

PATHOGENESE DU NEUROPALUDISME : FAITS ET HYPOTHESES

S.C. WASSMER, N. COLTEL, V. COMBES, G.E. GRAU

Med Trop 2003 ; 63 : 254-257

RESUME • Le neuropaludisme, l'une des plus sérieuses complications de l'infection à *Plasmodium falciparum*, est caractérisé par la séquestration d'hématies parasitées (HP) au sein des microvaisseaux cérébraux. Si les mécanismes précis responsables du développement de ce syndrome restent mal connus, la séquestration, les perturbations métaboliques et la réponse immunitaire de l'hôte ont été clairement mis en cause. Des études réalisées sur le modèle murin de neuropaludisme ont montré un rôle potentiel des cellules de l'hôte, et en particulier celui des plaquettes. Ces résultats nous ont amené à évaluer le rôle des plaquettes au cours du neuropaludisme humain. Nous avons démontré que l'accumulation plaquettaire au sein des microvaisseaux cérébraux est significativement plus élevée chez des patients du Malawi décédés de neuropaludisme, que chez ceux décédés d'autres pathologies. Nous avons ensuite étudié le rôle des plaquettes dans la cytoadhérence des HP, en utilisant des HP n'adhérant que sur CD36, des plaquettes, et des cellules endothéliales (CE) constitutivement dépourvues de CD36. Ces cultures cellulaires tripartites ont mis en évidence le rôle plaquettaire dans l'induction d'une cytoadhérence des HP sur les CE par un pontage cellulaire, résistant aux conditions de flux physiologiques. Le lien entre plaquettes et séquestration étant montré, il reste à examiner l'hypothèse du lien entre les plaquettes et le neuropaludisme lui-même. Seule une concertation des approches offertes par les différentes disciplines nous permettra de progresser efficacement dans la compréhension des mécanismes des complications du paludisme.

MOTS-CLES • Malaria - Immunopathologie - Cytokines - Endothélium - Plaquettes.

PATHOGENESIS OF CEREBRAL MALARIA: FACTS AND HYPOTHESES

ABSTRACT • Cerebral malaria (CM) is one of the most serious complications of *Plasmodium falciparum* infection. It is characterized by sequestration of parasitized red blood cells (PRBC) in cerebral capillaries and venules. Although the exact cause of CM remains unclear, current evidence has clearly implicated metabolic disturbances and host immune responses. Studies on mouse CM models suggest the involvement of host cells and in particular platelets. These results led us to study the role of platelets in human CM. Our findings demonstrated that significantly greater accumulation of platelets occurred in capillaries and venules of Malawian patients who died from CM than from other diseases. We also assessed the role of platelets in cytoadherence of PRBCs using PRBC adhering only on CD36, platelets and endothelial cells (EC) constitutively devoid of CD36. Cultures using the three components showed that platelets played a role in inducing cytoadherence of PRBC on EC via a cellular bridging resistant to physiological flow conditions. Having established the link between platelets and sequestration, the next step will be to examine the link between platelets and CM. A combination of approaches from different disciplines will be needed to gain further insight into the mechanisms underlying the complications of malaria.

KEY WORDS • Malaria – Immunopathology – Cytokines – Endothelium – Platelets.

Le paludisme, première endémie parasitaire au monde, présente une multitude de facettes. La lutte contre cette maladie requiert les efforts conjugués de personnes travaillant dans un grand nombre de disciplines différentes. Notre discipline est à la frontière entre l'immunopathologie et la physiopathologie. Nous cherchons à mieux comprendre les mécanismes pathogéniques conduisant aux complications du paludisme.

Les formes graves du paludisme, comme le neuropaludisme, sont caractérisées par une séquestration des hématies parasitées (HP) par *Plasmodium falciparum* au sein des lits microvasculaires profonds. Cependant, la raison pour laquelle seule une faible proportion des patients infectés développe un neuropaludisme reste inexplicée. Si

les mécanismes précis aboutissant au développement du syndrome neurologique restent peu connus, la séquestration parasitaire au niveau cérébral, les perturbations métaboliques ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte ont été clairement impliquées dans cette pathogénèse (1). Plusieurs théories ont été proposées pour le neuropaludisme humain : la théorie de la perméabilité, la théorie mécanique et enfin la théorie immunologique. Il semblerait cependant qu'une combinaison des facteurs du parasite, mais également de l'hôte contribuent au développement des accès sévères, et plus particulièrement aux lésions cérébrales observées durant le neuropaludisme (1-5).

Les modèles expérimentaux de neuropaludisme, et plus particulièrement le modèle murin d'infection à *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) ont permis des avancées significatives dans la connaissance des mécanismes pathogéniques. En effet, les diverses souches de souris utilisées en laboratoire répondent différemment à une infection expérimentale. Certaines souches sont hautement susceptibles au développement d'un neuropaludisme, alors que d'autres y sont résistantes, et ce malgré des parasitémies similaires

• Travail de l'Unité de Parasitologie expérimentale (S.C.W., N.C., Doctorants ; V.C., Docteur ès sciences ; G.E.G., Docteur en médecine, Professeur des universités), Laboratoire d'Immunopathologie, Faculté de Médecine, EA3282 UnivMed-IPP-IMTSSA, Marseille, France.

• Correspondance : G.E.GRAU, IFR 48, Université de la Méditerranée, 27, bd. Jean Moulin, F-13385 Marseille • Fax + 33 491 32 46 34 • E-mail : georges.grau@medecine.univ-mrs.fr •

pendant la phase critique de l'infection (6, 7). L'utilisation de ce modèle et de ces différentes souches de souris, nous a amené à nous intéresser plus précisément aux mécanismes liés à la réponse immunitaire de l'hôte.

Ainsi, le *tumor necrosis factor* (TNF) a pu être mis en évidence comme étant un facteur clé dans le développement de la pathologie (8), comme le suggèrent les taux sériques élevés au moment du neuropaludisme expérimental, la prévention de la pathologie par une neutralisation *in vivo* de la cytokine, l'induction du syndrome par perfusion de TNF chez des souris infectées résistantes et l'absence de syndrome neurologique chez des souris transgéniques exprimant de hauts titres de TNFR-1 soluble, un inhibiteur physiologique du TNF (9). Des deux récepteurs du TNF, seul le TNF récepteur-2 (TNFR-2, p75), dont l'expression se trouve augmentée lors du neuropaludisme au sein des microvaisseaux cérébraux des souris susceptibles, a été impliqué dans le développement du syndrome neurologique. En effet, les souris génétiquement déficientes en TNFR-2 sont significativement protégées contre le neuropaludisme expérimental, contrairement aux souris déficientes en TNF récepteur 1 (TNFR-1, p55) et aux souris génétiquement susceptibles (10,11). Plus récemment, des études de souris *knock-out* indiquent que le TNF bêta, appelé maintenant la lymphotoxine alpha (LT- α), produit comme le TNF par les lymphocytes et se liant également au récepteur endothélial TNFR-2, est le principal médiateur du neuropaludisme murin (12).

Les recherches effectuées grâce à ce modèle ont également permis de mettre en évidence le rôle potentiel des cellules de l'hôte dans l'induction du neuropaludisme, en particulier celui des monocytes et des plaquettes. Différentes études ont en effet prouvé que l'adhérence monocyttaire sur l'endothélium cérébral (j. 5-7 post-infection) est associée avec le neuropaludisme fatal murin (13,14). Cette séquestration est induite par le TNF : par son activité pro-inflammatoire, il conduit à l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhérence à la surface endothéliale (ICAM-1, VCAM-1). Les monocytes ont donc été associés au développement des lésions immunopathologiques du neuropaludisme.

Les plaquettes se comportent comme des cellules effectrices de la pathologie du neuropaludisme murin ; en témoignent a) l'association entre séquestration plaquettaire cérébrale et développement du syndrome neurologique, b) l'abolition de cette séquestration par le traitement *in vivo* avec un anticorps anti-LFA-1, qui prévient le neuropaludisme, et c), la prévention de la mortalité due au neuropaludisme par l'induction d'une thrombocytopénie (15). De plus, une étude récente menée sur le système urokinase (urinary-type plasminogen activator, uPA) / récepteur de l'urokinase (uPAR, CD87), a confirmé l'implication des plaquettes dans le développement du neuropaludisme. Le récepteur de l'urokinase joue notamment un rôle crucial dans la cinétique et la séquestration plaquettaire au sein des microvaisseaux. Le *knock-out* du gène uPA et de son récepteur atténue significativement la sévérité du neuropaludisme. Les souris protégées montrent une quasi-abolition

de la séquestration plaquettaire cérébrale, mais étonnamment, conservent la séquestration monocyttaire caractéristique du syndrome (16).

L'ensemble de ces résultats nous a amené à évaluer le rôle des plaquettes dans la pathologie humaine. Des analyses immunohistochimiques réalisées sur des échantillons post-mortem de cerveaux de patients du Malawi, nous ont permis de confirmer les résultats précédemment décrits dans le modèle murin. En effet, l'accumulation plaquettaire observée est significativement plus élevée au sein des microvaisseaux cérébraux de patients décédés de neuropaludisme, que dans ceux de patients décédés d'anémie sévère ou de coma d'autre origine (encéphalopathies non palustres) (17). Par ailleurs, dans un autre étude chez l'enfant africain impaludé, la thrombocytopénie s'avère liée à la sévérité de l'infection (18).

Afin d'étudier plus en détail l'implication des plaquettes dans les lésions microvasculaires observées lors de neuropaludisme, et afin de nous rapprocher des conditions pathologiques, nous avons mis au point un modèle de coculture impliquant des cellules endothéliales, des plaquettes et des HP. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules endothéliales issues de microvaisseaux cérébraux de singe Saïmiri (*Saimiri sciureus*), l'unique modèle animal d'étude de neuropaludisme humain actuellement recommandé par l'OMS (19). Une lignée de ces cellules endothéliales (CE, Sc1707) constitutivement dépourvue de CD36 membranaire (20), a été utilisée dans le but d'évaluer si, par leur présence, les plaquettes pouvaient moduler la cytoadhérence des HP. Ces CE ont été cultivées au repos ou pré-stimulées par TNF, en présence ou non de plaquettes purifiées. Enfin, des HP sélectionnées pour ne cytoadhérer que sur CD36, un récepteur parasitaire constitutivement exprimé à la surface plaquettaire, ont été ajoutées.

Nous avons ainsi montré que les plaquettes induisent une augmentation significative de la cytoadhérence de ces HP spécifiques du récepteur CD36 sur des CE cérébrales déficientes en CD36. Ce phénomène est amplifié par une pré-stimulation par TNF et aboli par la présence d'un anticorps anti-CD36. Afin de déterminer la pertinence physiologique de la cytoadhérence induite par les plaquettes, des expériences identiques ont été réalisées en conditions de flux, en appliquant aux cellules en culture une force de cisaillement physiologique de 0.5 Dyne/cm² (0.05 Pa). Le phénomène décrit en conditions statiques s'est montré résistant aux forces de cisaillement, suggérant ainsi une réelle signification *in vivo*.

Des analyses en immunofluorescence et en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence un pontage plaquettaire entre les CE et les HP. Des tests d'inhibitions ont déterminé que l'interaction CD40-CD40L (CD154), respectivement sur le versant endothélial et plaquettaire, est en partie impliquée dans l'adhérence des plaquettes sur l'endothélium cérébral. De plus, des analyses phénotypiques ont montré que l'expression de CD40 est augmentée significativement à la surface des CE lors d'une préstimulation par TNF, corroborant notre observation

d'une cytoadhérence plus élevée en condition inflammatoire qu'en condition de repos.

Enfin, nous avons pu montrer que, de part leur présence à la surface des CE, les plaquettes masquent physiquement d'autres récepteurs constitutivement exprimés sur les CE. C'est le cas pour la chondroïtine sulfate A (CSA, un autre récepteur-clé de *P. falciparum*) : la fixation des plaquettes empêche l'adhérence de parasites sélectionnés pour ne cytoadhérer que sur la CSA lorsqu'ils sont ajoutés en seconde intention. Ces résultats indiquent un rôle important des plaquettes dans les interactions cellulaires endothélium-HP au cours du neuropaludisme, en plus des interactions HP-HP précédemment décrites. Une étude récente a en effet démontré que les plaquettes permettent la formation d'agrégats d'HP dans un modèle de culture *in vitro* via leur CD36 membranaire, agrégation directement liée à la sévérité de la pathologie (21).

Outre la cytoadhérence caractéristique d'HP dans le développement du neuropaludisme, de nombreuses analyses ont récemment démontré le rôle pathogénique des cellules de l'hôte (22-24). Dans l'étude résumée ci-dessus, nous avons plus spécifiquement détaillé l'importance des plaquettes dans la pathogenèse de la séquestration des HP. Ces données complètent les faits démontrés dans le modèle murin de neuropaludisme, ainsi que de la présence abondante de plaquettes dans les vaisseaux cérébraux de patients du Malawi décédés de neuropaludisme. Le lien entre plaquettes et séquestration étant montré, il reste à examiner l'hypothèse du lien entre les plaquettes et le neuropaludisme lui-même.

PERSPECTIVES

S'il est inadapté pour l'analyse de paramètres parasitologiques, le modèle d'infection par PbA chez la souris est un bon modèle pour l'étude de la pathologie humaine, notamment concernant les implications immunopathologiques et l'étude des différents compartiments cellulaires (25). En complément des études chez l'homme, réalisées *ex vivo* et *in vitro*, ce modèle permet de nombreuses expériences impossibles dans d'autres systèmes, comme par exemple, l'appréciation de nouvelles thérapeutiques, ou la dissection fonctionnelle de divers gènes. De plus, à l'instar de ce qui se fait chez l'homme, des prélèvements *post-mortem* peuvent être réalisés, mais avec la souplesse des études cinétiques, permettant notamment d'étudier les facteurs cellulaires ou humoraux mis en jeu lors de l'établissement du syndrome. Aujourd'hui, avec la miniaturisation et le perfectionnement des techniques, la quasi-totalité des cellules circulantes murines sont purifiables à partir de faibles volumes sanguins. Le modèle murin est de plus en plus utilisé pour les études de susceptibilité / résistance, pour les études PKPD, ainsi que pour l'étude de l'implication de diverses molécules en particulier les marqueurs de surface des cellules dendritiques, les chimiokines et leurs récepteurs. Ces études sont rendues possibles par la génération de nombreuses souches ou lignées murines génétiquement modifiées.

Les faits sont le fruit de l'expérimentation animale, des expériences *in vitro* utilisant les types cellulaires pertinents, ainsi que des études cliniques, comprenant notamment le suivi de malades ou des analyses post-mortem. Cependant, les faits eux-mêmes imposent réflexion, et méritent une constante réévaluation. Prenons l'exemple du TNFR-2 : son rôle dans le neuropaludisme murin est un fait, établi (11) et confirmé par plusieurs groupes (26-28) (et G. Senaldi, communication personnelle). Cependant, ce récepteur est-il impliqué dans la modulation de molécules d'adhérence ou, plutôt, dans des troubles métaboliques particuliers, comme suggéré récemment (29) ? Un autre exemple est l'implication des plaquettes dans la pathogenèse du neuropaludisme. Les plaquettes sont-elles des cellules effectrices des cytokines, comme le suggèrent des faits établis *in vitro*, mais chez la souris (30), ou bien s'accumulent-elles dans les microvaisseaux (17) en fin de processus pathologique ? Seule une concertation des approches offertes par les différentes disciplines nous permettra de progresser efficacement.

Les hypothèses doivent continuer d'affluer des cliniciens et des chercheurs de toutes les disciplines, et doivent continuer d'être évaluées en mélangeant dévotion, travail acharné, rigueur et *serendipity*. Tous ces éléments sont indispensables pour améliorer nos connaissances et, de ce fait, nos moyens d'intervention sur les complications du paludisme ■

Remerciements • Ces travaux sont soutenus financièrement par le programme PAL+ du Ministère de la Recherche, Paris, France. Notre gratitude va également à la Mairie de la Ville de Marseille, qui nous a alloué une aide à l'installation de notre laboratoire.

REFERENCES

- 1 - BEALES PF, BRABIN B, DORMAN E *et Coll* - Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; **94** : S1-S90.
- 2 - GREENWOOD B, MARSH K, SNOW R - Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol Today* 1991; **7** : 277-281.
- 3 - CLARK IA, ROCKETT KA. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994; **10** : 410-412.
- 4 - GRAU GE, DE KOSSODO S - Cerebral malaria : mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today* 1994; **10** : 408-409.
- 5 - BERENDT AR, TURNER GDH, NEWBOLD CI - Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. *Parasitol Today* 1994; **10** : 412-414.
- 6 - GRAU GE, FAJARDO LF, PIGUET PF *et Coll* - Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; **237** : 1210-1212.
- 7 - LOU J, LUCAS R, GRAU GE - Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications in man. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14** : 810-820.
- 8 - GRAU GE, BEHR C. Cytokines in malaria - for better or for worse. In « AGGARWAL BB - Cytokines in human diseases ». Raven Press ed, New York, 1995, pp 459-476.
- 9 - GARCIA I, ARAKI K, MIYAZAKI Y *et Coll* - Transgenic mice expressing soluble TNF-R1-IgG3 molecules are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to Listeria monocytogenes and Leishmania major infections. *Eur J Immunol* 1995; **25** : 2401-2407.
- 10 - LUCAS R, LOU JN, JUILLARD P *et Coll* - Respective role of TNF receptors in the development of experimental cerebral malaria. *J Neuroimmunol* 1997; **72** : 143-148.

- 11 - LUCAS R, JUILLARD P, DECOSTER E *et Coll* - Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol* 1997; **27** : 1719-1725.
- 12 - ENGWERDA CR, MYNOTT TL, SAWHNEY S *et Coll* - Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* 2002; **195** : 1371-1377.
- 13 - JERUSALEM C, POLDER TW, WIJERSROUW M *et Coll* - Comparative clinical and experimental study on the pathogenesis of cerebral malaria. *Contrib Microbiol Immunol* 1983; **7** : 130-138.
- 14 - POLDER TW, JERUSALEM CR, ELING WMC - Morphological characteristics of intracerebral arterioles in clinical (*Plasmodium-falciparum*) and experimental (*Plasmodium berghei*) cerebral malaria. *J Neurol Sci* 1991; **101** : 35-46.
- 15 - GRAU GE, TACCHINI-COTTIER F, VESIN C *et Coll* - TNF-induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction. *Eur Cytokine Netw* 1993; **4** : 415-419.
- 16 - PIGUET PF, DALAPERROUSAZ C, VESIN C *et Coll* - Delayed mortality and attenuated thrombocytopenia associated with severe malaria in urokinase- and urokinase receptor-deficient mice. *Infect Immun* 2000; **68** : 3822-3829.
- 17 - GRAU GE, MACKENZIE CD, CARR RA *et Coll* - Platelet accumulation in brain microvessels in fatal paediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 2003; **187** : 461-466.
- 18 - GERARDIN P, ROGIER C, KASAS *et Coll* - Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66** : 686-691.
- 19 - GYSIN J - Relevance of the Squirrel Monkey as a model for experimental human malaria. *Res Immunol* 1991; **142** : 649-654.
- 20 - GAY F, ROBERT C, POUVELLE B *et Coll* - Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from Saimiri monkeys - An *in vitro* model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol Methods* 1995; **184** : 15-28.
- 21 - PAIN A, FERGUSON DJP, KAI O *et Coll* - Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98** : 1805-1810.
- 22 - URBAN BC, WILLCOX N, ROBERTS DJ - A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98** : 8750-8755.
- 23 - BELNOUE E, KAYIBANDA M, VIGARIO AM *et Coll* - On the pathogenic role of brain-sequestered alpha beta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2002; **169** : 6369-6375.
- 24 - HANSEN DS, SIOMOS MA, BUCKINGHAM L *et Coll* - Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 2003; **18** : 391-402.
- 25 - HUNT NH, GRAU GE - Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003 (in press).
- 26 - TACCHINI-COTTIER F, VESIN C, REDARD M *et Coll* - Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol* 1998; **160** : 6182-6186.
- 27 - STOELCKER B, HEHLGANS T, WEIGL K *et Coll* - Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2002; **70** : 5857-5859.
- 28 - AKASSOGLU K, DOUNI E, BAUER J *et Coll* - Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100** : 709-714.
- 29 - PIGUET PF, KAN CD, VESIN C. Role of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in cerebral malaria in mice. *Lab Invest* 2002; **82** : 1155-1166.
- 30 - LOU J, DONATI YRA, JUILLARD P *et Coll* - Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 1997; **151** : 1397-1405.