

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DES EFFETS DE L'HÈME SUR LA
MORPHOLOGIE DES LYMPHOCYTES B ET MACROPHAGES ET SUR
L'INFECTION DES GLOBULES ROUGES PAR LE PARASITE *PLASMODIUM*
CHABAUDI

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

VÉRONIQUE GAUDREULT ST-LAURENT

OCTOBRE 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Quelle belle expérience ce fut que de faire une maîtrise dans le laboratoire du Dre Scorza. Nous avons la chance d'avoir une très belle équipe, dont je tiens à remercier tous les membres. Je souhaite tout particulièrement remercier ma directrice de maîtrise, la Dre Tatiana Scorza, pour son enseignement, son temps, sa patience, sa compréhension et la confiance qu'elle a manifesté à mon égard tout au long de ce travail. J'ai beaucoup apprécié votre grande disponibilité, votre respect envers vos étudiants et votre support, autant professionnel qu'émotionnel. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude envers le Dr Armando Jardim pour m'avoir offert le privilège de réaliser un stage très enrichissant dans son laboratoire. Merci pour votre disponibilité et vos encouragements.

Je tiens à témoigner de ma reconnaissance envers Jaime Sanchez pour tous ses excellents conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur. Un grand merci à Esther et Diane pour leurs encouragements et leur écoute. Finalement, cet ouvrage et ces années d'études n'auraient pas été les mêmes sans le support de ma famille dont l'appui a été source de motivation et de persévérance. Un merci bien particulier à ma mère et à Simon pour leur intérêt, leurs éloges et leur présence assidue.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
CADRE THÉORIQUE DU SUJET	5
1.1 La malaria	5
1.1.1 Le cycle infectieux.....	6
1.1.2 L'immunité antipaludique	8
1.1.2.1 L'implication des macrophages dans l'infection	10
1.1.2.2 L'implication des lymphocytes B dans l'infection	12
1.1.3 L'anémie paludique	14
1.2 L'hème/hémine	16
1.2.1 Structure et fonction	17
1.2.2 Effets modulateurs et cytotoxicité de l'hème	19
1.2.2.1 Effets pro-oxydants et pro-apoptotiques de l'hème	20
1.2.2.2 Effets pro-inflammatoires de l'hème	21
1.2.2.3 Effets de l'hème sur l'immunité innée et adaptative	21
1.2.2.4 Effets de l'hème sur les érythrocytes	24
1.2.3 Détoxification de l'hème	25
1.2.3.1 L'haptoglobine	26
1.2.3.2 L'hémopexine	27
1.2.3.3 L'albumine	29
1.2.3.4 L'hème oxygénase	30

CHAPITRE II	
OBJECTIFS ET DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	32
2.1 Hypothèses et objectifs	32
2.2 Méthodologie	33
2.2.1 Souris BALB/c	33
2.2.2 Collecte des cellules du péritoine	33
2.2.3 Collecte des érythrocytes	34
2.2.4 Préparation de l'hème	34
2.2.5 Traitement d'hème <i>in vitro</i>	35
2.2.6 Activation des lymphocytes T par le complexe peptide/CMH-II	35
2.2.7 Traitement d'hème <i>in vivo</i>	36
2.2.8 Infection des souris par <i>Plasmodium</i> et suivi de la parasitémie	36
2.2.9 Cytofluorométrie	37
2.2.10 Dosage de l'hémoglobine	38
2.2.11 Dosage de l'hémopexine	38
2.2.12 Dosage de l'hème	39
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	40
3.1 Répercussions de l'hème <i>in vitro</i> sur les cellules B, les macrophages et sur la présentation d'un antigène par les CMH-II	40
3.2 Répercussions de l'hème <i>in vivo</i> sur les cellules B, les macrophages et les concentrations sériques d'hème et d'hémopexine	52
3.3 Répercussions de l'hème <i>in vivo</i> sur les érythrocytes et sur l'infection par <i>Plasmodium chabaudi adami DK</i>	71
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	76
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET OUVERTURE SUR LE PROJET	90
APPENDICES.....	92
BIBLIOGRAPHIE.....	97

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Cycle parasitaire de <i>Plasmodium</i> 8
1.2	Représentation de la structure quaternaire de l'hémoglobine, d'une molécule d'hème et de ses liaisons avec l'oxygène et la globine 18
1.3	Représentation de la structure de l'hème 18
1.4	Mécanismes et sous-produits de la catalyse de l'HE Fe ²⁺ (II) en HE Fe ³⁺ (III) et en HE Fe ⁴⁺ (IV) 19
1.5	Oxydation de l'hémoglobine libre et système de détoxification par l'haptoglobine, l'hémopexine, l'albumine et l'hème-oxygénase-1 limitant le stress oxydatif 26
3.1	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur les cellules exprimant CD19 42
3.2	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur l'expression des molécules du CMH-II par les cellules CD19 ⁺ 43
3.3	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur les cellules exprimant F4/80 46
3.4	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur l'expression des molécules du CMH-II par les cellules F4/80 ⁺ 47
3.5	Morphologie des populations de cellules F4/80 ⁺ 48
3.6	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur les cellules F4/80 ⁺ ayant la morphologie des macrophages 49
3.7	Impact de l'hémopexine sur les cellules péritonéales CD19 ⁺ traitées par l'hème <i>in vitro</i> 50
3.8	Effets de l'hème sur la capacité des molécules du CMH-II à présenter un peptide antigénique aux lymphocytes T 51
3.9	Effets de l'hème <i>in vivo</i> sur les cellules CD19 ⁺ 53
3.10	Effets de l'hème <i>in vivo</i> sur les cellules F4/80 ⁺ 55
3.11	Effets de l'hème <i>in vivo</i> sur les cellules F4/80 ⁺ ayant la morphologie des macrophages 56

3.12	Effets d'un traitement d'hème <i>in vitro</i> sur l'expression de CD19 par les cellules péritonéales en provenance de souris conditionnées avec de l'hème	58
3.13	Effets d'un traitement d'hème <i>in vitro</i> sur l'expression de CMH-II par les cellules CD19 ⁺ en provenance de souris conditionnées avec de l'hème	59
3.14	Effets d'un traitement d'hème <i>in vitro</i> sur les cellules CD19 ⁺ péritonéales en provenance de souris infectées par <i>Plasmodium</i>	60
3.15	Effets d'un traitement d'hème <i>in vitro</i> sur les cellules péritonéales F4/80 ⁺ en provenance de souris conditionnées avec de l'hème	62
3.16	Effets d'un traitement d'hème <i>in vivo</i> sur les cellules F4/80 ⁺ péritonéales en provenance de souris infectées par <i>Plasmodium</i>	63
3.17	Proportion de lymphocytes B2 (conventionnels) et de B1 en provenance de la cavité péritonéale de souris contrôles, préconditionnées avec de l'hème et ayant résolu l'infection par <i>Plasmodium</i>	67
3.18	Concentrations sériques d'hème chez les souris traitées avec de l'hème ou au pic d'infection par <i>Plasmodium</i>	69
3.19	Concentrations sériques d'hémopexine chez les souris traitées avec de l'hème ou infectées par <i>Plasmodium</i>	70
3.20	Impacts des prétraitements d'hème durant l'infection par <i>Plasmodium</i>	73
3.21	Le traitement préalable avec de l'hème affecte la capacité des érythrocytes à être infectés par <i>Plasmodium</i>	75
A.1	Effets d'un traitement d'hème <i>in vitro</i> prolongé sur les cellules péritonéales F4/80 ⁺	92
B.1	Nombre de cellules péritonéales totales chez les souris traitées avec l'hème <i>in vitro</i>	93
C.1	Effets de l'hème <i>in vitro</i> sur la durée de vie des érythrocytes	94
D.1	Concentrations sériques d'hémopexine chez les souris infectées par deux souches différentes de <i>Plasmodium</i>	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Récapitulatif des effets de l'hème <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur les lymphocytes B et macrophages	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALB	ALBUMINE
BCR	Récepteur de cellule B
CD	Cluster de différenciation
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CO	Monoxyde de carbone
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
Ctrl	Contrôle
D.O.	Densité optique
FSC	Foward scatter (taille moyenne des cellules)
Gmean	Moyenne de fluorescence
GRs	Globules rouges
GRs-p	Globules rouges parasités
GRs-np	Globules rouges non parasités
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ESM	Erreur standard de la moyenne
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HE	Hème\hémine
HEL	Lysozyme d'oeuf
Hgb	Hémoglobine
HgbFe ³⁺	Méthémoglobine
HO	Hème-oxygénase

Hp	Haptoglobine
HPX	Hémopexine
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
IP	Intrapéritonéale
IV	INTRAVEINEUX
Kd	Constante de dissociation
LDL	LIPOPROTÉINE DE FAIBLE DENSITÉ
NO	Oxyde nitrique
OVA	Ovalbumine
OVAp	Peptide de l'ovalbumine
<i>P. c. adami</i>	<i>Plasmodium chabaudi adami</i>
PECs	Cellules d'exsudats du péritoine
PS	Phosphatidylsérine
Strep	Streptavidine
SSC	Side scatter (complexité moyenne des cellules)
T CD4 ⁺	Lymphocyte T auxiliaire
T CD8 ⁺	Lymphocyte T cytotoxique
T NK	Lymphocyte T « Natural killer »
TCR	Récepteur des cellules T
Th1-2	Lymphocyte T auxiliaire de type 1 ou 2
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale

RÉSUMÉ

La malaria est une maladie infectieuse causée par des protozoaires du genre *Plasmodium*. La reproduction intraérythrocytaire du parasite génère une anémie hémolytique exacerbée chez l'hôte, favorisant la libération de taux élevés d'hème (HE) en circulation. La structure et les éléments qui composent l'HE en font une molécule cytotoxique et pro-oxydante lorsqu'elle est libre dans la circulation. L'objectif de cette investigation était de caractériser l'impact de l'HE sur les macrophages et lymphocytes B, tout en évaluant la possibilité que l'HE soit responsable de l'exacerbation de l'anémie paludique par un effet direct sur les érythrocytes ou indirectement par la modulation des molécules du CMH-II et présentation d'antigènes autoimmuns. Nos recherches *in vitro* et *in vivo*, sur des souris BALB/c, ont démontré un effet dévastateur de l'hémine (HE oxydé) sur les macrophages et cellules B du péritoine. Malgré la modulation *in vitro* de l'expression des molécules du CMH-II par les lymphocytes B, l'HE n'a pas été en mesure de modifier le niveau d'activation des cellules T par des cellules B pré-traitées avec l'HE. Toutefois, les injections d'HE *in vivo*, par deux voies distinctes, ont conféré une résistance au stress oxydatif aux cellules subsistantes, qui sont devenues tolérantes à un second traitement d'HE *in vitro*. Les cellules collectées à la suite des traitements par l'HE, ainsi que les lymphocytes B provenant de souris ayant résolu l'infection par *Plasmodium chabaudi adami*, étaient réfractaires aux effets de l'HE *in vitro*, en ce qui a trait à leur morphologie, leur expression des molécules du CMH-II, de F4/80 (macrophages) et de CD19 (cellules B). De plus, ce préconditionnement par l'HE a conduit à une diminution de la durée de l'infection par *P. c. adami* ainsi qu'à une baisse de la parasitémie à tous les jours de l'infection. L'injection du composé sulfo-NHS-biotine combiné à l'utilisation d'un marqueur d'ADN (cytrak orange), a permis de faire le suivi de l'infection par cytofluorométrie et la distinction entre les érythrocytes infectés présents au moment des injections d'HE, de ceux arrivés en circulation par la suite. Cette innovation nous a permis de préciser qu'une modification structurelle des érythrocytes, limitant l'invasion parasitaire ou la survie des globules rouges parasités, serait à l'origine de la décroissance parasitaire. L'intensité inexplicée de l'hémolyse associée à la malaria est un sujet d'étude depuis de nombreuses années et semble être causée par une multitude de facteurs distincts. Nos résultats offrent une explication d'ordre évolutive où l'hémolyse paludique aurait favorisé la survie de l'hôte infecté et limité l'impact des infections récurrentes rencontrées dans les pays endémiques.

INTRODUCTION

L'hème (HE) est une molécule ubiquitaire constituée d'un atome de fer compris au centre d'un anneau porphyrine et est principalement connue pour son rôle dans la liaison du dioxygène dans l'hémoglobine (Hgb) (Ponka, 1999). Bien que cette molécule essentielle se retrouve dans un état stable à l'intérieur des érythrocytes, sa structure et les éléments qui la composent en font une molécule cytotoxique et hautement oxydante lorsqu'elle se retrouve libre en circulation. Dans les dernières années, plusieurs recherches ont identifié l'HE comme étant en partie responsable de l'aggravation de nombreuses maladies d'ordres hémolytique, infectieuse et/ou cardiaque (Belcher *et al.*, 2013; Eskew *et al.*, 1999; Jeney *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2010).

La malaria est une maladie infectieuse causée par le protozoaire du genre *Plasmodium*. La reproduction intra-érythrocytaire du parasite génère une hémolyse chez l'hôte atteint, causant à son tour la libération d'HE en circulation. Cette hémolyse, consolidée par une inhibition de l'érythropoïèse, entraîne une anémie modérée ou sévère responsable de près de 30 % de la mortalité infantile associée au paludisme dans les pays endémiques (Perkins *et al.*, 2011). Il est toutefois reconnu que l'ampleur de la destruction des globules rouges (GRs) associée avec la malaria est beaucoup trop importante pour n'être reliée qu'à la reproduction intra-érythrocytaire des parasites. La ou les causes de cette perte massive de GRs durant l'infection ne sont toujours pas déterminées, malgré l'émission de plusieurs hypothèses (Chang et Stevenson, 2004; Evans *et al.*, 2006; Fendel *et al.*, 2011). Une reconnaissance biaisée des GRs sains par des cellules immunitaires est l'une des principales hypothèses à l'étude et bien que la suppression des macrophages ou des

lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) avant l'infection réduisent l'anémie paludique murin la cause de cette reconnaissance inappropriée est inconnue (Evans *et al.*, 2006).

Les résultats de l'étude de Sutherland et collègues (1995) illustrent une activation polyclonale des lymphocytes T $CD4^+$ par l'HE et suggèrent une modification de la structure des molécules du complexe majeure d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), protéines impliquées dans la présentation de peptides antigéniques reconnus par les lymphocytes T $CD4^+$. Il a été proposé qu'en modifiant les molécules du CMH-II, l'HE pourrait favoriser leur liaison avec plusieurs peptides différents et de ce fait, promouvoir l'exposition/reconnaissance de nouveaux répertoires de peptides antigéniques, y compris les peptides du soi (Sutherland *et al.*, 1995).

Dans un autre ordre d'idée, les recherches *in vitro* de Gatidis et collègues (2009) démontrent que l'HE serait un important inducteur d'apoptose érythrocytaire (éryptose). Par un processus d'oxydation membranaire, il serait en mesure d'induire l'externalisation des phosphatidylsérines (PS) sur la membrane externe des érythrocytes et de permettre ainsi leur reconnaissance et élimination par les macrophages.

Les résultats de ces recherches impliquent que l'HE pourrait jouer un rôle clé dans la destruction des GRs sains non-parasités (GRs-np) durant la malaria. Ainsi, l'hémolyse induite par la reproduction des parasites conduirait à la libération d'HE en circulation et pourrait mener d'une part à une modification des molécules du CMH-II et à la présentation des peptides appartenant aux érythrocytes phagocytés et d'une autre part à l'oxydation des membranes des GRs menant à leur sénescence et élimination accélérée. Les concentrations d'HE plasmatiques libres étant connues pour être élevées dans plusieurs pathologies, telles que la drépanocytose, la thalassémie et la sphérocytose, en plus de la malaria, il apparait important d'identifier ses effets sur les cellules environnantes, plus spécifiquement sur les cellules engageant l'immunité cellulaire et les érythrocytes (Kumar et Bandyopadhyay, 2005).

Les macrophages constituent la première ligne de défense contre l'infection par *Plasmodium* et ont pour rôle de restreindre la multiplication parasitaire en phagocytant les parasites et GRs-p. De plus, les macrophages murins ont la particularité de produire une grande quantité d'oxyde nitrique (NO), un agent endogène ayant des effets antiparasitaires contre plusieurs protozoaires (James, 1995; Schneemann et Schoeden, 2007). Les macrophages activés par l'infection expriment de plus les molécules du CMH-II avec lesquelles ils activent les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques aux protéines parasitaires et permettent ainsi le relais entre l'immunité innée et adaptative (Segura *et al.*, 2007).

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de l'immunité humorale antipaludique. Elles ont la charge de produire et de sécréter des anticorps spécifiques aux protéines de *Plasmodium* et ainsi d'opsoniser les parasites et GRs-p pour accélérer leur détection par les phagocytes et leur élimination. Les lymphocytes B expriment de manière constitutive les molécules du CMH-II dont elles se servent pour solliciter l'aide des lymphocytes T CD4⁺ dans leur processus d'activation ainsi que pour activer d'autres cellules T CD4⁺. Les cellules B permettent ainsi le lien entre l'immunité humorale et cellulaire (Sproul *et al.*, 2000).

Il a été démontré que l'HE affectait plusieurs facettes de la fonction immunitaire des macrophages et lymphocytes B, mais très peu d'information est rapportée sur l'effet de l'HE sur la morphologie et l'expression des protéines essentielles de ces cellules (Cambos *et al.*, 2010; Fortes *et al.*, 2012 ; Watanabe-Matsui *et al.*, 2011). De plus, leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en font un choix clé pour étudier l'effet de l'HE sur l'expression du CMH-II et sur sa fonction de présentation d'antigènes et d'activation des cellules T.

L'hémopexine (HPX) est la seule protéine plasmatique responsable du transport de l'HE libre aux hépatocytes à des fins de dégradation par l'enzyme hème-oxygénase (HO). Cette protéine éboueuse est reconnue pour lier l'HE dans un ratio 1:1 et ainsi

d'en inhiber la toxicité (Ascenzi *et al.*, 2005; Mauk *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2007). Il est toutefois rapporté que la concentration plasmatique d'HPX chute drastiquement durant un épisode paludique chez l'humain, mais rien n'est encore rapporté chez la souris (Fendel *et al.*, 2010). Il est essentiel de mesurer les taux d'HPX durant une infection par la souche *DK* non seulement pour évaluer la conformité du modèle à l'étude, mais aussi pour déterminer les taux d'HE libres en circulation qui seront responsables des effets constatés.

Dans le laboratoire du Dre Tatiana Scorza (UQAM), l'infection expérimentale murine est générée par le protozoaire *Plasmodium chabaudi adami DK* (*P. c. adami DK*) qui parasite environ 15 à 20 % des GRs totaux au pic d'infection et qui induit une anémie sévère (Hgb < 5 g/dl) avant la rémission des souris. Ce modèle d'infection est adéquat pour étudier la destruction non spécifique des érythrocytes durant la malaria puisqu'il reflète bien l'infection humaine où une anémie sévère est induite malgré un faible taux de GRs infectés.

Ce projet offre ainsi un aperçu des effets de l'HE sur les macrophages et lymphocytes B, en ce qui a trait à leur morphologie et expression des protéines CMH-II, F4/80 (macrophages) et CD19 (lymphocytes B). Nous proposons aussi un rôle dualistique de l'HE libéré durant la malaria et discutons de ses effets sur les érythrocytes. Cette investigation informe de plus sur l'importance et l'abondance de la protéine éboueuse HPX dans l'infection paludique murine, dont les concentrations sériques impliquent une disparité importante avec l'infection humaine. Finalement, nous proposons une explication d'ordre évolutive en ce qui a trait à l'exacerbation de l'hémolyse paludique.

CHAPITRE I

CADRE THÉORIQUE DU SUJET

1.1 La malaria

La malaria (ou paludisme), causée par les protozoaires *Plasmodium*, est la maladie parasitaire plus importante à ce jour. La bio-informatique a permis d'estimer que la relation homme-*Plasmodium* s'est fortifiée avec l'émergence de l'agriculture, il y a plus de 10 000 ans (Hay *et al.*, 2004). La malaria a d'ailleurs été rapportée dans des écrits datant du siècle précédant l'Antiquité et a même été décrite par Hippocrate 400 ans av. J.-c. (Hempelmann et Krafts, 2013). Plusieurs milliers d'années plus tard, la mortalité et la morbidité associées à la malaria s'accroissent encore et font de cette maladie l'une des plus mortelles de notre ère (Hay *et al.*, 2004; Hempelmann et Krafts, 2013). Bien que, depuis la campagne d'éradication de 1960, la malaria ait été éliminée dans plus d'une soixantaine de pays, elle reste toujours endémique dans plus de 100 pays et territoires d'Afrique, d'Amérique centrale et d'Asie et tend à ressurgir dans certaines régions où elle était éradiquée (Najera *et al.*, 2011; Mehlotra et Zimmerman, 2006).

La malaria est déclenchée à la suite de l'infection par un sporozoaire de la famille des *Plasmodiidae*, du genre *Plasmodium*. Des deux sous-genres connus, *Plasmodium* et *Laverania*, quatre espèces sont à l'origine de la malaria chez les humains: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* (Rich et Ayala, 2006). Chacune de ces espèces présente un phénotype différent à tous les stades de leur maturation (sporozoïtes, mérozoïtes, trophozoïtes, gamétocytes). Ce caractère singulier explique

en partie la variation de symptômes reliés à la malaria en plus de l'absence d'immunité protectrice inter-espèces. De plus, puisque le parasite s'évade de la réponse immune de son hôte en ayant recourt à la variation antigénique, le système immunitaire ne peut procurer une résistance immédiate contre une réinfection par le même parasite. Ainsi, une personne vivant en région endémique pourra être infectée plusieurs fois par chacune des souches de *Plasmodium* avant d'avoir des cellules immunitaires mémoires capables de la protéger contre l'infection (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002; Taylor-Robinson, 2009).

Dans de nombreux cas, les symptômes associés à l'infection par *Plasmodium* sont bénins et l'hôte survivra suite à un épisode de fièvre accompagné de céphalée et d'une anémie modérée. Toutefois, pour plusieurs hôtes la malaria se manifestera par une hyperparasitémie, une défaillance rénale, une détresse respiratoire, une pathologie cérébrale et/ou une anémie et hypoglycémie sévère (Perkins *et al.*, 2011). De 10 à 30 % des patients présentant une malaria sévère en mourront (Hawkes *et al.*, 2011). Bien que cela représente moins de 0.2 % des cas de paludisme recensés, le nombre global d'infections par *Plasmodium* est si imposant que ce faible pourcentage équivaut à plus d'un million de décès annuels, faisant de la malaria la maladie parasitaire la plus funeste (Trampuz *et al.*, 2003).

1.1.1 Le cycle infectieux

Le cycle de vie de *Plasmodium* est complexe et passe par plusieurs stades de maturation et différenciation autant à l'intérieur de son vecteur invertébré à sang froid, le moustique, que dans son hôte intermédiaire vertébré homéotherme, l'homme (figure 1.1). L'itinéraire de ces protozoaires débute dans les glandes salivaires d'un *Anophèle* femelle où plusieurs sporozoïtes infectieux attendent d'être transmis à un nouvel hôte. L'inoculation se produit lors de la prise d'un repas sanguin par le

moustique parasite qui injecte les sporozoïtes *plasmodiaux* dans la circulation sanguine de son hôte. Suite à l'infection, les parasites se dirigent vers le foie pour s'y reproduire par schizogonie. En moins d'une heure, les sporozoïtes y colonisent les hépatocytes parenchymateux et s'y différencient jusqu'à produire plusieurs milliers de mérozoïtes par cellule infectée. Près de 10 jours après l'invasion des hépatocytes, les nouveaux mérozoïtes formés s'évadent de leur cellule-hôte en s'emparant d'une portion de leur membrane cytoplasmique qu'ils utilisent comme bouclier protecteur. Ce mérosome contient plusieurs milliers de mérozoïtes camouflés à l'intérieur d'une bicouche phospholipidique qui traversent ainsi aisément les cellules de Kupffer et autres phagocytes des sinusoides hépatiques et rejoignent finalement la circulation sanguine. Une fois dans le sang, les mérosomes éclatent et libèrent les mérozoïtes qui envahissent les GRs dans lesquels ils se reproduisent de manière asexuée (Good et Doolan, 1999; Mouchet *et al.*, 2008, p.22-25; Sturm *et al.*, 2006). Ce cycle méticuleusement synchronisé prend de 24 à 48 heures, dépendant de l'espèce de *Plasmodium*, et permet de produire de 10 à 30 mérozoïtes par GRs-p. Le cycle se termine par la lyse des érythrocytes infectés et l'invasion de nouveaux GRs sains et perdurera ainsi jusqu'à l'éradication de l'infection par les défenses immunitaires ou la mort de l'hôte. La reproduction érythrocytaire est responsable à elle seule de la pathologie associée à la malaria, les symptômes réapparaissant à chaque période de rupture des GRs-p. Après plusieurs cycles érythrocytaires de reproduction asexuée, quelques mérozoïtes entreront dans un cycle gamogonique afin de prendre la forme de gamétocytes mâles et femelles qui seront ingérés par un nouvel *Anophèle* lors d'un repas sanguin et permettront la propagation des parasites à un nouvel hôte (Good et Doolan, 1999; Mouchet *et al.*, 2008, p.22-25).

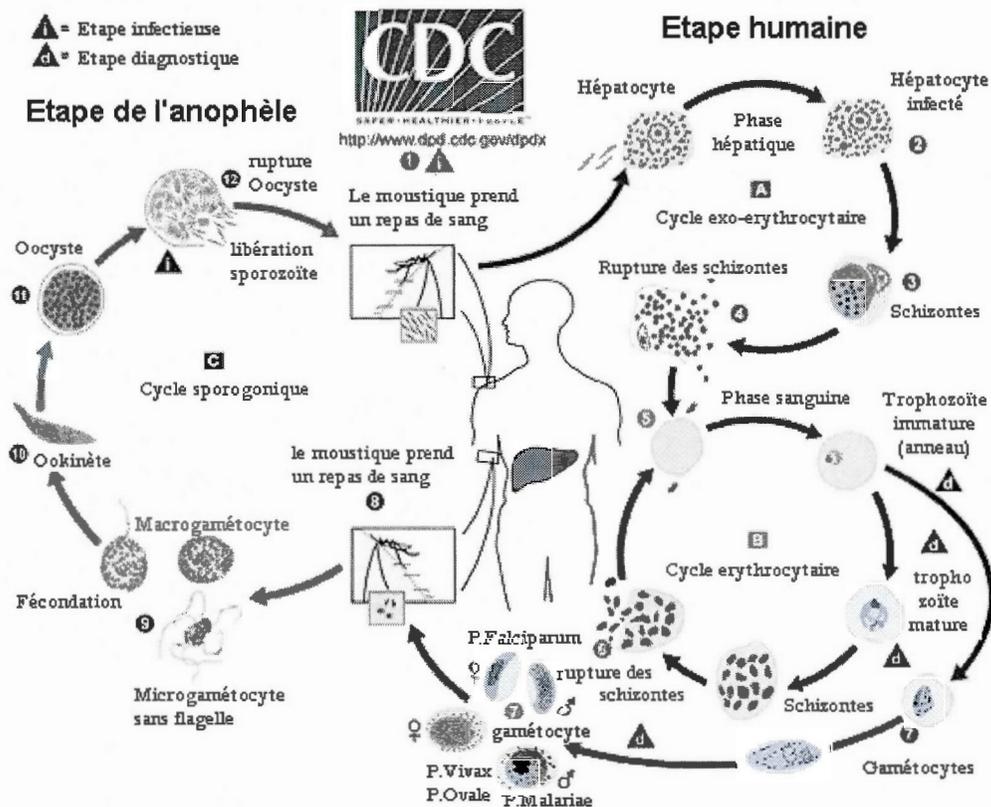


Figure 1.1 Cycle infectieux de *Plasmodium*. (Tiré de Centers for Disease Control & Prevention Center for Global Health).

1.1.2 L'immunité antipaludique

Tel que mentionné précédemment, l'instauration d'une immunité protectrice contre l'infection par *Plasmodium* est longue à obtenir. Le parasite a recours à la variation antigénique qui lui permet d'infecter plusieurs fois le même hôte et sa morphologie change plusieurs fois durant un seul cycle de reproduction hépatique et érythrocytaire, ce qui rend la reconnaissance plus difficile pour les cellules immunitaires (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002). De plus, il passe une grande partie de sa vie dans les GRs, des cellules dépourvues de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I permettant de signaler l'intrus intracellulaire aux cellules T cytotoxiques (CD8⁺) et cellules « natural killers » (NK).

Il est reconnu qu'une immunité cellulaire et humorale est essentielle pour protéger adéquatement contre l'infection par *Plasmodium*, mais la distinction entre les facteurs impliqués dans la protection et la pathogenèse de la malaria sont encore imprécis (Angulo et Fresno, 2002; Chua *et al.*, 2013). Les souches murines C57BL/6 et A/J, respectivement résistante et susceptible à l'infection par *P. chabaudi chabaudi* ont permis de caractériser et d'identifier les différentes cellules et cytokines favorisant ou non la pathogenèse paludique. Ces modèles ont mis de l'avant qu'une résistance aux complications de l'infection est reliée à une induction précoce des cellules T auxiliaires de type 1 (Th1), suivis d'une polarisation de type Th2. Les souris C57BL/6 inoculées avec *P. chabaudi* répondent par une forte production d'interleukine (IL)-12 par les splénocytes tôt dans la phase érythrocytaire de l'infection. Cette cytokine permet la différenciation des cellules de type Th1 qui sécrètent l'interféron gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α). Ces signaux pro-inflammatoires sont reconnus pour stimuler l'activité phagocytaire des macrophages qui contrôlent la parasitémie lors de la phase précoce de l'infection (Segura *et al.*, 2007; Taylor-Robinson *et al.*, 1993). Au pic de parasitémie, la production d'IL-4 dirige la polarisation des lymphocytes Th2 qui permettent le développement d'une immunité humorale chez ces souris et la sécrétion d'anticorps spécifiques conduisant à la clairance des parasites (Balmer *et al.*, 2000; Taylor-Robinson *et al.*, 1993). La résistance à l'infection implique toutefois une balance Th1/Th2 orchestrée au bon moment, par une concentration suffisante, mais non trop imposante, de cytokines pro-inflammatoires. Il est avancé que des facteurs tels l'âge, la quantité de parasites inoculés, la durée d'exposition à l'antigène et l'hérédité influenceraient fortement cette polarisation et production de cytokines, toutefois beaucoup d'autres facteurs encore inconnus sembleraient être en cause (Perlmann *et al.*, 1999).

1.1.2.1 L'implication des macrophages dans l'infection

Les recherches chez les modèles murins résistants et susceptibles ont confirmé le rôle clé des macrophages dans le contrôle de l'infection par *Plasmodium*. Les macrophages phagocytent les parasites et GRs-p et contribuent à l'instauration de l'immunité adaptative en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en activant les cellules T CD4⁺ spécifiques par présentation des antigènes sur leurs molécules du CMH-II (Segura *et al.*, 2007). Les macrophages expriment plusieurs récepteurs de surface leur permettant de détecter le parasite et sont les premiers à déceler l'invasion par *Plasmodium*. Tôt durant l'infection, le récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires CD36 lie des protéines parasitaires présentes sur la membrane des GRs-p, alors que leur récepteur 1 du complément (CD35) permet la détection des GRs-p liées aux fragments C3b du complément. De plus, les récepteurs de type Toll-2, 4 et 9 détectent certaines toxines, protéines et pigments parasitaires (Chua *et al.*, 2013). Finalement, après la production d'anticorps spécifiques, les récepteurs Fc des macrophages lient les parasites et GRs-p ayant été opsonisés (Chua *et al.*, 2013; Segura *et al.*, 2007). Les macrophages, activés par la reconnaissance du pathogène, phagocytent les parasites et cellules infectées qui sont ensuite dégradés dans un phagolysosome. Les peptides immunodominants issus de cette dégradation sont finalement apprêtés sur des molécules du CMH-II et externalisés. Cette présentation d'antigène active les lymphocytes T CD4⁺ avec des TCRs spécifiques aux peptides antigéniques et déclenche l'immunité cellulaire cruciale à l'élimination du parasite (Segura *et al.*, 2007). Les cytokines sécrétées par les macrophages activés dirigent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules auxiliaires de type 1 ou 2 et sont déterminantes dans l'instauration d'une immunité protectrice. Le type de récepteur impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose des GRs-p, le taux et les types d'antigènes présents, qui diffèrent en fonction de la souche de *Plasmodium*, semblent moduler le type de cytokines produites par les macrophages (Chua *et al.*, 2013).

Plusieurs recherches ont démontré l'importance des macrophages dans l'induction d'une immunité protectrice lors d'un épisode paludique où une déplétion de ces cellules conduit à une parasitémie et mortalité accrue chez la souche murine C57BL/6, pourtant résistante à *P. c. chabaudi* (Segura *et al.*, 2007). Par contre, plusieurs études ont argumenté en faveur d'un rôle pathologique des macrophages durant la malaria. Il a été démontré dans plusieurs cas d'anémie paludique sévère que la suractivation des macrophages contribuait à une phagocytose accrue et une perte accélérée des GRs-np et menait à leur sécrétion massive de TNF- α et NO qui avaient un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse (Chua *et al.*, 2013).

La protéine F4/80 est une glycoprotéine de 160 kDa présente uniquement sur la membrane plasmique des macrophages murins et des cellules de Langerhans, ce qui fait de F4/80 un antigène de choix pour la reconnaissance spécifique des macrophages du péritoine (Lin *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010). Son niveau d'expression est toutefois dépendant du stade de maturation et de développement des macrophages. Par exemple, les monocytes circulant expriment aussi F4/80, mais en moindre mesure que les macrophages matures, qui expriment aussi plus fortement la protéine à l'état quiescent qu'une fois activés (Lin *et al.*, 2005). Le rôle précis de F4/80 sur les macrophages n'est pas encore connu, mais McKnight et collègues (1996) ont proposé un rôle d'adhésion tissulaire et de signalisation intracellulaire important dans la réponse des macrophages en lien avec leur microenvironnement. De plus, quelques recherches ont mis de l'avant un rôle clé pour F4/80 dans l'instauration d'une immunité régulatrice et dans la production d'IFN- γ par les lymphocytes T NK. En effet, l'inactivation génétique de F4/80, par délétion d'un exon du gène codant pour la protéine F4/80, ne conduit à aucune indisposition dans le développement et la différenciation des macrophages, mais rend la production de cellules T régulatrices impossible suite à un essai de privilège immun (Lin *et al.*, 2005). De plus, l'inactivation de F4/80 avec un anticorps monoclonal spécifique dans une suspension de splénocytes de souris SCID (immunodéficiences combinées sévères) exposés à la

bactérie *Listeria monocytogenes*, inhibe l'interaction entre les macrophages et les cellules T NK ainsi que la production d'IFN- γ subséquente à l'activation de ces lymphocytes (Warschkau et Kiderlen, 1999).

1.1.2.2 L'implication des lymphocytes B dans l'infection

L'instauration d'une immunité protectrice durant la malaria est dépendante de la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B. Ces cellules, en plus de représenter l'immunité humorale, agissent comme CPA capable d'internaliser et de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Les cellules B quiescentes reconnaissent des antigènes sous leur conformation native par le biais de leur récepteur (BCR), qui est composé d'une immunoglobuline (Ig) membranaire et d'un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$. Une fois lié à leur antigène spécifique, l'Ig s'internalise et l'antigène est apprêté en peptides qui se lient aux molécules du CMH-II avant d'être externalisés. Les lymphocytes B conventionnels (B2) sont dépendants des cellules T pour leur activation et contrairement aux macrophages, qui sont activés par la liaison avec l'antigène, ils utilisent le complexe peptide-CMH-II à leur surface pour solliciter un signal de costimulation provenant d'un lymphocyte T $CD4^+$ spécifique à l'antigène présenté (Sproul *et al.*, 2000; Wagle *et al.*, 2000). Cette cellule T $CD4^+$ reconnaît et lie par son TCR à la fois le peptide antigénique et la molécule du CMH-II présentés par la cellule B. Cette double reconnaissance spécifique induit l'expression de la molécule CD40 (CD40L) par les cellules T qui se lie à son récepteur sur le lymphocyte B. Cette interaction déclenche une cascade de signalisation menant à l'activation des deux cellules, la sécrétion de cytokines par le lymphocyte T et la prolifération de la cellule B en plasmocyte sécréteur d'Ig spécifiques à l'antigène ou en cellule mémoire (Janeway *et al.*, 2009, p381).

La protection apportée par les anticorps durant une infection paludique a été confirmée chez des hôtes souffrants de malaria sévère ayant été soignés par transfert d'Ig provenant de témoins hyperimmuns (immunité passive). Les anticorps principalement produits durant la malaria sont dirigés contre des protéines de surface des mérozoïtes, des protéines parasitaires exprimées à la surface des GRs-p et des protéines érythrocytaires servant de ligand au parasite (Beeson *et al.*, 2008).

Les lymphocytes B mémoires sont des cellules de très grande longévité ayant été stimulées par leur antigène et permettant une réponse humorale rapide et spécifique lors d'une rencontre subséquente avec l'antigène. L'affinité des anticorps produits est proportionnelle au nombre de rencontre avec l'antigène, les Ig du plasmocyte passant par l'hypermutation somatique à chaque occasion (Jayneway *et al.*, 2009, p390). Pour des raisons encore obscures, l'immunité humorale mémoire est affectée durant la malaria et une faible proportion de lymphocytes B mémoires sont formés suite à l'infection par *Plasmodium*. La variation antigénique, l'assortiment d'antigènes complexes, l'épuisement des lymphocytes B suite à leur activation polyclonale massive et l'altération des différentes populations de cellules B sont quelques unes des nombreuses hypothèses émises pour expliquer cette modulation des cellules B mémoires par le parasite (Scholzen et Sauerwein, 2013). Une exposition répétée et fréquente par le parasite conduit donc vers une immunité clinique, mais en moindre mesure vers une immunité antiparasitaire. Ainsi, l'hôte supportera toujours la croissance des parasites, mais les symptômes associés à leur reproduction seront allégés. De plus, cette forme d'immunité mémoire est de courte durée et doit être maintenue par des rencontres fréquentes avec le parasite (Scholzen et Sauerwein, 2013).

Le cluster de différenciation 19 (CD19) est une glycoprotéine transmembranaire de 95 kDa faisant partie de la superfamille des Ig. La protéine CD19 est exprimée très tôt dans le développement des lymphocytes B et perdure jusqu'à la différenciation

des cellules en plasmocytes, chez qui elle n'est plus présente. Sa fonction primaire est de contribuer à l'activation des lymphocytes B en augmentant la transduction du signal activateur canalisé par le BCR et en diminuant le seuil de « cross-linking » nécessaire à l'activation de la cellule B. Il a d'ailleurs été démontré qu'un recrutement des molécules CD19 à la surface des lymphocytes B conduisait à une activation plus forte de ces cellules en comparaison à une inhibition de CD19 qui menait à leur hyporéceptivité. De plus, l'engagement de CD19 sur les cellules B conduisait à l'induction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, impliquée dans la maintenance des lymphocytes B en périphérie (Del Nagro *et al.*, 2005).

1.1.3 L'anémie paludique

L'anémie est une condition caractérisée par une forte chute du nombre total de GRs dans le sang et une baisse de la concentration d'Hgb. Une anémie dite sévère associée avec la malaria est déclarée lorsque le pourcentage de GRs dans le sang (hématocrite) est inférieur à 15 % (normalement $42 \% \pm 5$) ou que la concentration en Hgb est inférieure à 5 g/dl (normalement 12 à 17 g/dl) (Fendel *et al.*, 2010; Molnier, 2008 p.5). L'anémie est généralement causée par une abondante perte de sang, une production insuffisante de GRs et/ou une destruction excessive des érythrocytes en circulation (Uthman, 1998 p.3).

L'anémie paludique, autant humaine que murine, est quant à elle provoquée par une suppression de l'érythropoïèse ou par une dysérythropoïèse ainsi que par la clairance et la destruction des GRs-p et des GRs-np (Lamikanra *et al.*, 2007). L'absence d'une production adéquate de nouveaux érythrocytes semblent être occasionnée par l'incapacité des cellules érythroïdes de la moelle osseuse à répondre à la baisse d'hématocrite et à la hausse d'érythropoïétine, l'hormone de croissance des GRs. Cette dysfonction serait entre autre une conséquence de la formation du pigment

malarique hémozoïne par les parasites (Lamikanra *et al.*, 2007). Ce cristal aurait pour conséquence d'affecter la fonction des macrophages et d'ainsi perturber l'interaction des érythroblastes avec les macrophages qui supportent leur différenciation finale en réticulocytes. Plusieurs cas d'érythropoïèses inefficaces chez l'homme sont rapportés dans des situations où la parasitémie est très faible et indiquent que d'autres facteurs entrent en jeu dans la suppression de la formation de GRs par la moelle osseuse (Lamikanra *et al.*, 2007). Un système compensatoire où l'érythropoïèse est effectuée par la rate est reconnu chez les souris atteintes de malaria, mais n'est toujours pas mis en évidence chez l'homme, bien qu'une telle compensation soit déjà reconnue chez les personnes souffrant de thalassémie.

La destruction des GRs suite à la schizogonie est l'une des causes de l'anémie paludique, mais l'absence de relation entre le nombre de GRs-p et l'ampleur de la destruction des érythrocytes indiquent que d'autres facteurs sont impliqués dans cette hémolyse (Fendel, *et al.*, 2010). Il est d'ailleurs maintenant reconnu que l'anémie paludique est exacerbée par la destruction des GRs-np (Chang et Stevenson, 2004; Evans *et al.*, 2006; Fendel *et al.*, 2010; Omodeo-Salè *et al.*, 2003). Plusieurs chercheurs rapportent même que pour chacun des GRs-p détruits, 10 GRs-np seront éliminés chez l'homme (Evans *et al.*, 2006; Gallo *et al.*, 2012). Chez la souris, la majorité des souches infectieuses engendrent une forte charge parasitaire qui amoindrissent l'importance de la clairance des GRs-np dans l'essor de l'anémie (Lamikanra *et al.*, 2007). De nombreux mécanismes ont été invoqués pour expliquer la destruction non spécifique des érythrocytes chez l'homme. Dondorp et collègues (1999) soutiennent que la réduction de la déformabilité des GRs-np accentue leur destruction lors de leur passage dans les micro-capillaires de la rate. Omodeo-Salè et collègues (2003) ont démontré que l'oxydation des lipides membranaires des GRs-np conduit à leur sénescence accélérée et à leur destruction concomitante par les cellules phagocytaires. L'implication des réactions auto-immunitaires où la production d'anticorps dirigés contre les protéines érythrocytaires de l'hôte conduirait à la

destruction des GRs-np par les phagocytes a aussi été mise de l'avant. Plusieurs recherches ont démontré que les sérums de souris infectées par différentes souches de *Plasmodium* contenaient des auto-anticorps dirigés contre des protéines membranaires érythrocytaires (Kanbara *et al.*, 1988; Kataaha *et al.*, 1984; Schetters *et al.*, 1989; Waitumbi *et al.*, 2000). Quoi qu'il en soit, le ou les mécanismes responsables de cette réduction de la déformabilité, sénescence accélérée, peroxydation membranaire et/ou réponse auto-immune ne sont pas encore élucidés et impliquent certainement autant de facteurs qu'il n'y a de conséquences.

1.2 L'hème\hémine

L'HE est une molécule ubiquitaire nécessaire à la vie aérobie. Chacune des cellules nucléées des mammifères synthétisent et maintiennent une concentration intracellulaire d'HE de l'ordre des 100 nM, lui permettant de répondre à plusieurs fonctions vitales telles que le transport de l'oxygène, la génération d'énergie et la détoxification (Wijayanti *et al.*, 2004; Tracz *et al.*, 2007). Les érythrocytes, ayant pour rôle le transport d'oxygène à travers le corps, ont le fardeau de contenir 20 mM d'HE chacun (Balla *et al.*, 2003). L'HE est une molécule hautement cytotoxique et insoluble et ne peut ainsi pas circuler librement dans un organisme. Il est constamment maintenu dans un état stable et soluble par des liaisons avec des protéines. Les taux d'HE libre en circulation chez un organisme sain sont donc relativement bas et sont généralement occasionnés par la destruction spontanée des érythrocytes sénescents. Les maladies d'ordre hémolytique telles que la drépanocytose, la thalassémie et la sphérocytose sont caractérisées par des altérations de l'Hgb (drépanocytose et thalassémie) et par une anomalie de la membrane des GRs (sphérocytose) qui font en sorte de diminuer la durée de vie des GRs qui sont plus prompts à la lyse (ASH, 2008; Lang *et al.*, 2012). Ces désordres érythrocytaires, tout comme l'anémie paludique, sont reconnus pour induire la libération de grandes

quantités d'HE dans la circulation (Chiabrando *et al.*, 2014). De plus en plus de recherches ciblent les effets toxiques de cette molécule libre qui semblerait aggraver les symptômes de nombreuses maladies d'origine hémolytique (Muller-Eberhard, 1968; Balla *et al.*, 2003; Vinchi et Tolosano, 2013).

1.2.1 Structure et fonction de l'hème

L'HE est le groupement prosthétique de plusieurs protéines responsables de l'homéostasie cellulaire chez les mammifères : les hémoprotéines. Il compose par exemple le cytochrome C de la chaîne de transport des électrons permettant la respiration cellulaire, mais il est principalement connu pour son rôle de récepteur d'O₂ dans l'Hgb et la myoglobine. La molécule d'Hgb est constituée de 4 sous-unités protéiques nommées globines, chacune rattachée à une molécule d'HE (figure 1.2). La molécule d'HE est constituée d'un anneau organique, une porphyrine, composé de 4 anneaux pyrrole au centre desquels se retrouve un atome de fer ferreux (Fe²⁺) (figure 1.3). L'ion Fe²⁺ est maintenu au centre de la porphyrine par des liaisons covalentes de coordination avec les 4 atomes d'azote des anneaux pyrroles. L'HE est lié à l'Hgb par le même type de liaison, cette fois entre l'ion Fe²⁺ de l'HE et un résidu histidine de la globine. Le transport de l'O₂ est possible par des interactions de type dipôle-dipôle entre la molécule d'O₂ et le Fe²⁺ de l'HE. Cet agencement permet à chaque molécule d'Hgb de lier 4 molécules d'O₂ (figure 1.2) (Brown *et al.*, 1980; Kumar et Bandyopadhyay, 2005; Naik, 2012, p.114). La structure de l'HE et son ion central de fer lui permettent ainsi de lier l'O₂, mais aussi le NO et le monoxyde de carbone (CO) en plus d'être un acteur principal de la chaîne de transport d'électron. De plus, l'HE est le cofacteur de plusieurs enzymes responsables du métabolisme des substances toxiques (cytochrome p450), des changements de pression artérielle (prostaglandines synthases) et des réactions d'oxydoréduction (catalase, peroxydase) (Tracz *et al.*, 2007).

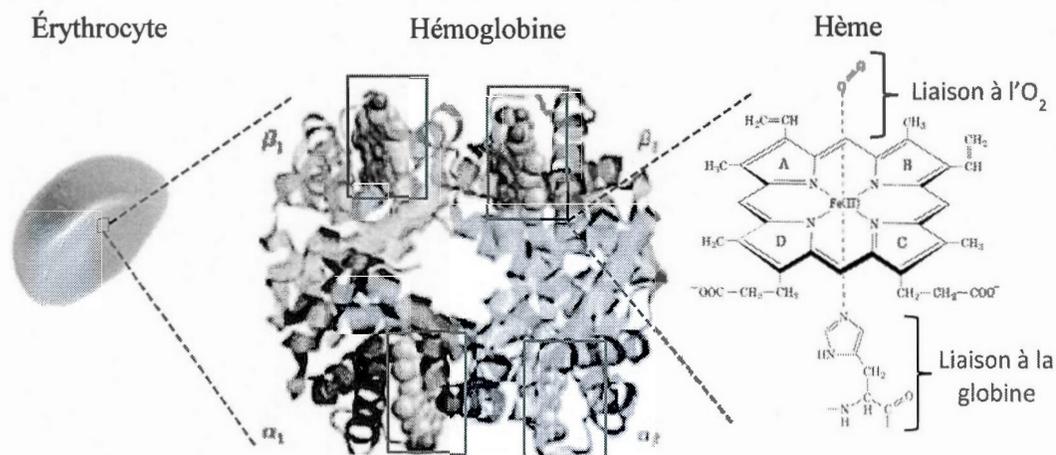


Figure 1.2 Représentation de la structure quaternaire de l'hémoglobine, d'une molécule d'hème et de ces liaisons avec l'oxygène et la globine. (Modifiée de Campbell et Farrell, 2012, p99 et Casiday et Frey, 2008)

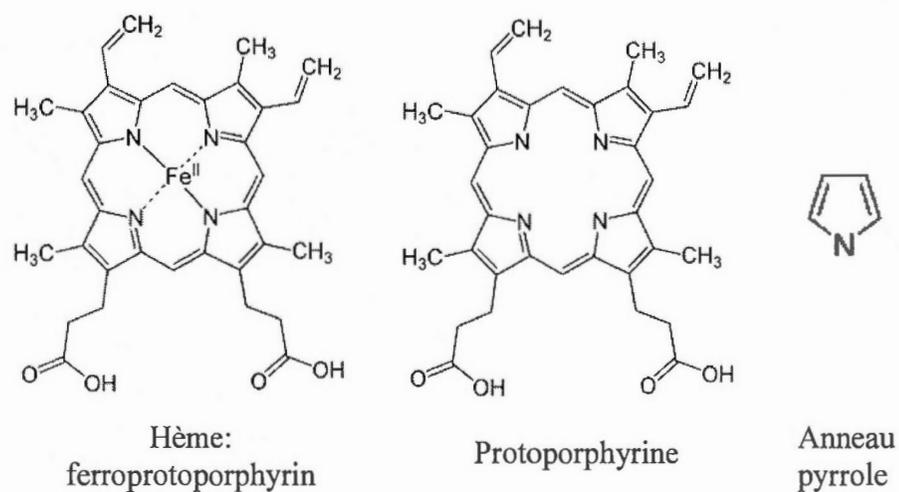


Figure 1.3 Représentation de la structure et de la composition d'une molécule d'hème. (Modifiée de Maines 1992, p76).

1.2.2 Effets modulateurs et cytotoxicité de l'hème

La lyse des érythrocytes durant un épisode d'anémie hémolytique libère les molécules d'Hgb dans la circulation sanguine causant l'oxydation du Fe^{2+} de l'HE en fer ferrique (Fe^{3+}) en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), selon la réaction de Fenton (figure 1.4). L'Hgb oxydée, la méthémoglobine (HgbFe^{3+}), est hautement réactive et instable et relâche rapidement ses groupements HE dans la circulation. Une fois libre, l'HE oxydé devient hémine (HE), une molécule liposoluble cytotoxique, pro-inflammatoire et pro-oxydante (Ascenzi *et al.*, 2005; Mense et Zhang, 2006; Pamplona, *et al.*, 2007; Vinchi *et al.*, 2008). La formation de l'HE Fe^{3+} provoque l'apparition de plusieurs types de radicaux libres, dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) et les hydroperoxydes ($\text{HOO}\cdot$) (Carlsen *et al.*, 2005; Girotti, 1998; Tracz *et al.*, 2007). Ces radicaux ont la propriété d'oxyder les protéines et lipides avoisinants. Il est aussi proposé que les lipides peroxydés (LOOH) interagissent avec le Fe^{3+} pour former un oxyde de fer Fe^{4+} très puissant, ainsi qu'une forme radicalaire de lipides oxydés ($\text{LOO}\cdot$), qui ne font qu'accentuer les dommages cellulaires et tissulaires (figure 1.4) (Carlsen *et al.*, 2005; Schaer *et al.*, 2013).

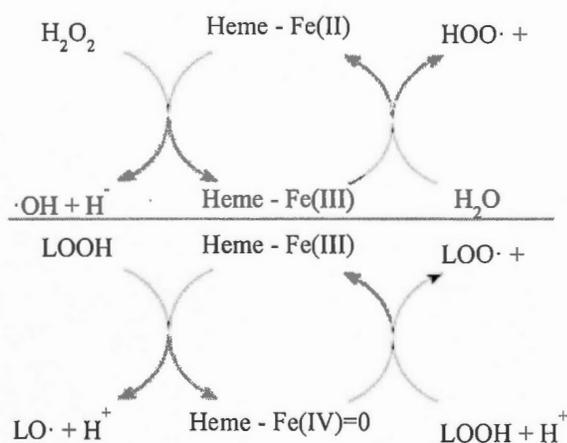


Figure 1.4 Mécanismes et sous-produits de la catalyse de l'hème Fe^{2+} (II) en hème Fe^{3+} (III) et en hème Fe^{4+} (IV) (Carlsen *et al.*, 2005).

1.2.2.1 Effets pro-oxydants et pro-apoptotique de l'hème.

Le caractère hydrophobe de l'HE implique qu'il traverse aisément les membranes cellulaires et qu'il n'est jamais réellement libre dans le plasma. Ainsi, au moment de sa disjonction d'avec l'HgbFe³⁺, l'HE se lie rapidement aux protéines et lipides environnants. Sa réactivité dépend non seulement de la quantité d'HE libéré, mais aussi du milieu dans lequel il est relâché et des molécules auxquelles il se fixe. Dans le plasma, l'HE est préférentiellement conjugué à l'HPX, l'albumine (Alb), les lipoprotéines de faibles et hautes densités (LDL et HDL) et les membranes cellulaires avoisinantes (Wijayanti *et al.*, 2004). Les GRs et les cellules rénales et endothéliales sont ainsi les plus affectées par une hémolyse aiguë. La liaison de l'HE avec les lipides cellulaires ou plasmatiques induit la peroxydation des acides gras insaturés et promeut l'inflammation et la toxicité cellulaire (Schaer *et al.*, 2013; Wijayanti *et al.*, 2004). La peroxydation des protéines par l'HE conduit à leur fragmentation ou à leur modification et agrégation par formation de liens covalents non réductibles. Finalement, l'interaction de l'HE avec les brins d'ADN provoque des scissions aléatoires (Aft et Mueller, 1983; Wijayanti *et al.*, 2004). Toutes ces altérations physiques sont promptes à conduire à la nécrose ou l'apoptose des cellules affectées et il a de plus été démontré que la forte génération des ERO par l'HE active les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et SP-1, des molécules impliquées dans l'induction de l'apoptose (Mense et Zhang, 2006).

Des radicaux libres sont produits tous les jours dans un organisme sain et leur potentiel oxydant est rapidement inactivé par le pouvoir réducteur des nombreuses molécules et enzymes antioxydants cellulaires. Toutefois, la lyse massive des GRs suivis de la libération d'HE catalyse directement la production de molécules oxydantes qui surpassent la protection fournie par ces antioxydants (Schaer *et al.*, 2013) et génère une dégradation des composantes cellulaires qui peut conduire à la mort des cellules par apoptose ou nécrose (Girotti, 1998; Schaer *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Effet pro-inflammatoire de l'hème

En plus de son caractère pro-oxydant et pro-apoptotique, l'HE aurait des propriétés pro-inflammatoires. Waganer et collègues (2001) ont mesuré une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (« *InterCellular Adhesion Molecule* ») au niveau du pancréas, du foie et des cellules endothéliales vasculaires chez des souris traitées avec de l'HE intraveineux. Cette induction aurait de plus conduit au recrutement et à l'activation des leucocytes et des granulocytes dans ces deux organes. Dans le même ordre d'idée, l'injection d'HE dans la cavité pleurale chez le rat aurait conduit à une augmentation de l'expression de l'IL-8 par les cellules locales et à la subséquente migration et activation des neutrophiles au site d'injection (Graça-Souza *et al.*, 2002).

1.2.2.3 Effets de l'hème sur l'immunité innée et adaptative

Les répercussions néfastes de l'HE sur différents types de cellules en ont fait la cible justifiée de plusieurs études portant sur le dérèglement de l'immunité innée et adaptative lors de conditions physiologiques menant à sa libération locale ou systémique. Ces études ont permis de déceler un autre aspect négatif de la libération de l'HE qui peut agir en tant que molécule de signalisation en liant certains récepteurs, facteurs de transcription et enzymes (Schaer *et al.*, 2013).

Il est ainsi désormais reconnu que l'HE est capable de moduler l'immunité innée en liant les macrophages et activant leur sécrétion de TNF- α *via* une signalisation par les TLR-4 (Figueiredo *et al.*, 2007). En revanche, notre laboratoire a aussi démontré que des macrophages traités *in vitro* avec de l'HE sécrétaient moins d'IL-12 et plus d'IL-10 par un processus dépendant des taux d'ERO intracellulaires (Cambos *et al.*, 2010). De plus, des traitements d'HE *in vivo* réduisent fortement la production d'IFN- γ par

les splénocytes et favorisent ainsi la stimulation de la réponse Th2 au détriment de la réponse Th1 (Dalko *et al.*, 2013). Ces résultats combinés impliquent qu'une forte quantité d'HE libérée trop tôt dans l'infection paludique pourrait avoir un impact négatif sur la polarisation séquentielle cruciale des lymphocytes T durant la malaria.

Selon les recherches de Watanabe-Matsui et collègues (2011), l'HE aurait aussi un impact important sur l'instauration d'une immunité humorale. Suite à sa pénétration dans un lymphocyte B, l'HE serait prompt à lier et ainsi inhiber Bach-2, une protéine dont le rôle est de limiter l'expression de la protéine (Blimp-1) qui à son tour permet la maturation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. En conditions normales, Bach-2 retarde la maturation des lymphocytes B en inhibant l'expression de Blimp-1, laissant ainsi le temps aux cellules d'effectuer la commutation de classe et l'hypermutation somatique qui permettent la sécrétion d'anticorps ayant une affinité et fonction accrue de protection contre un pathogène spécifique. L'inhibition de Bach-2 par l'HE entraîne une augmentation de la protéine intracellulaire Blimp-1, se soldant en une maturation précoce des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'IgM plus ou moins spécifiques à l'antigène. L'HE favorise ainsi la différenciation des cellules B en plasmocytes sécréteurs d'Ig, mais a un impact défavorable sur l'affinité et l'avidité des anticorps produits.

Dans la même ligne de pensée, Dimitrov et ses collègues (2007) ont démontré que l'HE avait la propriété de se lier aux anticorps et de compromettre leur réactivité. Selon leurs recherches, des IgGs polyspécifiques, c'est-à-dire des anticorps capables de lier différents antigènes structurellement semblables, auraient une habileté intrinsèque à lier l'HE, mais perdraient ainsi leur liberté conformationnelle. Alors que cette nouvelle rigidité du paratope induite par l'HE devrait compromettre leur réactivité multiple, les IgGs acquièrent plutôt ce que les auteurs nomment « une empreinte moléculaire spécifique » qui leur permet d'interagir avec davantage d'antigènes qui sont structurellement différents les uns des autres. Cette nouvelle et

forte polyréactivité pourrait être causée entre autre par un changement des forces responsables de la liaison du paratope à l'épitope de l'antigène. En effet, des anticorps exposés à l'HE lient leur antigène par des forces non polaires, alors que des interactions électrostatiques sont responsables de la liaison des IgGs au même antigène en absence d'HE. Ces auteurs avancent que les conséquences d'une infection où la quantité d'HE libre surpasse celle des protéines éboueuses d'HE pourraient favoriser l'élimination de l'antigène en augmentant les possibilités de reconnaissance par les anticorps. Toutefois, ce phénomène pourrait aussi contribuer aux dommages tissulaires en y dirigeant des auto-anticorps polyclonaux variés (Dimitrov *et al.*, 2007).

En plus d'influencer les réponses innée et humorale, l'HE semble moduler la réponse adaptative cellulaire. Sutherland et collègues (1995) ont démontré que l'HE était en mesure d'induire l'activation polyclonale des lymphocytes T CD4⁺ par un mécanisme similaire à une réponse allogénique et ce de manière CMH-dépendant. Bien que le mécanisme à la base de cette modulation n'ait pas été élucidé par les auteurs, ceux-ci postulent que l'HE, par son affinité pour les résidus histidines, pourrait lier certains peptides apprêtés par la CPA de manière à produire des complexes CMH-peptide non immunodominants. Un mécanisme par lequel l'HE modifie la conformation de la molécule du CMH-II, qui lie alors une nouvelle gamme de peptides non spécifiques, a aussi été mis de l'avant (Sutherland *et al.*, 1995). Les CPAs dans un environnement riche en HE deviendraient ainsi capables de présenter divers peptides non immunogènes et provoqueraient l'activation et la multiplication polyclonale de cellules T CD4, avec des TCRs à spécificités distinctes. L'HE pourrait de ce fait être en mesure de stimuler l'auto-réactivité du système immunitaire (auto-immunité). De manière intéressante, Ho et Webster ainsi qu'Ho et collègues (1990, 1994) affirment que l'infection par *Plasmodium* induit une activation accrue et polyclonale des lymphocytes T CD4⁺ qui ne répondent toutefois pas aux antigènes parasitaires. Le

mécanisme à la base de cette réaction est inconnu, mais il apparaît possible que l'HE massivement libéré durant la malaria puisse être responsable de cet effet.

1.2.2.4 Effets de l'hème sur les érythrocytes

Les GRs sont particulièrement susceptibles aux effets de l'HE, premièrement parce que ce sont des cellules anucléées qui n'ont pas la capacité de synthétiser *de novo* des protéines et enzymes antioxydants. D'une autre part, parce que le contenu intracellulaire des GRs, composé de 5 mM d'Hgb oxygéné (95 % du contenu intracellulaire), en fait des cellules où un excès d'ERO provoque une réaction d'oxydation exponentielle qui conduit rapidement à des changements morphologiques délétères (Çimen, 2008). Des ERO sont constamment produits à l'intérieur des GRs par l'oxydation de l'Hgb par l'O₂ qui mène à la production de l'O₂⁻ puis du H₂O₂ et qui conduit lentement vers la sénescence des GRs. Lorsque les réserves d'antioxydants sont épuisées, ou que la concentration d'ERO surpasse leur capacité de protection, les taux d'HgbFe³⁺ augmentent et provoquent la peroxydation des lipides, la désialylation des glycoprotéines membranaires et la formation ou destruction de liens inter-protéines (Çimen, 2008). Les exemples les plus rapportés sont l'agrégation de la protéine transmembranaire bande 3, la complexion de l'Hgb avec la protéine du cytosquelette spectrine, ainsi que l'inhibition de la formation du complexe essentiel bande 4.1/spectrine/actine. Tous ces processus conduisent à une baisse de la déformabilité des érythrocytes ainsi qu'à une perte de l'asymétrie de leurs phospholipides membranaires qui mènent à leur élimination par lyse ou phagocytose (Çimen, 2008). Ce phénomène de sénescence des érythrocytes se produit tous les jours et permet l'élimination d'environ 1 % des GRs totaux et le renouvellement d'un nombre identique en circulation. En plus de l'externalisation des PS, la modification de la conformation de la protéine CD47 à la surface des GRs favoriserait l'élimination des érythrocytes sénescents. Cette protéine membranaire fonctionnerait

tel un interrupteur dont une liaison sous sa forme native avec la glycoprotéine membranaire SIRP α , présente à la surface des phagocytes, induirait un signal inhibant la phagocytose (signal « ne me mange pas »). Toutefois, un changement conformationnel de CD47, occasionné par un stress oxydatif, déclencherait une cascade de signalisation stimulant la phagocytose du GR (signal « mange moi ») (Burger *et al.*, 2012).

Low et collègues (1985) ont démontré *in vitro* le rôle de l'HE dans l'agrégation de la protéine bande 3 et la subséquente opsonisation des GRs par des anticorps autologues. De même, les recherchent *in vitro* de Gatidis et collègues (2009) démontrent qu'en conditions sans protéines éboueuses, une concentration extracellulaire d'HE aussi faible que 3 μ M promeut l'externalisation des PS sur la membrane externe des Grs, la réduction de leur taille et l'augmentation de leur concentration de calcium intracellulaire : des changements biochimiques reliés à l'éryptose. Dans le même contexte, Chou et Fitch (1981) rapportent *in vitro* un effet hémolytique suite au traitement pendant 30 minutes avec 5 μ M de ferri-protoporphyrine dans un milieu de culture sans sérum.

1.2.3 Détoxification de l'hème

À la suite d'une hémolyse, plusieurs mécanismes existent pour contrer l'oxydation et l'inflammation reliées à la libération de l'Hgb et de l'HE. L'haptoglobine (Hp) est la protéine éboueuse de l'Hgb et leur complexion stabilise l'Hgb et évite son oxydation et le relargage des molécules d'HE en circulation. L'HPX et, en moindre mesure, l'Alb sont les deux protéines reconnues pour avoir un rôle dans la liaison et neutralisation de l'HE. C'est néanmoins l'enzyme HO-1 qui dégrade la molécule d'HE libre (figure 1.5). En période d'anémie hémolytique sévère, ces mécanismes

éboueurs sont toutefois saturés et une forte concentration d'Hgb et d'HE libre est retrouvée chez les humains (Piccard, *et al.*, 2007).

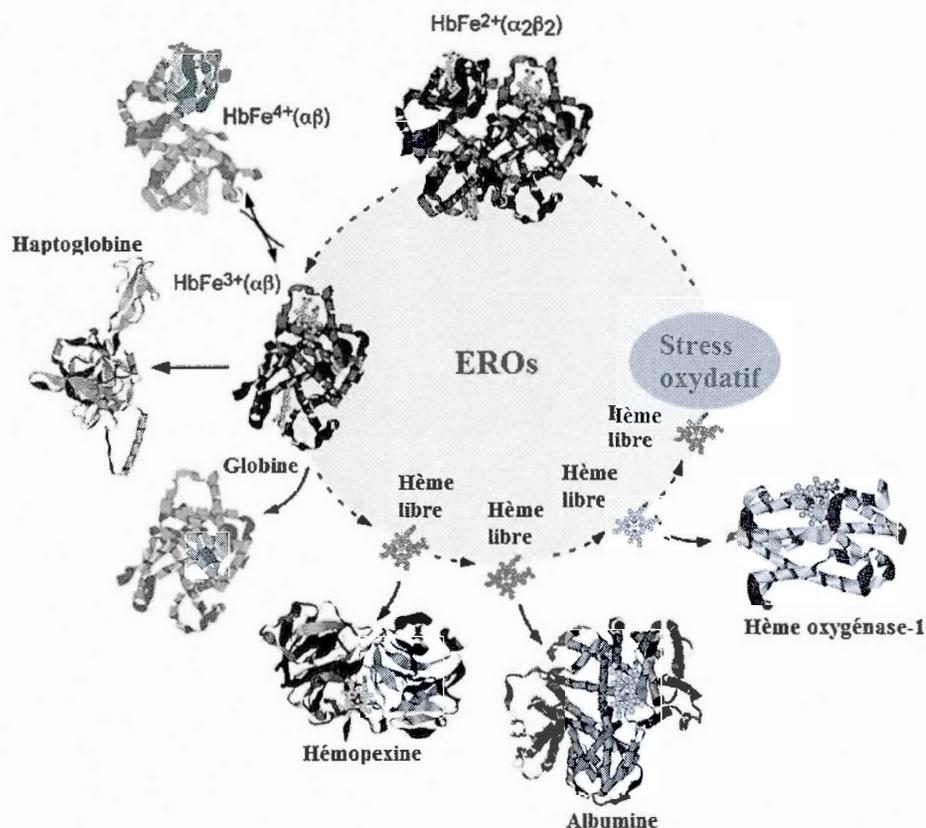


Figure 1.5 Oxydation de l'hémoglobine libre et système de détoxification par l'haptoglobine, l'hémopexine, l'albumine et l'hème-oxygénase-1 limitant le stress oxydatif (Ferreira *et al.*, 2008).

1.2.3.1 L'haptoglobine

L'Hp est une glycoprotéine plasmatique produite principalement par les hépatocytes lors de l'inflammation, mais aussi par les cellules de la peau, des reins et des poumons. Son unique rôle connu est de former un complexe stable avec l'Hgb libre et de la transporter jusqu'aux cellules permettant sa dégradation. La molécule d'Hp est

généralement constituée de 4 sous unités, 2 α et 2 β , ces dernières pouvant chacune lier un dimère d'Hgb. Une variation génique dans la population au niveau de la sous-unité α amène toutefois la liaison de plusieurs sous-unités β et par conséquent la séquestration de plus d'une molécule d'Hgb (Etzerodt et Moestrup, 2013). La complexation de l'Hp avec l'HgbFe²⁺, HgbFe³⁺ et HgbFe⁴⁺ promeut leur stabilisation et la réduction de leur potentiel redox (Kumar et Bandyopadhyay, 2005; Schaer *et al.*, 2013). Le complexe est ensuite internalisé par les monocytes et macrophages, les seules cellules exprimant le récepteur CD163. La liaison du complexe au récepteur induit son internalisation, puis la dégradation de l'Hp et de l'Hgb dont les molécules d'HE sont finalement catalysées par l'HO-1 (Etzerodt et Moestrup, 2013). L'absence de processus de recyclage de l'Hp décroît sa concentration plasmatique lors d'hémolyse, tel que durant la malaria, les taux passant de 2 mg/ml en conditions stables à des niveaux pratiquement indétectables (Nielsen *et al.*, 2010). Ce n'est qu'après la déplétion de l'Hp que les taux d'HPX plasmatiques diminuent, faisant foi de l'oxydation de l'Hgb libre et de la libération des molécules d'HE (Muller-Eberhard et Morgan, 2006).

1.2.3.2 L'hémopexine

L'HPX est une glycoprotéine plasmatique de phase aiguë d'environ 60 kDa. Sa synthèse est majoritairement effectuée par les cellules parenchymateuses du foie, mais aussi par les cellules des ganglions, des ovaires et des neurones du système nerveux périphérique. La synthèse de l'HPX est stimulée par plusieurs cytokines membres de la famille des IL-6 (IL-6, IL-11, IL-1 β , TNF- α et oncostatine) (Delanghe et Langlois, 2001). Le rôle le plus connu de l'HPX est de lier l'HE libre et de le maintenir dans un état soluble et monomérique afin de réduire sa réactivité (Delanghe et Langlois, 2001; Ascenzi *et al.*, 2005; Piccard, *et al.*, 2007; Mauk, *et al.*, 2011). L'HPX est la protéine ayant la plus forte affinité de liaison pour l'HE, avec une

constante de dissociation (K_d) d'environ 0.1 pM. Une fois combinée à l'HE, l'HPX subit un changement de conformation lui permettant de lier le récepteur LRP/CD91 exprimé par les hépatocytes, par lesquels les deux molécules sont internalisées. Bien que le foie soit le site majeur de dégradation de l'HE, les macrophages, lymphocytes et neurones du système nerveux central expriment aussi le récepteur de l'HPX. (Hvidberg *et al.*, 2005). La liaison du complexe HE-HPX au récepteur induit la transcription d'ARNm codant pour l'HO-1, la ferritine et la métallothionéine 1 en plus d'induire la translocation du facteur NF- κ B (facteur nucléaire-kappa-B) et la transcription des protéines p21 et p53 (Eskew *et al.*, 1999 ; Hvidberg *et al.*, 2005). Toutes ces modifications métaboliques permettent à la cellule réceptrice d'être parée au stress impliqué dans la dégradation de l'HE. Le pH acide ainsi que la présence d'anions chlorure dans les endosomes de ces cellules permettent la dissociation de l'HPX et de l'HE. Le complexe HPX-HPXrécepteur est ensuite réintégré à la surface cellulaire puis l'HPX est recyclée et retourne en circulation (Smith et Hunt, 1990; Delanghe et Langlois, 2001).

Chez les humains, les taux plasmatiques normaux d'HPX sont d'environ 0,4-1,5 mg/ml (10-25 μ M) (Delanghe et Langlois, 2001), mais ces niveaux chutent avec l'aggravation de l'hémolyse lors d'une infection paludéenne sévère, passant de 0,1 mg/ml (2 μ M) chez les patients atteints modérément à 0,042 mg/ml (800 nM) chez les gens souffrant d'anémie sévère (Fendel *et al.*, 2010). Ces valeurs indiquent qu'une forte concentration d'HE est libérée durant la malaria et que la seule protéine garantissant une inhibition totale de ses effets toxiques est saturée. La très faible concentration d'HPX présente en circulation durant une hémolyse aiguë permet à l'HE d'interagir avec beaucoup d'autres molécules avant d'être intercepté par son éboueur. Les valeurs plasmatiques d'HPX chez les modèles paludiques murins ne sont pas encore rapportées.

1.2.3.3 L'albumine

L'Alb est la protéine plasmatique la plus abondante chez les humains ($\approx 750 \mu\text{M}$) (Cao *et al.*, 2012) et représente jusqu'à 50 % des protéines totales du sang (Throop *et al.*, 2004). L'Alb est constituée d'une seule grande chaîne alpha de 585 acides aminés et sa masse moléculaire est de 66 kDa chez les humains (Cao *et al.*, 2012). Aucun organe n'est en mesure de stocker l'Alb de sorte que le foie doit constamment en produire afin d'éviter une hypoalbuminémie. Le rôle principal de l'Alb est de maintenir une pression oncotique adéquate dans la circulation sanguine et de servir de véhicule à plusieurs protéines exogènes, tels des anti-inflammatoires et antimicrobiens, qui sont transportés jusqu'à leur site d'action respectif. La synthèse de l'Alb est influencée à la hausse par une faible pression oncotique et à la baisse par l'inflammation, les taux d'ARNm pouvant décroître de 90% dans ce dernier cas (Throop *et al.*, 2004). La conformation de l'Alb lui permet de lier plusieurs molécules physiologiques, dont l'HE, la bilirubine (Komatsu *et al.*, 2005), le calcium, la cystéine et le cuivre (Throop *et al.*, 2004). Elle présente un site de liaison ayant une forte affinité pour l'HE ($K_d \approx 10 \text{ nM}$) ainsi que 4 autres sites de liaison plus faibles (Muller-Eberhard et Morgan, 2006). L'interaction de l'Alb avec l'HE est très importante puisqu'elle protège les cellules avoisinantes contre ses effets oxydants jusqu'à ce qu'une molécule d'HPX libre soit en mesure de le capter et de le diriger vers des cellules pouvant le dégrader. Toutefois, Grinberg et collègues (1999) ont déterminé, par mesure de l'oxydation de l' amino 4 antipyrine en quinoneimine, que seulement 40 à 60% de l'activité peroxidase de l'HE était inhibée par l'Alb. De plus, la concentration plasmatique d'Alb chute d'environ 25 % durant une infection sévère par *P. falciparum* (Das et Nanda, 1999). Aucune mention des niveaux d'albumine sériques n'est rapporté pour une infection par *P. chabaudi*.

1.2.3.4 L'hème-oxygénase

L'HO est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'HE en Fe^{2+} , CO et biliverdine, ce dernier étant ensuite converti par la biliverdine réductase en bilirubine (Gozzelino *et al.*, 2010). Les deux isoformes principaux de l'enzyme sont l'HO-1 et l'HO-2 et font respectivement 32 et 36 kDa. Alors que l'HO-1 est une forme inductible de l'enzyme très peu exprimé en conditions physiologiques, l'HO-2 est constitutivement exprimé par les cellules du cerveau, du foie, de la rate, des testicules, des poumons, des reins et du système vasculaire. L'HO-1 est quant à lui induit par l'HE, l'inflammation, le stress oxydatif, les épisodes d'hypoxie/ischémie et par plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Lors d'une infection par *Plasmodium*, les hépatocytes, les splénocytes et les macrophages sont les principaux producteurs d'HO-1 (Wagener *et al.*, 2003). L'HO promeut une protection contre les effets nocifs d'une hémolyse, non seulement par sa capacité à dégrader l'HE, mais aussi *via* les effets des sous-produits de cette catalyse. En effet, la bilirubine, lorsque conjuguée à l'Alb sérique, est un inhibiteur de la peroxydation lipidique par sa capacité à lier et inactiver les radicaux peroxy (Stockler *et al.*, 1987 ; Wagener *et al.*, 2003). Le Fe^{2+} libre est potentiellement pro-oxydant, mais l'induction de la ferritine par l'HO permet de le chélater et de le recycler. Finalement, il a été démontré que le CO est un vasodilatateur et inhibiteur d'apoptose, qui régule à la baisse la transcription de gènes pro-inflammatoire et à la hausse ceux codant pour des cytokines anti-inflammatoires (Wagener *et al.*, 2003). L'HO et ses sous-produits exercent des effets protecteurs dans des pathologies caractérisées par une ischémie-réperfusion, un stress oxydatif, de l'inflammation ou un rejet de greffe (Wagener *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs mentionnent de plus l'implication cruciale de l'HO dans la convalescence face à la malaria. Selon Seixas et ses collègues (2009), la survie des hôtes infectés par *P. falciparum* dépend principalement du taux d'expression de cet enzyme et l'induction précoce d'HO-1 minimise la sévérité de l'infection indépendamment de la parasitémie. De plus, Linares et collègues (2013) avancent qu'une forte induction

d'HO-1 permet à l'hôte d'échapper à un épisode de malaria cérébrale. Il est même avancé que le mécanisme à la base de la protection des gens souffrant d'anémie falciforme contre des formes létales de la malaria impliquerait l'HO-1 et le CO (Bunn, 2012).

CHAPITRE II

OBJECTIFS ET DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

2.1 Hypothèses et objectifs

La malaria est une infection qui génère une lyse des GRs-p et des GRs-np. Cette hémolyse conduit à la libération d'HE en excès dans la circulation sanguine de l'hôte et promeut l'oxydation des protéines et lipides cellulaires avoisinants si l'HE n'est pas rapidement pris en charge par des protéines éboueuses. Notre hypothèse est que l'HE, par sa capacité pro-oxydante, pro-apoptotique, pro-inflammatoire et modulatrice des molécules du CMH-II, est en partie responsable de l'aggravation de l'anémie hémolytique paludique. Nous croyons que sa libération inflige une modulation délétère des cellules immunitaires et/ou des GRs et une accélération de la destruction des érythrocytes.

Nos objectifs de travail étaient de :

- a) Caractériser *in vitro* et *in vivo* les modifications causées par l'HE chez les macrophages et lymphocytes B, au niveau de leur morphologie et de leur expression essentielle des molécules du CMH-II, de F4/80 (macrophages) et CD19 (lymphocytes B).
- b) Corroborer l'efficacité de l'HPX à bloquer les effets de l'HE sur ces cellules.
- c) Évaluer *in vitro* la capacité d'activation des lymphocytes T CD4⁺ par des cellules présentatrices d'antigènes ayant été en contact avec l'HE.
- d) Déterminer *in vivo* l'effet de l'HE sur la demi-vie des érythrocytes.

- e) Simuler une condition d'hémolyse chronique afin de caractériser les effets de l'HE libre avant une infection par *Plasmodium*, en incorporant une méthodologie permettant de suivre ses effets sur la capacité des érythrocytes à être infectés et sur leur durée de vie durant l'infection.

2.2 Méthodologie

2.2.1 Souris BALB/c.

Des souris BALB/c femelles (Charles River) âgées de 4 à 8 semaines ont été utilisées dans le contexte de cette étude. Toutes les expériences ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux (protocoles 0313-775-0314 et 0314-R1-775-0315), en respectant les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). La collecte des cellules d'exsudats du péritoine (PECs) et les ponctions cardiaques ont été réalisées suite à l'anesthésie des souris avec de l'isoflurane et leur euthanasie par inhalation de CO₂.

2.2.2 Collecte des cellules du péritoine.

Les PECs de souris naïves, traitées par l'HE et infectées par *Plasmodium*, ont été récoltées par injection/ponction de tampon phosphate salin (PBS) dans la cavité péritonéale des souris euthanasiées, sous une atmosphère stérile dans une hotte à flux laminaires. Plus précisément, 3 ml de PBS ont été injectés dans la cavité péritonéale à l'aide d'une aiguille de calibre 18G. Un massage de l'abdomen a permis de déloger les cellules adhérentes aux parois tissulaires, puis une ponction du liquide intrapéritonéale a été réalisée avec la même aiguille. Cette procédure a été répétée 3 fois pour chacune des souris. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 10

minutes à 1000 g, puis ont été mises en suspension dans du RPMI 1640 (HyClone, Thermo Scientific). La concentration cellulaire a été évaluée avec un hémacytomètre et une coloration au bleu de Trypan (Sigma).

2.2.3 Collecte des érythrocytes.

Un total de 10 μ l de sang ont été collectés par une légère incision du bout de la queue des souris. Le sang a été disposé dans un microtube contenant 1 μ l d'héparine (3000U/ml), puis centrifugé durant 5 minutes à 1000 g. Le sérum a été collecté puis conservé à -20°C pour le dosage de l'HPX. Les GRs ont été lavés dans du PBS, centrifugé de nouveau puis mis en suspension dans du PBS (HyClone, Thermo Scientific; sans Mg^{2+} et Ca^{2+}). La concentration cellulaire a été évaluée avec un hémacytomètre et une coloration au bleu de Trypan.

2.2.4 Préparation de l'hémine/hème

De l'HE bovine pure à ≥ 90 % (Fluka, Sigma) a été solubilisé par agitation durant 30 minutes à une concentration de 25 mg/ml dans une solution d'hydroxyde de sodium 0.1 M (NaOH). La solution concentrée a été stérilisée par filtration (filtre 0.22 μ m). L'HE a ensuite été dilué jusqu'à la concentration requise avec du PBS pour l'étude *in vitro* et dans une solution saline (0.9 %) pour les études *in vivo*. Les solutions d'HE concentrées et diluées ont été conservées à l'abri de la lumière et utilisées le jour même.

2.2.5 Traitement d'hème *in vitro*.

Les PECs ont été ajustées à 1×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 puis incubées dans un tube FACS à 37°C, dans une atmosphère comprenant 5 % de CO₂ et en présence d'HE et/ou d'HPX recombinante de souris (Sino Biologicals) selon l'étude en cours (voir résultats). Des PECs contrôles non traitées ont été incubées dans les mêmes conditions. Les cellules de chacun des tubes ont ensuite été lavées avec du PBS puis centrifugées 10 minutes à 1000 g avant l'analyse cytofluorométrique.

2.2.6 Activation des lymphocytes T par le complexe peptide/CMH-II.

Les lymphocytes T péritonéaux ont d'abord été retirés d'une suspension de PECs avec le kit de sélection positive CD90.2/Thy 1.2 (EasySep). Les PECs restant ont ensuite été incubées dans un pétri durant 2 heures à 37°C, 5 % de CO₂, et seules les cellules non adhérentes ont été collectées. Un marquage avec un anti-CD19-PerCP murin a permis de confirmer la pureté de la suspension cellulaire, qui contenait ≥ 93 % de lymphocytes B. Les cellules purifiées ont été incubées dans du RPMI 1640 durant 1 heure avec de l'HE, un temps jugé satisfaisant par des tests préliminaires. Des cellules contrôles ont été incubées dans les mêmes conditions sans HE, puis ont été lavées avec du RPMI. Les cellules B traitées ont été comptées puis disposées dans les puits d'une plaque de 96, à raison de 1×10^5 cellules/puits dans du RPMI 1640. Un peptide de l'ovalbumine (OVA) (résidus 323-335) ou de la lysozyme d'œuf (HEL) a été ajouté aux puits à une concentration finale de 1 µg/ml et une incubation d'une heure a été réalisée dans les conditions précédentes. L'hybridome de cellules T de la lignée 3DO.54-8, spécifique pour le peptide OVA (haplotype H-2^d) a été ajouté aux puits, à une concentration finale de 1×10^5 cellules/ml et la plaque a été incubée dans les mêmes conditions. Le surnageant a été collecté 24 heures plus tard et a

servit à réaliser un dosage d'IL-2 avec le kit ELISA de la compagnie BD Biosciences (Cat. No. 555148).

2.2.7 Traitement d'hème *in vivo*.

Du sulfo-NHS-Biotine (Sigma), solubilisé à 1 mg/ml dans une solution saline 0.9 %, a été injectée à toutes les souris préalablement aux traitements d'HE, par la route intraveineuse (IV) avec une seringue munie d'une aiguille 30G. Des concentrations d'HE (2.5, 5, 10 mg/kg) ont été testées dans notre laboratoire lors d'une étude connexe sur l'ostéoporose. Une perte de la masse osseuse, semblable à celle observée durant la malaria, chez les souris a été obtenue avec 10 mg/kg d'HE (article en préparation). De même, un dosage d'HPX suite aux traitements *in vivo* avec cette concentration d'HE a permis une baisse de plus de 50 % de l'HPX plasmatique, valeurs se rapprochant de celles observées chez les humains infectés. En se basant sur ces résultats, la dose de 10 mg/kg a été favorisée pour cette étude. Un premier groupe de souris a donc reçu une injection intrapéritonéale (IP) d'HE stérile à une concentration de 10 mg/kg/jour durant 3 jours consécutifs, dans un volume de 100 µl, avec une aiguille de calibre 28G. Un second groupe de souris a reçu le même profil d'injections d'HE, mais par la route IV. Deux autres groupes de souris contrôles ont reçu les mêmes profils d'injection, mais n'ont été traités qu'avec une solution saline 0.9 %. Au 4^e jour, les souris de chacun des groupes ont été euthanasiées et leurs PECs ont été récoltés.

2.2.8 Infection des souris par *Plasmodium* et suivi de la parasitémie.

Les souris ont reçu une injection IP contenant 5×10^5 GRs-p, par les souches *P. c. adami DK* ou *P. c. adami DS*, dans un volume de 100 µl de solution saline (0.9 %),

avec une aiguille de calibre 28G. La parasitémie a été évaluée tous les jours suivant l'infection par un frottis sanguin. Plus précisément, une goutte de sang étalée sur une lame de microscope à été fixée avec du méthanol 100 % durant 30 secondes, puis colorée durant 40 minutes avec une solution de Giemsa 26 M dans du méthanol. La lame a ensuite été rincée avec de l'eau déionisée puis séchée à l'air libre. La parasitémie a été estimée sur un total de 250 GRs observés au microscope à un grossissement de 1000X.

2.2.9 Cytofluorométrie.

Les PECs traitées *in vitro* et *in vivo* avec de l'HE ont été mises en suspension dans du PBS puis incubées durant 30 minutes à 4°C, à la noirceur, avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines murines CMH-II (I-A/I-E)-FITC (eBioscience), F4/80-PE (BioLegend), CD19-PerCP (BioLegend) CD23-PE (BioLegend). Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS, centrifugées durant 10 minutes à 1000 g, puis mises en suspension dans du PBS avant la lecture au cytofluoromètre. Une acquisition sur 10 000 cellules a été réalisée pour chacune des expériences.

Les érythrocytes des souris traitées avec l'HE et/ou infectées par *Plasmodium* ont été mis en suspension dans du PBS (HyClone, Thermo Scientific; sans Mg^{2+} et Ca^{2+}) puis incubés durant 30 minutes à 22°C, à la noirceur, avec 2 μM de cytrak orange (eBioscience), les protéines conjuguées streptavidine-FITC (eBioscience) et annexin-V-FITC (Invitrogen) et les anticorps conjugués dirigés contre les protéines murines CD47-PE (BioLegend) et CD71-FITC (eBioscience). Une acquisition sur 30 000 cellules a été réalisée pour chacune des expériences.

Les acquisitions ont été réalisées avec un FACSCalibur (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) et les résultats analysés avec le programme WinMDI (version 2.9).

2.2.10 Dosage de l'hémoglobine.

L'hémoglobine totale a été dosée avec le réactif de Drabkin's (Sigma). Tous les jours des traitements d'HE *in vivo* et de l'infection, 2 μ l de sang ont été collectés du bout de la queue des souris et ont été suspendues dans 498 μ l de réactif de Drabkin's, puis conservé à la noirceur. La solution a été disposée en duplicata dans une plaque de 96 puits à fond plat, à raison de 200 μ l par puits et la densité optique (D.O.) a été mesurée à 540 nm avec un lecteur de plaque ELISA. Une courbe étalon de la D.O. de l'Hgb de rat (Sigma) en fonction de sa concentration a été réalisée avec le même réactif et a permis de faire la conversion des D.O. obtenues en mg d'Hgb par dl de sang.

2.2.11 Dosage de l'hémopexine.

Le sérum collecté suite aux récoltes journalières de GRs a servi à faire le dosage de l'HPX. Les échantillons ont été dilués 1/20 000 dans du PBS puis leur concentration d'HPX a été dosée avec la trousse de Kamy Biomedical (Cat. No. KT-345), selon les recommandations du fournisseur.

2.2.12 Dosage de l'hème.

Les souris ayant reçu les traitements d'HE *in vivo* ont été euthanasiées 24 heures suivant la dernière injection d'HE. Une ponction cardiaque a été réalisée sur chacune des souris avec une seringue de 1 ml munie d'une aiguille de calibre 25G, préalablement héparinisée. Le sang collecté a été déposé dans des tubes Eppendorf contenant 10 µl d'héparine, puis a été centrifugé à 1000 g durant 5 minutes. Les sérums ont été collectés et dilués ½ dans de l'eau déionisée. Leur contenu en HE a été dosé avec le kit heme quantichrom de la compagnie bioassay systems (DIHM-250), selon les recommandations du fournisseur.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Répercussions de l'hème *in vitro* sur les cellules B et les macrophages.

Dans l'objectif de déterminer les effets potentiels de l'HE sur les molécules du CMH-II exprimées par les macrophages et lymphocytes B, une étude *in vitro* a d'abord été réalisée. Balla et collègues (1991) ont démontré une oxydation rapide des LDL par 5 μM d'HE en condition sans sérum et en présence d'ERO, où la production de substances dérivées de la peroxydation lipidique (TBARS) est exponentielle entre 10 et 40 minutes d'incubation. De plus, Ferreira et collègues (2008) ont rapporté une quantité d'HE libre de près de 10 μM durant un épisode paludique causé par *P. berghei ANKA* chez des souris BALB/c. Cet HE, qui n'est pas complexé à une protéine éboueuse ou à l'Hgb, est potentiellement réactif et libre d'interagir et d'oxyder les cellules avoisinantes. Considérant ces informations et afin d'évaluer les effets de l'HE libre dans des conditions de culture sans protéines éboueuses, s'apparentant à une hémolyse paludique importante, des résultats préliminaires ont été réalisés en traitant des PECs durant 20 minutes et 2 heures avec 5, 7.5, 10, 15, 20 et 40 μM d'HE (résultats non présentés). La durée du traitement n'ayant pour conséquence que d'accentuer les effets significatifs constatés après 20 minutes d'incubation en présence de 7.5 μM ou plus d'HE, la partie *in vitro* de cette étude a été réalisée avec des concentrations de 7.5 et 15 μM d'HE ainsi qu'une période de traitement de 20 minutes.

Dans ces conditions *in vitro*, l'HE a réduit de manière dose-dépendante le nombre de cellules péritonéales reconnues par l'anticorps anti-CD19, aboutissant à une chute de 50 % avec 15 μ M d'HE (figure 3.1A et D). L'expression constitutive de CD19 et CMH-II sur les cellules CD19 persistantes ont aussi diminué significativement, en plus du nombre de cellules CD19 exprimant le CMH-II (figure 3.1E et 3.2A). La fluorescence générale relative à la taille (FSC) des cellules CD19⁺ a été significativement diminuée suite au traitement par l'HE, mais aucune modification de la complexité intracellulaire n'a été constatée (figure 3.1F et G).

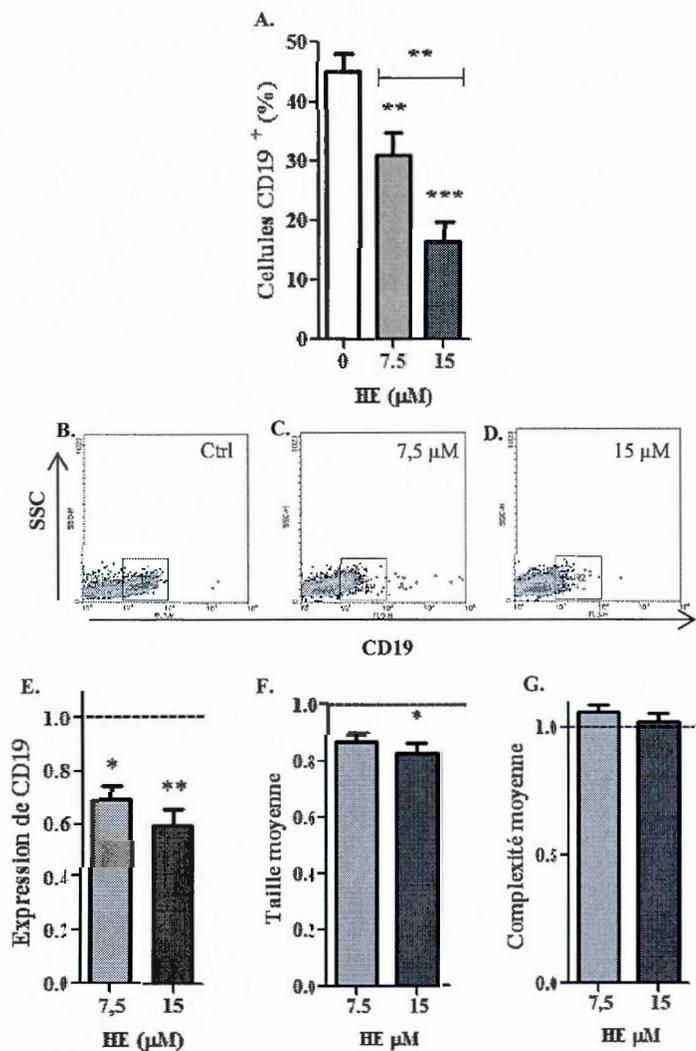


Figure 3.1 Effets de l'hème *in vitro* sur les cellules exprimant CD19. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire CD19. Le pourcentage de cellules exprimant CD19 (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression moyenne de CD19 (E) représente le ratio de la moyenne de fluorescence (gmean) associée à l'expression de CD19 chez les cellules CD19⁺ traitées par l'HE sur la gmean des cellules CD19⁺ non traitées (où Ctrl=1). La taille (F) et complexité (G) moyenne des cellules CD19⁺ sont représentées par la gmean associée à FSC et SSC respectivement. Les résultats sont une compilation de 4 expériences (n=6) ±ESM. Une one way ANOVA à mesures répétées couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey a été réalisée (A), ainsi qu'un test de T païré paramétrique (E, F, G); * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

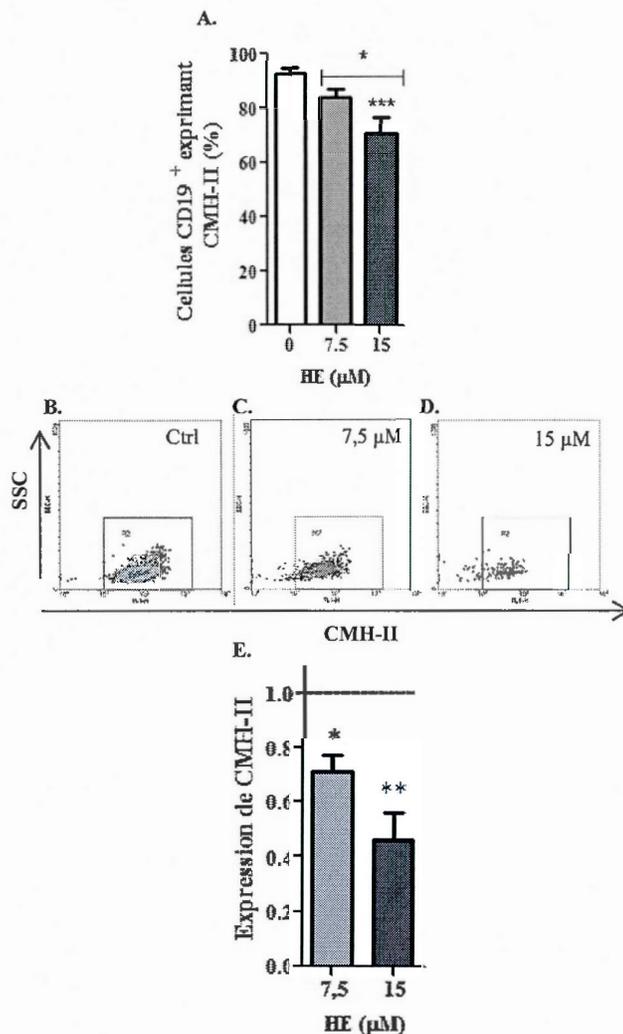


Figure 3.2 Effets de l'hème *in vitro* sur l'expression des molécules du CMH-II par les cellules CD19⁺. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CMH-II. Le pourcentage de cellules CD19⁺ exprimant CMH-II (A à D) représente la proportion de doubles positives sur les cellules CD19⁺ totales. L'expression moyenne de CMH-II (E) représente le ratio de la moyenne de fluorescence (gmean) associée à l'expression de CMH-II chez les cellules CD19⁺ et CMH-II⁺ traitées par l'HE sur la gmean des cellules CD19⁺ et CMH-II⁺ non traitées (où Ctrl=1). Les résultats sont une compilation de 4 expériences (n=6) ± ESM. Une one way ANOVA à mesures répétées couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey a été réalisée (A), ainsi qu'un test de T païré pramétrique (E); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Les macrophages du péritoine (cellules F4/80⁺) ont aussi réagi à la brève exposition à l'HE, qui a fortement modifié leur morphologie (figure 3.3B à D). Une nouvelle population de cellules peu complexes, mais exprimant F4/80 est apparue en réponse à l'HE, de manière dose-dépendante (figure 3.3C et D). La fluorescence totale associée à l'expression de F4/80 a augmenté suite au traitement chez les cellules F4/80⁺ (figure 3.3E), de même que leur taille moyenne (figure 3.3F). Bien que la complexité de cette population de cellules F4/80⁺ semblait différer dans les diagrammes biparamétriques, la moyenne de fluorescence associée à la complexité cellulaire (SSC) était similaire à celle du contrôle (figure 3.3G). Il est aussi intéressant de noter que l'HE a augmenté de près de 30 % la population de macrophage exprimant les molécules du CMH-II, mais que l'expression moyenne de cette molécule sur les cellules F4/80⁺ et CMH-II⁺ a diminuée (figure 3.4A et E). En d'autres mots, plus de macrophages en culture ont exprimé le CMH-II, mais en moyenne leurs niveaux d'expression étaient plus faibles.

Il est important de remarquer que la nouvelle population de cellules F4/80⁺ détectée ne présentait pas la morphologie typique des macrophages (figure 3.5). En analysant uniquement la population de cellules F4/80⁺ de taille et de complexité élevées s'apparentant aux macrophages, il est possible de constater que l'HE a causé une diminution de 30% de leurs effectifs (figure 3.6A).

Afin d'évaluer dans quelle mesure la protéine éboueuse HPX bloque les effets de l'HE, l'expérience a été répétée en ajoutant une concentration équimolaire d'HPX recombinante (2.5 μ M) au milieu de culture des PECs. L'HPX a été ajoutée à la suspension cellulaire en premier, ce qui permettait à l'HE d'entrer simultanément en contact avec les cellules et l'HPX. Dans ces expériences, l'HPX a complètement bloqué les effets de l'HE sur les lymphocytes B (figure 3.7) (études réalisées uniquement sur les cellules CD19⁺). En effet, aucune différence significative n'a été mesurée entre les cellules CD19⁺ traitées avec de l'HPX de celles traitées avec de

l'HPX et de l'HE en ce qui a trait au nombre de cellules (figure 3.7A et D), à leur expression de CD19 et CMH-II (figure 3.7 E et F) et à leur taille (figure 3.7G).

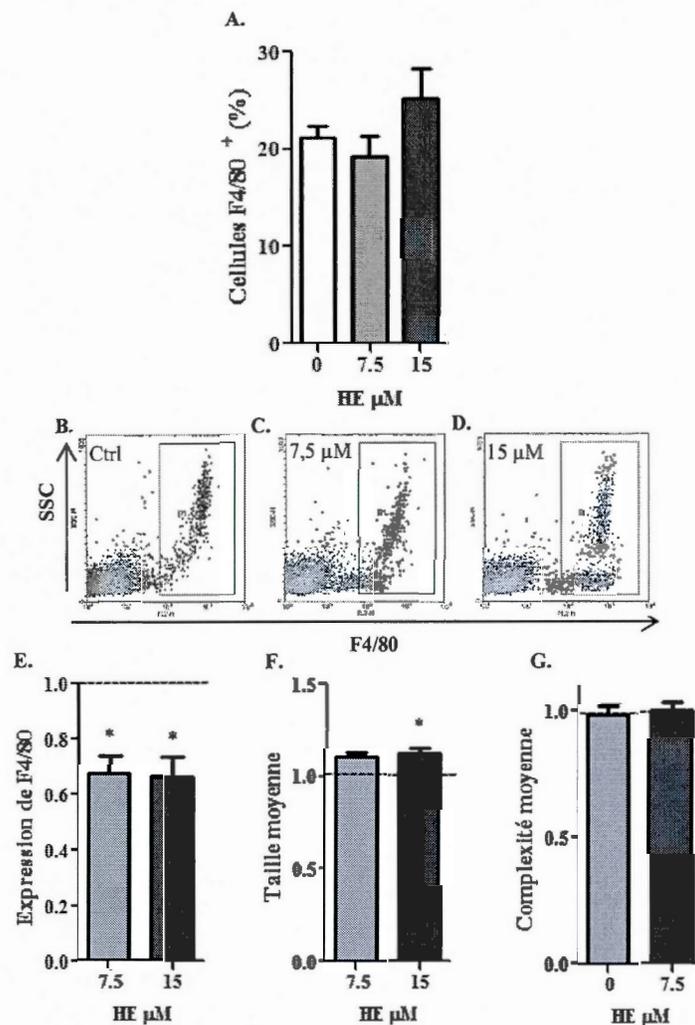


Figure 3.3 Effets de l'hème *in vitro* sur les cellules F4/80⁺. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire F4/80. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression de F4/80 (E) représente le ratio de la moyenne de fluorescence (gmean) associée à l'expression de F4/80 par les cellules F4/80⁺ traitées avec de l'HE sur la gmean des cellules F4/80⁺ non traitées (où Ctrl=1) \pm ESM. La taille (F) et complexité (G) moyenne des cellules F4/80⁺ sont représentées par la gmean \pm ESM associée à FSC et SSC respectivement. Les résultats sont une compilation de 4 expériences (n=6). Une one way ANOVA à mesures répétées couplée à un test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisée (A) ainsi qu'un test de T païré paramétrique (E, F, G); * P<0.05.

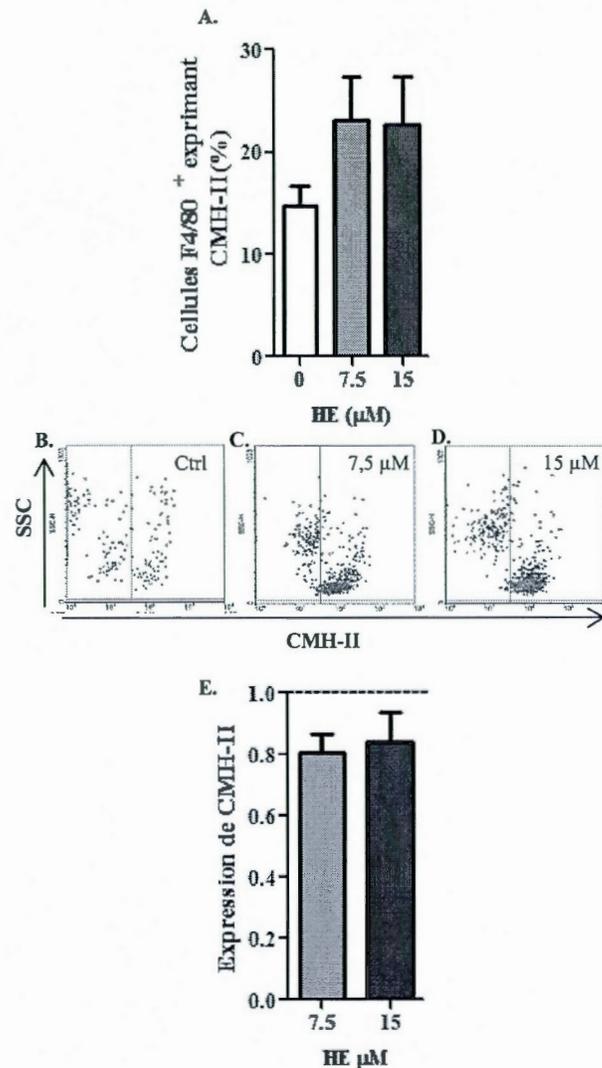


Figure 3.4 Effets de l'hème *in vitro* sur l'expression des molécules du CMH-II par les cellules F4/80⁺. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires F4/80 et CMH-II. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ exprimant CMH-II (A) représente la proportion de doubles positives sur les cellules F4/80⁺ totales. Les diagrammes (B, C, D) représentent la proportion de cellules F4/80⁺ exprimant CMH-II. L'expression moyenne de CMH-II (E) représente le ratio de la moyenne de fluorescence (gmean) associée à l'expression de CMH-II chez les cellules F4/80⁺ et CMH-II⁺ traitées par l'HE sur la gmean des cellules F4/80⁺ et CMH-II⁺ non traitées (où Ctrl=1) ± ESM. Les résultats sont une compilation de 4 expériences (n=6). Une one way ANOVA à mesures répétées couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey a été réalisée (A) ainsi qu'un test de T pairé paramétrique (E).

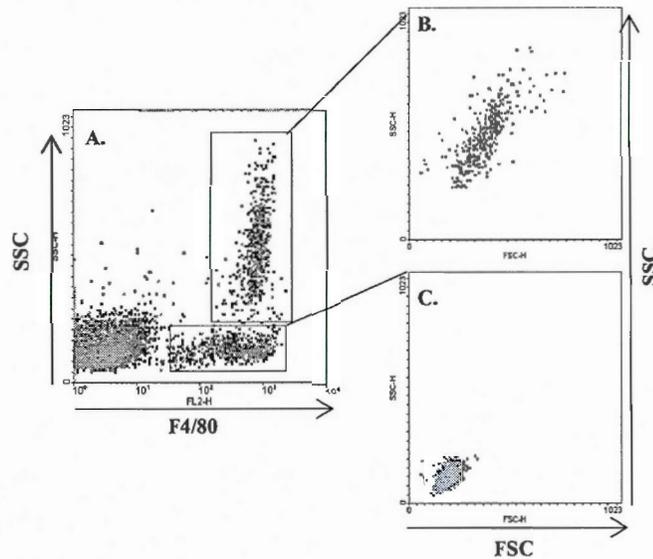


Figure 3.5 Morphologie des populations de cellules F4/80⁺. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE (15 μM), lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire F4/80. Un total de 10 000 cellules ont été analysées par cytofluorométrie. Les deux populations de macrophages ont été séparément sélectionnées (A) et un diagramme biparamétrique représentant leur taille et complexité intracellulaire a été réalisé (B, C). La population B représente les cellules F4/80⁺ ayant la morphologie habituelle des macrophages tandis que la population C est caractéristique de cellules beaucoup plus petites et peu complexes.

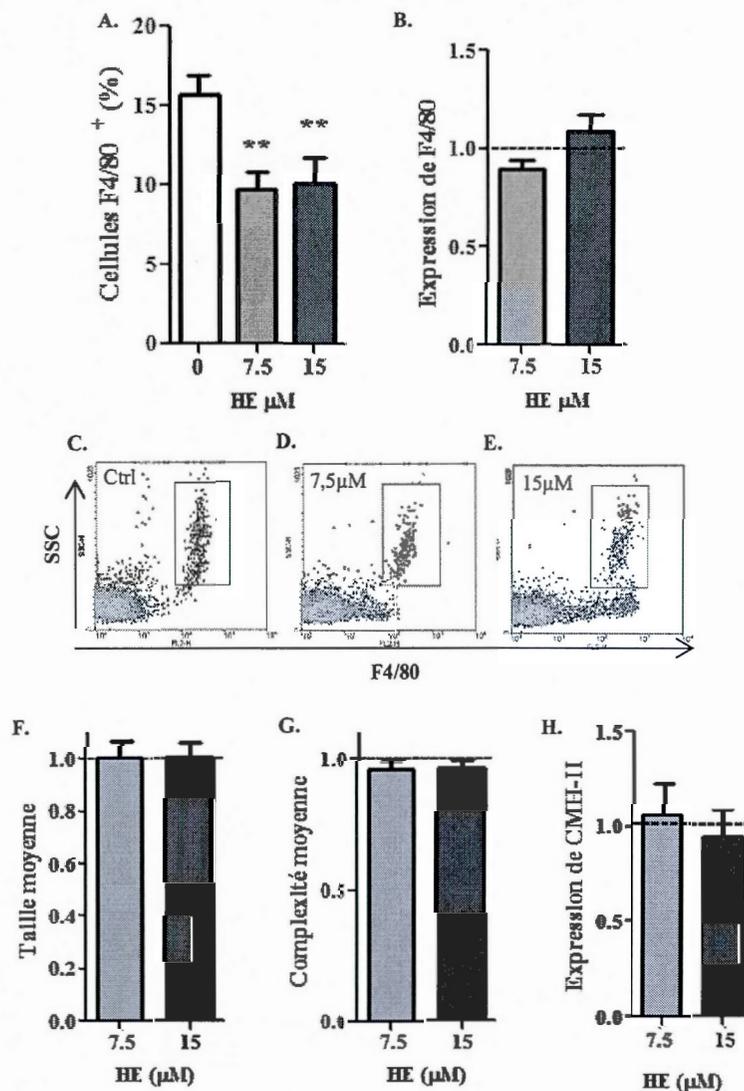


Figure 3.6 Effets de l'hème *in vitro* sur les cellules F4/80⁺ ayant la morphologie des macrophages. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 20 minutes avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire F4/80. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules en sélectionnant les cellules F4/80⁺ ayant un SSC élevé. La taille (E) et complexité (F) moyenne des cellules F4/80⁺ sont représentées par la gmean ± ESM associée à FSC et SSC respectivement. L'expression de CMH-II représente le ratio de la gmean associée à l'expression de CMH-II par les cellules F4/80⁺ et CMH-II⁺ traitées avec l'HE sur la gmean des cellules F4/80⁺ et CMH-II⁺ non traitées. Les résultats sont une compilation de 5 expériences (n=7). Une one way ANOVA à mesures répétées couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey a été réalisée (A, ainsi qu'un test de T païré paramétrique (B, F, G, H); ** P<0.01.

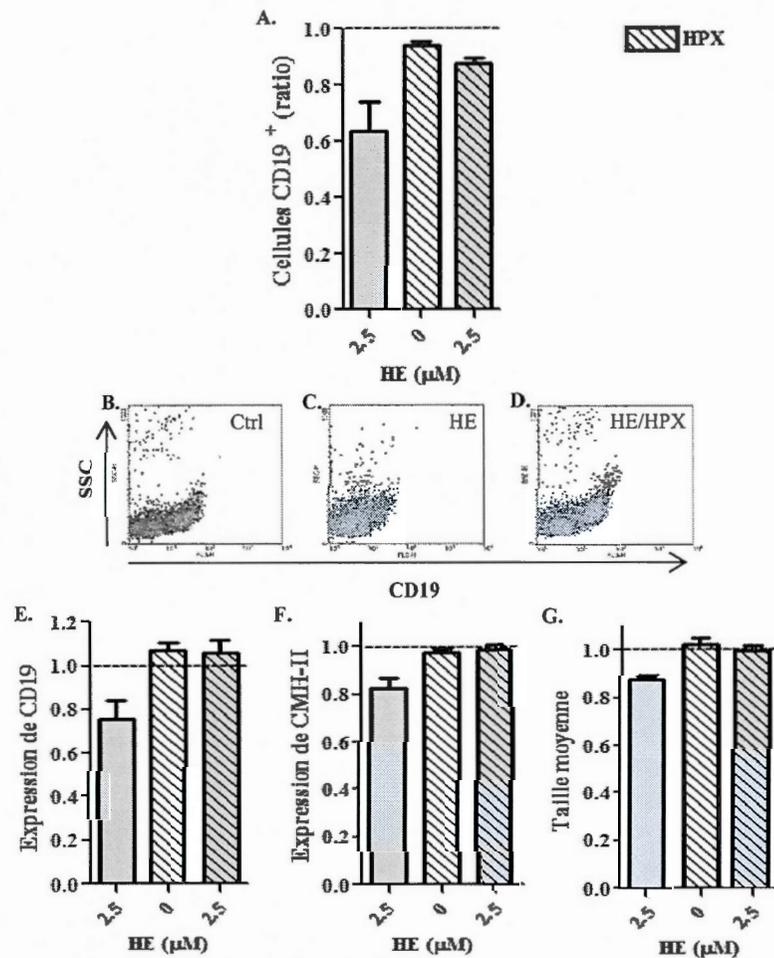


Figure 3.7 Impact de l'hémopexine sur les cellules péritonéales CD19⁺ traitées par l'hème *in vitro*. Les PECs de souris BALB/c ont été suspendues dans du RPMI supplémenté avec 2.5 μM d'HPX recombinante puis incubées à 37°C (5 % de CO₂) durant 20 minutes avec une concentration équimolaire d'HE. Les PECs ont ensuite été lavées avec du PBS puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CMH-II. Le nombre de cellules exprimant CD19 (A) est représenté par le ratio du pourcentage de cellules CD19⁺ traitées par l'HE, l'HPX ou les deux sur le pourcentage de cellules CD19⁺ non traitées (où Ctrl=1) ± ESM. L'analyse des résultats a été réalisée par cytofluorométrie en flux sur un total de 10 000 cellules (B à D). L'expression de CD19 (E) et CMH-II (F), ainsi que la taille moyenne des cellules (G), représentent le ratio de la gmean associée à l'expression respective de CD19, CMH-II et à la valeur de FSC chez les cellules CD19⁺ traitées par l'HE, l'HPX ou les deux, sur la gmean des cellules CD19⁺ non traitées ± ESM. Les résultats sont une compilation de 3 expériences (n=3). Un test de T paillé paramétrique a été réalisé entre les cellules traitées avec l'HPX et celles traitées avec l'HE et l'HPX.

Afin d'évaluer l'effet de l'HE sur la capacité des molécules du CMH-II à lier et présenter des peptides, les lymphocytes B ayant été traités *in vitro* avec l'HE ont été utilisés comme CPA en les mettant en contact avec des hybridomes de cellules T, l'antigène spécifique au TCR, un peptide de l'ovalbumine (OVA_p), ou un peptide non spécifique dérivé de la lysozyme d'oeuf (HEL), pendant 24 heures. L'IL-2 a ensuite été dosée dans le surnageant de culture, sa production étant directement proportionnelle à l'activation des lymphocytes T. Aucune différence significative n'a été mesurée dans le dosage de la cytokine suite au traitement avec l'HE, qui n'a pas altéré la présentation du peptide spécifique (figure 3.8A) ni modifié la reconnaissance du peptide non spécifique (figure 3.8B).

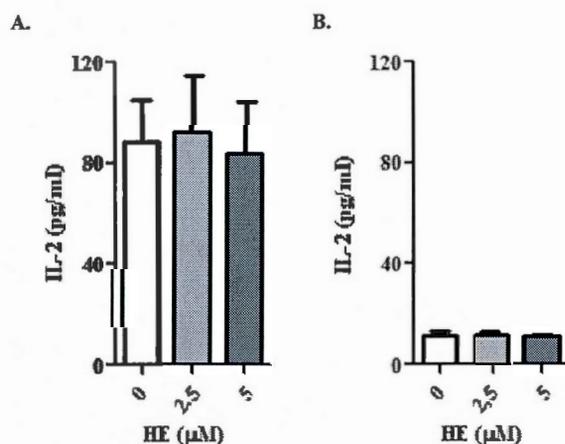


Figure 3.8 Effet de l'hème sur la capacité des molécules du CMH-II à présenter un peptide antigénique aux lymphocytes T. Les lymphocytes B purifiés d'une suspension de PECs de souris BALB/c ont été cultivés avec de l'HE (2.5 et 5 μM) à 37°C (5 % de CO₂) durant 1 heure puis ont été lavées avec du PBS. La suspension a été ajustée à 5x10⁵ cellules/ml et 1 μg/ml d'antigène spécifique (OVA_p; A) ou non spécifique (HEL; B) et un nombre comparable d'hybridomes de lymphocytes T (3DO.54-8) ont été ajoutés aux puits. Les suspensions ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) durant 24 heures pour permettre l'activation des cellules T. Un dosage d'IL-2 a été réalisé par ELISA en sandwich sur les surnageants de culture. Les résultats sont une compilation de 3 expériences (n=3) ± ESM. Une one way ANOVA à mesures répétées, couplé à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée.

3.2 Répercussions de l'hème *in vivo* sur les cellules B, les macrophages et les concentrations sériques d'hème et d'hémopexine

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'HE n'a pas affecté l'interaction *in vitro* entre des peptides antigéniques et les molécules du CMH-II, mais a toutefois modifié la morphologie des populations de lymphocytes B et macrophages et a fortement diminué le nombre de cellules CD19⁺ ainsi que leur expression constitutive des molécules du CMH-II. Les effets de l'HE *in vivo* sur ces populations cellulaires, qui sont à la base de l'instauration d'une immunité protectrice durant la malaria, ont donc été étudiés dans des conditions physiologiques normales. Pour ce faire, des souris BALB/c ont été traitées *in vivo* avec de l'HE par la voie IP pour évaluer son effet direct sur les populations cellulaires à l'étude et par la voie IV pour représenter une libération plus systémique.

L'HE a eu des effets subversifs sur les cellules CD19⁺ péritonéales qui ont diminué de plus de 50 % lorsque l'HE a été injecté directement au niveau du péritoine et de près de 20 % lors d'une administration IV (figure 3.9A). Contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, l'HE a peu affecté la morphologie et l'expression de CD19 (figure 3.9C à G, tableau 3.1). De plus, une hausse dans l'expression des molécules du CMH-II a été constatée chez les cellules CD19⁺, effet qui était plus prononcé lors du traitement IP, sans être statistiquement significatif (figure 3.9H).

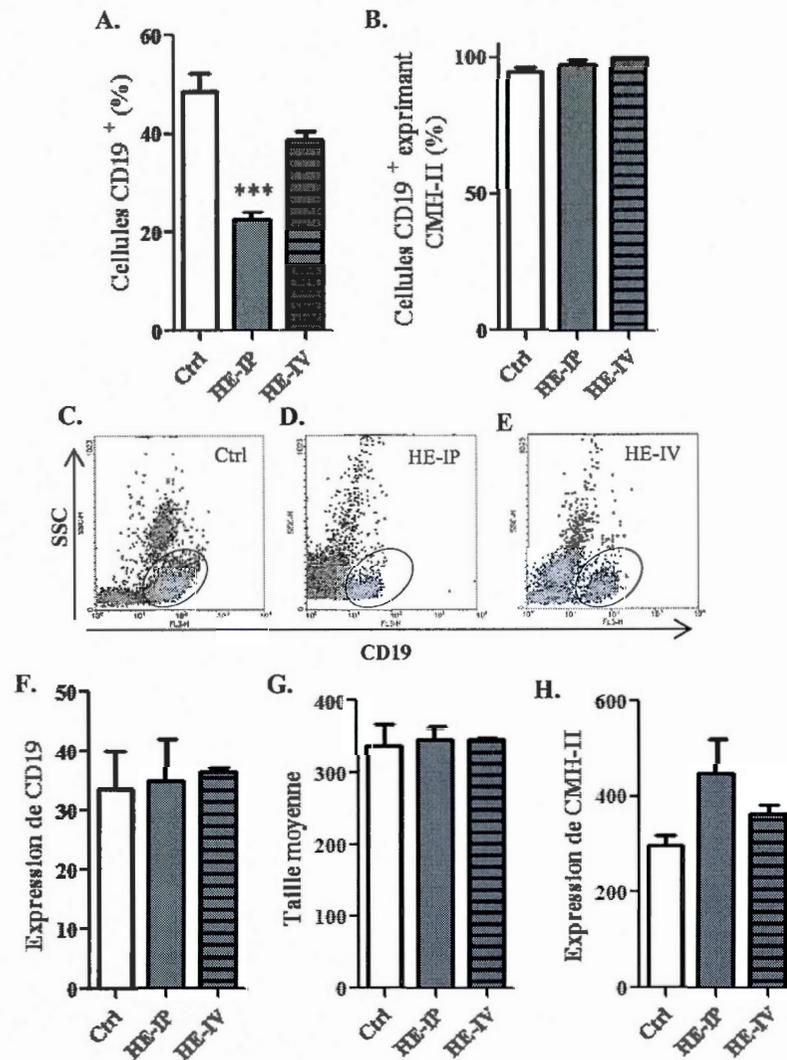


Figure 3.9 Effets de l'hème *in vivo* sur les cellules CD19⁺. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par les routes IP ou IV durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été récupérées puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CMH-II. Le pourcentage de cellules CD19⁺ (A, C à E) et CD19⁺ exprimant CMH-II (B) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression de CD19 (F), la taille moyenne des cellules (G) et l'expression de CMH-II (H) représentent la fluorescence moyenne (gmean) respectivement associée à CD19, FSC, CMH-II chez les cellules CD19⁺. Les résultats sont une compilation de 2 expériences pour le Ctrl (n=7) et HE-IP (n=7) et d'une expérience pour HE-IV (n=2). Un test de T non-pairé paramétrique a été réalisé entre le Ctrl et le traitement avec l'HE IP; *** P<0.001.

La population de macrophages (F4/80⁺) péritonéaux a été fortement affectée par les traitements d'HE *in vivo*. Ses effectifs ont diminué de près de 50 % lors des traitements systémiques et la population a complètement disparue lorsque l'HE a été administré par la route IP (figure 3.10A). Les macrophages subsistants ne présentaient toutefois pas de différences majeures quant à leur expression de F4/80 et CMH-II (figure 3.10B et H). De même, les fluorescences associées à la taille et complexité moyenne de ces cellules étaient similaires à celles des macrophages témoins, malgré la présence d'une petite population de cellules F4/80⁺ peu complexe retrouvée aussi à la suite des traitements *in vitro* (figure 3.10C à G).

Tel que précédemment, une analyse des mêmes paramètres a été réalisée sur la population de cellules F4/80⁺ présentant la morphologie connue des macrophages (figure 3.11). L'HE a eu un effet similaire sur cette population, c'est-à-dire une diminution de 50 % des effectifs sans modifications majeures de la morphologie ou de l'expression des molécules du CMH-II. Toutefois, cette population de macrophages exprimait davantage le marqueur de maturation F4/80 (figure 3.11B).

La chute du pourcentage de cellules CD19⁺ et F4/80⁺ dans le péritoine chez les souris traitées avec l'HE par la voie IP a été accompagnée d'une hausse dans le nombre de cellules péritonéales totales (appendice B, p.84). Les injections par la voie IV n'ont, quant à elles, conduit à aucune différence significative quant aux effectifs totaux dans le péritoine, toutefois une légère diminution était observée.

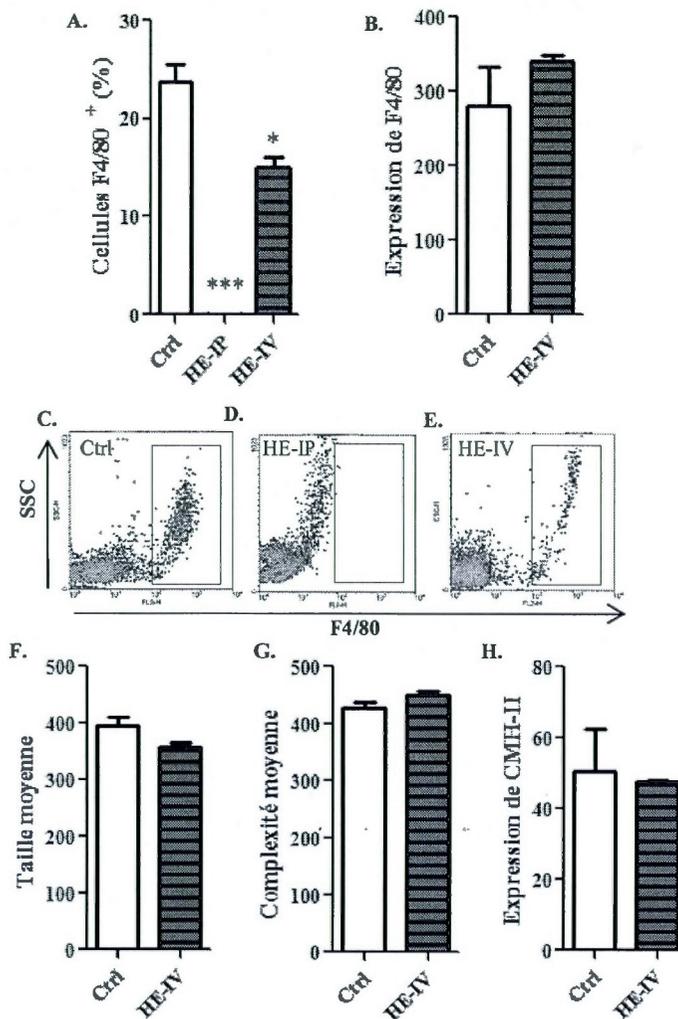


Figure 3.10 Effets de l'hème *in vivo* sur les cellules F4/80⁺. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par les routes IP ou IV durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été récupérées puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires F4/80 et CMH-II. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ (A) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression de F4/80 (B à E), la taille (F), la complexité (G) et l'expression de CMH-II (H) représentent la fluorescence moyenne (gmean) respectivement associée à F4/80, FSC, SSC et CMH-II chez les cellules F4/80⁺. Les résultats représentent la moyenne \pm ESM de 2 expériences pour Ctrl (n=7) et d'une expérience pour HE-ip (n=4) et HE-IV (n=2). Des tests de T non-pairés paramétriques ont été réalisés entre le Ctrl et les traitements avec l'HE; * P<0.05, *** P<0.001.

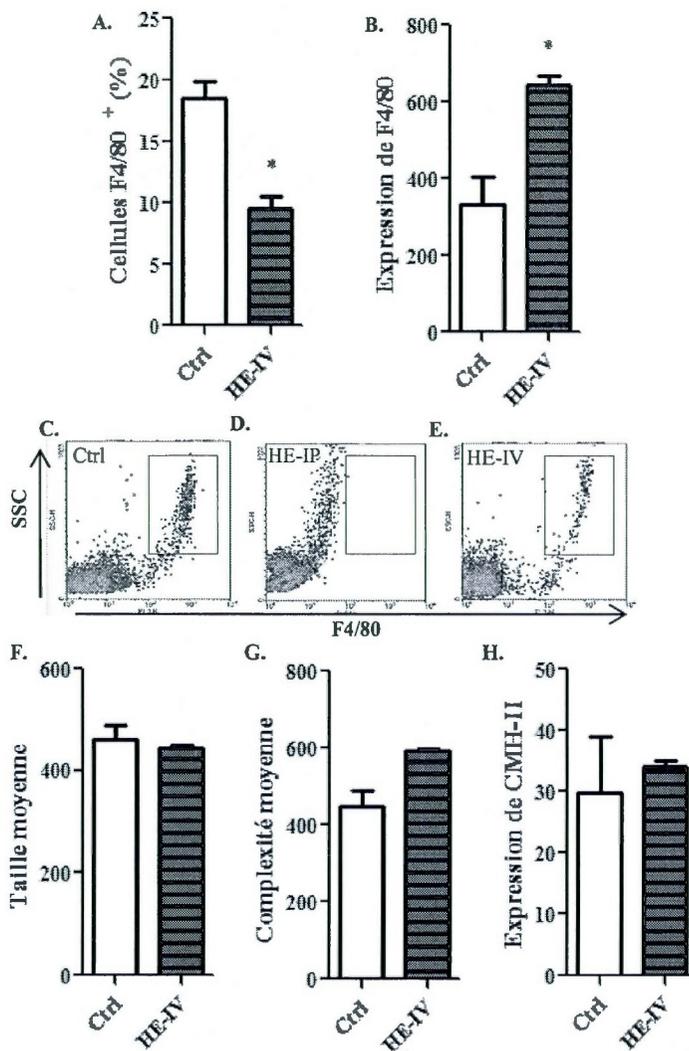


Figure 3.11 Effets de l'hème *in vivo* sur les cellules F4/80⁺ ayant la morphologie des macrophages. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par les routes IP ou IV durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été récupérées puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires F4/80 et CMH-II. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ (A) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression de F4/80 (B à E), la taille (F), la complexité (G) et l'expression de CMH-II (H) représentent la fluorescence moyenne (gmean) respectivement associée à F4/80, FSC, SSC et CMH-II chez les cellules F4/80⁺ ayant un SSC élevé. Les résultats représentent la moyenne \pm ESM de 2 expériences pour Ctrl (n=6) et d'une expérience pour HE-iv (n=2). Des tests de T non-pairés paramétriques ont été réalisées entre le Ctrl et le traitement avec l'HE; * P<0.05, (G; p=0.07).

De manière intéressante, les lymphocytes B ayant résisté aux traitements *in vivo* n'ont pas réagi de la même manière que les cellules contrôles au court traitement d'HE *in vitro*. En effet, les effectifs de cette population n'ont pas diminué et aucun effet n'a été constaté sur leur expression des molécules du CMH-II et de CD19 (figure 3.12 et 3.13).

Cette résistance apparente à l'HE a été également observée chez les lymphocytes B provenant du péritoine de souris infectées par *P. c. adami DK* (figure 3.14). L'infection, ainsi que les traitements d'HE *in vivo*, ont fait chuter de près de 30 % le nombre de lymphocytes B péritonéaux et un traitement ultérieur d'HE *in vitro* n'a pas influencé leur expression extracellulaire de CD19 et des molécules du CMH-II.

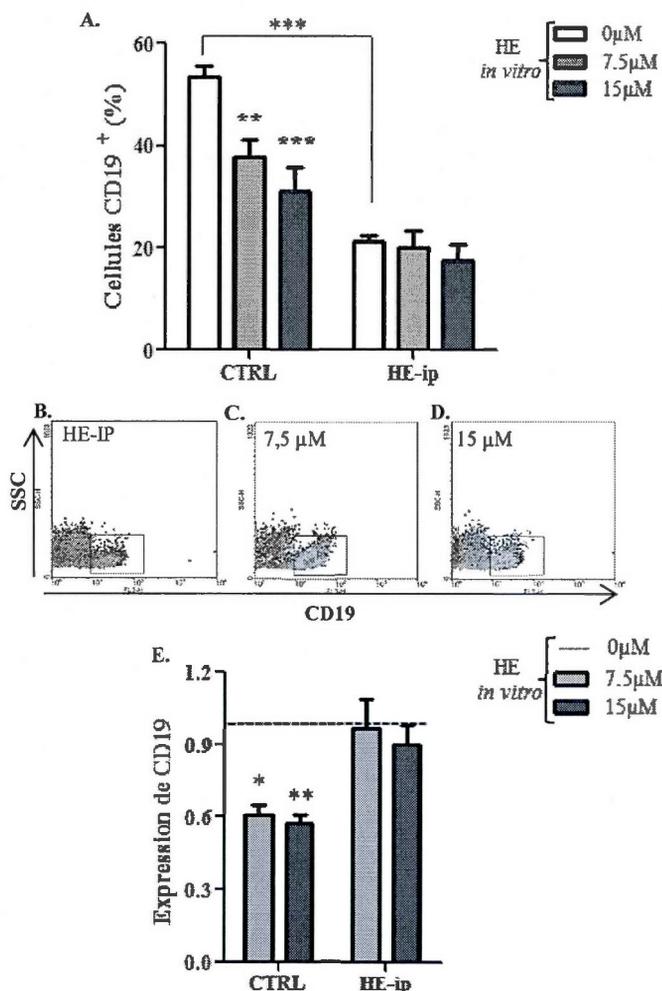


Figure 3.12 Effet d'un traitement d'hème *in vitro* sur l'expression de CD19 par les cellules péritonéales en provenance de souris conditionnées avec de l'hème. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par la route IP durant 3 jours puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été incubées *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 ou 15 μM) durant 20 min, lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire CD19. Le pourcentage de cellules exprimant CD19 (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules, de même pour l'expression moyenne de CD19 (E) qui est représenté par le ratio de la gmean associée à l'expression de CD19 chez les cellules CD19⁺ traitées par l'HE *in vitro* sur la gmean des cellules CD19⁺ Ctrl (0μM) associées ± ESM. Les résultats sont une compilation de 2 expériences (n=6). Une one way ANOVA, couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée entre les traitements d'HE *in vitro* et leur Ctrl respectif (A), ainsi qu'un test de T pairé paramétrique (E); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

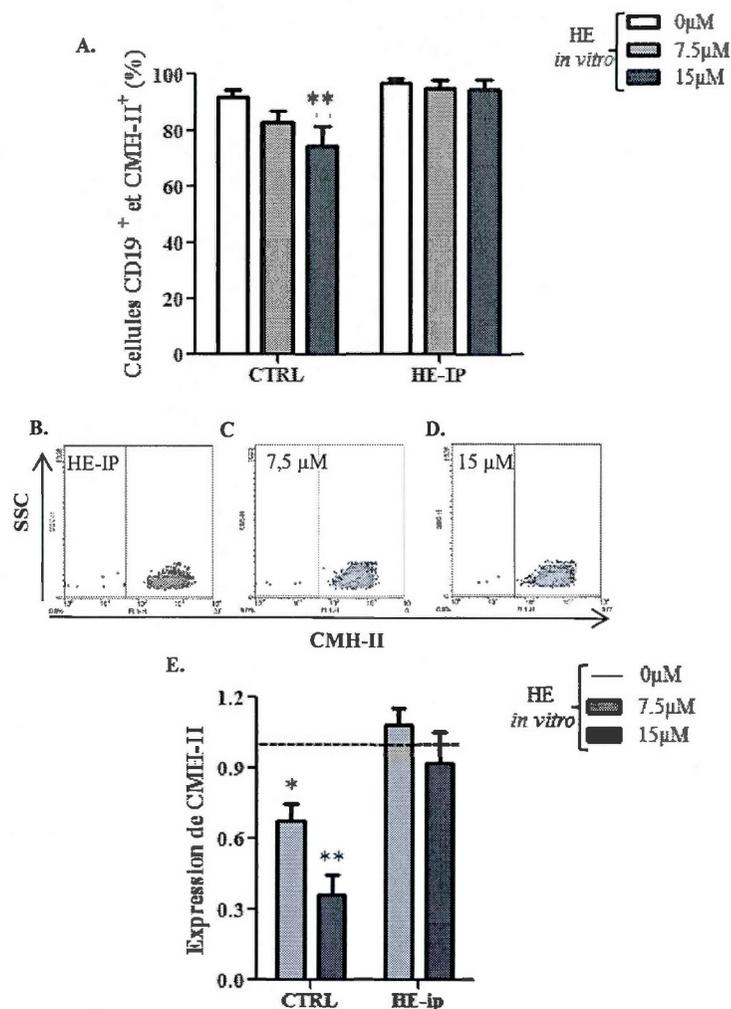


Figure 3.13 Effet d'un traitement d'hème *in vitro* sur l'expression de CMH-II par les cellules CD19⁺ en provenance du péritoine de souris conditionnées avec de l'hème. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par la route IP durant 3 jours puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été incubées *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 ou 15 μM) durant 20 min, lavées avec du PBS puis marquées avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CMH-II. Le pourcentage de cellules CD19⁺ exprimant CMH-II (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression moyenne de CMH-II (E) est représentée par le ratio de la gmean associée à l'expression de CMH-II par les cellules CD19⁺ et CMH-II⁺ traitées avec l'HE *in vitro* sur la gmean des cellules CD19⁺ et CMH-II⁺ Ctrl (0 μM) associées ± ESM. Les résultats sont une compilation de 2 expériences (n=6). Une one way ANOVA, couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée entre les traitements d'HE *in vitro* et leur Ctrl respectif (A), ainsi qu'un test de T pairé paramétrique (E); * P<0.05, ** P<0.01.

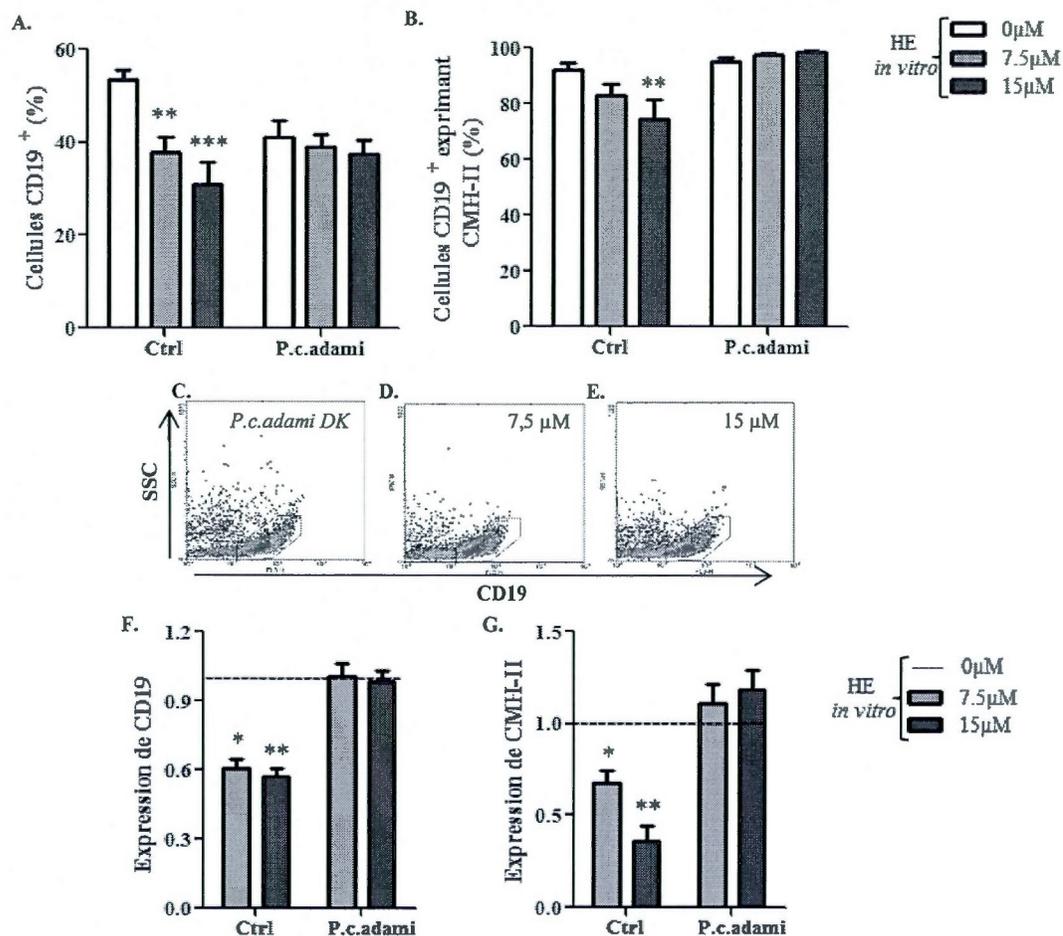


Figure 3.14 Effet d'un traitement d'hème *in vitro* sur les cellules CD19⁺ péritonéales en provenance de souris infectées par *Plasmodium*. Des souris BALB/c ont été infectées avec 5×10^5 GRs-p par *P.c.acdami* DK et ont été sacrifiées le jour de la résolution de l'infection (12 jours post-infection). Les PECs ont été incubées *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 ou 15 μM) durant 20 min, lavées avec du PBS puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CMH-II. Le pourcentage de cellules exprimant CD19 (A, C à D) et celui des cellules CD19⁺ exprimant CMH-II (B) ont été évalués par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression de CD19 (F) et CMH-II (G) représente le ratio de la gmean associée à l'expression de ces deux protéines chez les cellules CD19⁺ traitées par l'HE *in vitro* sur la gmean des cellules CD19⁺ non traitées *in vitro* ± ESM. La figure représente les résultats de 2 expériences pour les souris Ctrl (n=6) et d'une expérience pour les souris infectées (n=3). Une one way ANOVA, couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée entre les traitements d'HE *in vitro* et leur Ctrl respectifs (A, B), ainsi qu'un test de T pairé paramétrique (F, G); * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Les macrophages ont aussi répondu différemment au traitement d'HE *in vitro* à la suite de leur préconditionnement *in vivo* (figure 3.15). Comme les lymphocytes B, les cellules F4/80⁺ ont présenté une résistance à l'HE. En effet, leur pourcentage est resté stable (figure 3.15A), de même que leur expression des protéines F4/80 et CMH-II, qui n'ont pas diminué en présence de l'HE *in vitro* (figure 3.15E et F). De plus, la morphologie des cellules n'a pas été modifiée par le traitement ultérieur (figure 3.15 B à D, F et G).

Les macrophages présents chez les souris infectées par *P. c. adami DK* n'ont par contre pas été réfractaires au traitement ultérieur à l'HE (figure 3.16). Bien que la morphologie des cellules F4/80⁺ ainsi que leur expression du CMH de classe II (figure 3.16B, C, D et F) n'a pas été modifiée par le second traitement à l'HE, le nombre de macrophages en culture a fortement diminué, passant de 35 à près de 20 % des cellules totales du péritoine (figure 3.16A). De plus, sur les cellules exprimant toujours F4/80, l'expression moyenne de F4/80 était diminuée (figure 3.16E).

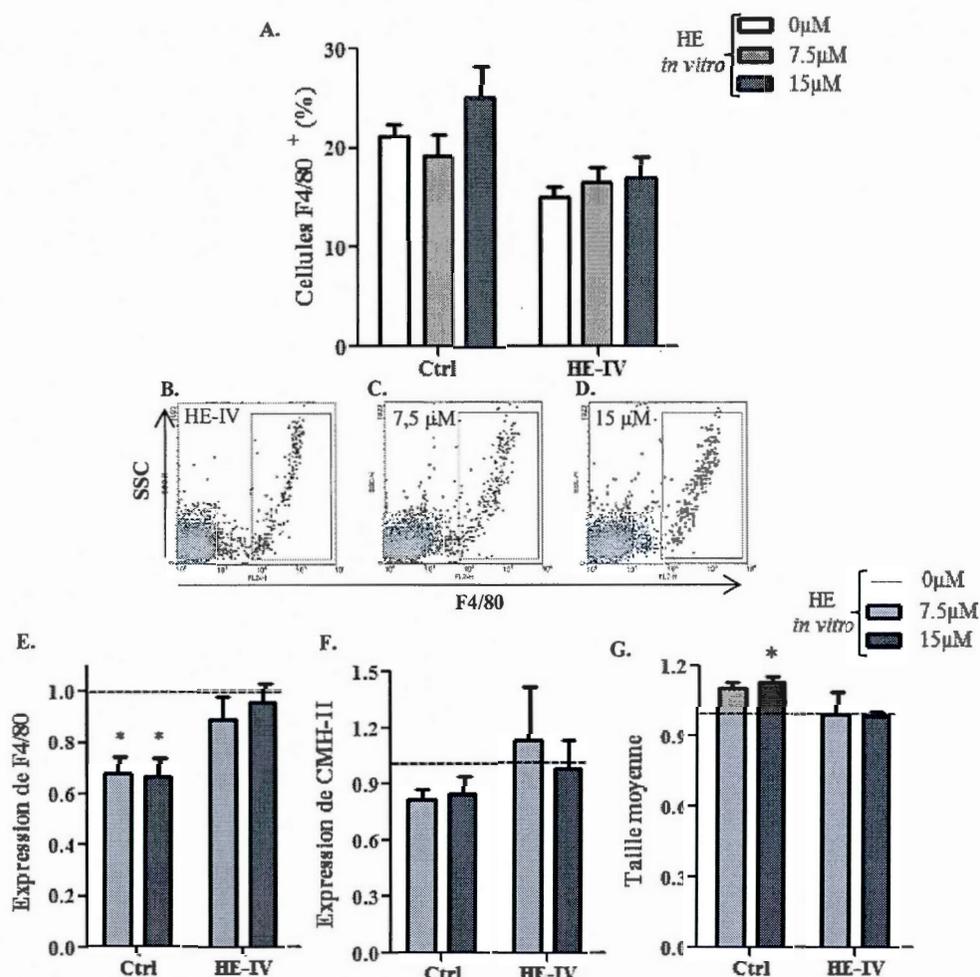


Figure 3.15 Effet d'un traitement d'hème *in vitro* sur les cellules péritonéales F4/80⁺ en provenance de souris conditionnées avec de l'hème. Des souris BALB/c ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par la route IP durant 3 jours puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été incubées *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 ou 15 μM) durant 20 min, lavées avec du PBS puis marquées avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires F4/80 et CMH-II. Le pourcentage de cellules exprimant F4/80 (A à D) a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules. L'expression moyenne de F4/80 (E) et CMH-II (F) est représentée par le ratio de la gmean associée à l'expression de ces deux protéines chez les cellules F4/80⁺ traitées par l'HE *in vitro* sur la gmean des cellules F4/80⁺ Ctrl (0 μM) associées. Les résultats représentent la moyenne ± ESM de 2 expériences pour les Ctrl (n=6) et d'une expérience pour HE-iv (n=2). Une one way ANOVA, couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée entre les traitements d'HE *in vitro* et leur Ctrl respectif (0 μM) (A), ainsi qu'un test de T païré paramétrique (E, F, G); * P<0.05.

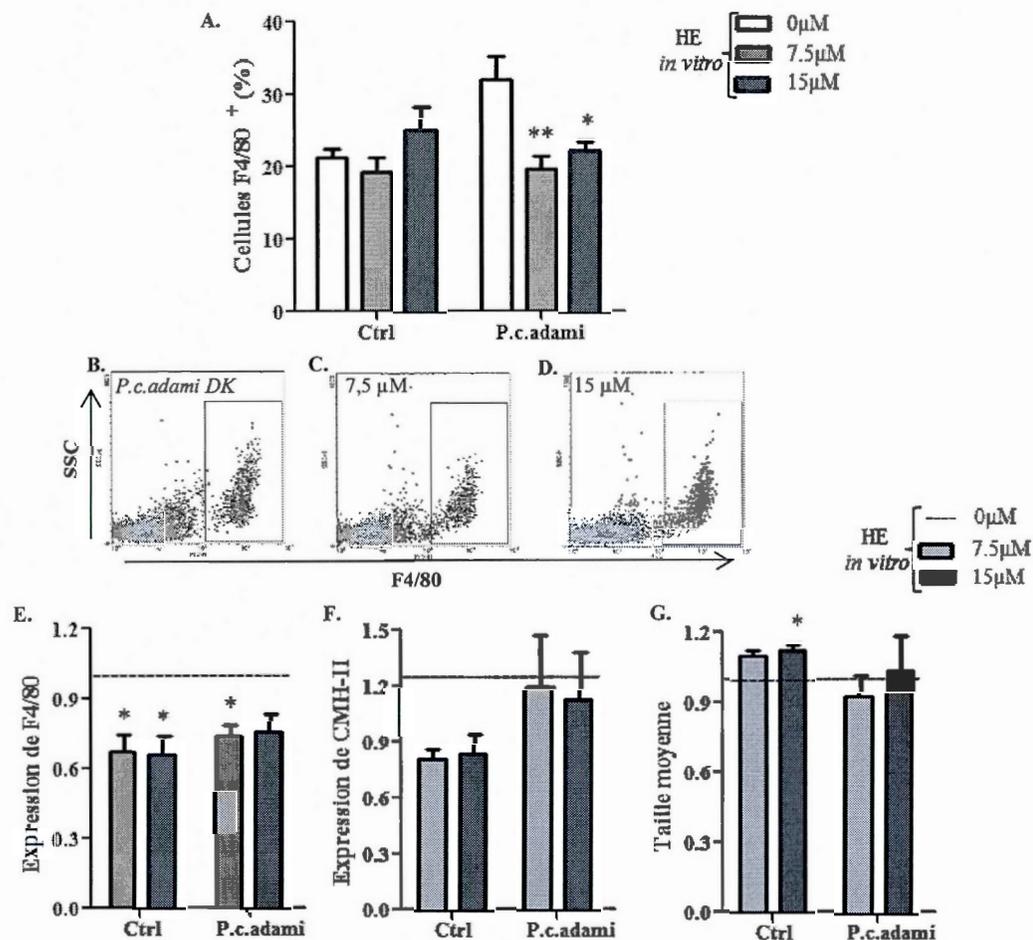


Figure 3.16 Effet d'un traitement d'hème *in vitro* sur les cellules F4/80⁺ péritonéales en provenance de souris infectées par *Plasmodium*. Des souris BALB/c ont été infectées avec 5×10^5 GRs-p par *P. c. adami* DK et ont été sacrifiées le jour de la résolution de l'infection. Les PECs ont été incubées *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 ou 15 μM) durant 20 min, lavées avec du PBS puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires F4/80 et CMH-II. Les figures A et B représentent respectivement le % de cellules F4/80 total (B à D) et leur proportion exprimant le CMH-II. L'expression de F4/80 (E), CMH-II (F) et la taille moyenne représentent le ratio de la gmean associée à l'expression respective de F4/80, CMH-II et FSC chez les cellules F4/80⁺ traitées par l'HE *in vitro* sur la gmean des cellules F4/80⁺ non traitées *in vitro*. La figure représente les résultats de 2 expériences pour les souris Ctrl (n=6) et d'une expérience pour les souris infectées (n=3) ± ESM. Une one way ANOVA, couplée à un test de comparaisons multiples de Tuckey, a été réalisée entre les traitements d'HE *in vitro* et leur Ctrl respectif (A), ainsi qu'un test de T paillé paramétrique (F, G, H); * P<0.05, ** P<0.01.

Tableau 3.I: Récapitulatif des effets de l'HE *in vitro* et *in vivo* sur les lymphocytes B et macrophages.

		HE (μ M)		
		7.5	15	
<i>In vitro</i>	Cellules CD19 ⁺	Pourcentage	↓ **	↓ ***
		Expression de CD19	↓ *	↓ **
		Pourcentage exprimant CD19 et CMH-II	nul	↓ ***
		Expression de CMH-II	↓ *	↓ **
		FSC	nul	↓ *
		SSC	nul	nul
	Cellules F4/80 ⁺	Pourcentage	nul	↑ n.s.
		Expression de F4/80	↓ *	↓ *
		Pourcentage exprimant F4/80 et CMH-II	↑ n.s.	↑ n.s.
		Expression de CMH-II	↓ n.s.	nul
		FSC	nul	↑ *
		SSC	nul	nul
	Cellules F4/80 ⁺ ayant la morphologie des macrophages	Pourcentage	↓ **	↓ **
		Expression de F4/80	nul	nul
		Pourcentage exprimant F4/80 et CMH-II	nul	nul
		Expression de CMH-II	nul	nul
		FSC	nul	nul
		SSC	nul	nul
		HE IP	HE IV	
<i>In vivo</i>	Cellules CD19 ⁺	Pourcentage	↓ ***	↓ n.s.
		Expression de CD19	nul	nul
		Pourcentage exprimant CD19 et CMH-II	nul	nul
		Expression de CMH-II	↑ n.s.	nul
		FSC	nul	nul
		SSC	nul	nul
	Cellules F4/80 ⁺	Pourcentage	↓ ***	↓ *
		Expression de F4/80	déplétion totale	nul
		Pourcentage exprimant F4/80 et CMH-II		nul
		Expression de CMH-II		nul
		FSC		nul
		SSC		nul

	Cellules F4/80 ⁺ ayant la morphologie des macrophages	Pourcentage	↓*** déplétion totale	↓*
		Expression de F4/80		↑*
		Pourcentage exprimant F4/80 et CMH-II		nul
		Expression de CMH-II		nul
		FSC		nul
		SSC		↑ n.s.
			HE (μM)	
			7.5	7.5
<i>In vitro</i> <i>post in vivo</i>	Cellules CD19 ⁺	Aucun effet pour chacun des paramètres		
<i>In vitro</i> <i>post in vivo</i>	Cellules F4/80 ⁺	Aucun effet pour chacun des paramètres		
<i>In vitro</i> <i>post</i> <i>infection</i>	Cellules CD19 ⁺	Aucun effet pour chacun des paramètres		
<i>In vitro</i> <i>post</i> <i>infection</i>	Cellules F4/80 ⁺	Pourcentage	↓**	↓*
		Expression de F4/80	↓*	↓ n.s.
		Pourcentage exprimant CMH-II	nul	nul
		Expression de CMH-II	nul	nul
		FSC	nul	nul
		SSC	nul	nul

Les PECs de souris BALB/c ont été collecté à partir de souris Ctrl (n=6), traitées avec de l'HE IP (n=4 à 7) et IV (n=2) ou infectées avec *P. c. adami DK* (n=3). Les PECs contrôles ont été traitées 20 minutes *in vitro* avec de l'HE (0, 7.5 et 15μM) à 37°C (5 % de CO₂), de mêmes que les PECs provenant de souris traitées *in vivo* IP (CD19⁺) et IV (F4/80⁺) et ceux en provenance de souris ayant résolu l'infection par *Plasmodium*. Les PECs ont ensuite été lavées et incubées avec les anticorps conjugués dirigés contre les protéines CD19, F4/80 et CMH-II, avant d'être analysées par cytofluorométrie. Les pourcentages de PECs associées à CD19 et F4/80 ont été mesurés ainsi que ceux associés à l'expression mutuelle de CD19 et CMH-II ainsi que F4/80 et CMH-II. Les gmean associées à la taille (FSC) des cellules ainsi qu'à leur complexité (SSC) ont aussi été répertoriées. Les résultats sont exprimés en fonction d'une hausse (↑) ou d'une baisse (↓) statistiquement significative (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001), non statistiquement significative (n.s.) ou ne présentant aucun effet (nul).

Le péritoine renferme deux populations distinctes de lymphocytes B ayant des capacités effectrices différentes. Une première population est représentée par les lymphocytes B conventionnels (cellules nommées B2) qui dépendent des lymphocytes T pour leur activation, à la suite de quoi elles expriment et sécrètent des anticorps spécifiques à l'antigène. La forte affinité de leurs anticorps pour l'antigène est générée par l'hypermutation somatique, où les régions variables reconnaissant l'épitope antigénique se modifient de manière à acquérir une meilleure affinité et avidité pour l'antigène (Jayneway *et al.*, 2009, p.169). La deuxième population est représentée par les lymphocytes B1, qui sont indépendants des lymphocytes T pour leur activation et qui sont majoritaires dans le péritoine. En présence d'un antigène spécifique à leur BCR, les lymphocytes B1 s'activent, mais ne passent pas par les étapes d'hypermutation somatique et de commutation de classe. Pour cette raison, ces lymphocytes sécrètent uniquement des IgM ayant peu d'affinité pour l'antigène, mais ayant la capacité de réagir avec plus d'un déterminant antigénique (spécificité accrue) (Mix, *et al.*, 2006). Les cellules B1 sont aussi impliquées dans la réactivité contre des auto-antigènes, entre autres contre des protéines de surface membranaires des GRs (Fagarasan *et al.*, 2000). Leur rôle durant l'infection par *Plasmodium* est encore ambigu, mais il a été rapporté que leur auto-réactivité contre les GRs pourrait favoriser la destruction des GRs-p, en occasionnant toutefois une anémie hémolytique plus importante (Brahimi *et al.*, 2011).

Dans l'optique de caractériser l'influence de l'HE dans l'anémie paludique, et puisque les traitements d'HE ainsi que l'infection diminuent le nombre de lymphocytes B péritonéaux, il était intéressant d'évaluer si ces deux conditions influençaient le ratio de cellules B conventionnelles (B2; CD19⁺, CD23⁺) protectrices et de lymphocytes B1 autoréactifs (CD19⁺, CD23⁻). Les résultats de cytofluorométrie n'ont par contre indiqué aucune modification quant au pourcentage de ces deux types cellulaires au sein de la population péritonéale de lymphocyte B (figure 3.17).

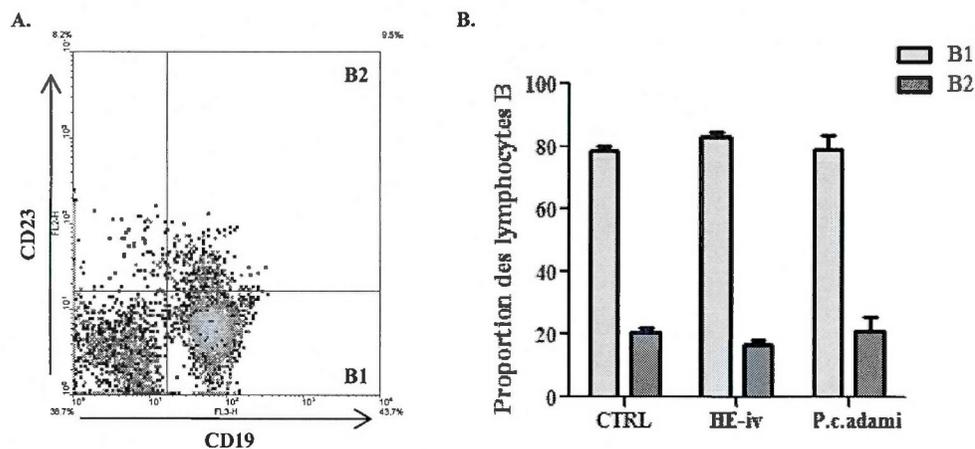


Figure 3.17 Proportion de lymphocytes B2 (conventionnels) et de B1 en provenance de la cavité péritonéale de souris contrôles, préconditionnées avec de l'hème et ayant résolu l'infection par *Plasmodium*. Les souris HE-IV ont été traitées avec 10 mg/kg/jour d'HE par la route IV durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les souris *P. c. adami* ont été infectées avec 5×10^5 GRs-p par *P. c. adami* DK, et ont été sacrifiées le jour suivant la résolution de l'infection. Les PECs de ces BALB/c ont été récoltées puis marquées avec des anticorps conjugués dirigés contre les protéines extracellulaires CD19 et CD23. Une grille de sélection a permis de discriminer les cellules simples et doubles positive pour les protéines CD19 et CD23 (A). L'histogramme (B) représente la proportion de lymphocytes B (CD19⁺) conventionnel (B2; CD23⁺) et de B1 (CD23⁻) au sein des cellules B totales du péritoine. Les résultats représentent 3 expériences pour les souris Ctrl (n=3) et une expérience pour les souris traitées avec l'HE-IV (n=2) et les souris infectées (n=3). Un test de T non païré paramétrique a été réalisé entre les différents traitements pour une même population de lymphocytes B.

Le fait que les cellules provenant de souris infectées ont reproduit la même résistance à l'HE *in vitro* que celles provenant de témoins traités avec l'HE *in vivo* nous a conduits à supposer qu'une quantité importante d'HE devait être libérée durant la malaria et serait responsable de cet effet. Des dosages d'HE sérique du pic de l'infection par *P. c. adami* DK et suivant les traitements d'HE *in vivo* ont donc été réalisés pour comparer les proportions d'HE libre dans ces deux conditions. Tel qu'attendu, la quantité d'HE sérique suite aux injections *in vivo* a augmentée de plus du double par rapport aux souris contrôles, toutefois, au pic de l'infection, une quantité plus faible d'HE que celle des témoins a été rapportée (figure 3.18). L'hémolyse étant reconnue pour être maximisée lors du pic d'infection (Ferreira *et al.*, 2008) cette baisse d'HE sérique chez les souris parasitées indiquerait la présence de mécanismes éboueurs efficaces. En considérant son efficacité comme éboueur d'HE libre, un dosage d'HPX a été réalisé. Une augmentation de plus de 200% des valeurs normales d'HPX sérique ont été mesurée lors du pic de parasitémie (figure 3.19).

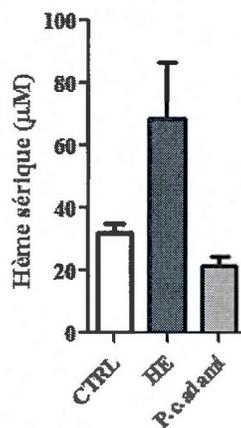


Figure 3.18 Concentrations sériques d'hème chez les souris traitées avec de l'hème ou au pic d'infection par *Plasmodium*. Les souris HE ont été traitées avec 10 mg/kg/jour d'HE par la route IP durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les souris *P. c. adami* ont été infectées avec 5×10^5 GRs parasités par *P. c. adami* DK et ont été sacrifiées lors du pic d'infection. Le sang a été récolté par ponction cardiaque avec une seringue héparinisée et les globules rouges retirés par centrifugation. Des sérums Ctrl (n=3), HE-IP (n=3) et *P. c. adami* (n=4) sans hémolyse ont été choisis pour le dosage d'HE avec le kit heme quantichrom de BioAssay Systems. Un test de T non-pairé paramétrique a été réalisé entre le Ctrl et les deux traitements (HE; $p=0.1165$, *P. c. adami*; $p=0.0549$).

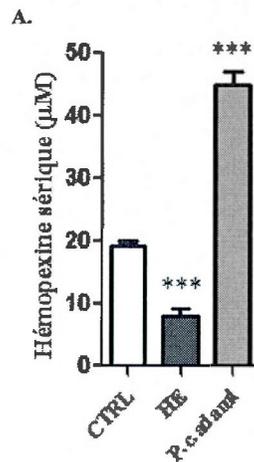


Figure 3.19 Concentrations sériques d'hémopexine chez les souris traitées avec de l'hème ou infectées par *Plasmodium*. La concentration sérique d'HPX a été évaluée le jour suivant les 3 injections d'HE-IP et le jour du pic de parasitémie. Des sérums Ctrl (n=7), HE-IP (n=6) et *P. c. adami* (n=6) sans hémolyse ont été choisis pour le dosage d'HPX avec la trousse ELISA de la compagnie Kamiya Biomedical. Un test de T non-pairé paramérique a été réalisé entre le Ctrl et les deux traitements; *** P<0.001.

3.3 Répercussions de l'hème *in vivo* sur les érythrocytes et sur l'infection par *Plasmodium chabaudi adami* (DK).

L'objectif central de ce projet de recherche était de déterminer l'importance de l'HE dans l'hémolyse non spécifique reliée à la malaria, en plus d'évaluer les effets de l'HE sur les cellules immunitaires cruciales dans la protection contre l'infection. Les résultats précédents ont été peu concluants en ce qui concerne l'impact de l'HE sur les molécules du CMH-II pouvant favoriser la reconnaissance des auto-antigènes érythrocytaires et l'élimination non spécifique des GRs. L'HE est toutefois reconnu comme étant un inducteur d'éryptose *in vitro*. Dans les recherches *in vitro* de Gatidis et collègues (2009), une brève exposition des érythrocytes à l'HE libre induisait l'expression des PS sur la membrane externe des GRs, augmentait les concentrations de calcium intracellulaire et occasionnait une réduction de la taille des cellules. Ces paramètres, ainsi que l'oxydation des membranes érythrocytaires, sont caractéristique de la sénescence des érythrocytes et de leur destruction ultérieure par les phagocytes (Gatidis *et al.*, 2009; Rifkind et Nagababu, 2013). Il apparaît ainsi très plausible que l'HE libéré par la destruction des érythrocytes durant la malaria puisse conduire à une modification des GRs environnants et/ou à leur vieillissement prématuré et retrait de la circulation.

Dans cette optique, les effets de l'HE sur la destruction et le renouvellement des érythrocytes ont été évalués. Pour ce faire, des souris ont été traitées *in vivo* avec de l'HE durant 3 jours, au cours desquels leurs GRs ont été étudiés par cytofluorométrie. Afin d'examiner le taux de destruction et de renouvellement des érythrocytes *in vivo*, du sulfo-NHS-biotine a été injecté aux souris préalablement aux injections d'HE. Ce composé a la propriété de lier les protéines de manière covalente et sa biotine à une forte affinité pour la streptavidine (strep), une molécule qui, couplée à un fluorochrome, devient un outil de cytofluorométrie spécifique aux cellules ayant été en contact avec le sulfo-NSH-biotine lors de l'injection. Ce composé a permis de

faire la distinction entre les érythrocytes en circulation au moment de l'injection (strep⁺) et des traitements avec l'HE, de ceux arrivés dans le sang par la suite (strep⁻).

Les GRs ont été suivis de manière journalière avant la 1^{re} injection d'HE et 24 heures suivant chacun des traitements. Le pourcentage de GRs strep⁺ n'a pas diminué davantage par rapport à celui des souris contrôles et la quantité totale d'Hgb était comparable dans les deux cas (appendice C, p.94). De plus, les érythrocytes traités avec l'HE n'ont pas présenté davantage de phosphatidylsérine sur leur membrane externe (cellules annexin-V⁺), de même que la protéine CD47, dont le changement de conformation est un marqueur de sénescence, n'a pas été modifiée (figure C.1b et c).

Les souris traitées ou non avec l'HE ont ensuite été infectées avec *P. c. adami* DK et la parasitémie, la réticulocytose, le pourcentage de cellules strep⁺ et les taux d'Hgb total et d'HPX sérique ont été évalués de manière journalière (figure 3.20). Tel que rapporté par notre équipe de recherche (Dalko *et al.*, 2013), l'HE a exercé un effet protecteur chez la souris en diminuant le nombre de GRs-p à tous les jours de l'infection par rapport au souris infectées, mais non traitées avec l'HE (figure 3.20A). De plus, la résolution complète de l'infection a été plus rapide, soit 2 jours avant les souris contrôles. Néanmoins, la baisse significative d'HPX sérique après les 3 traitements d'HE n'a pas influencé son augmentation au cours de l'infection (figure 3.20E). Dès le 2^e jour de l'infection, les taux d'HPX sont revenus à des valeurs comparables à celles des souris non traitées. Ainsi, comme démontré précédemment, aucun impact sur le taux de GRs strep⁺ n'a été constaté lors de l'infection chez les souris préconditionnées avec l'HE par rapport aux témoins (figure 3.20B). Toutefois, malgré une plus faible parasitémie chez les souris préconditionnées avec l'HE, le nombre de réticulocytes générés lors de l'infection n'a pas différé de celui des souris non traitées (figure 3.20C). De plus, une tendance à la baisse de la concentration d'Hgb totale a été mesurée chez les sujets traités avec l'HE (figure 3.20D).

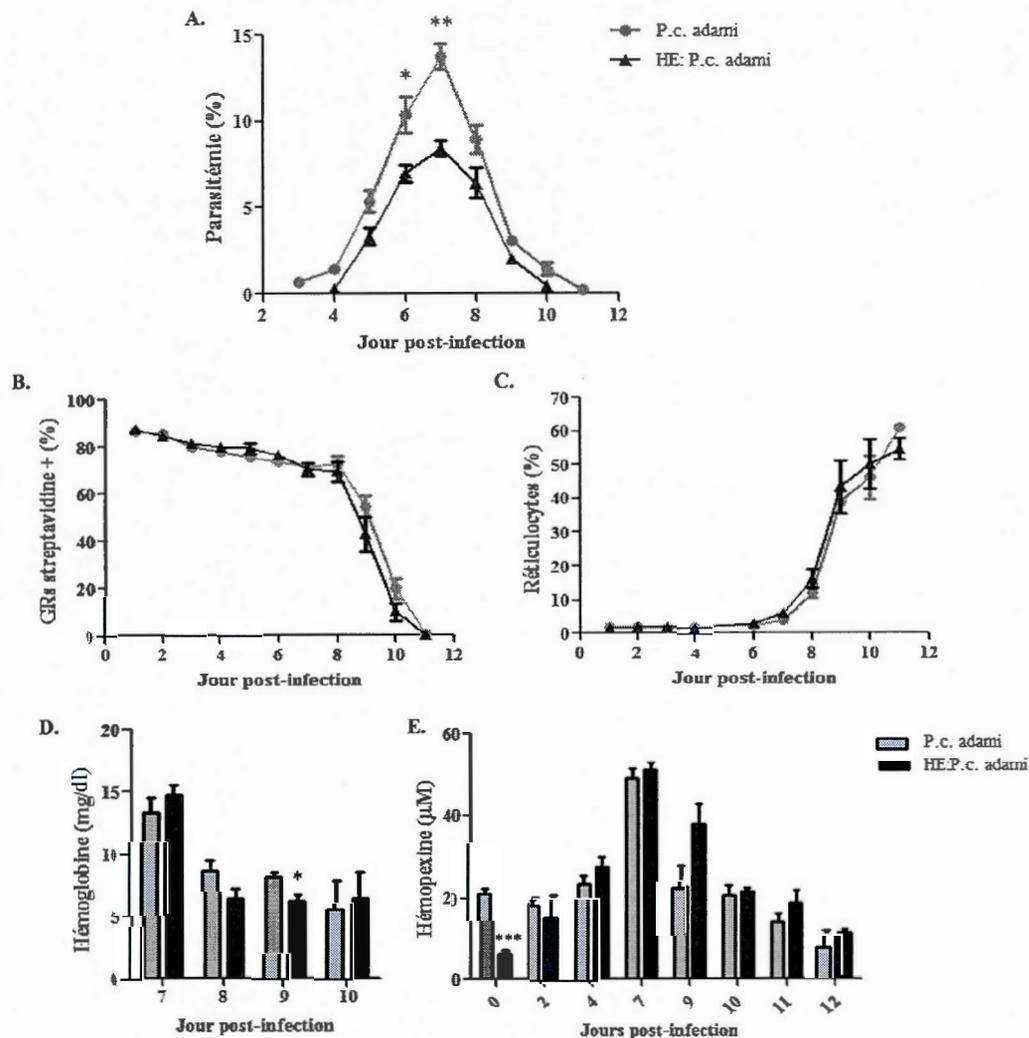


Figure 3.20 Impacts des prétraitements d'hème durant l'infection par *Plasmodium*. Les cellules sanguines de souris BALB/c ont été marquées *in vivo* avec du sulfo-NHS-biotine. Le lendemain, et pour 3 jours consécutifs, la moitié des témoins ont été traités avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par la voie IP. Ensuite, au jour 0, elles ont toutes été infectées avec 5×10^5 GRs parasités par *P. c. adami* DK. Le % de GRs-p (A) a été évalué de manière journalière avec un frottis sanguin coloré au giemsa. Le taux de GRs NHS-biotine⁺ (B) et la réticulocytose (C) ont été déterminés par cytofluorométrie avec la streptavidine et un anti-CD71 conjugués. L'Hgb totale (D) a été dosée avec le réactif de Drabkin et l'HPX sérique (E) avec la trousse ELISA de la compagnie Kamiya Biomedical. Les résultats représentent la moyenne \pm ESM d'une expérience sur un total de n=3 souris. Des tests de T non-pairés paramétriques ont été réalisés à chaque jour de l'infection entre les témoins infectés et ceux ayant reçu l'HE; * P<0.05, ** P<0.01.

En plus du suivi de la parasitémie par frottis sanguins, le pourcentage de GRs-p a été évalué par cytofluorométrie en flux à l'aide d'un marqueur fluorophore spécifique à l'acide nucléique (cytrak orange). Ainsi, avec le marquage à la streptavidine, les érythrocytes infectés (cytrak⁺) pouvaient être discriminés comme étant présent dans le sang lors des traitements d'HE (strep⁺) de ceux arrivés par la suite (strep⁻). Ce double marquage a permis de démontrer que chez les deux types de souris, les GRs strep⁺ étaient proportionnellement moins infectés que les strep⁻ (figure 3.21B et C). De plus, la parasitémie était significativement inférieure chez les souris traitées avec l'HE par rapport aux souris contrôles uniquement chez les GRs présents lors des injections d'HE (strep⁺) (figure 3.21C).

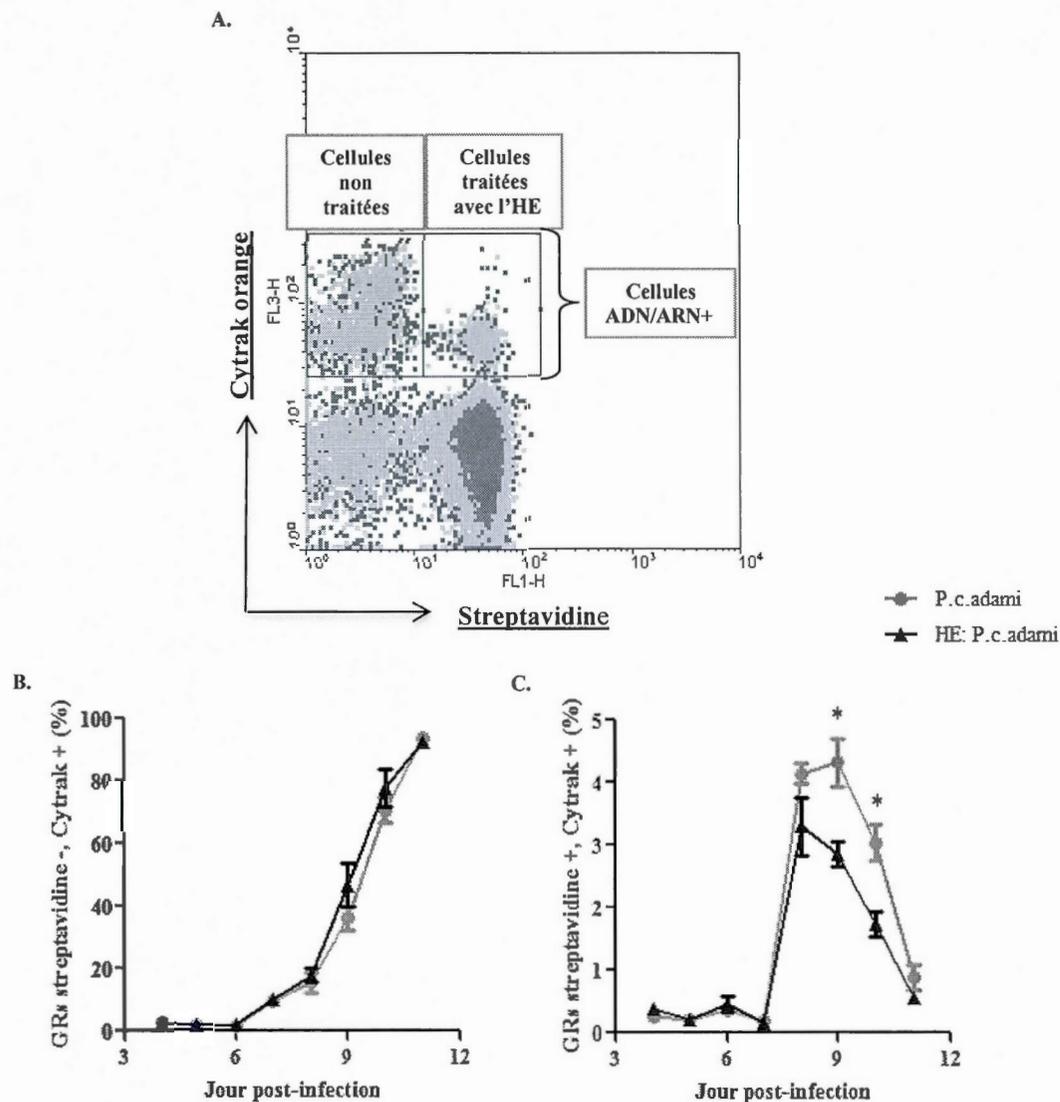


Figure 3.21 Le traitement préalable avec de l'hème affecte la capacité des érythrocytes à être infectés. La parasitémie par *P. c. adami* DK a été suivie de manière journalière par frottis sanguins. Des cellules sanguines ont aussi été lavées dans du PBS et marquées avec la protéine conjuguée streptavidine et du cytrak orange (A). Ce double marquage permet de discriminer les GRs infectés (cytrak⁺) produits après le traitement par l'HE (strep⁻) (B) de ceux présents lors du traitement (strep⁺) (C) par cytofluorométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne \pm ESM d'une expérience sur un total de n=3 souris. Des tests de T non-pairés paramétriques ont été réalisés à chaque jour de l'infection entre les témoins infectés et ceux ayant reçu l'HE; * P<0.05.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'objectif central de ce projet de recherche était de documenter le possible rôle de l'HE dans l'induction de l'anémie non spécifique reliée au paludisme. Dans cette optique, nous voulions mesurer l'impact de l'HE sur les érythrocytes, ainsi que sur les populations de lymphocytes B et macrophages en ce qui a trait à leur expression du CMH-II, lui-même relié à leur niveau d'activation et de capacité présentatrice d'antigène, ainsi qu'à l'expression de CD19 et F4/80.

Dans un premier volet, les effets de l'HE, en concentrations équivalentes à celles rapportées comme étant libres en circulation durant la malaria, ont été évalués *in vitro* sur les lymphocytes B et macrophages. Ces cellules immunitaires sont essentielles à l'instauration d'une immunité antipaludique efficace et bien qu'elles soient étudiées depuis plusieurs années, beaucoup de questions restent encore sans réponses quant à leur rôle dans la pathologie reliée à la malaria.

Dans un milieu sans protéines éboueuses, l'HE a eu un effet dose-dépendant critique sur les cellules CD19⁺ (lymphocytes B) dont les effectifs en culture ont chuté de plus de 50 % en présence de 15 μ M d'HE, en plus d'exprimer moins de molécules CD19 et CMH-II à leur surface (figure 3.1A et e et 3.2E). Cette baisse du nombre de lymphocytes reconnus par l'anti-CD19 était de plus associée à une diminution de la taille moyenne des ces cellules (figure 3.1F), effet qui est caractéristique de l'apoptose des lymphocytes B (Buttke et Sandstrom, 1994). Il est reconnu que le

stress oxydatif, induit par la génération d'ERO, est directement relié à l'apoptose de plusieurs types de cellules et de plus, Diaz et collègues (2004) rapportent une chute importante de l'expression de CD19 par les lymphocytes B en phase précoce d'apoptose. Ces informations suggèrent la possibilité que l'HE ait induit la mort programmée de ces cellules dans les conditions testées. (Buttke et Sandstrom, 1994; Fortes *et al.*, 2012). Toutefois, la perte d'expression de CD19 ne permet pas de faire le suivi de la morphologie des cellules lors du stade tardif de l'apoptose, où leur taille devrait être fortement diminuée et leur complexité intracellulaire augmentée par la condensation de l'ADN. Des essais avec des lymphocytes B purifiés, ainsi que leur marquage subséquent avec l'iodure de propidium et l'annexin-V, seraient requis pour confirmer l'apoptose HE-dépendant des lymphocytes B et pour écarter la possibilité que l'oxydation de l'épitope reconnu par l'anti-CD19 soit à l'origine de la chute du pourcentage de cellules CD19⁺.

Tel que proposé dans la littérature, la protéine éboueuse HPX, en concentration équimolaire à l'HE, a été en mesure de bloquer efficacement les répercussions de l'HE sur les lymphocytes B (figure 3.7) (Ascenzi *et al.*, 2005). Cette confirmation soutient l'idée qu'il est peu probable qu'une faible hémolyse induise les effets que nous constatons *in vitro*, mais tout porte à croire qu'une situation d'anémie hémolytique aiguë concomitante avec une inflammation systémique, telle qu'observée durant la malaria, présenterait tous les critères pour conduire à des effets dévastateurs.

L'HE a présenté un effet plutôt controversé sur les cellules F4/80⁺ (macrophages). En effet, le pourcentage de cellules F4/80⁺ a augmenté à la suite du traitement de 20 minutes avec 15 μ M d'HE (figure 3.3A). Cette hausse concorde avec l'apparition dose-dépendante d'une population de cellules peu complexes reconnues par l'anti-F4/80 (figure 3.3B à D). La prise en considération de ces cellules comme étant des macrophages peut par contre être trompeuse, puisque les macrophages sont des

cellules volumineuses complexes et puisque l'analyse morphologique de cette nouvelle population F4/80⁺, par cytofluorométrie, révèle des petites cellules peu complexes (figure 3.5). Il apparaît de plus improbable que cette nouvelle population de cellules F4/80 soit le résultat d'une activation de l'expression de F4/80 par des monocytes ou macrophages puisque ceux-ci présentent constitutivement cette protéine à leur surface à chacun des stades de leur maturation (Lin *et al.*, 2005). Un tri des cellules ayant fixé l'anticorps F4/80 avec un cytofluoromètre suivi d'une fixation sur lame et la mise en évidence des noyaux cellulaires avec la coloration de Pappenheim permettrait toutefois d'évaluer avec d'avantage de certitude l'indépendance de ces cellules d'avec la population de macrophages.

En analysant uniquement les cellules F4/80⁺ ayant la morphologie typique des macrophages, une baisse significative de plus de 30% des macrophages en culture a été observée (figure 3.6A). L'HE n'a toutefois présenté aucun effet sur la taille, la complexité ou l'expression de CMH-II et F4/80 par les cellules F4/80 ayant la morphologie des macrophages (figure 3.6). La perte des effectifs de la population de macrophages *in vitro* va de pair avec les résultats récemment obtenus par Fortes et collègues (2012), qui démontrent que l'HE *in vitro* (30 μ M), dans un milieu sans protéines éboueuses, induit rapidement la nécrose programmée des macrophages par un processus dépendant des ERO et du facteur de nécrose tumorale (TNF).

Il est très intéressant de constater que l'effet de l'HE sur les macrophages ne semble pas dose-dépendant et qu'environ 60 % des macrophages ne sont pas affectés par une plus forte concentration d'HE (15 μ M) (figure 3.6A), ni par un temps de traitement prolongé (2 heures) (appendice A, p.92). Il semblerait de plus que cette particularité soit fréquemment observée chez les macrophages et pourrait être induite par une différence au niveau du stade de maturation ou du type de macrophage rencontré (Cambos et Scorza, 2010).

L'infection par *Plasmodium* se caractérise par une anémie sévère reliée à la destruction des GRs-p et des GRs-np. Plusieurs hypothèses ont été proposées, confirmées ou abrogées concernant cette destruction non spécifique des érythrocytes, mais les mécanismes impliqués restent encore à déterminer (Chang et Stevenson, 2004). Le fait que Sutherland et collègues (1995) aient démontré une activation polyclonale des lymphocytes T CD4⁺ dépendante du CMH par l'HE nous a conduits à émettre l'hypothèse que l'HE libéré durant la malaria pourrait occasionner la liaison et présentation des peptides appartenant aux érythrocytes phagocytés et à l'activation de lymphocytes T autoréactifs, par un mécanisme impliquant la modulation de la spécificité des molécules du CMH-II. Pour évaluer cette possibilité, des lymphocytes B, qui expriment constitutivement le CMH-II, ont été cultivés en présence d'HE, puis leur capacité à présenter un peptide spécifique aux TCR des cellules 3DO.54-8 a été évaluée par dosage de l'IL-2, une cytokine sécrétée par des lymphocytes T activés. Dans un contexte où l'HE modifierait le site de liaison du peptide au CMH-II, il était attendu de retrouver une baisse du niveau d'activation des lymphocytes T en présence du peptide spécifique. Toutefois, les résultats ne suggèrent pas une telle modification (figure 3.8). Dans leur ouvrage, Sutherland et collègues (1995) précisent toutefois que certains haplotypes du CMH-II sont plus sensibles à l'HE et plus propices à activer les cellules T de manière polyclonale. L'haplotype H-2^d à notre disposition n'est pas l'un des plus affectés par l'HE et un nouvel essai avec des hybridomes et CPAs de souris SJL/J, porteuses de l'haplotype H-2^s répondant fortement à l'HE, pourrait générer les résultats suggérés.

Il est toutefois possible que l'HE favorise la liaison des molécules du CMH-II avec des peptides qui ne sont pas immunodominants par un mécanisme analogue à celui postulé par Dimitrov et collègues (2007) qui se réfèrent à la modification des paratopes d'IgGs par l'HE. Ainsi plusieurs molécules d'HE pourraient lier un peptide riche en histidine, pour lequel l'HE a une forte affinité, et favoriser ainsi sa liaison avec une molécule du CMH-II par des forces non polaires générées par l'HE. Pour

évaluer cette hypothèse il serait toutefois nécessaire d'incuber les cellules B et T ainsi que le peptide antigénique avec l'HE tout au long de l'expérience, jusqu'à la collecte du surnageant. Dans ce cas, l'effet pro-apoptotique *in vitro* de l'HE sur les lymphocytes présenté ultérieurement pourrait aussi influencer l'issue des résultats obtenus, en affectant de manière dose-dépendante le nombre de cellules en culture.

Suite aux résultats *in vitro*, un essai *in vivo* a été réalisé pour explorer les effets de l'HE dans des conditions physiologiques. L'administration de l'HE par deux voies d'injection différentes, soit IP et IV, avait comme objectif de distinguer les effets de l'HE sur les cellules avoisinantes avec lesquelles il entre directement en contact de ses effets sur les cellules plus distantes du lieu de l'hémolyse. Ainsi, tel qu'attendu, dans un contexte où l'HE a été administré par la voie IP, les PECs, qui ont été directement en contact avec les l'HE, ont présentés des altérations beaucoup plus prononcées que lors d'une administration IV, représentative d'une libération d'HE systémique. Les injections par les voies IV et IP ont respectivement fait diminuer de 20 % et 50 % la proportion de cellules péritonéales CD19⁺ (figure 3.9A). Malgré la hausse du nombre de PECs totales à la suite des injections IP (appendice B, p.93), l'effet important de l'HE IV constaté sur les lymphocytes B péritonéaux sous-tend que la baisse de plus de 50 % de leurs effectifs lors de l'administration IP soit possiblement causée par l'HE et non par leur dilution, relative au recrutement des cellules vers le péritoine.

La chute du pourcentage de lymphocytes B *in vivo* par les 2 voies d'administration n'a pas été accompagnée d'une modulation de leur expression de CD19 ou CMH-II, ni d'une modification de la taille des cellules subsistantes par rapport aux cellules CD19⁺ contrôles (figure 3.9F, à H). Cette absence d'effet par rapport aux résultats *in vitro* suppose un retrait des cellules affectées par l'HE et possiblement la présence d'une population de cellules plus résistantes à la toxicité de l'HE. Le péritoine étant constitué de deux types de lymphocytes B ayant des fonctions et capacités effectrices

différentes, la sélection des lymphocytes B1 par rapport à la population de cellules B2 conventionnelles par l'HE aurait pu révéler une explication intéressante pour la génération d'auto-anticorps durant la malaria. Néanmoins, aucune différence n'a été mesurée entre le pourcentage de lymphocytes péritonéaux B1 et B2, autant suivant les traitements d'HE que suite à la résolution de l'infection par *P. c. adami* DK (figure 3.17).

Les macrophages péritonéaux ont été très fortement atteints par l'injection IP d'HE et en moindre mesure par son administration IV (figure 3.10). L'effet pro-apoptotique et pro-nécrotique de l'HE, déjà démontré *in vitro* sur ces cellules (Cambos et Scorza, 2010; Fortes *et al.*, 2012), semble aussi effectif *in vivo*, malgré la présence de protéines éboueuses. En effet, au site d'injection de l'HE, aucune cellule exprimant F4/80 n'a été retrouvée chez ces animaux, faisant foi de l'effet toxique direct de l'HE (figure 3.10A). La présence, dans le péritoine de ces souris, de cellules volumineuses et complexes qui ne présentent pas l'antigène F4/80, semble confirmer la migration de neutrophiles au niveau du site d'injection d'HE, rapporté par Graça-Souza et collègues (2002) (figure 3.10D). Malgré les 24 heures séparant la dernière injection et la collecte des cellules, la coloration noire du culot de PECs récoltés indiquait la présence d'HE, ce qui supposait que les mécanismes éboueurs avaient été totalement surpassés par les doses d'HE administrées, ou que l'HE s'était intercalé dans les membranes cellulaires et était rendu inaccessible à l'HPX. La présence d'HE dans le culot des PECs n'a pas été constatée à la suite des injections IV, mais la chute du nombre de cellules péritonéale F4/80⁺ ainsi que l'émergence de la population F4/80⁺ de faible complexité, retrouvée aussi à la suite des traitements d'HE *in vitro*, a confirmé l'accession de l'HE au péritoine (figure 3.10A et E).

De manière intéressante, l'administration de l'HE par la voie IV n'a pas entièrement décimé la population péritonéale de cellules F4/80⁺ ayant la morphologie des macrophages et a donné des résultats similaires à ceux obtenus *in vitro*, où une

population représentant environ 50 % des PECs F4/80⁺ totales a subsisté aux traitements (figure 3.11A). Ces résultats tendent à confirmer la présence d'une population de cellules F4/80⁺ plus résistante au stress oxydatif généré par l'HE. Cambos et Scorza (2010) proposent qu'une telle différence soit occasionnée par le stade de maturation ou le type de macrophages présents. Selon nos résultats, les cellules F4/80⁺ ayant subsisté aux traitements d'HE *in vivo* présenteraient une expression significativement accrue de la protéine F4/80 par rapport aux cellules F4/80⁺ des souris contrôles ainsi qu'une plus grande complexité intracellulaire (figure 3.11B et G). L'expression de F4/80 est reconnue pour être plus importante sur les macrophages matures que sur les monocytes (Lin *et al.*, 2005), de même que la présence de nombreux lysosomes cytoplasmiques chez les macrophages leur confèrent une plus grande complexité intracellulaire par rapport aux monocytes (Cohn et Benson, 1965). Ces résultats supposent la sélection des macrophages matures au détriment des monocytes lors d'une hémolyse importante. De plus, une expérience *in vitro* réalisée sur un seul témoin (résultat non présenté) a permis de confirmer l'activation des cellules F4/80⁺ par l'HE, par la mesure de l'expression de la protéine CD69, un marqueur d'activation chez plusieurs cellules, dont les macrophages (Marzio *et al.*, 1997). Dans cette expérience, une incubation de 20 minutes avec 15 µM d'HE a significativement réduit le nombre de macrophages en culture et augmenté de 700 % les effectifs de cellules F4/80⁺ exprimant CD69, mais n'a toutefois pas modifié leur expression des molécules du CMH-II par rapport aux cellules F4/80⁺ non traitées. Bien qu'une investigation plus importante devra être réalisée, ce résultat, combiné à celui *in vivo* présenté précédemment, suppose que l'HE favorise non seulement la sélection de macrophages matures aux dépens des monocytes, mais qu'il polarise aussi la différenciation des macrophages en type M2 au détriment du type M1 sur lesquels les molécules du CMH-II sont exprimées (Corna *et al.*, 2010). Cette hypothèse est de plus soutenue par le fait que Zhang et collègues (2013) ont récemment démontré l'importance des ERO lors de la différenciation des macrophages de type M1 en M2, ce qui sous-tend qu'une forte

hausse d'ERO pourrait aussi favoriser cette polarisation. L'importance d'une telle découverte dans le contexte de la malaria réside au niveau du rôle distinct de ces deux types de macrophages. Alors que l'activation des macrophages M1 est reliée à l'induction des réponses Th1 qui mènent à la destruction des parasites par la production d'ERO et de cytokines pro-inflammatoires, la polarisation de macrophages M2 contribue plutôt à la réparation tissulaire et l'angiogenèse (Corna *et al.*, 2010). Une polarisation des macrophages M2 trop tôt durant l'infection, occasionnée par une hémolyse importante et la libération d'HE en circulation, pourrait en théorie favoriser la croissance parasitaire et l'hyperparasitémie (Raes *et al.*, 2007).

Afin de confirmer le phénotype de tolérance généré par l'HE sur les macrophages subsistants, les PECs provenant des souris traitées *in vivo* par les routes IP et IV ont été retraitées *in vitro* avec 7.5 et 15 μM d'HE et les effets de ce second traitement ont été comparés à ceux induits chez les PECs contrôles (tableau 3.1). Les macrophages, ainsi que les lymphocytes B provenant du péritoine de souris préconditionnées avec l'HE ont toléré le traitement d'HE *in vitro* (figure 3.12, 3.13 et 3.15). Les effectifs de ces deux populations sont restés stables à la suite des 20 minutes de traitement avec l'HE, de même que leur morphologie et expression respective de F4/80, CMH-II et CD19. Cette résistance occasionnée par des traitements répétés avec de l'HE a déjà été démontrée *in vitro* sur des cellules endothéliales (Balla *et al.*, 1993) ainsi qu'*in vivo* sur des hépatocytes (Vinchi *et al.*, 2008). Dans les deux cas, les chercheurs ont démontré que l'induction de l'HO-1 suite à la première rencontre avec l'HE était responsable de la protection cellulaire et tissulaire lors du second traitement. Cet enzyme est fortement induit chez les macrophages, les lymphocytes de la rate et les hépatocytes lors de l'infection par *Plasmodium* (Wagener *et al.*, 2003) et de manière très intéressante, les lymphocytes B péritonéaux provenant de souris ayant résolu l'infection par *P. c. adami* DK ont exhibé une tolérance comparable face au traitement d'HE *in vitro* (figure 3.14). Toutefois, cette tolérance était absente chez les

cellules F4/80⁺ provenant des souris ayant résolu l'infection (figure 3.16). En effet, le pourcentage de cellules F4/80⁺ et leur expression de F4/80 ont présenté la même tendance à la baisse que celle observée chez les cellules contrôles (figure 3.16A et E; tableau 3.1). Il est probable que les macrophages analysés étaient des nouvelles cellules différenciées à partir des nouveaux monocytes n'ayant pas eu de contact avec l'HE. Cette supposition est supportée par la demi-vie plus courte des macrophages par rapport aux lymphocytes, en plus du fait que l'érythrophagocytose durant la malaria diminue davantage cette espérance (Cambos et Scorza, 2010; Parham, 2009, p. 176). Ainsi, des monocytes arrivés au péritoine durant la résolution de l'infection auraient possiblement été en présence de plus faibles quantités d'HE et auraient produits peu d'HO-1 protecteur.

La tolérance à l'HE des lymphocytes B provenant de souris ayant résolu l'infection nous a amenés à postuler qu'une forte concentration d'HE devait être libérée durant l'infection par *P. c. adami DK*. Bien que les injections d'HE IP aient conduit à une hausse de 200 % de la concentration d'HE sérique, le sérum de souris au pic de l'infection contenait 30% moins d'HE que les souris contrôles (figure 3.18). Cette chute inattendue est théoriquement justifiée par la hausse d'HPX sérique constatée chez les souris infectées, qui a certainement conduit à une dégradation accrue de l'HE par les hépatocytes (figure 3.19).

L'induction d'HPX était toutefois imprévue en considérant les données obtenues lors de l'infection chez l'homme et le fait que les injections d'HE IP avaient diminué de plus de 50 % de la concentration d'HPX sérique (figure 3.19A). Cette hausse d'HPX n'a pas été constatée chez les souris au pic de parasitémie par *P. c. adami DS* (appendice D, p.96). Puisque les deux souches paludiques confèrent une anémie hémolytique sévère chez les souris infectées, ce résultat tend à supposer que l'induction de l'HPX murine est fortement influencée par la souche causant l'infection et non simplement par la présence d'HE. Ce résultat sous-tend toutefois

une différence majeure dont la prise en compte est cruciale dans la recherche sur la malaria avec un modèle de paludisme murin.

En considérant l'impact de l'HE sur la survie des lymphocytes B et des macrophages, par les deux voies d'administration, nous nous attendions à une réduction de la durée de vie des érythrocytes en circulation. Néanmoins, aucune différence n'a été mesurée en ce qui a trait au pourcentage de GRs marqués par le sulfo-NHS-biotine ou à la concentration d'Hgb totale, représentative d'une absence d'anémie, à la suite des traitements IP avec l'HE (appendice C, p.94). De plus, aucune modification quant à l'expression extracellulaire des phosphatidylsérines ou de la protéine CD47 n'a été constatée (figure C.1b et c). Ces résultats permettent de supposer que, malgré la présence de 70 μM d'HE dans le sérum des souris suite aux injections, la concentration d'HE utilisée, ou la durée des traitements, n'ont pas abouti à la lyse des érythrocytes *in vivo* ou à leur destruction accélérée. De plus, la forte concentration d'HE sérique n'a pas conduit à une déplétion totale de l'HPX, tel que retrouvée durant l'infection par *Plasmodium* chez l'homme. Cette information, et le fait que l'HPX se retrouve en concentration comparable dans le sérum de l'homme et de la souris en situation homéostatique, suggèrent qu'une concentration d'HE de plus de 70 μM est libérée lors de l'infection chez l'homme ou que le mécanisme de recyclage de l'HPX est plus efficace chez la souris.

Tel que publié par notre équipe de laboratoire, le préconditionnement des souris avec l'HE a toutefois conduit à une baisse de la parasitémie à tous les jours de l'infection chez la souris et à une différence hautement significative du pourcentage de GRs-p au pic de l'infection par rapport aux souris contrôles (figure 3.20A) (Dalko *et al.*, 2013). Dans cette publication de Dalko et collègues (2013), une concentration d'HE de 5 mg/kg/jour avait été utilisée pour conditionner les souris avant l'infection et avait conduit à la même tolérance que celle divulguée dans ce mémoire, mais à une prolongation de la parasitémie par rapport aux souris contrôle. La concentration d'HE

de 10 mg/kg/jour utilisée lors de la présente investigation à, quant à elle, conduite à une résolution de l'infection une journée plus tôt que les souris contrôles et à une réduction du temps d'infection de 2 jours, laissant supposer un effet dose-dépendant de l'HE sur la résistance des souris à l'infection (figure 3.20A).

L'effet du préconditionnement d'HE sur la durée de vie des érythrocytes est toutefois ambigu. Bien que le pourcentage de GRs sulfo-NHS-biotine⁺ ne semblait pas affecté par l'HE, l'inhibition de l'érythropoïèse durant l'infection ne permet pas une analyse de la destruction des GRs en circulation par cette méthode (figure 3.20B). Le faible renouvellement des GRs durant l'infection n'affecte pas suffisamment le pourcentage de GRs strep⁻ et empêche la mesure d'une différence dans le ratio GRs strep⁺/strep⁻ qui permettrait d'estimer le pourcentage journalier d'érythrocytes détruits. Une expérimentation prochaine, qui comprendra une mesure d'hématocrite, nous permettra d'exposer avec plus de certitude les effets du préconditionnement d'HE sur la durée de vie des GRs en proie à l'infection. Les concentrations journalières d'Hgb, qui ont une tendance à la baisse le jour suivant le pic d'infection et une diminution significative au jour 9 nous permettent toutefois de supposer une anémie plus sévère chez les souris préconditionnées avec de l'HE (figure 3.20D). Garcia-Santos et collègues (2014) ont d'ailleurs démontré que la différenciation des cellules érythroïdes était sous le contrôle de l'HO-1 dont la surexpression induite par l'HE conduisait à une altération de la synthèse de l'Hgb. Cette information est intéressante dans le contexte d'une infection humaine, où les concentrations d'HPX sérique sont basses et celles d'HE libre sont élevées. Toutefois, dans le contexte de l'infection par *P. c. adami*, où l'HPX est surexprimée dès le jour 2 post-infection et que l'HE libre au pic de parasitémie est en deçà des valeurs homéostatiques, la baisse de concentration en Hgb au jour 9 post-infection semble moins propice à être occasionnée par une inhibition de l'érythropoïèse. Nous n'excluons toutefois par la possibilité que l'HE pré-infection puisse inhiber l'érythropoïèse par un mécanisme indirect, tel la polarisation de cellules immunitaires sécrétant des cytokines qui

inhibent la formation de nouveaux GRs dans la rate ou la moelle osseuse. En contrepartie, une altération des GRs traités avec l'HE lors du préconditionnement pourrait aussi altérer leur demi-vie, favorisant ainsi leur lyse durant l'infection ainsi qu'une chute de la concentration d'Hgb total. Cette hypothèse d'une altération des GRs est de plus soutenue par le fait que la baisse de parasitémie significative par rapport aux souris non traitées était constatée exclusivement chez les GRs qui étaient présents lors des injections d'HE (strep⁺) (figure 3.21C). Autant chez les souris préconditionnées que les souris contrôles, les parasites ont infecté d'avantage les GRs strep⁻, ce qui confirme la préférence de jeunes érythrocytes par *P. c. adami* (figure 3.21B et C). Toutefois, la diminution importante du nombre de GRs-p strep⁺ chez les souris préconditionnées par l'HE suggère une difficulté pour les parasites à pénétrer ces GRs, s'y développer ou y survivre. De plus, le fait que les valeurs d'HPX sériques chez les souris préconditionnées aient rejoint celles des souris contrôles avant l'arrivée des premiers parasites intra-érythrocytaires (figure 3.20A et E) supposent que l'HE injecté a été retiré de la circulation avant le début de l'infection et que la baisse de parasitémie soit due à un effet direct sur les GRs strep⁺ et non sur les parasites en circulation. Nous émettons ainsi l'hypothèse que la modification des GRs en circulation par l'HE serait à l'origine d'une altération/oxydation des érythrocytes qui, en plus de réduire leur demi-vie, serait responsable d'une élimination précoce des GRs-p strep⁺ ou d'une altération des protéines permettant l'invasion par les parasites. Cette hypothèse sera abordée prochainement dans une expérimentation *in vitro* avec la souche *P. falciparum* dans le laboratoire du Dre Petra Rohrbach de l'institut de parasitologie de McGill.

L'utilisation d'un modèle d'infection paludique *in vitro* permettra également d'évaluer les effets de concentrations connues d'HE, dans un milieu où la concentration des protéines éboueuses est sélectionnée. En effet, les concentrations sériques d'HPX d'environ 45 μ M chez le modèle expérimental murin *P. c. adami DK* s'opposent à celles retrouvées chez l'homme, où l'HPX peut atteindre des valeurs de

l'ordre des nanomolaires (Fendel *et al.*, 2010). Le préconditionnement avec l'HE pourrait ainsi avoir des répercussions encore plus importantes chez l'homme ou dans un modèle murin déficient en HPX et le modèle *in vitro* de *P. falciparum* nous permettra d'estimer ces effets.

La tolérance acquise face à l'infection chez les personnes souffrant de désordres hémolytiques et d'hémolyse chronique démontre d'ailleurs un bon exemple des effets de l'HE sur l'infection humaine (Ferreira *et al.*, 2011; Pattanapanyasat *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2013). Les maladies, telles la thalassémie, l'anémie falciforme, la sphérocytose et la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase, génèrent une fragilité des érythrocytes qui sont plus prompts à lyser et occasionnent chez les porteurs une hémolyse chronique et une concentration d'HE libre élevée en circulation. Les patients souffrant de ces maladies sont toutefois protégés des complications létales liées à la malaria et de nombreuses études ont tenté d'expliquer cette tolérance (Orimadegun et Sodeinde, 2014; Taylor *et al.*, 2013). Plusieurs hypothèses impliquent qu'une inhibition de la croissance ou de l'invasion de *Plasmodium* dans ces érythrocytes suite à une modification génétique des protéines d'invasion ou de structure des GRs serait à la base de cette tolérance (Greth *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013). D'autres recherches ont indiqué qu'une stimulation de l'immunité innée par une hausse de l'expression d'HO-1 et/ou de NO pourrait être en cause. La production d'IgG spécifiques à plusieurs variantes des protéines parasitaires a aussi été détectée chez certains patients (Taylor *et al.*, 2013). Nos résultats avec les souris préconditionnées par l'HE nous portent à penser que l'HE serait impliqué dans la tolérance contre la malaria chez ces patients et qu'il agirait en modifiant la structure ou le potentiel antioxydant des érythrocytes qui supporteraient moins aisément l'invasion ou la croissance des parasites.

Ces maladies héréditaires sont principalement rencontrées dans les pays où la malaria est endémique et démontrent que le fardeau imposant de la présence de *Plasmodium*

dans ces pays a poussé à une sélection évolutive favorisant ces mutations qui protègent contre la malaria, possiblement par leur libération d'HE en circulation. Nous pourrions ainsi poser l'hypothèse que l'hémolyse des GRs-np durant la malaria, qui semble causée par de nombreux facteurs distincts et qui occasionne aussi la libération d'HE, serait également le fruit de l'évolution qui aurait permis la coexistence de *Plasmodium* et de l'homme, en limitant la parasitémie et permettant la survie de l'hôte.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Les parasites du genre *Plasmodium* affectent la condition humaine depuis des millénaires et infectent près de 500 000 000 d'individus chaque année, principalement des femmes enceintes et des jeunes enfants d'Afrique. La compréhension des mécanismes immunologiques impliqués dans la pathologie liée au paludisme est pressante et impérative et encore beaucoup trop de questions restent sans réponses en ce qui a trait aux complications associées à la malaria. Cette investigation avait pour objectifs d'évaluer la possibilité que l'HE soit en partie responsable de l'exacerbation de l'anémie hémolytique paludique et de caractériser ses effets sur les macrophages et les lymphocytes B. Bien que l'HE ce soit avéré une molécule hautement néfaste sur ces cellules immunitaires, sa capacité à moduler l'activation des lymphocytes T par un mécanisme CMH-II dépendant n'a pas pu être démontrée dans le contexte de cette recherche. De plus, hors du contexte de l'inflammation associée à la malaria, l'HE n'a pas présenté d'effets pro-apoptotique ou pro-lytique sur les érythrocytes. Néanmoins, cette investigation a révélé des résultats inattendus et très pertinents quant aux effets d'un préconditionnement d'HE sur les cellules immunitaires et les érythrocytes. En effet, nous avons démontré que les lymphocytes B et macrophages subsistants au stress oxydatif généré par l'HE deviennent résistants à un second traitement d'HE. Cette tolérance des cellules à des stress oxydatifs pourrait permettre le maintien et la survie de populations de cellules immunitaires stables lors d'une hémolyse chronique et d'ainsi favoriser l'établissement d'une réponse immune en vue de l'élimination des parasites. Nous

avons aussi découvert que l'HE agit directement sur les érythrocytes qu'il modifie de manière à réduire leur capacité à supporter l'infection par *Plasmodium*. Cette tolérance à l'infection reflète de manière intéressante la résistance inexplicée aux séquelles létales du paludisme chez les individus atteints d'hémoglobinopathies. Ces complications génétiques d'ordre hémolytique sont fortement recensées dans les pays où la malaria est endémique et supposent une pression évolutive où ces maladies ont favorisé la survie de l'hôte infecté par *Plasmodium*. Nos résultats avec l'HE offrent une explication similaire d'ordre évolutive où l'hémolyse paludique aurait favorisé la survie de l'hôte infecté et limité l'impact des infections récurrentes rencontrées dans les pays endémiques. Ces résultats proposent aussi une explication quant à la résistance conférée par les maladies hémolytiques. Ainsi, bien que nous cherchions un coupable responsable de l'exacerbation de l'anémie hémolytique paludique, nous avons décelé un aspect protecteur de l'hémolyse face à l'hyperparasitémie.

Nos recherches à venir tenteront de déceler les modifications structurelles conférées par l'HE sur les érythrocytes, qui limitent l'invasion ou la survie des GRs-p. Par le fait même, nous discriminerons par quel procédé l'HE confère une résistance à l'infection par *Plasmodium*. Nous entreprendrons aussi de caractériser l'importance de la résistance conférée par l'HE dans un contexte de malaria humaine, où l'HPX sérique est en concentration minimale. Dans ce contexte, nous évaluerons aussi les cytokines en liens avec l'induction de l'HPX murine et déterminerons les éléments qui favorisent ou limitent son induction chez les souris par rapport aux humains.

APPENDICE A

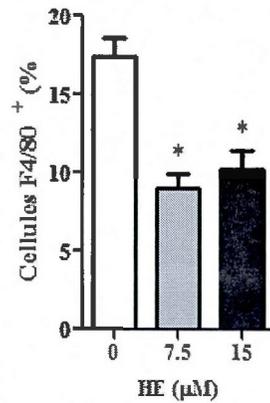


Figure A.1. Effets d'un traitement d'hème *in vitro* prolongé sur les cellules péritonéales F4/80⁺. Les PECs de souris BALB/c ont été incubées à 37°C (5 % de CO₂) dans du RPMI durant 2 heures avec l'HE, lavées avec du PBS puis marquées avec l'anticorps conjugué dirigé contre la protéine extracellulaire F4/80. Le pourcentage de cellules F4/80⁺ a été évalué par cytofluorométrie sur un total de 10 000 cellules en sélectionnant les cellules F4/80⁺ ayant un SSC élevé.

APPENDICE B

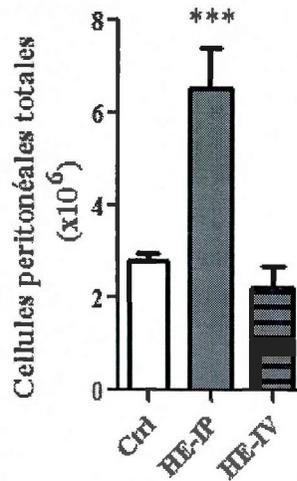


Figure B.1.. Nombre de cellules péritonéales totales chez les souris traitées avec l'hème *in vivo*. Des souris BALB/c (Ctrl=11, HE-IP=7, HE-IV=2) ont été traitées avec de l'HE (10 mg/kg/jour) par les routes IP ou IV durant 3 jours consécutifs puis sacrifiées au jour 4. Les PECs ont été récupérés avec un enchaînement de 3 injections et ponctions de 3 ml de PBS dans la cavité péritonéale des souris. Le nombre de cellules totales a été évalué avec un hémacytomètre. Un test de T non-pairé paramétrique a été réalisé entre le Ctrl et les deux traitements d'HE; *** P<0.001.

APPENDICE C

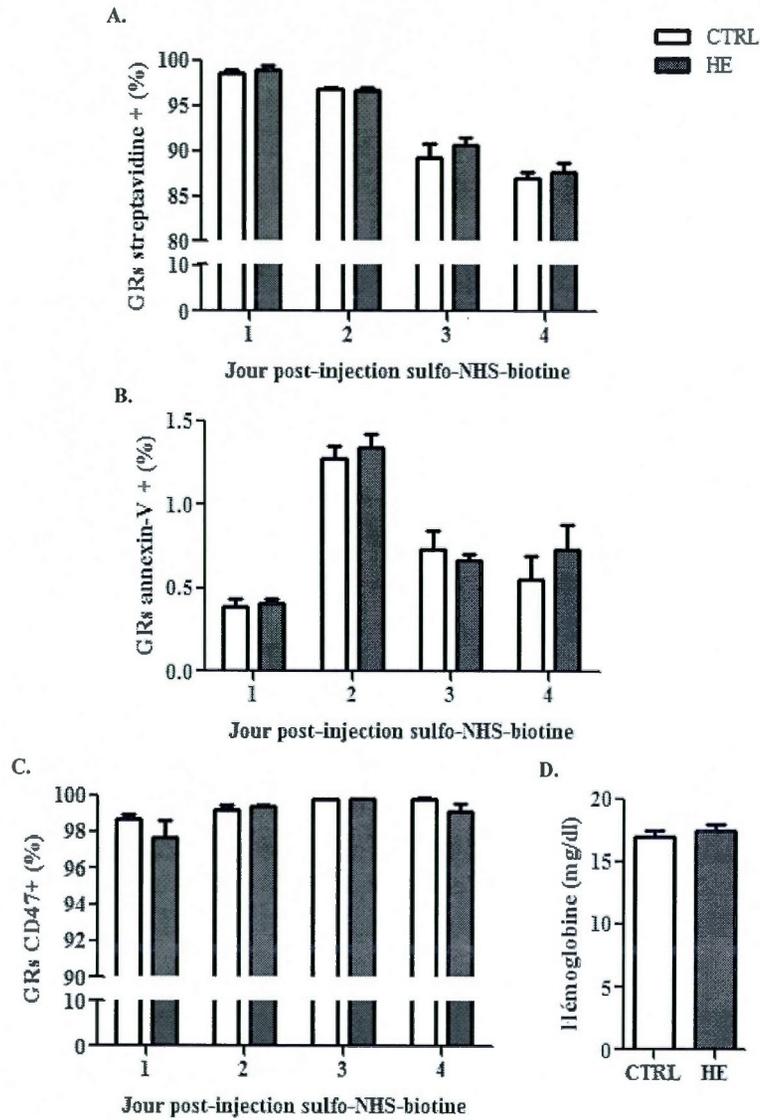


Figure C.1.. Effets de l'hème *in vivo* sur la durée de vie des érythrocytes. Du sulfo-NHS-biotine (1 mg/souris) a été injecté à des souris BALB/c par la voie IV au jour 0. De l'HE (10 mg/kg/jour) a été injecté par la route IP le lendemain, durant 3 jours consécutifs à la moitié des souris. Avant chacun des traitements d'HE, 5 μ l de sang ont été collectés de la pointe de la queue des souris. Les GRs ont été suspendues dans du PBS et marqués avec les protéines conjuguées streptavidine (A), annexin-V (B) et un anti-CD47 reconnaissant une conformation unique de la protéine (C). Les

GRs ont ensuite été lavés, resuspendues dans du PBS et analysés par cytofluorométrie. L'Hgb totale a été dosée avec le réactif de Drabkin (D). Les résultats représentent la moyenne \pm ESM d'une expérience sur un total de n=3 souris. Des tests de T non-pairés paramétriques ont été réalisés à chaque jour entre les témoins Ctrl et ceux ayant été traités avec l'HE.

APPENDICE D

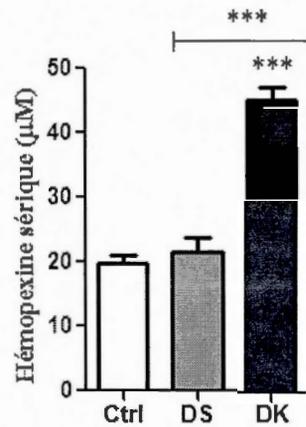


Figure D.1 Concentrations sériques d'hémopexine chez les souris infectées par 2 souches différentes de *Plasmodium*. La concentration sérique d'HPX a été évaluée le jour du pic de parasitémie pour les souris DK et le jour précédant le décès pour les souris DS. Des sérums Ctrl (n=7), *P. c. adami* DS et *P. c. adami* DK (n=4) sans hémolyse ont été choisis pour le dosage d'HPX avec la trousse ELISA de la compagnie Kamiya Biomedical. Un test de T non-pairé paramérique a été réalisé entre chacune des conditions; *** P<0.001.

BIBLIOGRAPHIE

- Aft, R. L. et Mueller, G. C.** (1983). Hemin-mediated DNA strand scission. *Journal of biological chemistry*, 258(19), 12069-12072.
- Angulo, I. et Fresno, M.** (2002). Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(6), 1145-1152.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Visca, P., Altruda, F., Tolosano, E., Beringhelli, T. et Fasano, M.** (2005). Hemoglobin and heme scavenging. *IUMDB Life*, 57(11), 749-759.
- ASH:** American society of hematology [s. d.]. (2008) *Sickle cell disease and thalassemia*. [Brochure]. Oakland: Vinchinsky, E
- Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D. et Vercellotti, G. M.** (1991). Hemin : A possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology/ American heart association*, 11(6), 1700-1711.
- Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., Nath, K., Eaton, J. W. et Vercellotti, G. M.,** (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: Induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proceedings of the national academy of sciences*, 90(20), 9285-9289.
- Balla, J., Vercellotti, G. M., Nath, K., Yachie, A., Nagy, E., Eaton, J. W. et Balla, G.** (2003). Haem, haem oxygenase and ferritin in vasculas endothelial cell injury. *Nephrology dialysis transplantation*, 18(5), 8-12.
- Balmer, P., Alexander, J. et Phillips, R. S.** (2000). Protective immunity to erythrocyte *Plasmodium chabaudi AS* infection involves IFN γ -mediated responses and a cellular infiltrate to the liver. *Parasitology*, 121(5), 473-782.
- Beeson, J. G., Osier, F. H. A. et Engwerda, C. R.** (2008). Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in parasitology*, 24(12), 578-584.

Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdula, F., Alayash, A. I. et al. (2013). Heme triggers TRL4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*, 123(3), 377-390.

Brahimi, K., Martins, Y. C., Zanini, G. M., Ferreira-da-Cruz, M. F. et Daniel-Ribeiro, C. T. (2011). Monoclonal auto-antibodies and sera of autoimmune patients react with *Plasmodium falciparum* and inhibits its *in vitro* growth. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (1), 44-51.

Brown, S. B., Hatzikonstantinou, H. et Herries, D. G. (1980). The structure of porphyrins and haems in aqueous solution. *International journal of biochemistry*, 12(5-6), 701-707.

Bunn, H. F. (2012), The triumph of good over evil: protection by sickle gene against malaria. *Blood*, 121(1), 20-25

Buttke, T. M. et Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15(1), 7-10.

Cao, Y., Nicoletti, F. P., De Sanctis, G., Bocedi, A., Ciaccio, C., Gullotta, F., Fanali, G., Tundo, G. R., di Masi, A., Fasano, M., Smulevich, G., Ascenzi, P. et Coletta, M. (2012) Evidence for pH-dependent multiple conformers in iron (II) heme-human serum albumin: spectroscopic and kinetic investigation of carbon monoxide binding. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(1), 133-147.

Cambos, M., Bazinet, S., Abed, E., Sanchez-Dardon, J., Bernard, C., Moreau, R., Olivier, M. et Scorza, T. (2010). The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages. *International journal for parasitology*, 40(9), 1003-1012.

Cambos, M. et Scorza, T. (2010). Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance : role in hemolytic disorders. *Journal of leucocyte biology*, 89(1), 159-171.

Campbell, M. K. et Farrell, S. O. (2012). *Biochemistry*, 7^e édition, États-Unis : Brooks/Cole, Cengage Learning.

Carlsen, C. U., Moller, J. K. S. et Skibsted, L. H. (2005). Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination chemistry reviews*, 249(3-4), 485-498.

Casiday, R. et Frey, R. (2008). Hemoglobin and the heme group: metal complexes in the blood for oxygen transport. Récupéré le 25-03-2014 de; <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Hemoglobin/MetalComplexinBlood.html>

Centers for Disease Control & Prevention Center for Global Health , Récupéré le 12-02-2014 de; <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

Chang, K.-H., et Stevenson, M. M., (2004). Malarial anemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *International Journal of parasitology*, 34(13), 1501-1516.

Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. et Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology : a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in pharmacology*, 5: 61. doi 10.3389/fphar.2014.00061

Chua, C. L. L., Brown, G., Hamilton, J. A., Rogerson, S. et Boeuf, P. (2013). Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?. *Trends in parasitology*, 29(1), 26-34.

Çiment, M. Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *International journal of clinical chemistry*, 390(1-2), 1-11.

Chou, A. et Fitch C. D. (1981). Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *Journal of clinical investigation*, 68(3), 672-677.

Cohn, Z. A. et Benson B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry. *Journal of experimental medicine*, 121, 153-170.

Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., Campanella, A., Brunelli, S., Manfredi, A. A., Apostoli, P., Silvestri, L., Camaschella, C. et Rovere-Querini, P. (2010). Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*, 95(11), 1814-1822.

Dalko, E., Gaudreault, V., Sanchez-Dardon, J., Moreau, R. et Scorza, T. (2013). Preconditioning with hemin decreases *Plasmodium chabaudi adami* parasitemia and inhibits erythropoiesis in BALB/c mice. *PLoS One*, 8(1), e54744.

Das, B. S. et Nanda, N. K. (1999). Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 93(1), 58-62.

Delanghe, J. R. et Langlois, M. R. (2001). Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clinical Chimica Acta*, 312(1-2), 13-23.

Diaz, D., Prieto, A., Barcenilla, H., Monserrat, J., Prieto, P., Sanchez, M. A., Reyes, E., Hernandez-Fuentes, M. P., de la Hera, A., Orfao, A. et Alvarez-Mon, M. (2004). Loss of lineage antigens is a common feature of apoptotic lymphocytes. *Journal of leucocyte biology*, 76(3), 609-615.

Dimitrov, J. D., Roumenina, L. T., Doltchinkova, V. R., Mišlova, N. M., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V. et Vassilev, T. L. (2007). Antibodies use heme as a cofactor to extend their pathogen elimination activity and to acquire new effector functions. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26696-26706.

Del Nagro, C. J., Otero, D. C., Anzelon, A. N., Omorim S. A., Kolla, R. V. et Rickert, R. C. (2005). CD19 function in central and peripheral B-cell development. *Immunologic research*, 31(2), 119-131.

Dondorp, A. M., Angus, B. J., Chotivanich, K., Silamut, K., Ruangveerayuth, R., Hardeman, M. R. et al. (1999). Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. *American Journal of tropical medicine and hygiene*, 60(5), 733-737.

Eskew, J. F., Vanacore, R. M., Sung, L., Morales, P. J. et Smith, A. (1999). Cellular protection mechanisms against extracellular heme: heme-hemopexin, but not free heme, activates the N-terminal c-Jun kinase. *Cell biology and metabolism*, 274(2), 638-648.

Etzerodt, A. et Moestrup, S. K. (2013). CD163 and inflammation : Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & redox signaling*, 18(17), 2352-2353.

Evans, K. J., Hansen, D. S., Rooijen, N. V., Buckingham, L. A., et Schofield L. (2006). Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood*, 107(3), 1192-1199.

Fagarasan, S., Watanabe, N. et Honjo, T. (2000). Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunological review*, 176(1), 205-215.

Fendel, R., Brandts, C., Rudat, A., Kreidenweiss, A., Steur, C., Appelman, I. et al. (2010). Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *Plos One*, 5(4), e10038.

Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G. et Soares, M. P. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?. *Journal of molecular medicine*. 86(10), 1097-1111.

Ferreira, A., Marguti, I., Bechmann, I., Jeney, V., Chora, A., Palha, N. R., Rebelo, S., Henri, A., Beuzard, Y. et Soares, M. P. (2011). Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell*, 145(3), 398-409.

Fortes, G. B., Alves, L. S., de Oliveira, R., Dutra, F. F., Rodrigues, D., Fernandez, P. L., Souto-Padron, T., De Rosa, M. J., Kelliher, M., Golenbock, D., Chan, F. K. M. et Bozza, M. T. (2012). Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood*, 119(10), 2368-2375.

Figueiredo, R. T., Fernandez, P. L., Mourano-Sa, D. S., Porto, B. N., Dutra, F. F., Alves, L. S., Oliveira, M. F., Oliveira, P. L., Graça-Souza, A. V. et Bozza, M. T. (2007). Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *Journal of biological chemistry*, 282(28), 20221-20229.

Gallo, V., Skorokhod, O. A., Schwarzer, E. et Arese, P. (2012). Simultaneous determination of phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized and non-parasitized red blood cells by flow cytometry. *Malaria Journal*, 11: 428.

Garcia-Santos, D., Schrankhofer, M., Horvathova, M., Jaber, M. M., Chies, J. A. B., Sheftel, A. et Ponka, P. (2014). Heme oxygenase 1 is expressed in murine erythroid cells where it controls the level of regulatory heme. *Blood*, 123(14), 2269-2277.

Gatidis, S., Föller, M. et Lang, F. (2009). Hemin-induced suicidal erythrocyte death. *Annals of hematology*, 88(8), 721-726.

Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*, 39(8), 1529-1542.

Good, M. F. et Doolan, D. L. (1999). Immune effector and mechanisms in malaria. *Current opinion in immunology*, 11(4), 412-419.

Gozzelino, R., Jeney, V. et Soares, M. P. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 323-354.

Graça-Souza, A. V., Arruda, M. A. B., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C. et Oliveira, P. L. (2002). Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*, 99(11), 4160-4165.

Greth, A., Lampkin, S., Mayura-Guru, P., Rodda, F., Drysdale, K., Roberts-Thomson, M., McMorrin, B. J., Foote, S. J. et Burgio, G. (2012). A novel ENU-mutation in ankyrin-1 disrupts malaria parasite maturation in red blood cells of mice. *PLoS One*, 7(6), e38999.

- Grinberg, L. N., O'Brien, P. J. et Hrkal, Z.** (1999). The effect of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin. *Free radical biology & medicine*, 27(1-2), 214-219.
- Hay, S. I., Guerra, C. A., Tatem, A. J., Noor, A. M. et Snow. R. W.** (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet infectious diseases*, 4(6), 327-336.
- Hawkes, M., Opoka, R.O., Namasopo, S., Miller, C., Thorpe, K. E., Lavery J. V. et al.** (2011). Inhaled nitric oxide for the adjunctive therapy of severe malaria: protocol for a randomized controlled trial, *Trials*, 12:176.
- Hempelmann, E. Krafts, k.** (2013). Bad air, amulets and mosquitoes : 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malaria Journal*, 12(1), 213.
- Ho., M., Tongtawe, P., Kriangkum, J., Wimonwattrawatee, T., Pattanapanyasat, K., Bryant, L., Shafiq, J., Suntharsamai, P., Looareesuwau, S., Webster, H. K. et Elliot, J. F.** (1994). Polyclonal expansion of peripheral gamma delta T cells in human *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity*, 62(3), 855-862.
- Ho., M. et Webster, H. K.** (1990). T cell responses in acute falciparum malaria. *Immunology letters*, 25(1-3), 135-138.
- Hvidberg, V., Maciej, B., Maniecki, M. B. et Jacobsen, C.** (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, 106, 2572-2579.
- James, S. L.** (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological reviews*, 59(4), 533-547.
- Janeway, C. A., Murphy, K., Travers, P. et Walport, M.** (2009). *Immunobiologie* (3^e éd.). Belgique: De Boeck Supérieur.
- Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercelloti, G. M., Eaton, J. W. et Balla, G.** (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood*, 100(3), 879-887.
- Kanbara, T., Azuma, M., Hasegawa, K. et Matsuda, H.** (1988). Anemia and anti-erythrocyte antibodies developed after repeated injections of sonicated preparations of *Plasmodium bergi* and *Babesia rodhaini*. *Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, 269(1),100-108.
- Kataaha, P. K., Facer, C. A., Mortazavi-Milani, S. M., Stierle, H. et Holborow, E. J.** (1984). Stimulation of autoantibody production in normal blood lymphocytes by malaria culture supernatants. *Parasite Immunology*, 6(5), 481-492.

Komatsu, T., Ohmichi, N., Nakagawa, A., Zunszain, P. A., Curry, S. et Tsuchida, E. (2005) O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *Journal of American Chemical Society*, 127(45), 15933-15942

Kumar, S. et Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology letters* 157(3), 175-188.

Lamikanra, A. A., Brown, D., Potocnik, A., Casals-Pascual, C., Langhorne, J. et Roberts, D. (2007). Malarial anemia: of mice and men. *Blood*, 110(1), 18-28.

Lang, F., Lang, E. et Föller, M. (2012). Physiology and pathophysiology of eryptosis. *Transfusion medicine and hemotherapy*, 39(5), 308-314.

Larsen, R., Gozzelino, R., Jeney, V., Tokaji, L., Bozza, F. A., Japiassu, A. M. et al. (2010). A central role for free heme in pathogenesis of severe sepsis. *Science translational medicine*, 2(51), 51ra71.

Lin, H-H., Faunce, D. E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., Kerley, M., Mucenski, M. L., Gordon, S. et Stein-Streilein, J. (2005). The macrophages F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific effector regulatory T cells in peripheral tolerance. *Journal of experimental medicine*, 201(10), 1615-1625.

Lin, H-H., Stacey, M., Stein-Streilein, J. et Gordon, S. (2010) F4/80 : the macrophages-specific adhesion-GPCR and its role in immunoregulation. Dans : *Adhesion-GPCRs: structure to function* (éditeurs Yona, S. et Stacey, M.) p. 149-156. Texas : Landes Bioscience et Allemagne: Springer Science+Business Media.

Linares, M., Marin-Garcia, P., Martinez-Chacon, G., Pérez-Benavente, S., Puyet, A., Diez, A. et Bautista, J. M. (2013). Glutathione peroxidase contributes with heme oxygenase-1 to redox balance in mouse brain during the course of cerebral malaria. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), 2009-2018.

Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K. et Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Sciences*, 227(4686), 531-533.

Maines, M. D. (1992). *Heme oxygenase: Clinical applications and functions*. États-Unis: CRC Press Inc.

Marzio, R., Jirillo, E., Ransijn, A., Mauël, J. et Corradin, S. B. (1997) Expression and functions of the early activation antigen CD69 in murine macrophages, *Journal of leucocyte biology*, 62(3), 349-355.

- Mauk, M. R., Smith, A. et Mauk, A. G.** (2011). An alternative view of the proposed alternative activities of hemopexin. *Protein science*, 20(5), 791-805.
- McKnight, A. J. Macfarlane, A. J., Dri, P., Turley, L., Willis, A. C. et Gordon, S.** (1996). Molecular cloning of F4/0, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *Journal of biological chemistry*, 271(1), 486-489.
- Mehlotra, R. K. et Zimmerman, P. A.** (2006). Resistance to antimalaria drugs: parasites and host genetic factors. Dans: *Malaria : Genetic and Evolutionary Aspects* (éditeurs : Dronamraju, K. R. et Arese, P.) p.125-146. New York : Springer.
- Mense, S. M. et Zhang, L.** (2006). Heme; a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases, *Cell Research*, 16(8), 681-692.
- Mix, E., Goertsches, R. et Zetl, U. K.** (2006) Immunoglobulins – Basic considerations. *Journal of neurology*, 253, V9-V17.
- Molnier, A.** (2008). *Pathologie médicale et pratique infirmière*. France : Lamarre. Volume 3.
- Mouchet, J., Carnevale, P. et Manquin, S.** (2008). *Biodiversity of malaria in the world*, Paris: John Libbey Eurotext.
- Muller-Eberhard, U., Javid, J., Liem, H. H., Hanstein, A. et Hanna, M.** (1968). Brief report: Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood*, 32(5), 811-815.
- Muller-Eberhard, U. et Morgan, W. T.** (2006). Porphyrin-binding proteins in serum. *Annals of the New York academy of sciences*, 244(1), 624-649
- Naik, P.** (2012). *Essential of biochemistry*. Inde: Jaypee Brothers medical publishers Ltd.
- Najera, J. A., Gonzalez-Silva, M. et Alonso, P. L.** (2011). Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). *PLoS Medicine*, 8(1), e1000412.
- Nielsen, M., Moller, H. J. et Moestrup, S.K.** (2010). Hemoglobin and heme scavenger Receptors. *Antioxydants and Redox Signaling*, 12(2), 261-273.

Omodeo-Salè, F., Motti, A., Basilico, N., Parapini, S., Olliaro, P. et Taramelli, D. (2003). Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 102(2), 405-711.

Orimadegun, A. E. et Sodeinde, O. (2014). Features and outcomes of malaria infection in glucose-6-phosphatedehydrogenase normal and deficient Nigerian children. *Journal of vector borne diseases*, 51(1), 33-39.

Pamplona, A., Ferreira, A. et Balla, J. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria, *Nature Medicine*, 13(6); 703-710.

Parham, P. (2009). *The immune system*, 3e edition, États Unis: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Pattanapanyasat, K., Yongvanitchit, K., Tongtawe, P., Tachavanich, K., Wanachiwanawin, W., Fucharoen, S. et Walsh, D. S. (1999). Impairment of *Plasmodium falciparum* growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. *Blood*, 93(9), 3116-3119.

Perkins, D. J., Were T., Davenport G. C., Kempaiah P., Hittner J. B. et Ong'echa J. M. (2011). Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1427-1442.

Perlmann, P., Perlmann, H., ElGhazali, G. et Troye Blomberg, M. (1999). IgE and tumor necrosis factor in malaria infection. *Immunology letters*, 65(1-2), 29-33.

Perlmann, P. et Troye-Blomberg, M. (2002). Malaria and the immune system in humans, *Chemical Immunology*. 80, 229-242.

Piccard, H., Van Den Steen, P. E. et Opdenakker, G. (2007). Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(4), 870-892.

Ponka, P. (1999). Cell biology of heme. *American journal of the medical sciences*, 318(4), 241-256.

Raes, G., Beschin, A., Ghassabeh, H. P. et de Baetselier, P. (2007). Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Current Opinion in immunology*, 19(4), 454-459.

Rich, S. M. et Ayala, F. J. (2006). Evolutionary origins of human malaria parasites. Dans : *Malaria : Genetic and Evolutionary Aspects* (éditeurs : Dronamraju, K. R. et Arese, P.) p.125-146. New York : Springer.

Rifkind, J. M. et Nagababu, E. (2013). Hemoglobin oxydation reactions and red blood cell aging. *Antioxydants & Redox signaling*, 18(17), 2274-2283.

Schettters, T. P., Van Run van Breda, J. H., Hermsen, C., Curfs, J. et Eling, W. M. (1989). Protective and pathological activity in serum of mice developing resistance to *Plasmodium berghei* infection. *Parasite immunology*, 11(4), 413-423.

Schneemann, M. et Schoeden, M. (2007). Macrophages biology and immunology: man is not a mouse. *Journal of leucocyte biology*, 81(3), 579

Scholzen, A. et Sauerwein, R. W. (2013). How malaria modulates memory : activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends in parasitology*, 29(5), 252-262.

Segura, M., Ing, R., Su, Z., Thawani, N. et Stevenson, M. M. (2007). Effector functions of Macrophages in *Plasmodium* parasite infections. Dans: *Protozoans in macrophages* (éditeurs Denkers. E. Y., Gazzibelli, R. T.) p. 160-183. Texas: Landes Bioscience.

Seixas, E., Gozzelino, R., Chora, A., Ferreira, A., Silva, G., Larsen, R., Rebelo, S., Penido, C., Smith, N. R., Coutinho, A. et Soares, M. P. (2009). Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(37), 15837-15842.

Schaer, D. J., Buehler, P. W., Alayash, A. I., Belcher, J. D. et Vercellotti, G. M. (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 121(8), 1276-1284.

Smith, A. et Hunt, R. C. (1990). Hemopexin joins transferrin as representative members of a distinct class of receptor-mediated endocytic transport systems. *European journal of cell biology*, 53(2), 234-245.

Sproul, T. W., Cheng, P. C., Dykstra, M. L. et Pierce, S. K. (2000). A role for MHC class II antigen processing in B cell development. *International reviews of immunology*, 19(2-3), 139-155.

Stocker, R., Glazer, A. N. et Ames, B. N. (1987). Antioxydant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the national academy of sciences*, 84(16), 5918-5922

Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollock, J.-M., Menard, R. et Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Sciences*, 313(5791), 1287-1290.

- Sutherland, R. M., Pan, Z-K., Caton, A. J., Tang, X. X., Cerasoli, D. M. et Paterson, Y.** (1995). T cells from unprimed mice respond to the self antigen heme, in a class II restricted manner at a frequency similar to alloresponses. *International Immunology*, 7(5), 771-783.
- Taylor, S. M., Cerami, C. et Fairhurst, R. M.** (2013). Hemoglobinopathies: Slicing the gordian knot of *Plasmodium falciparum* malaria pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003327.
- Taylor-Robinson, A.W.** (2009). Regulation of immunity to *Plasmodium*: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Immunology and cell biology of protozoan parasites*. 126(3), 406-414.
- Taylor-Robinson, A. E., Phillips, R. S., Severn, A., Moncada, S. et Liew F. Y.** (1993). The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. *Science*, 260(5116), 1931-1934.
- Throop, J., Kerl, M. et Cohn, L.** (2004) Albumin in health and disease : protein metabolism and function. *Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian*, 26,932-948.
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I. et Prabhu, R. M.** (2003). Clinical review; severe malaria. *Critical Care*, 7(4), 315-323.
- Tracz, M. J., Alam, J. et Nath, K. A.** (2007). Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *Journal of American society of nephrology*, 18(2), 414-420.
- Uthman, E. D.** (1998). *Understanding anemia*. United States of America: University press of mississippi.
- Vinchi, F., Gastaldi, S. et Silengo, L.** (2008). Hemopexin prevents endothelial damage and Liver congestion in a mouse model of heme overload, *American Journal of Pathology*, 173(1), 289-299.
- Vinchi, F. et Tolosano, E.** (2013). Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 396527, doi: 10.1155/2013/396527
- Wagener, F. A. D. T. G., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Verhofstad, A., Abraham, N. G., Adema, AG., van Kooyk, Y., de Witte, T. et Figdor, C. G.** (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 98(6), 1802-1811.

Wagener, F. A. D. T. G., Volk, H-D., Willis, D., Abraham, N. G., Soares, M. P., Adema, G. J. et Figdor, C. G. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacological reviews*, 55(3), 551-571.

Wagle, N. M., Kim, J. H. et Pierce, S. K. (2000). CD19 regulates B cell antigen receptor-mediated MHC class II antigen processing. *Vaccine*, 18(3-4), 376-386.

Waitumbi, J. N., Oppolo, M. O., Muga, R. O., Misore, A. O. et Stoute, J. A. (2000). Red cell surface changes and érythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood*, 95(4), 1481-1486.

Warschkau, H. et Kiderlen, A. F. (1999). A monoclonal antibody directed against the murine macrophages surface molecule F4/80 modulates natural immune response to *Listeria monocytogenes*. *The journal of immunology*, 163(6), 3409-3416.

Watanabe-Matsui, M., Muto, A., Matsui, T., Itoh-Nakadai, A., Nakajima, O., Murayama, K., Ymamoto, M., Ikeda-Saito, M. et Igarashi, K. (2011), Heme regulates B cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of bach2, *Blood Journal*, 117(20); 5438-5448

Wijayanti, N., Katz, N. et Immenschuh, S. (2004). Biology of heme in health and disease. *Current medicinal chemistry*, 11(8), 981-986.

Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobeziinskaya, Y., Linnoila, I. et Liu, Z. G. (2013). ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Research*, 23(7), 898-914.

Zhang, Y., Furuyama, K., Kaneko, K., Ding, Y., Ogawa, K., Yoshizawa, M., Kawamura, M., Takeda, K., Yoshida, T. et Shibahara, S. (2006). Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS Journal*, 273(14), 3136-3147.