAT ET FORMATIONS

Publications

Christiane Deregnacourt, **Mélanie Dacheux**, Veronique Sinou, Christine Payre, Daniel Parzy, Philippe Grellier, Gérard Lambeau. « Concerted action of human secreted group IIA phospholipase A2 and oxidized lipoproteins inhibits the *in vitro* growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* ». **Soumis le 14 juillet 2018** à Infection and Immunity.

Mélanie Dacheux, Soraya Chaouch, Amandine Labat, Philippe Grellier, Lhousseine Touqui, Christine Payré, Gérard Lambeau, Christiane Deregnacourt. « *In vivo* antimalarial activity of human group IIA phospholipase A2 in a transgenic mouse model of malaria ». **Manuscrit en preparation.**

Congrès

Présentations orales :

Mélanie Dacheux, Soraya Chaouch, Grégory Jouvion, Christine Payré, Amandine Labat, David Hardy, Lhousseine Touqui, Philippe Grellier, Gérard Lambeau et Christiane Deregnacourt. « Anti-*Plasmodium* activity of human group IIA phospholipase A2 in a transgenic mouse model of malaria ». 29/03 au 31/03/2018. **Bioactive lipids conference**, Athènes, Grèce.

Mélanie Dacheux, Soraya Chaouch, Amandine Labat, Lhousseine Touqui, Philippe Grellier, Gérard Lambeau, Christiane Deregnacourt. « Potential involvement of human secreted group IIA phospholipase A2 in malaria ». 06/03 au 10/03/2018. **5th Young Natural History Scientists' Meeting**, Paris, France.

Mélanie Dacheux, Soraya Chaouch, Amandine Labat, Lhousseine Touqui, Philippe Grellier, Gérard Lambeau, Christiane Deregnacourt. « Interactions hôte/parasite : rôle des phospholipases A2 sécrétées dans le paludisme ». 30/11/2017. **Journée départementale MCAM**, MNHN. Paris, France.

Mélanie Dacheux, Gérard Lambeau, Christine Payré, Philippe Grellier, Lhousseine Touqui, Christiane Deregnacourt. « On the role of human group IIA phospholipase A2 in malaria: from *in vitro* to *in vivo* mouse studies ». 23/10 au 26/10/2016. **12th GERLI international Lipidomics meeting « Microbe and host lipids »**, Toulouse, France.

Posters :

Mélanie Dacheux, Gérard Lambeau, Christine Payré, Philippe Grellier, Lhousseine Touqui, Christiane Deregnacourt. « On the role of human group IIA phospholipase A2 in malaria: from *in vitro* to *in vivo* mouse studies ». 23/10 au 26/10/2016. **12th GERLI international Lipidomics meeting « Microbe and host lipids »**, Toulouse, France.

Mélanie Dacheux, Gérard Lambeau, Christine Payré, Philippe Grellier, Lhousseine Touqui, Christiane Deregnacourt. « On the role of human group IIA phospholipase A2 in malaria: from *in vitro* to *in vivo* mouse studies ». 09/06 au 10/06/2016. **2nd Microorganism Conference, UPMC/MNHN**. Paris, France.

Missionnariat

Enseignement :

« **TP ARN d'interférence** », niveau Master 2. Responsables : Linda KOHL (MNHN) & Serge BONNEFOY (Institut Pasteur Paris). 96 heures.

Rendez-vous de la science : « **La science en cuisine** », niveau 6^{ème}, 5^{ème}, 3^{ème} et 2^{nde}. 36 heures.

Rendez-vous de la science « **Quelle roche pour ta maison ?** », niveau 5^{ème}. 28 heures.

Diffusion scientifique :

Administratrice du forum « **Biologie Cellulaire et Moléculaire** » du MNHN. 20 heures.

Rédaction des articles de vulgarisation scientifique (à destination des enseignants du secondaire) : (60 heures)

- **La transgénèse Bt**
- **Les microorganismes dans l'alimentation**
- **Faire produire des médicaments par les bactéries**

Formation

« **Career Development for Doctors of Natural Science** ». 12/06 au 22/06/2017. MNHN. Responsable : Jill BARGIEL.

« **Formation niveau I : Expérimentation animale, éthique et bien-traitance** ». 06/03 au 17/03/2017. Université Pierre et Marie Curie, Paris. Responsable : Brigitte RAULT.

« **Imagerie numérique – Initiation au logiciel ImageJ/FIJI** ». 01/02/2017. MNHN. Responsable : Patricia WILS.

« **Module R** ». 14/03 au 16/03/2016. MNHN. Responsables : Jérôme SUEUR et Loic PONGER.

« **Rédiger un article scientifique en sciences de la vie** ». 08/02 au 12/02/2016. MNHN. Responsable : Vincent DEBAT.

« **Toulouse School of Lipid 2016** ». 27/01 au 29/01/2016. Faculté de Médecine de Rangueil, Toulouse. Responsables : Justine BERTRAND-MICHEL et Bernard PAYRASTRE.

« **Mythes et réalités : les grands singes** ». 17/12 au 18/12/2015. MNHN. Responsable : Florence GOUDENECHÉ.

« **Les expéditions scientifiques : un support pour articuler la démarche d'investigation et les compétences du socle** ». 25/11 au 27/11/2015. MNHN. Responsables : Alexandra MOREIRA et Natacha OUVRIE.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Achtman A.H., Khan M., MacLennan I.C., Langhorne J. Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice induces strong B cell responses and striking but temporary changes in splenic cell distribution. *J Immunol* 2003;171:317-324.
- Agudelo O., Bueno J., Villa A., Maestre A. High IFN-gamma and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of Plasmodium falciparum. *Malaria Journal* 2012;11:38-38.
- Ait-Oufella H., Herbin O., Lahoute C., Coatrieux C., Loyer X., Joffre J., Laurans L., Ramkhalawon B., Blanc-Brude O., Karabina S., Girard C.A., Payre C., Yamamoto K., Binder C.J., Murakami M., Tedgui A., Lambeau G., Mallat Z. Group X secreted phospholipase A2 limits the development of atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:466-473.
- Akdis C.A., Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J.* 1999;13:603-609.
- Alister G.C., Mohd Fadzli Mustaffa K., Pradeep R.P. Cytoadherence and Severe Malaria. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS* 2012;19:5-18.
- Alves H.J., Weidanz W., Weiss L. The spleen in murine Plasmodium chabaudi adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:370-378.
- Ancian P., Lambeau G., Mattéi M.-G., Lazdunski M. The Human 180-kDa Receptor for Secretory Phospholipases A2: Molecular cloning, identification of secreted soluble form, and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:8963-8970.
- Angulo I., Fresno M. Cytokines in the Pathogenesis of and Protection against Malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:1145-1152.
- Anstey N.M., Handojo T., Pain M.C., Kenangalem E., Tjitra E., Price R.N., Maguire G.P. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 2007;195:589-596.
- Artavanis-Tsakonas K., Eleme K., McQueen K.L., Cheng N.W., Parham P., Davis D.M., Riley E.M. Activation of a Subset of Human NK Cells upon Contact with Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology* 2003;171:5396-5405.
- Asaoka Y., Yoshida K., Sasaki Y., Nishizuka Y., Murakami M., Kudo I., Inoue K. Possible role of mammalian secretory group II phospholipase A2 in T-lymphocyte activation: implication in propagation of inflammatory reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:716-719.
- Astagneau P., Roberts J.M., Steketee R.W., Wirima J.J., Lepers J.-P., Deloron P. Antibodies to a Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigen as a Tool for Predicting the Protection Levels of Two Malaria-Exposed Populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995;53:23-28.
- Atsumi G.-i., Murakami M., Kojima K., Hadano A., Tajima M., Kudo I. Distinct Roles of Two Intracellular Phospholipase A2s in Fatty Acid Release in the Cell Death Pathway: PROTEOLYTIC FRAGMENT OF TYPE IVA CYTOSOLIC PHOSPHOLIPASE A2 alpha INHIBITS STIMULUS-INDUCED ARACHIDONATE RELEASE, WHEREAS THAT OF TYPE VI Ca²⁺-INDEPENDENT PHOSPHOLIPASE A2 AUGMENTS SPONTANEOUS FATTY ACID RELEASE. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:18248-18258.
- Augert A., Payré C., de Launoit Y., Gil J., Lambeau G., Bernard D. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Reports* 2009;10:271-277.
- Baird J.K. Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute Plasmodium vivax Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26:36-57.
- Baird J.K. Pernicious and Threatening Plasmodium vivax as Reality. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2014;91:1-2.
- Baker D.A. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2010;172:57-65.
- Baker V.S., Imade G.E., Molta N.B., Tawde P., Pam S.D., Obadofin M.O., Sagay S.A., Egah D.Z., Iya D., Afolabi B.B., Baker M., Ford K., Ford R., Roux K.H., Keller T.C.S. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malaria Journal* 2008;7.

- Balestrieri B., Maekawa A., Xing W., Gelb M.H., Katz H.R., Arm J.P. Group V Secretory Phospholipase A2 Modulates Phagosome Maturation and Regulates the Innate Immune Response against *Candida albicans*. *The Journal of Immunology* 2009;182:4891-4898.
- Balsinde J., Bianco I.D., Ackermann E.J., Conde-Frieboes K., Dennis E.A. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995a;92:8527-8531.
- Barnwell J.W., Nichols M.E., Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 1989;169:1795-1802.
- Barros G.A., Pereira A.V., Barros L.C., Lourenco A., Jr., Calvi S.A., Santos L.D., Barraviera B., Ferreira R.S., Jr. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2015;21:48.
- Basu S., Hodgson G., Katz M., Dunn A.R. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002;100:854-861.
- Beales P., Brabin B., Dorman E., Gilles H., Loutain L., Marsh K., Molyneux M., Olliaro P., Schapira A., Touze J., Hien T., Warrell D., White N., WHO. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000;94 Suppl 1:S1-90.
- Beattie L., Engwerda C.R., Wykes M., Good M.F. CD8+ T lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *J Immunol* 2006;177:2518-2526.
- Beck L.H., Bonegio R.G.B., Lambeau G., Beck D.M., Powell D.W., Cummins T.D., Klein J.B., Salant D.J. M-Type Phospholipase A(2) Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *The New England journal of medicine* 2009;361:11-21.
- Bezzine S., Koduri R.S., Valentin E., Murakami M., Kudo I., Ghomashchi F., Sadilek M., Lambeau G., Gelb M.H. Exogenously Added Human Group X Secreted Phospholipase A2 but Not the Group IB, IIA, and V Enzymes Efficiently Release Arachidonic Acid from Adherent Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:3179-3191.
- Bhanot P., Schauer K., Coppens I., Nussenzweig V. A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. *J Biol Chem* 2005;280:6752-6760.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512.
- Boeltz S., Muñoz L.E., Fuchs T.A., Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Open the Pandora's Box in Severe Malaria. *Frontiers in Immunology* 2017;8.
- Boilard E., Lai Y., Larabee K., Balestrieri B., Ghomashchi F., Fujioka D., Gobeze R., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Thornhill T.S., Divangahi M., Remold H., Lambeau G., Gelb M.H., Arm J.P., Lee D.M. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Molecular Medicine* 2010;2:172-187.
- Bouharoun-Tayoun H., Attanath P., Sabchareon A., Chongsuphajaisiddhi T., Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1990;172:1633-1641.
- Boutrin M.C., Foster H.A., Pentreath V.W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei* brucei and enterobacteria. *Exp Parasitol* 2008;119:246-251.
- Bowton D.L., Seeds M.C., Fasano M.B., Goldsmith B., Bass D.A. Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997;155:421-425.
- Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 2015;10:975-999.
- Brasil P., Zalis M.G., de Pina-Costa A., Siqueira A.M., Júnior C.B., Silva S., Areas A.L.L., Pelajo-Machado M., de Alvarenga D.A.M., da Silva Santelli A.C.F., Albuquerque H.G., Cravo P., Santos de Abreu F.V., Peterka C.L., Zanini G.M., Suárez Mutis M.C., Pissinatti A., Lourenço-de-Oliveira R., de Brito C.F.A., de Fátima Ferreira-da-Cruz M., Culleton R., Daniel-Ribeiro C.T. Outbreak

of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health* 2017;5:e1038-e1046.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004;303:1532-1535.

Brockelman C., Wongsattayanont B., Tan-Ariya P., Fucharoen S. Thalassaemic erythrocytes inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.* 1987;25:56-60.

Brugat T., Cunningham D., Sodenkamp J., Coomes S., Wilson M., Spence P.J., Jarra W., Thompson J., Scudamore C., Langhorne J. Sequestration and histopathology in *Plasmodium chabaudi* malaria are influenced by the immune response in an organ-specific manner. *Cell Microbiol* 2014;16:687-700.

Bull P.C., Lowe B.S., Kortok M., Molyneux C.S., Newbold C.I., Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nature medicine* 1998;4:358-360.

Bunn F. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. *Blood* 2013;121:20-25.

Bunyaratvej A., Butthep P., Sae-Ung N., Fucharoen S., Yuthavong Y. Reduced deformability of thalassaemic erythrocytes and erythrocytes with abnormal hemoglobins and relation with susceptibility to *Plasmodium falciparum* invasion. *Blood* 1992;79:2460-2463.

Burger M., Jane, Tebay M., Anne, Keith P., Anne, Samarantunga H., Mali, Clements J., Lavin M., Francis, Gardiner R., Alexander. Expression analysis of delta-catenin and prostate-specific membrane antigen: Their potential as diagnostic markers for prostate cancer. *International Journal of Cancer* 2002;100:228-237.

Butthep P., Wanram S., Pattanapanyasat K., Vattanaviboon P., Fucharoen S., Wilairat P. Cytoadherence between endothelial cells and *P. falciparum* infected and noninfected normal and thalassaemic red blood cells. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2006;70B:432-442.

Cadman E.T., Abdallah A.Y., Voisine C., Sponaas A.M., Corran P., Lamb T., Brown D., Ndungu F., Langhorne J. Alterations of splenic architecture in malaria are induced independently of Toll-like receptors 2, 4, and 9 or MyD88 and may affect antibody affinity. *Infect Immun* 2008;76:3924-3931.

Carlson J., Nash G.B., Gabutti V., al-Yaman F., Wahlgren M. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 1994;84:3909-3914.

Cavigiolio G., Jayaraman S. Proteolysis of Apolipoprotein A-I by Secretory Phospholipase A2. A new Link between Inflammation and Atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 2014.

Chang K.H., Tam M., Stevenson M.M. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* 2004;103:3727-3735.

Chin W., Contacos P.G., Coatney G.R., Kimball H.R. A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys. *Science* 1965;149:865-865.

Chotivanich K., Udomsangpetch R., Pattanapanyasat K., Chierakul W., Simpson J., Looareesuwan S., White N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood* 2002;100:1172-1176.

Choudhury H.R., Sheikh N.A., Bancroft G.J., Katz D.R., de Souza J.B. Early Nonspecific Immune Responses and Immunity to Blood-Stage Nonlethal *Plasmodium yoelii* Malaria. *Infection and Immunity* 2000;68:6127-6132.

Coelho C.H., Doritchamou J.Y.A., Zaidi I., Duffy P.E. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *NPJ Vaccines* 2017;2:34.

Combes V., Coltel N., Alibert M., van Eck M., Raymond C., Juhan-Vague I., Emile Grau G., Chimini G. ABCA1 Gene Deletion Protects against Cerebral Malaria: Potential Pathogenic Role of Microparticles in Neuropathology. *The American Journal of Pathology* 2005;166:295-302.

Combes V., Taylor T.E., Juhan-Vague I., et al. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe *falciparum* malaria complicated with coma. *JAMA* 2004;291:2542-2544.

Cormier R.T., Hong K.H., Halberg R.B., Hawkins T.L., Richardson P., Mulherkar R., Dove W.F., Lander E.S. Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 1997;17:88-91.

Couturier C., Brouillet A., Couriaud C., Koumanov K., Bereziat G., Andreani M. Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. *J Biol Chem* 1999;274:23085-23093.

Cox-Singh J., Hiu J., Lucas S.B., Divis P.C., Zulkarnaen M., Chandran P., Wong K.T., Adem P., Zaki S.R., Singh B., Krishna S. Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria Journal* 2010;9:10-10.

Cox F.E.G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors* 2010;3:5-5.

Cox J., Semoff S., Hommel M. Plasmodium chabaudi: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. *Parasite Immunology* 1987;9:543-561.

Crowl R.M., Stoller T.J., Conroy R.R., Stoner C.R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* 1991;266:2647-2651.

Crutcher J.M., Stevenson M.M., Sedegah M., Hoffman S.L. Interleukin-12 and malaria. *Research in Immunology* 1995;146:552-559.

Cruz L.N., Wu Y., Ulrich H., Craig A.G., Garcia C.R.S. Tumor necrosis factor reduces Plasmodium falciparum growth and activates calcium signaling in human malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016;1860:1489-1497.

Cui L., Mharakurwa S., Ndiaye D., Rathod P.K., Rosenthal P.J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2015;93:57-68.

Cupillard L., Koumanov K., Mattéi M.-G., Lazdunski M., Lambeau G. Cloning, Chromosomal Mapping, and Expression of a Novel Human Secretory Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:15745-15752.

Cupillard L., Mulherkar R., Gomez N., Kadam S., Valentin E., Lazdunski M., Lambeau G. Both Group IB and Group IIA Secreted Phospholipases A2 Are Natural Ligands of the Mouse 180-kDa M-type Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:7043-7051.

da Silva G.B., Pinto J.R., Barros E.J.G., Farias G.M.N., Daher E.D.F. Kidney involvement in malaria: an update. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2017;59:e53.

Dal Piaz F., Casapullo A., Randazzo A., Riccio R., Pucci P., Marino G., Gomez-Paloma L. Molecular Basis of Phospholipase A2 Inhibition by Petrosaspongiolide M. *ChemBioChem* 2002;3:664-671.

Das B.S., Patnaik J.K., Mohanty S., Mishra S.K., Mohanty D., Satpathy S.K., Bose T.K. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:720-725.

Dascalescu C., Najman A. Splénomégalies tropicales : splénomégalie palustre hyperréactive et lymphome splénique tropical à lymphocytes villeux. *Hématologie* 2005;11 259-263.

de Beer F.C., de Beer M.C., van der Westhuyzen D.R., Castellani L.W., Lusi A.J., Swanson M.E., Grass D.S. Secretory non-pancreatic phospholipase A2: influence on lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1997;38:2232-2239.

Degousee N., Kelvin D.J., Geisslinger G., Hwang D.M., Stefanski E., Wang X.-H., Danesh A., Angioni C., Schmidt H., Lindsay T.F., Gelb M.H., Bollinger J., Payré C., Lambeau G., Arm J.P., Keating A., Rubin B.B. Group V Phospholipase A2 in Bone Marrow-derived Myeloid Cells and Bronchial Epithelial Cells Promotes Bacterial Clearance after Escherichia coli Pneumonia. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:35650-35662.

Del Portillo H.A., Ferrer M., Brugat T., Martin-Jaular L., Langhorne J., Lacerda M.V. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol* 2012;14:343-355.

Demissie Y., Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with Plasmodium vivax among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:436.

Dennis E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:13057-13060.

Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. Phospholipase A(2) Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical reviews* 2011;111:6130-6185.

Depinay N., Franetich J.F., Grüner A.C., Mauduit M., Chavatte J.-M., Luty A.J.F., van Gemert G.-J., Sauerwein R.W., Siksik J.-M., Hannoun L., Mazier D., Snounou G., Rénia L. Inhibitory Effect of TNF-alpha on Malaria Pre-Erythrocytic Stage Development: Influence of Host Hepatocyte/Parasite Combinations. *PLOS ONE* 2011;6:e17464.

Deroost K., Lays N., Pham T.T., Bacı D., Van den Eynde K., Komuta M., Prato M., Roskams T., Schwarzer E., Opdenakker G., Van den Steen P.E. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the Plasmodium strain. *PLOS ONE* 2014;9:e113519.

Deroost K., Tyberghein A., Lays N., Noppen S., Schwarzer E., Vanstreels E., Komuta M., Prato M., Lin J.W., Pamplona A., Janse C.J., Arese P., Roskams T., Daelemans D., Opdenakker G., Van den Steen P.E. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;48:589-600.

Doyle N.A., Bhagwan S.D., Meek B.B., Kutkoski G.J., Steeber D.A., Tedder T.F., Doerschuk C.M. Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. *J Clin Invest* 1997;99:526-533.

Dumont M.E., Dei-Cas E., Maurois P., Slomianny C., Prensier G., Houcke-Lecomte M., Vernes A., Camus D. Histopathology of the liver and kidney during malaria: relation to malaria-induced dyslipoproteinemia. *Ann Parasitol Hum Comp* 1988;63:171-183.

Duncan R.E., Sarkadi-Nagy E., Jaworski K., Ahmadian M., Sul H.S. Identification and Functional Characterization of Adipose-specific Phospholipase A2 (AdPLA). *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:25428-25436.

Edwards S.H., Thompson D., Baker S.F., Wood S.P., Wilton D.C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry* 2002;41:15468-15476.

Eintracht J., Maathai R., Mellors A., Ruben L. Calcium entry in Trypanosoma brucei is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem J* 1998;336 (Pt 3):659-666.

El-Assaad F., Whewey J., Hunt N.H., Grau G.E.R., Combes V. Production, Fate and Pathogenicity of Plasma Microparticles in Murine Cerebral Malaria. *PLoS Pathogens* 2014;10:e1003839.

Enevold A., Lusingu J. P., Mmbando B., Alifrangis M., M. L.M., Bygberg I. C., Theander T. G., S. V.L. Reduced Risk of Uncomplicated Malaria Episodes in Children with Alpha+-Thalassemia in Northeastern Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008;78:714-720.

Engelbrecht Y., de Wet H., Horsch K., Langeveldt C.R., Hough F.S., Hulley P.A. Glucocorticoids Induce Rapid Up-Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Dephosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Impair Proliferation in Human and Mouse Osteoblast Cell Lines. *Endocrinology* 2003;144:412-422.

Entwistle L.J., Pelly V.S., Coomes S.M., Kannan Y., Perez-Lloret J., Czieso S., Silva dos Santos M., MacRae J.I., Collinson L., Sesay A., Nikolov N., Metidji A., Helmbly H., Hui D.Y., Wilson M.S. Epithelial-Cell-Derived Phospholipase A2 Group 1B Is an Endogenous Anthelmintic. *Cell Host & Microbe* 2017;22:484-493.e485.

Escoffier J., Jemel I., Tanemoto A., Taketomi Y., Payre C., Coatrieux C., Sato H., Yamamoto K., Masuda S., Pernet-Gallay K., Pierre V., Hara S., Murakami M., De Waard M., Lambeau G., Arnoult C. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 2010;120:1415-1428.

Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.

Evans K.J., Hansen D.S., van Rooijen N., Buckingham L.A., Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 2006;107:1192-1199.

Facer C., Rouse D. Spontaneous splenic rupture due to Plasmodium ovale malaria. *The Lancet* 1991;338:896.

Faille D., Combes V., Mitchell A.J., Fontaine A., Juhan-Vague I., Alessi M.-C., Chimini G., Fusaï T., Grau G.E. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *The FASEB Journal* 2009;23:3449-3458.

Fatih F.A., Siner A., Ahmed A., Woon L.C., Craig A.G., Singh B., Krishna S., Cox-Singh J. Cytoadherence and virulence - the case of Plasmodium knowlesi malaria. *Malaria Journal* 2012;11:33-33.

Feldmann M. Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118:3533-3536.

Fenard D., Lambeau G., Valentin E., Lefebvre J.C., Lazdunski M., Doglio A. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest* 1999;104:611-618.

Ferrante A., Kumaratilake L., Rzepczyk C.M., Dayer J.M. Killing of Plasmodium falciparum by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunology Letters* 1990;25:179-187.

Ferreira A., Marguti I., Bechmann I., Jeney V., Chora A., Palha N., Rebelo S., Henri A., Beuzard Y., Soares M. Sickie Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. *Cell* 2011;145:398-409.

Ferreira M.U., da Silva Nunes M., Wunderlich G. Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2004;11:987-995.

Flammersfeld A, Lang C, Flieger A, Pradel G. Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. *International Journal of Medical Microbiology* 2018;308:129-141

Franson R., Weiss J., Martin L., Spitznagel J.K., Elsbach P. Phospholipase A activity associated with membranes of human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* 1977;167:839-841.

Freeman R.R., Parish C.R. Spleen cell changes during fatal and self-limiting malarial infections of mice. *Immunology* 1978;35:479-484.

Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 2007;176:231-241.

Fujioka D., Saito Y., Kobayashi T., Yano T., Tezuka H., Ishimoto Y., Suzuki N., Yokota Y., Nakamura T., Obata J.E., Kanazawa M., Kawabata K., Hanasaki K., Kugiyama K. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation* 2008;117:2977-2985.

Ghosh M., Tucker D.E., Burchett S.A., Leslie C.C. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Progress in Lipid Research* 2006;45:487-510.

Gilsbach R., Kouta M., Bönisch H., Brüss M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques* 2006;40:173-177.

Girard C., Seitz-Polski B., Dolla G., Augert A., Vindrieux D., Bernard D., Lambeau G. New physiopathological roles for the PLA2R1 receptor in cancer and membranous nephropathy. *Médecine sciences : M/S* 2014;30:519-525.

Glenister F.K., Coppel R.L., Cowman A.F., Mohandas N., Cooke B.M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* 2002;99:1060-1063.

Goheen M.M., Campino S., Cerami C. The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *British journal of haematology* 2017;179:543-556.

Gomes P.S., Bhardwaj J., Rivera-Correa J., Freire-De-Lima C.G., Morrot A. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:1617.

Gong H., Sun L., Chen B., Han Y., Pang J., Wu W., Qi R., Zhang T.-m. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Scientific Reports* 2016;6:38513.

Graff J.R., Konicek B.W., Deddens J.A., Chedid M., Hurst B.M., Colligan B., Neubauer B.L., Carter H.W., Carter J.H. Expression of group IIa secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 2001;7:3857-3861.

Granata F., Petraroli A., Boilard E., Bezzine S., Bollinger J., Del Vecchio L., Gelb M.H., Lambeau G., Marone G., Triggiani M. Activation of Cytokine Production by Secreted Phospholipase A2 in Human Lung Macrophages Expressing the M-Type Receptor. *The Journal of Immunology* 2005;174:464-474.

Grass D.S., Felkner R.H., Chiang M.Y., Wallace R.E., Nevalainen T.J., Bennett C.F., Swanson M.E. Expression of human group II PLA2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J Clin Invest* 1996;97:2233-2241.

Grau G.E., Pigué P.F., Vassalli P., Lambert P.H. Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev.* 1989;112:49-70.

Grigg M.J., Snounou G. Plasmodium simium: a Brazilian focus of anthropozoonotic vivax malaria? *The Lancet Global Health* 2017;5:e961-e962.

Grönroos J.O., Laine V.J.O., Nevalainen T.J. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *The Journal of Infectious Diseases* 2002;185:1767-1772.

Guan M., Qu L., Tan W., Chen L., Wong C.W. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha regulates liver triglyceride metabolism in part through secreted phospholipase A(2) GXIIB. *Hepatology* 2011;53:458-466.

Gueirard P., Tavares J., Thiéberge S., Bernex F., Ishino T., Milon G., Franke-Fayard B., Janse C.J., Ménard R., Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:18640-18645.

Guillaume C., Calzada C., Lagarde M., Schrevel J., Deregnacourt C. Interplay between lipoproteins and bee venom phospholipase A2 in relation to their anti-Plasmodium toxicity. *J Lipid Res* 2006;47:1493-1506.

Guillaume C., Deregnacourt C., Clavey V., Schrevel J. Anti-Plasmodium properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A2 are serum-dependent. *Toxicon* 2004;43:311-318.

Guillaume C., Payre C., Jemel I., Jeamment L., Bezzine S., Naika G.S., Bollinger J., Grellier P., Gelb M.H., Schrevel J., Lambeau G., Deregnacourt C. In vitro anti-Plasmodium falciparum properties of the full set of human secreted phospholipases A2. *Infect Immun* 2015;83:2453-2465.

Gunalan K., Niangaly A., Thera M.A., Doumbo O.K., Miller L.H. Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation? *Trends Parasitol* 2018;34:420-429.

Hallstrand T.S., Lai Y., Ni Z., Oslund R.C., Henderson W.R., Gelb M.H., Wenzel S.E. Relationship between levels of secreted phospholipase A2 groups IIA and X in the airways and asthma severity. *Clinical & Experimental Allergy* 2011;41:801-810.

Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92:3007-3017.

Hanasaki K., Arita H. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2002;68-69:71-82.

Hendrickse R.G., Adeniyi A., Edington G.M., Glasgow E.F., White R.H.R., Houba V. Quartan malarial nephrotic syndrome: Collaborative Clinicopathological Study in Nigerian Children. *The Lancet* 1972;299:1143-1149.

Hirunpetcharat C., Tian J.H., Kaslow D.C., van Rooijen N., Kumar S., Berzofsky J.A., Miller L.H., Good M.F. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of Plasmodium yoelii expressed in Saccharomyces cerevisiae: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *The Journal of Immunology* 1997;159:3400-3411.

Hoeft B., Linseisen J., Beckmann L., Müller-Decker K., Canzian F., Hüsing A., Kaaks R., Vogel U., Jakobsen M.U., Overvad K., Hansen R.D., Knüppel S., Boeing H., Trichopoulou A., Koumantaki Y., Trichopoulos D., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Bueno-de-Mesquita H.B., van Duynhoven F.J.B., van Gils C.H., Peeters P.H., Dumeaux V., Lund E., Huerta Castaño J.M., Muñoz X., Rodríguez L., Barricarte A., Manjer J., Jirström K., Van Guelpen B., Hallmans G., Spencer E.A., Crowe F.L., Khaw K.-T., Wareham N., Morois S., Boutron-Ruault M.-C., Clavel-Chapelon F., Chajes V., Jenab M., Boffetta P., Vineis P., Mouw T., Norat T., Riboli E., Nieters A. Polymorphisms in fatty acid metabolism-related genes are associated with colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2010;31:466-472.

Hogan L.H., Klein B.S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun* 1994;62:3543-3546.

Horvath L.L., Murray C.K. Spontaneous Splenic Rupture Due to *Plasmodium vivax* in a Traveler. *Journal of Travel Medicine* 2008;15:140-140.

Hsiao L.L., Howard R.J., Aikawa M., Taraschi T.F. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 1991;274 (Pt 1):121-132.

Huang H., Lamikanra A.A., Alkaitis M.S., Thézénas M.L., Ramaprasad A., Moussa E., Roberts D.J., Casals-Pascual C. Interleukin-10 Regulates Hepcidin in *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLOS ONE* 2014;9:e88408.

Huggins K.W., Boileau A.C., Hui D.Y. Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002;283:E994-E1001.

Huhtinen H.T., Gronroos J.O., Gronroos J.M., Uksila J., Gelb M.H., Nevalainen T.J., Laine V.J. Antibacterial effects of human group IIA and group XIA phospholipase A2 against *Helicobacter pylori* in vitro. *Apmis* 2006;114:127-130.

Ilic D., Bollinger J.M., Gelb M., Mauro T.M. sPLA2 and the epidermal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1841:416-421.

Imbert P., Rapp C., Buffet P.A. Pathological rupture of the spleen in malaria: Analysis of 55 cases *Travel Medicine and Infectious Disease* 2009;7:147-159.

Ishizaki J., Hanasaki K., Higashino K., Kishino J., Kikuchi N., Ohara O., Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:5897-5904.

Ivancic B., Castellani L.W., Wang X.P., Qiao J.H., Mehrabian M., Navab M., Fogelman A.M., Grass D.S., Swanson M.E., de Beer M.C., de Beer F., Lusis A.J. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIA phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1284-1290.

Jaworski K., Ahmadian M., Duncan R.E., Sarkadi-Nagy E., Varady K.A., Hellerstein M.K., Lee H.-Y., Samuel V.T., Shulman G.I., Kim K.-H., de Val S., Kang C., Sul H.S. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high fat feeding or leptin deficiency. *Nature medicine* 2009;15:159-168.

Jemel I., Li H., Oslund R.C., Payré C., Dabert-Gay A.-S., Douguet D., Chargui K., Scarzello S., Gelb M.H., Lambeau G. Group X secreted phospholipase A2 proenzyme is matured by a furin-like proprotein convertase and releases arachidonic acid inside of human HEK293 cells. *Journal of Biological Chemistry* 2011.

Jesse R.L., Franson R.C. Modulation of purified phospholipase A2 activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochim Biophys Acta* 1979;575:467-470.

Karadjian G., Berrebi D., Dogna N., Vallarino-Lhermitte N., Bain O., Landau I., Martin C. Co-infection restrains *Litomosoides sigmodontis* filarial load and plasmodial *P. yoelii* but not *P. chabaudi* parasitaemia in mice. *Parasite* 2014;21:16.

Karasawa K., Harada A., Satoh N., Inoue K., Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Progress in Lipid Research* 2003;42:93-114.

Kelvin A.A., Degousee N., Banner D., Stefanski E., Leon A.J., Angoulvant D., Paquette S.G., Huang S.S.H., Danesh A., Robbins C.S., Noyan H., Husain M., Lambeau G., Gelb M., Kelvin D.J., Rubin B.B. Lack of group X secreted phospholipase A2 increases survival following pandemic H1N1 influenza infection. *Virology* 2014;454-455:78-92.

Kenangalem E., Karyana M., Burdarm L., Yeung S., Simpson J.A., Tjitra E., Anstey N.M., Poespoprodjo J.R., Price R.N. *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. 2016;15:321.

Kennedy B.P., Payette P., Mudgett J., Vadas P., Pruzanski W., Kwan M., Tang C., Rancourt D.E., Cromlish W.A. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 1995;270:22378-22385.

Kermanizadeh A., Jacobsen N.R., Roursgaard M., Loft S., Moller P. Hepatic toxicity assessment of cationic liposome exposure in healthy and chronic alcohol fed mice. *Heliyon* 2017;3:e00458.

Kharazmi A., Jensen S. Enhanced inhibition of in vitro multiplication of Plasmodium falciparum by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 1984;57:287-292.

Kibukamusoke J.W., Hutt M.S.R. Histological features of the nephrotic syndrome associated with quartan malaria. *Journal of Clinical Pathology* 1967;20:117-123.

Kim J.O., Chakrabarti B.K., Guha-Niyogi A., Louder M.K., Mascola J.R., Ganesh L., Nabel G.J. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J Virol* 2007;81:1444-1450.

Klebanoff S.J. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111:383-389.

Knowles R., Gupta B.M.D. A Study of Monkey-Malaria, and Its Experimental Transmission to Man. *The Indian Medical Gazette* 1932;67:301-320.

Knudsen K.B., Northeved H., Kumar P.E., Permin A., Gjetting T., Andresen T.L., Larsen S., Wegener K.M., Lykkesfeldt J., Jantzen K., Loft S., Moller P., Roursgaard M. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine* 2015;11:467-477.

Koduri R.S., Gronroos J.O., Laine V.J., Le Calvez C., Lambeau G., Nevalainen T.J., Gelb M.H. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem* 2002;277:5849-5857.

Koenig W., Vossen C.Y., Mallat Z., Brenner H., Benessiano J.I., Rothenbacher D. Association between type II secretory phospholipase A2 plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. *European Heart Journal* 2009;30:2742-2748.

Kramer R.M., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E.P., Tizard R., Pepinsky R.B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1989a;264:5768-5775.

Krause M.A., Diakite S.A.S., Lopera-Mesa T.M., Amaratunga C., Arie T., Traore K., Doumbia S., Konate D., Keefer J.R., Diakite M., Fairhurst R.M. Alpha-Thalassemia Impairs the Cytoadherence of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. *PLOS ONE* 2012;7:e37214.

Kuefner M.S., Pham K., Redd J.R., Stephenson E.J., Harvey I., Deng X., Bridges D., Boilard E., Elam M.B., Park E.A. Secretory phospholipase A2 group IIA modulates insulin sensitivity and metabolism. *J Lipid Res* 2017;58:1822-1833.

Kumaratilake L.M., Ferrante A. Opsonization and Phagocytosis of Plasmodium falciparum Merozoites Measured by Flow Cytometry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:9-13.

Kumaratilake L.M., Ferrante A. T-cell cytokines in malaria: their role in the regulation of neutrophil- and macrophage-mediated killing of Plasmodium falciparum asexual blood forms. *Research in Immunology* 1994;145:423-429.

Kumaratilake L.M., Ferrante A., Rzepczyk C. The role of T lymphocytes in immunity to Plasmodium falciparum. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *The Journal of Immunology* 1991;146:762-767.

Kumaratilake L.M., Robinson B.S., Ferrante A., Poulos A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on Plasmodium falciparum and in vivo effects on P. berghei. *J Clin Invest* 1992;89:961-967.

Kurtzhals J.A.L., Adabayeri V., Goka B.Q., Akanmori B.D., Oliver-Commey J.O., Nkrumah F.K., Behr C., Hviid L. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *The Lancet* 1998;351:1768-1772.

Kuwata H., Yamamoto S., Miyazaki Y., Shimbara S., Nakatani Y., Suzuki H., Ueda N., Yamamoto S., Murakami M., Kudo I. Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A2 regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A2. *J Immunol* 2000;165:4024-4031.

Kwiatkowski D., Sambou I., Twumasi P., Greenwood B.M., Hill A.V.S., Manogue K.R., Cerami A., Castracane J., Brewster D.R. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *The Lancet* 1990;336:1201-1204.

Laine V.J., Rajamaki A., Grass D.S., Nevalainen T.J. Neutrophil response of transgenic mice expressing human group IIA phospholipase A2 in bacterial infections. *Scand J Immunol* 2000a;52:362-368.

- Laine V.J.O., Grass D.S., Nevalainen T.J. Protection by Group II Phospholipase A2 Against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* 1999;162:7402-7408.
- Laine V.J.O., Grass D.S., Nevalainen T.J. Resistance of Transgenic Mice Expressing Human Group II Phospholipase A2 to *Escherichia coli* Infection. *Infection and Immunity* 2000b;68:87-92.
- Lamb T.J., Brown D.E., Potocnik A.J., Langhorne J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 2006;8:1-22.
- Lamb T.J., Langhorne J. The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites. *Malaria Journal* 2008;7:68.
- Lambeau G., Ancian P., Barhanin J., Lazdunski M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:1575-1578.
- Lambeau G., Barhanin J., Schweitz H., Qar J., Lazdunski M. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:11503-11510.
- Lambeau G., Gelb M., H. . Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A2. *Annual Review of Biochemistry* 2008;77:495-520.
- Lambeau G., Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999;20:162-170.
- Lambeau G., Lazdunski M., Barhanin J. Properties of receptors for neurotoxic phospholipases A2 in different tissues. *Neurochem Res.* 1991;16:651-658.
- Lambeau G., Schmid-Alliana A., Lazdunski M., Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:9526-9532.
- Landau I. Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp. Parasite de rongeurs africains. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1965;261:230-232.
- Landau I., Killick-Kendrick R. Rodent plasmodia of the Republique Centrafricaine: the sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1966;60:633-649.
- Langhorne J., Cross C., Seixas E., Li C., von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:1730-1734.
- Langhorne J., Quin S.J., Sanni L.A. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol* 2002;80:204-228.
- Lemmerer R., Unger M., Voßen M., Forstner C., Jalili A., Starzengruber P., Werzowa J., Ramharter M., Winkler S., Thalhammer F. Case report: spontaneous rupture of spleen in patient with *Plasmodium ovale* malaria. *Wiener klinische Wochenschrift* 2016;128:74-77.
- Leveque M.F., Berry L., Yamaryo-Botte Y., Nguyen H.M., Galera M., Botte C.Y., Besteiro S. TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*. 2017;105:158-174.
- Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11070-11075.
- Li C., Seixas E., Langhorne J. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical microbiology and immunology* 2001;189:115-126.
- Li X., Shridas P., Forrest K., Bailey W., Webb N.R. Group X secretory phospholipase A2 negatively regulates adipogenesis in murine models. *Faseb j* 2010;24:4313-4324.

- Liao C.-C., Ou T.-T., Wu C.-H., Wang C.-J. Prevention of Diet-Induced Hyperlipidemia and Obesity by Caffeic Acid in C57BL/6 Mice through Regulation of Hepatic Lipogenesis Gene Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013;61:11082-11088.
- Lögters T., Margraf S., Altricher J., Cinatl J., Mitzner S., Windolf J., Scholz M. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol* 2009;198:211.
- Luty A.J., Perkins D.J., Lell B., Schmidt-Ott R., Lehman L.G., Luckner D., Greve B., Matousek P., Herbich K., Schmid D., Weinberg J.B., Kremsner P.G. Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 2000a;68:3909-3915.
- Luty A.J.F., Lell B., Schmidt-Ott R., Lehman L.G., Luckner D., Greve B., Matousek P., Herbich K., Schmid D., Migot-Nabias F., Deloron P., Nussenzweig R.S., Kremsner P.G. Interferon-gamma Responses Are Associated with Resistance to Reinfection with Plasmodium falciparum in Young African Children. *The Journal of Infectious Diseases* 1999;179:980-988.
- Mac-Daniel L., Buckwalter M.R., Berthet M.I., Virk Y., Yui K., Albert M.L., Gueirard P., MÃ©nard R. Local Immune Response to Injection of Plasmodium Sporozoites into the Skin. *The Journal of Immunology* 2014.
- MacPhee M., Chepenik K.P., Liddell R.A., Nelson K.K., Siracusa L.D., Buchberg A.M. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell* 1995;81:957-966.
- Madsen L.M., Inada M., Weiss J. Determinants of activation by complement of group II phospholipase A2 acting against Escherichia coli. *Infect Immun* 1996;64:2425-2430.
- Mantel P.-Y., Marti M. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. *Cellular Microbiology* 2014;16:344-354.
- Marathe G.K., Pandit C., Lakshmikanth C.L., Chaithra V.H., Jacob S.P., D'Souza C.J.M. To hydrolyze or not to hydrolyze: the dilemma of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Journal of Lipid Research* 2014;55:1847-1854.
- Martínez-García A., Sastre I., Recuero M., Aldudo J., Vilella E., Mateo I., Sánchez-Juan P., Vargas T., Carro E., Bermejo-Pareja F., Rodríguez-Rodríguez E., Combarros O., Rosich-Estrago M., Frank A., Valdivieso F., Bullido M.J. PLA2G3, a Gene Involved in Oxidative Stress Induced Death, is Associated with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010;22:1181-1187.
- Masuda S., Murakami M., Takanezawa Y., Aoki J., Arai H., Ishikawa Y., Ishii T., Arioka M., Kudo I. Neuronal Expression and Neuritogenic Action of Group X Secreted Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:23203-23214.
- Mauchley D., Meng X., Johnson T., Fullerton D.A., Weyant M.J. Modulation of growth in human esophageal adenocarcinoma cells by group IIa secretory phospholipase A(2). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:591-599; discussion 599.
- May J., Evans J.A., Timmann C., et al. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *JAMA* 2007;297:2220-2226.
- 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* 2005;122:107-118.
- McCall M.B.B., Sauerwein R.W. Interferon-gamma-central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of Leukocyte Biology* 2010;88:1131-1143.
- Meibalan E., Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2017;7.
- Meliton A.Y., Muñoz N.M., Meliton L.N., Birukova A.A., Leff A.R., Birukov K.G. Mechanical induction of group V phospholipase A2 causes lung inflammation and acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2013;304:L689-L700.
- Memon R.A., Staprans I., Noor M., Holleran W.M., Uchida Y., Moser A.H., Feingold K.R., Grunfeld C. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1536-1542.
- Menard D., Barnadas C., Bouchier C., Henry-Halldin C., Gray L.R., Ratsimbaoa A., Thonier V., Carod J.F., Domarle O., Colin Y., Bertrand O., Picot J., King C.L., Grimberg B.T., Mercereau-Puijalon O., Zimmerman P.A. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5967-5971.

Mendes C., Dias F., Figueiredo J., Mora V.G., Cano J., de Sousa B., do Rosario V.E., Benito A., Berzosa P., Arez A.P. Duffy negative antigen is no longer a barrier to Plasmodium vivax--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1192.

Menschikowski M., Kasper M., Lattke P., Schiering A., Schiefer S., Stockinger H., Jaross W. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1995;118:173-181.

Metzger W.G., Mordüller B.G., Kremsner P.G. Malaria pigment in leucocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:637-636.

Miki Y., Yamamoto K., Taketomi Y., Sato H., Shimo K., Kobayashi T., Ishikawa Y., Ishii T., Nakanishi H., Ikeda K., Taguchi R., Kabashima K., Arita M., Arai H., Lambeau G., Bollinger J.M., Hara S., Gelb M.H., Murakami M. Lymphoid tissue phospholipase A2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving antiinflammatory lipid mediators. *The Journal of Experimental Medicine* 2013;210:1217-1234.

Miller L.H., Mason S.J., Clyde D.F., McGinniss M.H. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;295:302-304.

Mockenhaupt F.P., Ehrhardt S., Gellert S., Otchwemah R.N., Dietz E., Anemana S.D., Bienzle U. α -thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood* 2004;104:2003-2006.

Mohan K., Moulin P., Stevenson M.M. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. *The Journal of Immunology* 1997;159:4990-4998.

Monneret G., Gravel S., Diamond M., Rokach J., Powell W.S. Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 2001;98:1942-1948.

Moreira L.A., Ito J., Ghosh A., Devenport M., Zieler H., Abraham E.G., Crisanti A., Nolan T., Catteruccia F., Jacobs-Lorena M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* 2002;277:40839-40843.

Moreira L.A., Wang J., Collins F.H., Jacobs-Lorena M. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit Plasmodium development. *Genetics* 2004;166:1337-1341.

Mota M.M., Brown K.N., Holder A.A., Jarra W. Acute Plasmodium chabaudi chabaudi Malaria Infection Induces Antibodies Which Bind to the Surfaces of Parasitized Erythrocytes and Promote Their Phagocytosis by Macrophages In Vitro. *Infection and Immunity* 1998;66:4080-4086.

Mounier C.M., Wendum D., Greenspan E., Fléjou J.F., Rosenberg D.W., Lambeau G. Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. *British Journal Of Cancer* 2008;98:587.

Movert E., Wu Y., Lambeau G., Kahn F., Touqui L., Areschoug T. Secreted group IIA phospholipase A2 protects humans against the group B streptococcus: experimental and clinical evidence. *J Infect Dis* 2013;208:2025-2035.

Muñoz-Sanjuan I., Brivanlou A.H. Induction of ectopic olfactory structures and bone morphogenetic protein inhibition by Rossy, a group XII secreted phospholipase A2. *Mol Cell Biol* 2005;25:3608-3619.

Muñoz N.M., Meliton A.Y., Arm J.P., Bonventre J.V., Cho W., Leff A.R. Deletion of Secretory Group V Phospholipase A2 Attenuates Cell Migration and Airway Hyperresponsiveness in Immunosensitized Mice. *The Journal of Immunology* 2007;179:4800-4807.

Muñoz N.M., Meliton A.Y., Meliton L.N., Dudek S.M., Leff A.R. Secretory group V phospholipase A2 regulates acute lung injury and neutrophilic inflammation caused by LPS in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2009;296:L879-L887.

Murakami M., Kudo I. Phospholipase A2. *The Journal of Biochemistry* 2002;131:285-292.

Murakami M., Masuda S., Shimbara S., Bezzine S., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H., Matsukura S., Kokubu F., Adachi M., Kudo I. Cellular arachidonate-releasing function of novel classes of secretory phospholipase A2s (groups III and XII). *J Biol Chem* 2003;278:10657-10667.

Murakami M., Sato H., Miki Y., Yamamoto K., Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A₂. *Journal of Lipid Research* 2015a;56:1248-1261.

Murakami M., Taketomi Y., Miki Y., Sato H., Hirabayashi T., Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans. *Progress in Lipid Research* 2015b;50:152-192.

Murakami M., Taketomi Y., Sato H., Yamamoto K. Secreted phospholipase A₂ revisited. *The Journal of Biochemistry* 2011;150:233-255.

Murakami M., Yamamoto K., Miki Y., Murase R., Sato H., Taketomi Y. Chapter Four - The Roles of the Secreted Phospholipase A₂ Gene Family in Immunology. *Advances in Immunology* 2016;132:91-134.

Nakano T., Ohara O., Teraoka H., Arita H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A₂ production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J Biol Chem* 1990;265:12745-12748.

Nardin E.H., Nussenzweig R.S. T Cell Responses to Pre-Erythrocytic Stages of Malaria: Role in Protection and Vaccine Development Against Pre-Erythrocytic Stages. *Annual Review of Immunology* 1993;11:687-727.

Navarro P., Silva M., Garrido E., Coronado N., Kaswan E. Malaria: medical and surgical complications. *Bol Chil Parasitol* 1989;44:17-23.

Ndungu F.M., Cadman E.T., Coulcher J., Nduati E., Couper E., Macdonald D.W., Ng D., Langhorne J. Functional memory B cells and long-lived plasma cells are generated after a single Plasmodium chabaudi infection in mice. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000690.

Nemeth E., Valore E.V., Territo M., Schiller G., Lichtenstein A., Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461-2463.

Nevalainen T.J., Haapanen T.J. Distribution of pancreatic (group I) and synovial-type (group II) phospholipases A₂ in human tissues. *Inflammation* 1993;17:453-464.

Nevalainen T.J., Laine V.J., Grass D.S. Expression of human group II phospholipase A₂ in transgenic mice. *J Histochem Cytochem* 1997;45:1109-1119.

Newman K.C., Korbel D.S., Hafalla J.C., Riley E.M. Cross-Talk with Myeloid Accessory Cells Regulates Human Natural Killer Cell Interferon-gamma Responses to Malaria. *PLoS Pathogens* 2006;2:e118.

Nok A.J., Esievo K.A., Ibrahim S., Ukoha A.I., Ikediobi C.O. Phospholipase A₂ from Trypanosoma congolense: characterization and haematological properties. *Cell Biochem Funct* 1993;11:125-130.

Nunes D.C., Figueira M.M., Lopes D.S., De Souza D.L., Izidoro L.F., Ferro E.A., Souza M.A., Rodrigues R.S., Rodrigues V.M., Yoneyama K.A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from Bothrops pauloensis snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Parasitology* 2013;140:844-854.

O'Garra A., Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology* 2000;10:542-550.

Obi R.K., Okangba C.C., Nwanebu F.C., Ndubuisi U.U., Orji N.M. Premunition in Plasmodium falciparum malaria. *Afr. J. Biotechnol.* 2010;9:1397-1401.

Ohta S., Imamura M., Xing W., Boyce J.A., Balestrieri B. Group V Secretory Phospholipase A₂ Is Involved in Macrophage Activation and Is Sufficient for Macrophage Effector Functions in Allergic Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology* 2013.

Ohtsuki M., Taketomi Y., Arata S., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Takanezawa Y., Aoki J., Arai H., Yamamoto K., Kudo I., Murakami M. Transgenic Expression of Group V, but Not Group X, Secreted Phospholipase A₂ in Mice Leads to Neonatal Lethality because of Lung Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:36420-36433.

Oka S., Arita H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. *J Biol Chem* 1991;266:9956-9960.

- Olivier M., Van Den Ham K., Shio M.T., Kassa F.A., Fougeray S. Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology* 2014;5:25.
- Omer F.M., Kurtzhals J.A.L., Riley E.M. Maintaining the Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF-beta? *Parasitology Today* 2000;16:18-23.
- Oslund R.C., Cermak N., Gelb M.H. Highly Specific and Broadly Potent Inhibitors of Mammalian Secreted Phospholipases A2. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008;51:4708-4714.
- Pages F., Orlandi-Pradines E., Corbel V. Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2007;37:153-161.
- Pankoui Mfonkeu J.B., Gouado I., Fotso Kuaét H., Zambou O., Amvam Zollo P.H., Grau G.E.R., Combes V. Elevated Cell-Specific Microparticles Are a Biological Marker for Cerebral Dysfunctions in Human Severe Malaria. *PLOS ONE* 2010;5:e13415.
- Pappa V., Seydel K., Gupta S., Feintuch C.M., Potchen M.J., Kampondeni S., Goldman-Yassen A., Veenstra M., Lopez L., Kim R.S., Berman J.W., Taylor T., Daily J.P. Lipid metabolites of the phospholipase A2 pathway and inflammatory cytokines are associated with brain volume in paediatric cerebral malaria. *Malar J* 2015;14:513.
- Park J.B., Lee C.S., Jang J.-H., Ghim J., Kim Y.-J., You S., Hwang D., Suh P.-G., Ryu S.H. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012;12:782.
- Pasloske B.L., Howard R.J. Malaria, the Red Cell, and the Endothelium. *Annual Review of Medicine* 1994;45:283-295.
- Passero L.F., Laurenti M.D., Tomokane T.Y., Corbett C.E., Toyama M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol Res* 2008;102:1025-1033.
- Pawlowic M.C., Zhang K. *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence. *Mol Biochem Parasitol* 2012;186:11-20.
- Piris-Gimenez A., Paya M., Lambeau G., Chignard M., Mock M., Touqui L., Goossens P.L. In vivo protective role of human group IIa phospholipase A2 against experimental anthrax. *J Immunol* 2005;175:6786-6791.
- Pressac M. Les rongeurs, formation spéciale à l'expérimentation animale. 2006.
- Pruzanski W., Lambeau L., Lazdunsky M., Cho W., Kopilov J., Kuksis A. Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2005;1736:38-50.
- Pruzanski W., Vadas P. Phospholipase A2--a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991;12:143-146.
- Pucer A., Brglez V., Payré C., Pungercar J., Lambeau G., Petan T. Group X secreted phospholipase A(2) induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival. *Mol Cancer* 2013;12:111.
- Quach N.D., Arnold R.D., Cummings B.S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical Pharmacology* 2014;90:338-348.
- Quehenberger O., Armando A.M., Brown A.H., Milne S.B., Myers D.S., Merrill A.H., Bandyopadhyay S., Jones K.N., Kelly S., Shaner R.L., Sullards C.M., Wang E., Murphy R.C., Barkley R.M., Leiker T.J., Raetz C.R.H., Guan Z., Laird G.M., Six D.A., Russell D.W., McDonald J.G., Subramaniam S., Fahy E., Dennis E.A. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research* 2010;51:3299-3305.
- Quispe A.M., Pozo E., Guerrero E., Durand S., Baldeviano G.C., Edgel K.A., Graf P.C.F., Lescano A.G. Plasmodium vivax Hospitalizations in a Monoendemic Malaria Region: Severe Vivax Malaria? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2014;91:11-17.
- Reid R., C. . Inhibitors of Secretory Phospholipase A2 Group IIA. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12:3011-3026.
- Reynolds L.J., Mihelich E.D., Dennis E.A. Inhibition of venom phospholipases A2 by manoalide and manoalogue. Stoichiometry of incorporation. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:16512-16517.

Ridgley E.L., Ruben L. Phospholipase from *Trypanosoma brucei* releases arachidonic acid by sequential sn-1, sn-2 deacylation of phospholipids. *Mol Biochem Parasitol* 2001;114:29-40.

Rodhain J. *Plasmodium vinckei* n. sp. Un deuxième *Plasmodium* de parasite de rongeurs sauvages au Katanga. *Ann. Soc. belg. Med. Trop.* 1952;32:275-279.

Rodrigues F.G., Santos M.N., de Carvalho T.X., Rocha B.C., Riehle M.A., Pimenta P.F., Abraham E.G., Jacobs-Lorena M., Alves de Brito C.F., Moreira L.A. Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Mol Biol* 2008;17:175-183.

Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999;5:285-294.

Romani L., Puccetti P., Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10:611-636.

Rouault M., Bollinger J.G., Lazdunski M., Gelb M.H., Lambeau G. Novel Mammalian Group XII Secreted Phospholipase A2 Lacking Enzymatic Activity. *Biochemistry* 2003;42:11494-11503.

Rouault M., Le Calvez C., Boilard E., Surrel F., Singer A., Ghomashchi F., Bezzine S., Scarzello S., Bollinger J., Gelb M.H., Lambeau G. Recombinant Production and Properties of Binding of the Full Set of Mouse Secreted Phospholipases A2 to the Mouse M-Type Receptor. *Biochemistry* 2007;46:1647-1662.

Rouault M., Rash L.D., Escoubas P., Boilard E., Bollinger J., Lomonte B., Maurin T., Guillaume C., Canaan S., Deregnacourt C., Schrevel J., Doglio A., Gutierrez J.M., Lazdunski M., Gelb M.H., Lambeau G. Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity. *Biochemistry* 2006;45:5800-5816.

Rts S.C.T.P. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)* 2015;386:31-45.

Rubio J.M., Rodriguez J.P., Gil-de-Gómez L., Guijas C., Balboa M.A., Balsinde J. Group V Secreted Phospholipase A2 Is Upregulated by IL-4 in Human Macrophages and Mediates Phagocytosis via Hydrolysis of Ethanolamine Phospholipids. *The Journal of Immunology* 2015.

Ryan J.R., Stoute J.A., Amon J., Dunton R.F., Mtalib R., Koros J., Owour B., Luckhart S., Wirtz R.A., Barnwell J.W., Rosenberg R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:575-581.

Rys-Sikora K.E., Konger R.L., Schoggins J.W., Malaviya R., Pentland A.P. Coordinate expression of secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 in activated human keratinocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2000;278:C822-C833.

Saegusa J., Akakura N., Wu C.-Y., Hoogland C., Ma Z., Lam K.S., Liu F.-T., Takada Y.K., Takada Y. Pro-inflammatory Secretory Phospholipase A2 Type IIA Binds to Integrins α 5 β 3 and α 4 β 1 and Induces Proliferation of Monocytic Cells in an Integrin-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283:26107-26115.

Sato H., Isogai Y., Masuda S., Taketomi Y., Miki Y., Kamei D., Hara S., Kobayashi T., Ishikawa Y., Ishii T., Ikeda K., Taguchi R., Ishimoto Y., Suzuki N., Yokota Y., Hanasaki K., Suzuki-Yamamoto T., Yamamoto K., Murakami M. Physiological roles of group X-secreted phospholipase A2 in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. *J Biol Chem* 2011;286:11632-11648.

Sato H., Kato R., Isogai Y., Saka G.-i., Ohtsuki M., Taketomi Y., Yamamoto K., Tsutsumi K., Yamada J., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Kobayashi T., Ikeda K., Taguchi R., Hatakeyama S., Hara S., Kudo I., Itabe H., Murakami M. Analyses of Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Reveal Potential Participation of This Enzyme in Plasma Lipoprotein Modification, Macrophage Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:33483-33497.

Sato H., Taketomi Y., Isogai Y., Masuda S., Kobayashi T., Yamamoto K., Murakami M. Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation. *Biochemical Journal* 2009;421:17-27.

Sato H., Taketomi Y., Isogai Y., Miki Y., Yamamoto K., Masuda S., Hosono T., Arata S., Ishikawa Y., Ishii T., Kobayashi T., Nakanishi H., Ikeda K., Taguchi R., Hara S., Kudo I., Murakami M. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120:1400-1414.

Sato H., Taketomi Y., Ushida A., Isogai Y., Kojima T., Hirabayashi T., Miki Y., Yamamoto K., Nishito Y., Kobayashi T., Ikeda K., Taguchi R., Hara S., Ida S., Miyamoto Y., Watanabe M., Baba H., Miyata K., Oike Y., Gelb Michael H., Murakami M. The Adipocyte-Inducible Secreted Phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E Play Distinct Roles in Obesity. *Cell Metabolism* 2014;20:119-132.

Scaccabarozzi D., Deroost K., Corbett Y., Lays N., Corsetto P., Sale F.O., Van den Steen P.E., Taramelli D. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with Plasmodium chabaudi AS or Plasmodium berghei NK65. *Malar J* 2018;17:18.

Schevitz R.W., Bach N.J., Carlson D.G., Chirgadze N.Y., Clawson D.K., Dillard R.D., Draheim S.E., Hartley L.W., Jones N.D., Mihelich E.D., Olkowski J.L., Snyder D.W., Sommers C., Wery J.P. Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A2. *Nature Structural Biology* 1995;2:458.

Schofield L., Ferreira A., Altszuler R., Nussenzweig V., Nussenzweig R.S. Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro. *The Journal of Immunology* 1987;139:2020-2025.

Schofield L., Grau G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 2005;5:722.

Schorn C., Janko C., Latzko M., Chaurio R., Schett G., Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in Immunology* 2012;3.

Schuster F.L. Cultivation of Plasmodium spp. *Clinical Microbiology Reviews* 2002;15:355-364.

Schwarzer E., Alessio M., Ulliers D., Arese P. Phagocytosis of the Malarial Pigment, Hemozoin, Impairs Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen, CD54, and CD11c in Human Monocytes. *Infection and Immunity* 1998;66:1601-1606.

Schwarzer E., Turrini F., Ulliers D., Giribaldi G., Ginsburg H., Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment [published erratum appears in J Exp Med 1993 Mar 1;177(3):following 873]. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;176:1033-1041.

Schwetz J., Peel M. Congenital malaria and placental infections amongst the negroes of Central Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1934;28:167-174.

Scott G.A., Jacobs S.E., Pentland A.P. sPLA2-X Stimulates Cutaneous Melanocyte Dendricity and Pigmentation Through a Lysophosphatidylcholine-Dependent Mechanism. *Journal of Investigative Dermatology* 2006;126:855-861.

Seilhamer J.J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J.A., Kloss J., Johnson L.K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* 1989;264:5335-5338.

Sharma Y.D. Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria. *International Journal of Biochemistry* 1991;23:775-789.

Shelby J.P., White J., Ganesan K., Rathod P.K., Chiu D.T. A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14618-14622.

Shridas P., Bailey W.M., Talbott K.R., Oslund R.C., Gelb M.H., Webb N.R. Group X secretory phospholipase A2 enhances TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol* 2011;187:482-489.

Shridas P., Zahoor L., Forrest K.J., Layne J.D., Webb N.R. Group X secretory phospholipase A2 regulates insulin secretion through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2014;289:27410-27417.

Shuaibu M.N., Kanbara H., Yanagi T., Ameh D.A., Bonire J.J., Nok A.J. Phospholipase A2 from Trypanosoma brucei gambiense and Trypanosoma brucei brucei: inhibition by organotins. *J Enzyme Inhib* 2001;16:433-441.

Sibmooh N., Yamanont P., Krudsood S., Leowattana W., Brittenham G., Looareesuwan S., Udomsangpetch R. Increased fluidity and oxidation of malarial lipoproteins: relation with severity and induction of endothelial expression of adhesion molecules. *Lipids Health Dis* 2004;3:15.

Silliman C.C., Moore E.E., Zallen G., Gonzalez R., Johnson J.L., Elzi D.J., Meng X., Hanasaki K., Ishizaki J., Arita H., Ao L., England K.M., Banerjee A. Presence of the M-type sPLA2 receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2002;283:C1102-C1113.

Singer A.G., Ghomashchi F., Le Calvez C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem* 2002;277:48535-48549.

Singh S., Singh N., Handa R. Tumor necrosis factor-alpha in patients with malaria. *Indian J Malariol.* 2000;37:27-33.

Six D.A., Dennis E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1488:1-19.

Smith R.C., Kizito C., Rasgon J.L., Jacobs-Lorena M. Transgenic mosquitoes expressing a phospholipase A(2) gene have a fitness advantage when fed Plasmodium falciparum-infected blood. *PLOS ONE* 2013;8:e76097.

Sribar J., Krizaj I. Secreted Phospholipases A2 – not just Enzymes. *Acta Chim. Slov.* 2011;58:678-688.

Stegmann K.A., De Souza J.B., Riley E.M. IL-8-induced expression of high-affinity IL-2R on murine NK cells is essential for NK-cell IFN-gamma production during murine Plasmodium yoelii infection. *European Journal of Immunology* 2015;45:3431-3440.

Stephens R., Culleton R.L., Lamb T.J. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. *Trends in parasitology* 2012;28:73-82.

Stephens R., Langhorne J. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001208.

Stevenson M.M., Kraal G. Histological changes in the spleen and liver of C57BL6 and AJ mice during Plasmodium chabaudi AS infection. *Experimental and Molecular Pathology* 1989;51:80-95.

Stevenson M.M., Riley E.M. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* 2004;4:169.

Sun T., Chakrabarti C. Schizonts, merozoites, and phagocytosis in falciparum malaria. *Ann Clin Lab Sci.* 1985;15:465-469.

Sved P., Scott K.F., McLeod D., King N.J., Singh J., Tsatralis T., Nikolov B., Boulas J., Nallan L., Gelb M.H., Sajinovic M., Graham G.G., Russell P.J., Dong Q. Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:6934-6940.

Takada Y., Fujita M. Secreted Phospholipase A2 Type IIA (sPLA2-IIA) Activates Integrins in an Allosteric Manner. *Protein Reviews: Volume 17.* Singapore: Springer Singapore, 2017: 103-115.

Tan L.K., Yacoub S., Scott S., Bhagani S., Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of Plasmodium vivax malaria. *Lancet Infect Dis* 2008;8:449-454.

Tannous S., Ghanem E. A bite to fight: front-line innate immune defenses against malaria parasites. *Pathog Glob Health.* 2018;112:1-12.

Taylor-Robinson A.W., Phillips R.S., Severn A., Moncada S., Liew F.Y. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* 1993;260:1931-1934.

Taylor S.M., Parobek C.M., Fairhurst R.M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2012b;12:457-468.

Tobin C.M., Knoll L.J. A patatin-like protein protects Toxoplasma gondii from degradation in a nitric oxide-dependent manner. *Infect Immun* 2012;80:55-61.

Torre D., Speranza F., Giola M., Matteelli A., Tambini R., Biondi G. Role of Th1 and Th2 Cytokines in Immune Response to Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:348-351.

Trager W., Jensen J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-675.

Tremaroli V., Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012;489:242-249.

Triggiani M., Granata F., Oriente A., Gentile M., Petraroli A., Balestrieri B., Marone G. Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 2002;32:67-76.

- Tripp C.S., Wolf S.F., Unanue E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:3725-3729.
- Tsunawaki S., Sporn M., Ding A., Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988;334:260.
- Udomsangpetch R., Sueblinvong T., Pattanapanyasat K., Dharmkrong-at A., Kittikalayawong A., Webster H.K. Alteration in cytoadherence and rosetting of Plasmodium falciparum- infected thalassemic red blood cells. *Blood* 1993;82:3752-3759.
- Ulich T.R., Dakay E.B., Williams J.H., Ni R.X. In vivo induction of neutrophilia, lymphopenia, and diminution of neutrophil adhesion by stable analogs of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha. *Am J Pathol* 1986;124:53-58.
- Urban C., F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology* 2006;8:668-676.
- Vadas P., Hay J.B. The release of phospholipase A2 from aggregated platelets and stimulated macrophages of sheep. *Life Sci* 1980;26:1721-1729.
- Vadas P., Keystone J., Stefanski E., Scott K., Pruzanski W. Induction of circulating group II phospholipase A2 expression in adults with malaria. *Infect Immun* 1992;60:3928-3931.
- Vadas P., Taylor T.E., Chimsuku L., Goldring D., Stefanski E., Pruzanski W., Molyneux M.E. Increased serum phospholipase A2 activity in Malawian children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1993a;49:455-459.
- Valentin E., Ghomashchi F., Gelb M.H., Lazdunski M., Lambeau G. On the Diversity of Secreted Phospholipases A2 : Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 1999a;274:31195-31202.
- Valentin E., Koduri R.S., Scimeca J.-C., Carle G., Gelb M.H., Lazdunski M., Lambeau G. Cloning and Recombinant Expression of a Novel Mouse-secreted Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry* 1999b;274:19152-19160.
- van der Heyde H.C., Huszar D., Woodhouse C., Manning D.D., Weidanz W.P. The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse. *The Journal of Immunology* 1994;152:4557-4562.
- Vandekerckhove J., Courtois G., Coulon S., Ribeil J.-A., Hermine O. Regulation of erythropoiesis. 2009.
- Verheij H.M., Westerman J., Sternby B., de Haas G.H. The complete primary structure of phospholipase A2 from human pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1983;747:93-99.
- von der Weid T., Honarvar N., Langhorne J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *The Journal of Immunology* 1996;156:2510-2516.
- Vuong P.N., Richard F., Snounou G., Coquelin F., Renia L., Gonnet F., Chabaud A.G., Landau I. Development of irreversible lesions in the brain, heart and kidney following acute and chronic murine malaria infection. *Parasitology* 1999;119 (Pt 6):543-553.
- Walliker D., Carter R., Morgan S. Genetic Recombination in Malaria Parasites. *Nature* 1971:561-562.
- Wambua S., Mwangi T.W., Kortok M., Uyoga S.M., Macharia A.W., Mwacharo J.K., Weatherall D.J., Snow R.W., Marsh K., Williams T.N. The Effect of alpha-Thalassaemia on the Incidence of Malaria and Other Diseases in Children Living on the Coast of Kenya. *PLOS Medicine* 2006;3:e158.
- Wang F., Wang J., Liu D., Su Y. Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Analytical Biochemistry* 2010;399:211-217.
- Wang V.M., Rosen R.B., Meyerle C.B., Kurup S.K., Ardeljan D., Agron E., Tai K., Pomykala M., Chew E.Y., Chan C.C., Tuo J. Suggestive association between PLA2G12A single nucleotide polymorphism rs2285714 and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy in patients with exudative age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2012;18:2578-2585.

Wang Y., Kowalski P.E., Thalmann I., Ornitz D.M., Mager D.L., Thalmann R. Otoconin-90, the mammalian otoconial matrix protein, contains two domains of homology to secretory phospholipase A(2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:15345-15350.

Watanabe K., Fujioka D., Saito Y., Nakamura T., Obata J.E., Kawabata K., Watanabe Y., Mishina H., Tamaru S., Hanasaki K., Kugiyama K. Group X secretory PLA2 in neutrophils plays a pathogenic role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H95-104.

Weinrauch Y., Abad C., Liang N.S., Lowry S.F., Weiss J. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J Clin Invest* 1998;102:633-638.

Weiss J., Inada M., Elsbach P., Crowl R.M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:26331-26337.

Weiss J.P. Molecular determinants of bacterial sensitivity and resistance to mammalian Group IIA phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2015;1848:3072-3077.

Weiss W.R., Mellouk S., Houghten R.A., Sedegah M., Kumar S., Good M.F., Berzofsky J.A., Miller L.H., Hoffman S.L. Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1990;171:763-773.

Wenisch C., Parschalk B., Narzt E., Looareesuwan S., Graninger W. Elevated Serum Levels of IL-10 and IFN-gamma in Patients with Acute *Plasmodium falciparum* Malaria. *Clin Immunol and Immunopathol.* 1995;74:115-117.

WHO. World Malaria Report 2017. 2017; Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Willems E., Mateizel I., Kemp C., Cauffman G., Sermon K., Leyns L. Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells. *The International journal of developmental biology* 2006;50:627-635.

Williams T.N., Maitland K., Bennett S., Ganczakowski M., Peto T.E.A., Newbold C.I., Bowden D.K., Weatherall D.J., Clegg J.B. High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature* 1996;383:522.

Williams T.N., Mwangi T.W., Wambua S., Peto T.E.A., Weatherall D.J., Gupta S., Recker M., Penman B.S., Uyoga S., Macharia A., Mwacharo J.K., Snow R.W., Marsh K. Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha-thalassaemia and the sickle cell trait. *Nature Genetics* 2005;37:1253.

Wilson S.K., Knoll L.J. Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa. 2018;107:34-46.

Wipasa J., Elliott S., Xu H., Good Michael F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology and Cell Biology* 2002;80:401-414.

Wootton P.T.E., Arora N.L., Drenos F., Thompson S.R., Cooper J.A., Stephens J.W., Hurel S.J., Hurt-Camejo E., Wiklund O., Humphries S.E., Talmud P.J. Tagging SNP haplotype analysis of the secretory PLA2-V gene, PLA2G5, shows strong association with LDL and oxLDL levels, suggesting functional distinction from sPLA2-IIA: results from the UDACS study. *Human Molecular Genetics* 2007;16:1437-1444.

Xu H., Wipasa J., Yan H., Zeng M., Makobongo M.O., Finkelman F.D., Kelso A., Good M.F. The Mechanism and Significance of Deletion of Parasite-specific CD4(+) T Cells in Malaria Infection. *The Journal of Experimental Medicine* 2002;195:881-892.

Yamamoto K., Miki Y., Sato H., Nishito Y., Gelb M.H., Taketomi Y., Murakami M. Expression and function of group IIE phospholipase A2 in mouse skin. *Journal of Biological Chemistry* 2016.

Yap G.S., Stevenson M.M. *Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol* 1992;75:340-352.

Yindom L.M., Forbes R., Aka P., Janha O., Jeffries D., Jallow M., Conway D.J., Walther M. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Tissue Antigens* 2010;79:104-113.

Young M.D., Eyles D.E., Burgess R.W., Jeffery G.M. Experimental testing of the immunity of Negroes to *Plasmodium vivax*. *J Parasitol* 1955;41:315-318.

- Yu J.A., Li H., Meng X., Fullerton D.A., Nemenoff R.A., Mitchell J.D., Weyant M.J. Group IIA secretory phospholipase expression correlates with group IIA secretory phospholipase inhibition-mediated cell death in K-ras mutant lung cancer cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012a;144:1479-1485.
- Yu J.A., Mauchley D., Li H., Meng X., Nemenoff R.A., Fullerton D.A., Weyant M.J. Knockdown of secretory phospholipase A2 IIA reduces lung cancer growth in vitro and in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012b;144:1185-1191.
- Zandecki M., Ugo V. Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. 2012.
- Zeissig S., Murata K., Sweet L., Publicover J., Hu Z., Kaser A., Bosse E., Iqbal J., Hussain M.M., Balschun K., Röcken C., Arlt A., Günther R., Hampe J., Schreiber S., Baron J.L., Moody D.B., Liang T.J., Blumberg R.S. Hepatitis B virus-induced alterations in hepatocyte CD1D lipid antigens activate Natural Killer T cells and contribute to protective immunity. *Nature medicine* 2012;18:1060-1068.
- Zeiger B., Steingrub J., Laterre P-F., Dmitrienko A., Fukiishi Y., Abraham E. LY315920NA/S-5920, a selective inhibitor of group IIA secretory phospholipase A2, fails to improve clinical outcome for patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine* 2005; 33(8):1741-1748.
- Zhao X., Yang H., Yamoah E.N., Lundberg Y.W. Gene targeting reveals the role of Oc90 as the essential organizer of the otoconial organic matrix. *Developmental biology* 2007;304:508-524.
- Zidouh S., Jidane S., Belkouch A., Bekkali H., Belyamani L. Spontaneous splenic rupture from Plasmodium ovale malaria. *The American Journal of Emergency Medicine* 2017;35:347-349.
- Zidovetzki R., Sherman I.W., O'Brien L. Inhibition of Plasmodium falciparum phospholipase A2 by chloroquine, quinine, and arteether. *J Parasitol* 1993;79:565-570.
- Zieler H., Keister D.B., Dvorak J.A., Ribeiro J.M. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp Biol* 2001;204:4157-4167.
- Zimmerman P.A. Plasmodium vivax Infection in Duffy-Negative People in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2017;97:636-638.
- Zvaritch E., Lambeau G., Lazdunski M. Endocytic Properties of the M-type 180-kDa Receptor for Secretory Phospholipases A. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:250-257.