

N° d'ordre :

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Spécialité : Sciences Naturelles

Présentée à

L'Université des Sciences et Technologies de Lille

Par

Christine PIERROT-SENECAUT

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

De la schistosomiase au paludisme âge-dépendant : apport du modèle rat

Soutenue le 18 décembre 2006 devant la commission composée de :

Président	Professeur Monique Capron
Rapporteurs	Docteur Geneviève Milon
	Docteur Anne Tsicopoulos
	Docteur Laurent Rénia
Examineurs	Docteur Joël Mazurier
	Docteur Jamal Khalife

Unité Inserm 547 – Université Lille 2 – Institut Pasteur de Lille
'Schistosomiase, Paludisme et Inflammation'

Sommaire

Remerciements	
Introduction	1
Présentation du parcours scientifique.....	2
Le paludisme et la schistosomiase : généralités.....	3
Les moyens de lutte : de la chimiothérapie à l'analyse des réponses immunes ; le problème des co-infections.....	6
L'apport des modèles expérimentaux.....	7
Travaux présentés dans ce mémoire	9
Partie 1 - Résumé des thèmes de recherche depuis la thèse	10
1- Etude de la réponse immune engendrée au cours de la schistosomiase expérimentale du rat	11
2- Analyse des paramètres immunogénétiques du rat.....	14
3- Impact de l'âge sur l'infection par <i>Plasmodium</i> : le modèle rat	20
4- Effet de la ferroquine sur la réponse immune lors de l'infection de rats jeunes par <i>Plasmodium berghei</i>	23
5- Etude des infections mixtes <i>Schistosoma mansoni</i> – <i>Plasmodium berghei</i> : de l'influence sur la pathologie à la caractérisation des gènes impliqués	29
Partie 2 - Recherche actuelle et perspectives :	
Etude de l'infection expérimentale du rat par <i>Plasmodium berghei</i> : vers la compréhension des mécanismes à la base de la susceptibilité / résistance dépendante de l'âge	34
1- Introduction	35
Rôle de l'âge dans l'évolution de l'infection palustre	35
Immunité anti- <i>Plasmodium</i> chez l'homme	36
Etude de la réponse immune dans des modèles de malaria expérimentale.....	37
2- Le modèle d'infection palustre âge-dépendant chez le rat.....	38
Présentation du modèle	38
<i>article publié dans Experimental Parasitology</i>	39
Etude des réponses immunes âge-dépendantes au cours de l'infection	44
<i>article publié dans International Journal for Parasitology</i>	45
3- Comment protéger les rats jeunes ?	57
Des approches décevantes... ..	57
... aux approches plus concluantes : le rôle de la réponse cellulaire.....	59
<i>article accepté pour publication dans the Journal of Immunology</i>	61
Protection des rats jeunes : quelques données complémentaires	79
<i>Rôle des cellules du receveur</i>	79
<i>Le transfert de protection n'est pas une exclusivité des cellules spléniques</i>	79
<i>Etude in vitro des cellules spléniques transférant la protection</i>	80
4- Perspectives	82
4.1. Quels sont les mécanismes à la base du transfert de protection aux rats jeunes ?	82
<i>Rôle des neutrophiles</i>	82
<i>Rôle de l'OX40</i>	84
4.2. Pourquoi les rats jeunes sont ils susceptibles à l'infection palustre ?.....	88
Conclusion.....	92
Références bibliographiques	93
Titres et Travaux	99

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé dans l'Unité 547 Inserm – Université Lille 2 – Institut Pasteur de Lille, dirigée par le professeur Monique Capron, dans le groupe de recherches 'Paludisme' animé par le Docteur Jamal Khalife.

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Monique Capron qui soutient depuis quelques années déjà mon travail et qui, pour l'occasion, a accepté de présider ce jury. Merci aussi pour votre enthousiasme et votre dynamisme à toute épreuve.

Je remercie bien évidemment tous les membres de mon jury, le Docteur Geneviève Milon, le Docteur Anne Tsicopoulos, le Docteur Laurent Rénia, le Docteur Joël Mazurier, sans oublier mon directeur de recherches, le Docteur Jamal Khalife ; vous avez tous accepté avec beaucoup de gentillesse d'apporter un regard éclairé sur mes travaux, merci !

Merci aussi à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, aux résultats présentés dans ce mémoire et à mon parcours scientifique, bien sûr tous les membres de l'unité Inserm 547, le personnel de l'animalerie, et plus particulièrement tous les membres de l'équipe 'Paludisme'. Merci notamment à Sophia Lafitte pour son aide précieuse, aide (ou plutôt contribution) qui va bien au-delà de la technique...

Merci bien évidemment à Jamal Khalife pour la confiance qu'il me témoigne depuis tant d'années (je ne les compte plus !).

Enfin, je souhaiterais profiter de l'occasion pour adresser mes profonds remerciements au Professeur André Capron. Depuis l'accueil dans votre unité pour un stage de DEA malgré une formation atypique, vous avez toujours suivi et soutenu mon parcours. Que ce mémoire soit le témoignage de ma respectueuse admiration et de ma sincère reconnaissance.

Résumé

Actuellement, malgré d'intenses recherches, le paludisme reste un problème de santé publique majeur. Cette situation est aggravée par la multiplication des zones de résistance aux antipaludéens, résistance qui augmente plus rapidement que ne sont mis au point de nouveaux traitements ou vaccins. L'infection par *Plasmodium falciparum* est à l'origine de très fortes morbidité et mortalité, en particulier chez les enfants. Chez l'adulte, il semble qu'une exposition au parasite pendant plusieurs années soit nécessaire à l'acquisition d'une résistance et à l'apparition d'une réponse immune efficace. Cependant, il a été montré récemment que les adultes acquièrent une résistance plus rapidement que les enfants. Dans ce contexte, et malgré de nombreux travaux réalisés sur les mécanismes effecteurs dans le paludisme, ainsi que les informations obtenues grâce au séquençage du génome de *P. falciparum*, nos connaissances sont très limitées sur la façon dont l'homme devient protégé et plus précisément comment il serait possible de convertir un phénotype susceptible vers un phénotype résistant. Afin de prendre en compte l'impact de l'âge sur l'issue de l'infection par *Plasmodium*, nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier les profils immunologiques observés en fonction de la susceptibilité / résistance âge-dépendante.

Une première étude menée par notre groupe sur la susceptibilité / résistance âge-dépendante observée chez la souris et le rat infectés par *P. berghei* a permis de montrer que le modèle d'infection rat / *P. berghei* Anka était un modèle approprié pour l'étude des variations âge-dépendantes des paramètres immunologiques au cours de l'infection palustre. Dans cette étude, nous avons ainsi montré que des rats jeunes (âgés de 4 semaines) succombent à l'infection par *P. berghei* Anka alors que les rats adultes (âgés de 8 ou 12 semaines) contrôlent la parasitémie et survivent. Dans un second temps, l'analyse des profils immunologiques a montré que cette résistance âge-dépendante est effectivement associée à des réponses immunes humorales et cellulaires différentes. L'évaluation du rôle effectif des différents marqueurs cellulaires et moléculaires mis en évidence a montré que seul le transfert adoptif de cellules spléniques de rats adultes était capable de protéger les rats jeunes.

Actuellement, nous nous attachons à analyser le rôle *in vivo* de chaque population cellulaire impliquée dans la protection des rats jeunes ; nous évaluons notamment le rôle des neutrophiles et des cellules portant le marqueur OX40. Parallèlement, dans l'hypothèse où l'issue fatale de l'infection observée chez les rats jeunes serait la conséquence d'un dysfonctionnement âge-spécifique de la réponse cellulaire lors d'une infection primaire, une approche transcriptomique réalisée au cours de l'infection, associée à l'étude des réponses immunes âge-dépendantes à l'état basal, doivent permettre l'identification et la caractérisation de nouveaux marqueurs associés avec l'issue de l'infection.

Introduction

- ▶ Présentation du parcours scientifique
- ▶ Le paludisme et la schistosomiase : généralités
- ▶ Les moyens de lutte : de la chimiothérapie à l'analyse des réponses immunes ; le problème des co-infections
- ▶ L'apport des modèles expérimentaux
- ▶ Travaux présentés dans ce mémoire

Présentation du parcours scientifique

Après avoir réalisé des études d'ingénieur en génie chimique à l'Ecole des Hautes Etudes Industrielles de Lille, j'ai obtenu un DEA des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Lille 1 en 1993. J'ai réalisé mon stage de DEA au sein de l'unité mixte Inserm 167 – CNRS 624 dirigée par le Professeur André Capron, sous la tutelle du Docteur Jamal Khalife. Au cours de ce stage dans un laboratoire de renommée pour ses recherches sur la bilharziose, j'ai eu l'occasion de me former aux techniques de biologie moléculaire et de découvrir le monde merveilleux des parasites. Allocataire de recherche BDI (CNRS – Région Nord – Pas de Calais), j'ai effectué mon doctorat dans le même domaine, celui de la biologie du parasite *Schistosoma mansoni*, responsable de la bilharziose intestinale. Notamment, j'ai effectué la caractérisation moléculaire d'une protéine clé pour le parasite, l'élastase de cercaire, indispensable au parasite pour sa pénétration chez l'hôte définitif.

Par la suite, à l'initiative du Dr. Jamal Khalife et au cours de la thèse de C. Cêtre, nous avons revisité le rat comme modèle d'infection par *Schistosoma mansoni*. Pour mener à bien ce projet, il nous a été nécessaire de développer certains outils immunologiques, notamment des cytokines et anticorps anti-cytokines, non disponibles sur le marché. Participant au développement de ces outils, j'ai été amenée, au cours de mon stage post doctoral à étudier certains paramètres immuno-génétiques chez le rat, en comparaison avec l'homme et la souris, modèle beaucoup plus largement utilisé. Cette étude ainsi que l'analyse de la réponse immune chez le rat infecté par *S. mansoni* ont montré que ce modèle présentait certaines caractéristiques identiques à l'homme et différentes de la souris, notamment dans l'établissement des réponses Th2. A l'issue de ce stage post doctoral, cofinancé par la Fondation des Treilles et l'Institut Pasteur de Lille, j'ai eu la chance d'obtenir un poste de chargé d'études au sein de l'Institut Pasteur de Lille, ce poste ayant évolué depuis 2003 vers un poste de chargé de recherche.

Depuis 1999, au sein de l'unité Inserm 547 dirigée par le Professeur Monique Capron, j'ai donc eu l'occasion d'utiliser le modèle rat qui nous a semblé adéquat pour l'étude des coinfections schistosome – *Plasmodium* d'une part et s'est révélé d'un intérêt tout particulier dans le cas du paludisme puisque présentant une issue de l'infection dépendante de l'âge. Au cours de ces années, je suis donc passée progressivement de la biologie du parasite à la réponse immune de l'hôte, même si je participe ponctuellement aux travaux réalisés dans notre groupe de recherche sur la biologie de *Plasmodium falciparum*.

Le paludisme et la schistosomiase : généralités

Le paludisme et la schistosomiase (ou bilharziose) sont les deux premières endémies parasitaires mondiales. Elles sévissent dans les zones tropicales du globe et sont, à elles deux, responsables d'environ 2 millions de décès par an. Le nombre d'individus soumis au risque d'infection est encore plus impressionnant puisqu'il est admis que, en ne considérant que le cas du paludisme, 40% de la population mondiale vit dans une région endémique, et l'OMS estime à 500 millions le nombre de nouveaux cas par an. Au-delà des problèmes de santé publique majeurs dus à ces infections parasitaires, de tels chiffres impliquent évidemment de nombreuses répercussions sur le développement socio-économique des pays concernés.

Le paludisme est une parasitose provoquée par un protozoaire, *Plasmodium* appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Il existe différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'homme : *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* mais la plus dangereuse est *P. falciparum* car potentiellement mortelle. Le cycle de ce parasite comprend une phase sexuée chez son hôte définitif, un moustique du genre *Anopheles*, et une phase asexuée chez l'homme.

La forme du parasite infectante pour l'homme est le sporozoïte, transmis par l'Anophèle. Lorsque celui-ci pique, des sporozoïtes sont injectés dans les vaisseaux sanguins avec la salive de l'insecte. En 30 minutes, les sporozoïtes atteignent et envahissent les hépatocytes après avoir traversé la couche de cellules de Kupfer. Ils se développent dans la cellule hépatique pendant 5 à 7 jours en subissant une série de divisions nucléaires, formant ainsi une masse multinucléée (schizonte hépatique, corps bleu) où vont s'individualiser de 10000 à plus de 30000 mérozoïtes.

Lors de l'éclatement du schizonte hépatique, les mérozoïtes passent dans la circulation sanguine et envahissent les hématies, initiant ainsi le cycle érythrocytaire. Dans l'hématie colonisée, le mérozoïte se transforme en anneau, puis en trophozoïte. Il donne, à la suite de plusieurs divisions nucléaires, un schizonte. Celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui vont réenvahir de nouvelles hématies saines. L'ensemble du cycle intraérythrocytaire dure généralement deux jours (3 jours chez *P. malariae*). C'est au cours de cette phase que se manifestent les fièvres aiguës et les frissons symptomatiques de la malaria.

Certains mérozoïtes envahissent les globules rouges, puis au bout de 24h, se séquestrent par adhérence dans la moelle osseuse ou la rate pour se différencier en gamétocytes mâles et femelles qui sont ensuite libérés dans la circulation au bout de 8 à 10 jours. La circulation des gamétocytes dans le sang périphérique est variable suivant les espèces. Elle constitue un pré-requis pour l'initiation de la phase sexuée de reproduction. Les gamétocytes présents dans le sang du porteur sont prélevés par le moustique lorsqu'il prend son repas. Il a été récemment montré que la présence de gamétocytes dans le sang d'un porteur pouvait avoir

un effet attractant sur les moustiques, par l'intermédiaire d'un mécanisme encore inconnu (Lacroix *et al.*, 2005).

Dans l'estomac de l'insecte, les gamétocytes se différencient en gamètes qui fusionnent pour former un zygote. Après la fertilisation, commence la phase asexuée chez le moustique. Le zygote se transforme en un oocinète mobile qui migre à travers l'épithélium endoplasmique du moustique, s'installe dans les espaces intracellulaires, se développe en un oocyste qui se divise pour produire environ mille sporozoïtes qui, après leur libération, vont migrer par chimiotactisme dans les glandes salivaires du moustique. Le cycle sporogonique dure en tout de 10 à 18 jours selon la température extérieure et l'espèce de *Plasmodium*. Quand les glandes salivaires de l'insecte sont infectées, le cycle peut recommencer.

Les pathologies observées en cas d'infection par *Plasmodium* vont de l'accès palustre simple dont les symptômes se manifestent de façon chronique lors du cycle érythrocytaire (fièvre, maux de tête, nausées et vomissements), à des formes très graves (accès pernicieux ou neuropaludisme) pouvant être mortelles. Le neuropaludisme se caractérise par une atteinte cérébrale où de très nombreux parasites sont séquestrés dans les capillaires du cerveau. On observe chez le patient une hypoglycémie intense, de l'acidose, des convulsions et un coma fréquent. Il est à noter que les enfants, particulièrement touchés, développent généralement un paludisme chronique caractérisé par une très forte anémie pouvant conduire à une mortalité très importante. Cet aspect sera développé en introduction de la partie 2 de ce mémoire.

L'agent responsable de la schistosomiase est un helminthe trématode hématophage du genre *Schistosoma*. Parmi les 18 espèces de schistosome, cinq peuvent infecter l'homme : *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* et *S. mekongi*. Le cycle des schistosomes s'effectue entre un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce.

L'infestation de l'homme s'effectue lors des bains dans des eaux douces contaminées par les mollusques. La pénétration de la forme infestante du parasite, la furcocercaire (issue du mollusque) dans l'hôte définitif, commence par une étape de fixation sur la peau par l'intermédiaire de la ventouse antérieure munie d'épines. Grâce à des mouvements vibratoires et à la sécrétion d'enzymes protéolytiques au niveau des glandes céphaliques, la cercaire va traverser les couches supérieures de la peau en quelques minutes. La pénétration sera complète en 10 minutes. Au cours de la pénétration, elle va perdre sa queue bifide ; le parasite est alors appelé schistosomule. Tout en poursuivant ses processus de maturation, le schistosomule quitte le derme, atteint la lumière d'une veine ou d'un vaisseau lymphatique, puis est entraîné par le flux sanguin jusqu'au cœur et aux poumons. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours durant lesquels le parasite s'étire (passant d'une longueur de 300 μm à près de 900 μm) afin de se faufiler dans les fins capillaires pulmonaires. Par la suite, le schistosomule sera entraîné vers les artères

mésentériques et la veine porte, jusqu'au foie, son lieu de maturation.

Le jeune parasite va alors se différencier en schistosome, subir une maturation sexuelle (en 3 semaines environ) et s'accoupler. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant une période de 2 à 18 ans. Les vers appariés se déplacent ensuite à contre-courant du flux sanguin grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infectant l'homme va se nicher dans les veines proches de l'intestin. Les femelles matures vont produire des œufs en continu; on estime que la femelle de *S. mansoni* pond jusqu'à 300 œufs par jour. Les œufs sont ensuite disséminés dans divers organes internes, notamment le foie, où à la faveur du rétrécissement des vaisseaux sanguins, ils se trouvent bloqués. Ils sont alors la cible d'une forte réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ces granulomes sont responsables de la pathologie liée à l'infection. Les œufs qui parviennent à franchir les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*), sont alors excrétés dans les urines ou les selles et ainsi libérés dans l'eau.

Les œufs vont alors donner naissance à une forme larvaire libre, le miracidium. Celui-ci est extrêmement mobile car doté de cils vibratiles lui permettant de se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, le mollusque.

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste puis en furcocercaire par multiplication asexuée et polyembryonie. Un seul miracidium peut ainsi aboutir à la production de 100 000 cercaires. Les mollusques infestés stimulés par la lumière et la chaleur, rejettent alors chaque jour dans l'eau environnante des milliers de cercaires aux heures chaudes de la journée. Ils peuvent vivre en eau libre pendant 48 heures au maximum. L'étude des " profils d'émergence " des cercaires révèle une ponctualité intéressante, en effet, la forme infestante va quitter son hôte intermédiaire à une heure de la journée qui coïncide le mieux avec le moment où son hôte définitif fréquente le milieu aquatique (Combes *et al.*, 1992). Ainsi, les larves de *S. mansoni* seront libérées vers le milieu de la journée (pic à 11h) lorsque les activités de l'homme (travail, tâches ménagères ou loisirs) les mènent au contact de l'eau, alors que les cercaires de l'espèce *S. bovis* seront présentes dans l'eau à l'heure où le bétail vient s'abreuver (pic à 9h).

Les pathologies associées à la schistosomiase varient selon la localisation de l'espèce chez l'hôte définitif. L'infection par *S. haematobium* se manifeste par des troubles urinaires (hématurie) qui peuvent conduire, selon l'intensité de l'infection, à des lésions très importantes des voies urinaires voire à une uropathie obstructive. *S. mansoni* a une localisation intestinale et les manifestations cliniques seront d'ordre intestinal et hépatosplénique. Les atteintes hépatospléniques représentent une complication conduisant à une hypertension portale.

Les moyens de lutte : de la chimiothérapie à l'analyse des réponses immunes ; le problème des co-infections

Pour la schistosomiase comme pour le paludisme, les moyens de lutte reposent sur des stratégies visant à limiter d'une part la transmission (lutte anti-vectorielle, éducation pour la santé) et d'autre part, la morbidité (prophylaxie médicale associant approche vaccinale et chimiothérapie), ces deux stratégies n'étant pas mutuellement exclusives. Cependant, avec la chimiothérapie, se pose très rapidement le problème de la résistance des parasites aux traitements. Ainsi, dans le cas du paludisme, on assiste à une course de vitesse entre la mise au point de nouvelles molécules anti-paludiques et l'acquisition par le parasite d'une résistance. Il devient donc urgent de développer de nouvelles molécules ant-paludiques pour lesquelles les probabilités d'apparition de résistance sont minimales. Dans ce contexte, une nouvelle molécule antipaludique combinant la chloroquine et un groupement férrocène a été conçue par le laboratoire de catalyse de Lille (UMR CNRS 8010, ENSCL, Pr. J. Brocard). Ce composé organométallique, nommé ferroquine ou ferrochloroquine, présente une activité antipaludique très prometteuse (Biot *et al.*, 1997; Pradines *et al.*, 2001; Pradines *et al.*, 2002; Atteke *et al.*, 2003; Chim *et al.*, 2004). De plus, outre son action sur des souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine, la ferroquine semble présenter une très faible probabilité de chimio-résistance (Daher *et al.*, 2006a).

Parallèlement, l'étude de la biologie du parasite et des réponses immunes suite à une infection permet de mieux comprendre la relation entre le parasite et son hôte vertébré, dans le but de limiter les pathologies engendrées. Dans ce sens, de nombreuses études immuno-épidémiologiques ont été réalisées et ont permis de corréliser certains profils de la réponse immune avec la protection ou l'aggravation des pathologies. Cependant, ces études sont, de part la nature du 'modèle', limitées et ne permettent pas de disséquer les mécanismes de l'immunité protectrice. De plus, il est très difficile de contrôler le statut infectieux des personnes en zone d'endémie. En effet, les répartitions géographiques de la schistosomiase et du paludisme présentent de grandes zones de recouvrement et les individus se retrouvent souvent infectés par les deux parasites en même temps. Attribuer à l'une ou à l'autre infection un profil immunologique devient alors très délicat. Des études se sont penchées sur l'influence d'une infection sur l'autre, l'influence de l'infection par *S. mansoni* ou *S. haematobium* sur l'infection palustre étant la plus étudiée du fait du caractère chronique des infections par schistosome. Avant tout il est important de rappeler brièvement les réponses immunes observées dans l'une et l'autre infection. Lors d'une infection par *Plasmodium*, on assiste an phase précoce, à la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IFN- γ ou le TNF α , caractéristiques d'une réponse Th1, puis une réponse Th2 se met en place et coopère avec les cellules B pour la production d'anticorps . Le développement de l'immunité est accompagné par le switch d'une classe d'anticorps non cytophiles vers des anticorps cytophiles d'isotype IgG1 et IgG3. Cependant, alors que les cytokines proinflammatoires sont

associées à une immunité protectrice en phase précoce de l'infection, en cas de malaria sévère, une surproduction de ces cytokines prédispose à une aggravation. Dans la schistosomiase humaine chronique la réponse immune est polarisée vers un profil Th2, caractérisé par la production des cytokines IL-4, IL-5 ou IL-13, et des taux importants d'IgE. Cependant des taux élevés d'IFN- γ et de TNF α sont observés chez des patients au stade hépatosplénique (de Jesus *et al.*, 2002). Au regard de ces réponses immunes, aussi simplifiées soient-elles, il est évident que la présence des deux parasites, schistosome et *Plasmodium*, chez un même individu aura des conséquences différents selon que l'infection par l'un et l'autre des parasites se trouve en phase précoce, aiguë ou chronique. De plus, l'âge des patients, l'espèce de schistosome et l'intensité d'infection semblent également intervenir. Par exemple, alors que deux études ont montré que l'infection par *S. haematobium* avait un effet protecteur vis-à-vis de l'infection palustre, Sokhna et coll. montraient une incidence plus importante des cas de paludisme chez des enfants infectés par *S. mansoni* (Sokhna *et al.*, 2004; Briand *et al.*, 2005; Lyke *et al.*, 2005).

Il est donc difficile d'établir un consensus sur ces différentes études du fait que chacune d'elles est un cas particulier impliquant une chronologie de co-infection, une espèce de parasite, une tranche d'âge, et les paramètres évalués ne sont pas toujours équivalents.

L'apport des modèles expérimentaux

Les modèles d'infection expérimentale, où l'environnement est contrôlé, et permettant des manipulations destinées à disséquer les mécanismes des réponses immunes trouvent donc tout leur intérêt. Pour la schistosomiase, comme pour le paludisme, il existe des modèles expérimentaux chez les rongeurs. L'animal de laboratoire le plus couramment utilisé est la souris, du fait principalement de son faible coût, et de la disponibilité de nombreux outils immunologiques nécessaires à l'analyse des réponses immunes ; notamment, la possibilité de manipuler simplement le génome de la souris a conduit à une multiplication du nombre de modèles murins. Ainsi la souris, hôte permissif pour *S. mansoni*, est particulièrement adaptée pour l'étude de la pathologie et de la réponse granulomateuse au cours de la schistosomiase, ainsi que pour des protocoles de protection. Dans ce modèle, il a pu être observé une réponse de type Th1 en début d'infection qui se réoriente vers un profil Th2 en phase aiguë à partir du moment où les œufs, à l'origine la pathologie, sont déposés dans les tissus (Grzych *et al.*, 1991; Sher *et al.*, 1991). Dans le cas du paludisme, il existe différentes souches de *Plasmodium* de rongeurs, isolées à l'origine en Afrique chez des rongeurs sauvages, conduisant à des pathologies plus ou moins importantes. Avec les différents couples souche de *Plasmodium* – souche de souris, on dispose donc de plusieurs modèles d'infection létale ou non, permettant l'étude des mécanismes de la réponse immune, de la

pathogénèse ou encore des phénomènes de séquestration observés dans la malaria cérébrale. Ainsi, alors que l'infection par *Plasmodium berghei* est un modèle de choix pour l'étude de la malaria cérébrale, de nombreux travaux sur les réponses immunes ont été réalisés grâce aux souches *Plasmodium chabaudi chabaudi* et *P. chabaudi adami* (Taylor-Robinson, 1995; Li *et al.*, 2001). Ces modèles ont permis de proposer une séquence d'évènements intervenant dans le contrôle de l'infection chez la souris : une réponse innée proinflammatoire impliquant les cellules dendritiques, les NK et les macrophages se mettrait en place en phase précoce du cycle érythrocytaire jusqu'au pic de parasitémie. Des mécanismes de phagocytose, de production de radicaux toxiques (NO) seraient à l'origine du contrôle de la croissance parasitaire. Ensuite, à partir du pic de parasitémie, une réponse de type Th2 serait induite et les cellules CD4⁺ activeraient les lymphocytes B à produire des anticorps neutralisant le parasite. Dans le même temps, des cytokines régulatrices modèleraient de façon négative la réponse immune proinflammatoire pouvant entraîner à long terme des pathologies (pour revue, (Stevenson *et al.*, 2004; Stevenson *et al.*, 2006).

L'ensemble des travaux réalisés dans le modèle souris a donc permis une considérable évolution dans la compréhension de la régulation des réponses immunes observées dans la schistosomiase et le paludisme. Cependant, au regard des nombreuses différences entre l'homme et la souris au niveau des paramètres de la réponse immune, il est nécessaire de prendre des précautions lors de l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans ce modèle (Mestas *et al.*, 2004). Dans ce sens, des études complémentaires dans d'autres modèles sont indispensables afin de contourner cette restriction. Ainsi, bien qu'il semble très proche de la souris, le modèle rat se révèle d'un intérêt tout particulier pour l'étude des réponses immunes au cours de la schistosomiase et du paludisme. Le rat présente en effet de nombreuses caractéristiques de la réponse immune identiques à l'homme (de Andres *et al.*, 1997; Capron *et al.*, 1999; Dombrowicz *et al.*, 2000).

Le rat est un animal de laboratoire souvent utilisé pour les études toxicologiques ou comportementales. Il représente également un modèle de choix pour l'étude des processus liés au vieillissement, ainsi que pour toutes les études pour lesquelles les manipulations chez la souris sont rendues délicates du fait de la taille de l'animal. Des modèles spontanés de pathologie existent également chez le rat, c'est notamment le cas pour les diabètes de type I et de type II.

Dans la schistosomiase, bien que le rat présente une pathologie différente de l'homme (le rat est un hôte semi permissif pour *S. mansoni*), ce modèle a permis de disséquer les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC pour Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) observés également chez l'homme, alors que ces mécanismes n'ont pas été décrits chez la souris. Dans le cas du paludisme, des travaux assez anciens ont montré que l'issue de l'infection du rat par *Plasmodium* évoluait avec l'âge, situation semblable à celle décrite chez l'homme (Zuckerman *et al.*, 1954). Une étude

semblable menée chez la souris montrait dans le même temps, une issue fatale quel que soit l'âge des souris infectées (Greenberg *et al.*, 1953).

Travaux présentés dans ce mémoire

Dans ce contexte, et du fait que le modèle rat avait déjà une 'histoire' dans notre unité de recherche (il avait permis de mettre en évidence notamment les mécanismes d'ADCC), nous avons souhaité revisiter ce modèle de façon plus approfondie dans le cas d'une infection par *S. mansoni* d'une part et d'autre part, développer un modèle d'infection palustre se rapprochant de la situation humaine de part son évolution dépendante de l'âge de l'hôte infecté. Autour de ce fil conducteur, nous avons également été amenés à étudier certains paramètres immunogénétiques du rat impliqués directement dans les différences de réponses immunes observées entre la souris, l'homme et le rat. De plus, notre modèle d'infection palustre âge-dépendant nous a permis d'évaluer l'effet de la ferroquine sur la réponse immune lors d'une infection palustre. Enfin, disposant des modèles d'infection par *S. mansoni* et *P. berghei* nous avons abordé la question des co-infections.

Ce mémoire sera donc divisé en deux parties, la première présentant rapidement les thèmes de recherche développés depuis ma thèse avec les résultats principaux, la deuxième étant consacrée plus particulièrement à la recherche menée actuellement sur les mécanismes impliqués dans la protection de rats jeunes infectés par *P. berghei*, pour laquelle seront présentés résultats et perspectives.

Partie 1

Résumé des thèmes de recherche depuis la thèse

- ▶ Etude de la réponse immune engendrée au cours de la schistosomiase expérimentale du rat

- ▶ Analyse des paramètres immunogénétiques du rat

- ▶ Impact de l'âge sur l'infection par *Plasmodium* : le modèle rat

- ▶ Effet de la ferroquine sur la réponse immune lors de l'infection de rats jeunes par *Plasmodium berghei*

- ▶ Etude des infections mixtes *Schistosoma mansoni* – *Plasmodium berghei* : de l'influence sur la pathologie à la caractérisation des gènes impliqués

1- Etude de la réponse immune engendrée au cours de la schistosomiase expérimentale du rat

L'ensemble des résultats présentés ci-dessous a fait l'objet de la thèse de doctorat de Catherine Cêtre soutenue en 1999 et a abouti aux publications suivantes :

Cêtre, C., Cocude, C., Pierrot, C., Godin, C., Capron, A., Capron, M. and Khalife, J. (1998) *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, **20**, 135-142.

Cêtre, C., Pierrot, C., Cocude, C., Lafitte, S., Capron, A., Capron, M. and Khalife, J. (1999) Profiles of Th1 and Th2 cytokines after a primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. *Infection and Immunity*, **67**, 2713-2719.

Cêtre, C., Pierrot, C., Maire, E., Capron, M., Capron, A. & Khalife, J. (2000) Interleukin 13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *European Cytokine Network*, **11**, 241-249.

Khalife J, Cêtre C, Pierrot C, and Capron M. (2000) Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. *Parasitology International* **49**, 339-45.

Pierrot C., Khalife J., Cêtre, C, Capron, A and M. Capron. (2001) Contribution des modèles expérimentaux à la compréhension de l'immunité contre la schistosomiase. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la Vie*. **324**, 1133-1140.

De nombreuses études immuno-épidémiologiques ont permis d'associer la protection contre la bilharziose avec un profil de type Th2 caractérisé notamment par une forte réponse IgE spécifique et la production des cytokines IL-4 et IL-5. Inversement des taux élevés d'IFN- γ et de TNF- α sont observés chez des patients au stade hépatosplénique. Cependant, les études épidémiologiques ne suffisent pas, à elles seules pour dégager un consensus immunologique définitif quant à la nature de la réponse immune à induire dans le cadre d'une stratégie de prophylaxie. Les modèles animaux reproduisant les infections humaines trouvent donc tout leur intérêt dans la détermination précise du rôle effectif de chaque type de réponse.

Si le modèle souris a permis une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques suscités au cours de l'infection et notamment au niveau de la pathologie granulomateuse due au dépôt des œufs dans les tissus, il reste néanmoins que, contrairement à la situation humaine, la réponse immune protectrice soit plutôt associée à un profil de type Th1 (Sher *et al.*, 1991). Le rat, quant à lui, hôte semi permissif à l'infection et exprimant une importante immunité à la réinfection, est connu pour développer des

mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) suite à une infection par *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1978;

Capron *et al.*, 1981).

Ces mécanismes effecteurs, déjà décrits chez l'homme, mettent en jeu différents isotypes d'anticorps et types cellulaires, alors que des mécanismes régulateurs basés sur la production d'anticorps bloquants ont été également décrits chez l'homme et dans le modèle rat (tableau I).

Tableau I. Comparaison des mécanismes effecteurs et régulateurs de l'immunité anti-schistosome chez l'homme et chez le rat

	Homme	Rat
Anticorps effecteurs	IgG1, IgG3, IgE	IgG2a, IgE
Anticorps bloquants	IgM, IgG2, IgG4	IgG2c
Cellules effectrices	Eosinophiles macrophages plaquettes	Eosinophiles macrophages plaquettes
Coopération cellulaire	Monocytes	Mastocytes

Ces similarités de mécanismes immunologiques nous ont conduits à approfondir la réponse immune au cours de la schistosomiase expérimentale du rat au niveau d'une primo-infection ainsi qu'à celui d'une réinfection. Pour cela, nous avons analysé l'expression des cytokines et la production d'anticorps. Ainsi nous avons pu mettre en évidence dans un premier temps l'existence d'un profil de type Th0/2 (IFN- γ , IL-4, IL-5) lors d'une primo-infection par *S. mansoni* et l'existence d'un profil de type 2 (IL-4, IL-5) lors de la réinfection, avec une production d'anticorps d'isotypes IgE, IgG1 et IgG2a (tableau II). Notons que cette réponse Th2 est observée, alors que chez le rat les schistosomes ne produisent pas d'œufs, stimulus majeur de la réponse Th2 chez la souris (Grzych *et al.*, 1991).

Par la suite, nous avons analysé l'expression de l'IL-13, cytokine impliquée dans l'induction de la réponse IgE chez l'homme. Dans ce contexte, nous avons observé que, tout comme l'IL-4, l'IL-13 est largement produite et sécrétée au cours de la schistosomiase, ce qui suggérerait la participation de ces deux cytokines dans l'induction de la réponse IgE. Ceci a été confirmé lorsque nous avons observé que l'injection d'IL-13 recombinante à des rats infectés par *S. mansoni* conduisait à une augmentation significative de la réponse IgE totale à J28, 35 et 42 après infection.

Tableau II. Expression des cytokines et production d'anticorps au cours de la schistosomiase expérimentale du rat

	Cytokines				Isotypes	
	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-13	Th1 IgG2b	Th2 IgG1 IgG2a
Infection	+	++	++	++	+	++
Réinfection	-	++	++	++	+	+++

Afin d'appréhender le rôle spécifique de chaque cytokine produite au cours de la schistosomiase, les modèles animaux ont été largement exploités. Dans la schistosomiase

expérimentale du rat, nous avons basé nos expériences sur une stratégie de blocage des récepteurs aux cytokines, afin d'évaluer le rôle endogène de ces cytokines. Au cours de ces expériences, nous avons analysé, chez des rats infectés, l'influence du traitement avec des anticorps anti IFN- γ R, anti IL-4R, anti IL-5R et anti IL-13R sur la charge parasitaire. Nous avons ainsi observé une augmentation de la charge parasitaire lors du traitement des animaux avant et au cours de l'infection, avec des anticorps anti IL-4R ou anti IL-13R. Ceci suggère la participation de l'IL-4 et de l'IL-13 dans les mécanismes de protection. L'influence de ces traitements sur les paramètres immunologiques a été analysée et a suggéré que la régulation in vivo de la synthèse d'IFN- γ pourrait être contrôlée en partie par l'IL-4 et l'IL-13.

L'ensemble de ces travaux a donc permis d'approfondir les connaissances sur la réponse immune engendrée au cours de la schistosomiase expérimentale du rat et plus particulièrement sur la résistance à l'infection et à la réinfection. Nous avons ainsi conforté dans un modèle animal les hypothèses émises dans le cas de l'infection humaine, à savoir l'association entre une réponse de type Th2 et la résistance à l'infection. Au cours de cette étude, nous avons été amenés à développer dans le modèle rat les outils immunologiques nécessaires, non disponibles à l'époque et encore actuellement pour certains sur le marché (cytokines et anticorps anti-cytokines, récepteurs de cytokines et anticorps anti-récepteurs). L'observation d'une différence de réponse immune chez le rat et la souris infectés par *S. mansoni* nous a également conduits à analyser les paramètres immunogénétiques du rat potentiellement impliqués.

2- Analyse des paramètres immunogénétiques du rat

Ce travail a fait en partie l'objet du DEA de Lydie Beniguel (2000)

Les résultats résumés ci-dessous ont été concrétisés par les publications suivantes:

Pierrot C., Beniguel L., Bègue A., and J. Khalife. (2001) Expression of a functional IL-13 R alpha 1 by rat B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **287**, 969-976.

Pierrot C., Bègue A., Szpirer C. Capron A., Capron M. and J. Khalife. (2001) Cloning of the rat IL-5 R alpha gene: Analysis of 5'-upstream region and expression by B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **288**, 328-339.

Pierrot C., Capron, M. and Khalife J. (2003) Molecular and functional characterization of rat IL-5 receptor: comparative analysis with its counterparts in mouse and human." in "*Recent Research Developments in Biophysics & Biochemistry*". **3**, 259-268.

Lors de nos travaux précédents, nous avons montré que les réponses immunes observées au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni* chez l'homme et le rat présentaient de fortes similarités. En effet, bien que le rat développe une pathologie différente de celle de l'homme (le rat est un hôte semi-permissif), la réponse Th2 observée au cours de l'infection jouerait dans les deux cas un rôle crucial dans la protection. Chez la souris, les mécanismes d'ADCC n'ont jamais été décrits dans un système homologue, contrairement au rat et à l'homme, et aucune activité cytotoxique n'est observée avec des éosinophiles de souris. Ces discordances entre les mécanismes effecteurs IgE dépendants chez l'homme, le rat et la souris ont récemment trouvé une explication moléculaire. En effet il a été montré que, contrairement à l'homme, les souris sauvages n'expriment pas de récepteur de haute affinité pour l'IgE sur certaines populations cellulaires effectrices et libératrices de médiateurs pro-inflammatoires comme les macrophages et les éosinophiles (de Andres *et al.*, 1997; Capron *et al.*, 1999; Dombrowicz *et al.*, 2000). Par contre ces cellules expriment chez le rat un récepteur FcεRI trimérique comme chez l'homme (Dombrowicz *et al.*, 2000).

De plus, lors d'expériences in vivo, nous avons observé que les rats infectés par *S. mansoni* et traités par la co-administration d'anticorps anti-IL-4 et anti-IL-13 présentaient une diminution significative du taux d'IgE par rapport aux contrôles. A l'inverse, l'administration d'IL-13 exogène pouvait induire une augmentation de la réponse IgE (Cêtre *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que, chez le rat comme chez l'homme, l'IL-4 et l'IL-13 sont impliquées dans l'induction de la réponse IgE. Chez la souris, alors que le rôle de l'IL-4 sur la

production d'IgE a été largement documenté, celui de l'IL-13 n'a pu être démontré. En effet, contrairement à la situation humaine (Zurawski *et al.*, 1994), l'IL-13 recombinante de souris n'affecte pas la production d'IgE, que ce soit in vivo ou sur des cellules B activées in vitro. De même, l'utilisation de souris déficientes en IL-13 (IL-13 KO) n'a pas permis d'impliquer cette cytokine dans l'induction de la réponse IgE (Zurawski *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1999; McKenzie *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces observations nous a conduits à analyser les paramètres immunogénétiques du rat potentiellement impliqués dans de telles variations entre la souris et le rat. Ainsi, nous avons cloné et caractérisé les récepteurs à l'IL-5 (IL-5R) et à l'IL-13 (IL-13R) chez le rat (Pierrot *et al.*, 2001a; Pierrot *et al.*, 2001b; Pierrot *et al.*, 2003b).

Concernant le récepteur à l'IL-5, nous avons dans un premier temps cloné l'ADNc de la chaîne α (chaîne de liaison à l'IL-5) du récepteur chez le rat (fig. 1). Trois sites d'initiation de la transcription ont été identifiés. Nous avons pu localiser et cartographier le gène, dont l'organisation est proche de celle des gènes correspondants chez l'homme et la souris (Fig 2 – Tableau III). L'analyse de l'activité du promoteur a permis d'identifier deux régions de 200 et 160pb impliquées dans la régulation négative de l'expression du gène. Nous avons également identifié une région minimale de 300pb nécessaire à l'activité maximum du promoteur, et contenant notamment des sites NF-AT, AP-1 et une boîte 'TATA'. L'implication directe de ces éléments n'a pas été étudiée.

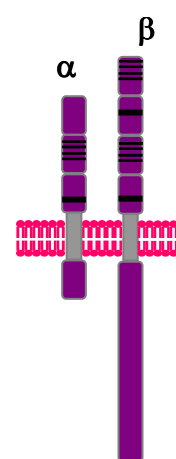


Figure 1. Schéma du récepteur à l'IL-5. Sont figurés les domaines extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires des chaînes α (impliquée dans la liaison de faible affinité à l'IL-5) et β (commune avec les récepteurs à l'IL-3 et au GM-CSF et impliquée dans la transduction du signal). Dans le domaine extracellulaire de la chaîne α on note 3 domaines FBN-III et dans celui de la chaîne β deux motifs répétés contenant chacun deux domaines FBN-III.

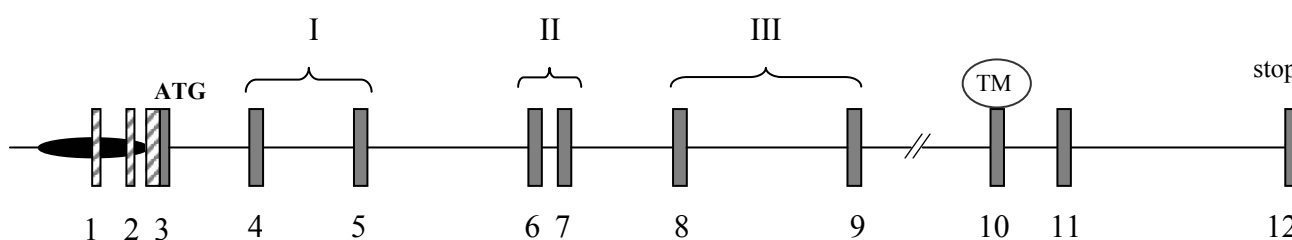


Figure 2. Organisation du gène du récepteur à l'IL-5 chez le rat. Ce gène comprend 12 exons (chiffres arabes, rectangles gris ou hachurés selon qu'ils se trouvent dans la partie codante ou dans la région 5' non codante) et 11 introns. La région noircie correspond au promoteur. En chiffre romain sont figurées les paires d'exons codant pour les trois domaines FBN-III. Les exons 1, 10 et 12 contiennent respectivement l'ATG, le domaine transmembranaire (TM), et le codon stop.

Une approche fonctionnelle a permis de montrer que l'expression de l'IL-5R était retrouvée dans différents tissus du rat (rate, poumons foie) et dans les lymphocytes B (purifiés ou lignée cellulaire B) aux niveaux transcriptionnel et protéique. Ce dernier résultat fournit donc une explication à l'activité de l'IL-5 observée sur les cellules B de rat (facteur de croissance), l'IL-5 agissant directement sur les cellules B.

De ce point de vue, le modèle rat peut donc parfaitement être utilisé pour l'étude de pathologies pour lesquelles la réponse Th2 et plus particulièrement l'IL-5 sont impliquées (parasitoses, allergies).

Tableau III : Comparaison des caractéristiques du récepteur à l'IL-5 chez la souris, le rat et l'homme

	Souris	Rat	Homme
Structure protéique			
Taille (a.a.)	415	414	420
domaine extracellulaire	322	314	324
domaine transmembranaire	22	25	21
domaine intracellulaire	54	55	55
Caractéristiques	boite WSxWS 3 domaines FBN-III	boite WSxWS 3 domaines FBN-III	boite WSxWS 3 domaines FBN-III
% d'identité de la protéine mature prédite avec celle de l'homme	70%	65%	-
Transcrits codant pour une forme soluble (nombre)	oui (1)	?	oui (2)
Gène			
Taille	>35 Kb	>25 Kb	>33 Kb
Nombre d'Exons	11	12	14
Nombre d'exons codants	11	10	11
Génération de la (des) forme(s) soluble(s)	épissage alternatif	?	épissage alternative ou absence d'épissage
Localisation	chromosome 6 (40-48 cM)	chromosome 4 (4q34-q41)	chromosome 3 (3p26-p24)
Expression	éosinophiles, basophiles, cellules B	cellules B, rate, poumons, foie	éosinophiles, basophiles, cellules B ?

Ayant observé une augmentation de la réponse IgE suite à l'administration d'IL-13 recombinante à des rats infectés par le parasite *S. mansoni*, nous avons entrepris le clonage

et la caractérisation du récepteur à l'IL-13 chez le rat, dans le but notamment de vérifier son expression sur les cellules B de rat.

L'IL-13 possède deux récepteurs apparentés, l'IL-13R α 1 et l'IL-13R α 2, tous deux membres de la superfamille des récepteurs hématopoïétiques. L'IL-13 se lie à la chaîne α 1 avec une faible affinité et à la chaîne α 2 avec une forte affinité. Afin d'être fonctionnel, le récepteur à l'IL-13 s'associe avec la chaîne α du récepteur à l'IL-4 (IL-4R α) (Fig. 3). Ainsi, l'IL-13R α 1, lorsqu'il est couplé à l'IL-4R α lie l'IL-13 avec une forte affinité et transmet le signal. Ce complexe IL-13R α 1 / IL-4R α constitue également le récepteur de type II pour l'IL-4, le récepteur de type I étant quant à lui composé de l'IL-4R α et de la chaîne γ c commune aux récepteurs à l'IL-2, IL-7, IL-9 et IL-15 (Fig. 3). Le rôle de l'IL-13R α 2 est moins clair dans la mesure où il n'est pas capable de transduire un signal, même en présence de l'IL-4R α . De ce fait, il est admis que l'IL-13R α 2 serait un récepteur 'leurre', d'autant qu'il a été retrouvé sous forme soluble *in vivo* et que sa surexpression diminue les effets de l'IL-13.

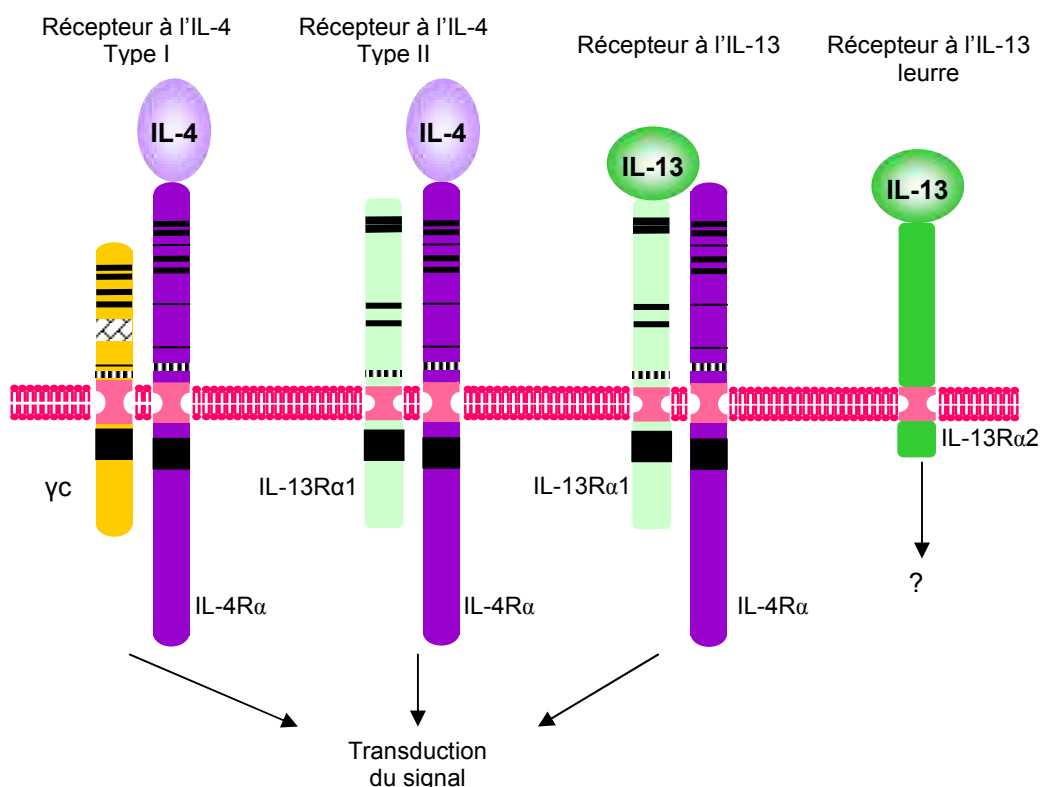


Figure 3. Représentation schématique des récepteurs à l'IL-4 et à l'IL-13. Le récepteur à l'IL-4 de type II est aussi le récepteur fonctionnel à l'IL-13 et est constitué des chaînes IL-4R α et IL-13R α 1. Le récepteur à l'IL-4 de type I partage la chaîne γ c avec les récepteurs à l'IL-2, IL-7 et IL-9. Le récepteur IL-13R α 2, possédant un domaine intracellulaire très court ne permet pas la transduction du signal et serait un récepteur 'leurre'. Les chaînes IL-4R α et IL-13R α 1 possèdent les caractéristiques des récepteurs de type I (motif WSxWS, cystéines conservées dans le domaine extracellulaire, motif riche en prolines dans le domaine intracellulaire).

Au cours de notre étude, nous avons cloné et séquencé l'ADNc codant pour l'IL-13R α 1 chez le rat. Cette séquence possède un cadre ouvert de lecture de 426 acides aminés et présente respectivement 87% et 72% d'identité avec ses homologues chez la souris et l'homme. Dans le domaine intracellulaire de la protéine sont retrouvés différents éléments conservés potentiellement impliqués dans la transduction du signal et caractéristiques des récepteurs de type I. Nous avons cloné et exprimé le domaine extracellulaire en système bactérien et nous avons pu vérifier qu'il liait bien l'IL-13 recombinante de rat préalablement produite au laboratoire.

L'objectif majeur de cette étude étant d'évaluer l'expression du récepteur à l'IL-13 sur les cellules B de rat, nous avons tout d'abord analysé la présence du transcrite de l'IL-13R α 1 au niveau de cellules B purifiées ainsi que sur une lignée cellulaire B de rat. Nous avons ainsi montré non seulement la présence de l'ARNm de l'IL-13R α 1 mais également celle de la protéine correspondante. Des expériences de 'binding' sur cellules B purifiées en présence d'IL-13 marquée à l'ode 125 ont permis de démontrer la liaison de l'IL-13 sur les cellules B de rat. Par la suite, nous avons observé une augmentation de la prolifération de cellules B purifiées en présence d'IL-13 et de cellules exprimant le CD40 ligand (Fig. 4).

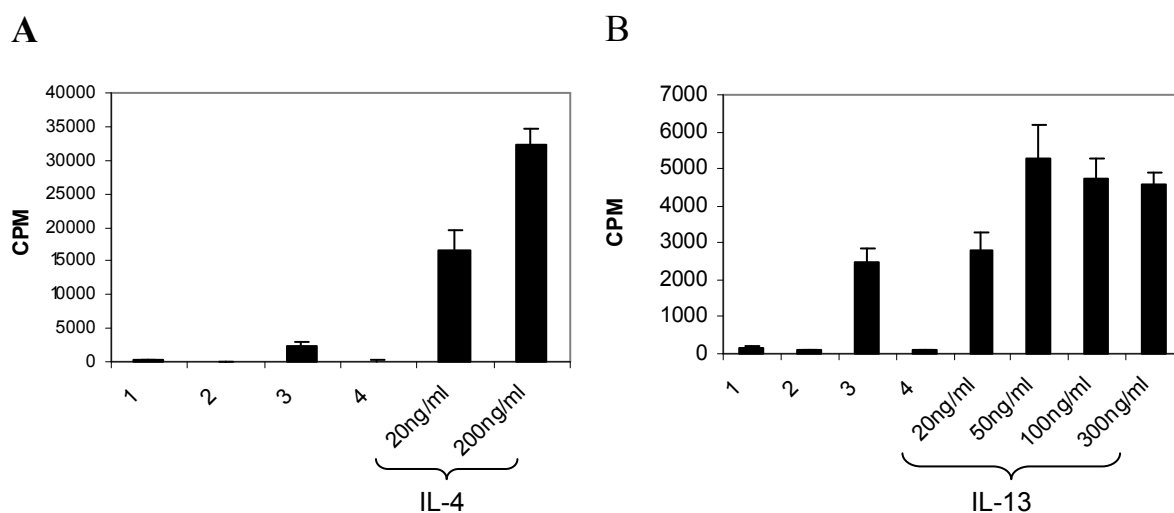


Figure 4. Augmentation de la prolifération des cellules B de rat par l'IL-4 (A) et l'IL-13 (B) en présence de cellules transfectées avec le CD40L. L'incorporation de thymidine ³H est mesurée après 3 jours de culture en présence de quantités croissantes de cytokines. Les contrôles sont 1- les cellules B seules, 2- les cellules CD40L seules, 3- les cellules B en présence des cellules CD40L, 4-les cellules B en présence des cytokines (200 ng/ml pour l'IL-4 ; 50 ng/ml pour l'IL-13).

L'ensemble de ces travaux contribue donc à la démonstration de la présence d'un récepteur fonctionnel à l'IL-13 sur les cellules B de rat, contrairement à la situation décrite chez la souris. En effet, Andrews et coll. ont montré que l'absence de réponse à l'IL-13 par les cellules B de souris pouvait être expliqué par l'absence de récepteur, dans la mesure où des cellules B de souris transfectées avec les chaînes IL-4R α et IL-13R α 1 humaines étaient tout à fait capables de répondre à l'IL-13 humaine (Andrews *et al.*, 2001). Une fois encore ces résultats soulignent les précautions à prendre lors de l'extrapolation à l'homme des concepts du rôle de l'IL-13 dans différentes pathologies, lorsque ceux-ci sont issus d'observations dans le modèle souris. Cette remarque est d'autant plus vraie lorsqu'on y associe les travaux précédemment cités sur les différences observées entre les éosinophiles et la distribution cellulaire du récepteur à l'IgE chez l'homme et la souris. Le modèle rat a donc tout son intérêt pour l'étude de pathologies impliquant une réponse de type Th2 et notamment les parasitoses.

3- Impact de l'âge sur l'infection par *Plasmodium* : apport du modèle rat

Les travaux actuellement en cours résumés ci-dessous seront plus amplement développés en partie 2 de ce mémoire. Cependant, afin d'exposer les thèmes 4 et 5 de cette partie 1, il est nécessaire de présenter rapidement le modèle d'infection palustre chez le rat.

Cette étude a été initiée avec l'aide d'Estelle Adam, ingénieur en formation pendant 2 ans et ont, jusqu'à présent, fait l'objet des publications suivantes :

Pierrot C., Adam E., Lafitte S., Godin C., Dive D., Capron M. and Khalife J. (2003) Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp. Parasitol.* **104**, 81-85.

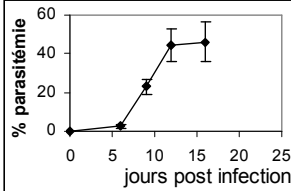
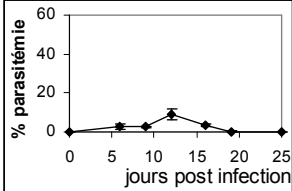
Adam E., Pierrot C., Lafitte, S., Godin, C., Saoudi, A., Capron, M. and Khalife, J. (2003) The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral responses. *Int. J. Parasitol.*, **33**;1067-1078.

Dans la malaria expérimentale, les travaux les plus complets sur l'étude de la réponse immune ont été menés dans le modèle de souris adulte, en négligeant l'influence de l'âge de l'hôte sur le développement de la réponse immune et sur l'issue de l'infection. Ainsi, aucune susceptibilité / résistance âge-dépendante n'a été clairement établie chez la souris infectée par *Plasmodium*. Par contre le rat représente un modèle âge-dépendant mimant la situation humaine (Adam *et al.*, 2003). Afin de prendre en compte l'impact de l'âge sur l'issue de l'infection par *Plasmodium*, nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier les profils immunologiques observés en fonction de la susceptibilité / résistance âge-dépendante.

Dans un premier temps, une étude comparative de l'infection dans les modèles souris et rat avec différentes souches de *Plasmodium* a permis de montrer que le modèle d'infection rat / *P. berghei* Anka était approprié pour l'étude des variations âge-dépendantes des paramètres immunologiques au cours de l'infection palustre (Pierrot *et al.*, 2003a). Ainsi, les rats jeunes (âgés de 4 semaines) développent une très forte parasitémie et succombent à l'infection par *P. berghei* Anka alors que les rats adultes (âgés de 8 ou 12 semaines) contrôlent la parasitémie et survivent. Dans un second temps, l'analyse des profils immunologiques a montré que cette résistance âge-dépendante est effectivement associée à des réponses

immunes humorales et cellulaires différentes (Adam *et al.*, 2003) (Tableau IV). Ainsi, nous avons pu observer, chez les rats jeunes susceptibles infectés, la persistance des cellules T CD4+CD25+ ainsi que des taux élevés d'IL-10 circulante. Parallèlement, chez les rats adultes résistants, nous observons des taux élevés de cellules T CD8+ et T NK. De plus, l'analyse de la réponse humorale a montré la présence de taux d'IgG2c (isotype sous contrôle de l'IFN- γ) significativement plus élevés chez les rats adultes.

Tableau IV. Modèle d'infection du rat Fischer par *Plasmodium berghei* ANKA : caractéristiques cliniques, immunologiques et moléculaires dépendantes de l'âge.

	Rats jeunes (4 semaines)	Rats adultes (8 semaines)
Signes cliniques		
survie	0%	100%
parasitémie		
anémie	50%	50%
poids (perte maximum)	-30%	-10%
index de splénomégalie ^a	33,3	29,6
Paramètres de la réponse immune		
Paramètres sériques		
IgG2c spécifiques	+	+++
IL-10	+++	+
Distribution cellulaire splénique		
cellules B (J6)	+	+++
cellules T CD8+ (J6)	+	+++
cellules NKT (J6 - J13)	++	+++
cellules CD4+CD25+	+++	+

^a l'index de splénomégalie est le rapport du poids de la rate en g sur celui de l'animal en kg

Afin de compléter ce profil, nous avons réalisé une étude des variations des transcriptomes de rats jeunes / adultes au cours de l'infection, permettant de caractériser les événements moléculaires au niveau de la rate en fonction de l'âge et de l'issue de l'infection. Cette étude est actuellement en cours d'analyse.

Disposant de ce modèle, nous avons, par la suite, tenté par différentes approches de protéger les rats jeunes. Ces études nous ont conduits d'une part à disséquer les mécanismes cellulaires impliqués dans la protection des rats jeunes, et d'autre part à explorer la possibilité que des différences fonctionnelles existent chez les rats jeunes, en

dehors de tout contexte d'infection. L'ensemble de ces résultats ainsi que les perspectives qui en découlent sont présentés en partie 2 de ce mémoire. Parallèlement, grâce à la disponibilité de ce modèle nous avons été amenés à analyser les réponses immunes observées chez des rats jeunes infectés, suite à un traitement curatif à la ferroquine, en comparaison avec la chloroquine. Ce modèle nous a également permis d'aborder la question des co-infections *Plasmodium*-schistosome.

4- Effet de la ferroquine sur la réponse immune lors de l'infection de rats jeunes par *Plasmodium berghei*

Ce travail a fait l'objet d'une publication:

Pierrot C., Lafitte S., Dive D., Fraisse L., Brocard J. and J. Khalife (2005) Analysis of immune response patterns in naive and *Plasmodium berghei*-infected young rats following a ferroquine treatment. *International Journal for Parasitology* **35**, 1601-1610 ;

Malgré une extension des zones de résistance aux antipaludéens, et devant l'absence de vaccins, le traitement chimiothérapeutique reste un moyen largement utilisé pour lutter contre le paludisme. Schématiquement il existe quatre sous-familles de molécules anti-paludiques, qu'elles soient d'origine végétale ou synthétique : les amino-4-quinoléines, les amino alcools, l'artémisinine et ses dérivés, et les antifolates. Ces composés sont utilisés en traitement curatif et/ou prophylactique de l'accès palustre et la presque totalité ciblent le stade érythrocytaire responsable des symptômes cliniques. Cette gamme de médicaments relativement 'étroite' rend d'autant plus critiques les chimiorésistances du *Plasmodium* à la chloroquine, à la méfloquine et à l'association sulfadoxine-pyriméthamine, très largement répandues actuellement. Face à ce constat alarmant, l'urgence de la recherche de nouvelles molécules antipaludiques a été soulignée par l'OMS. Pour cela, deux démarches complémentaires sont développées : la première vise, à court ou moyen terme, à modifier des molécules connues afin d'obtenir de nouveaux dérivés efficaces, ou à identifier des associations rationnelles de molécules connue d'activités synergiques ou additives. La deuxième démarche, plus classique et plus lentement productive, vise à découvrir de nouvelles cibles spécifiques du parasite et concevoir les inhibiteurs correspondants.

Dans ce contexte, une nouvelle molécule antipaludique combinant la chloroquine (CQ) et un groupement ferrocène a été conçue par le laboratoire de catalyse de Lille (UMR CNRS 8010, ENSCL, Pr. J. Brocard). Ce composé organométallique, nommé ferroquine (FQ) ou ferrochloroquine (Fig. 5), a été sélectionné suite à la synthèse et au criblage de différents dérivés ferrocéniques d'antipaludéens classiques. Ainsi, alors que les dérivés de la méfloquine, de la quinine

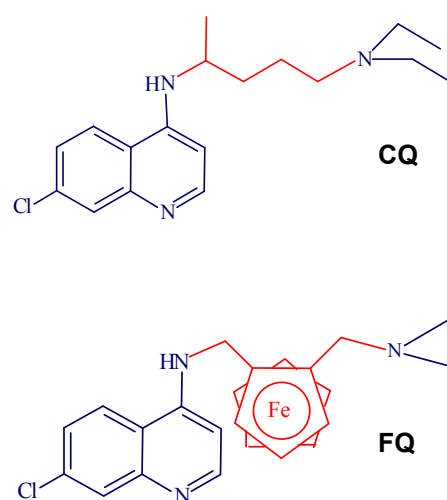


Figure 5. Formules chimiques de la chloroquine (CQ) et de la ferroquine (FQ).

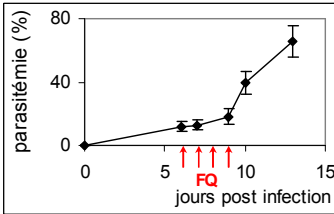
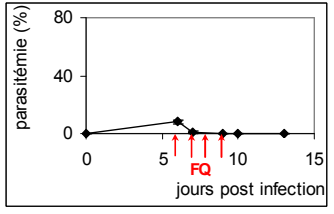
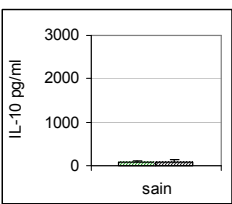
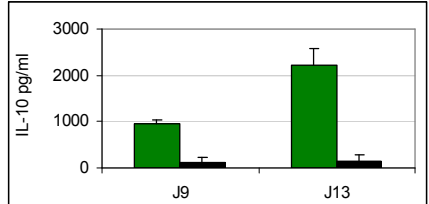
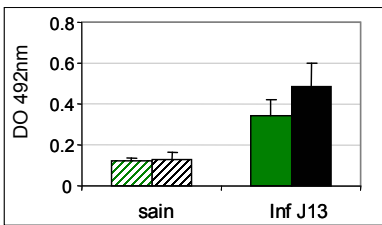
et de l'artémisinine se sont révélés peu actifs (Biot *et al.*, 2000; Delhaes *et al.*, 2000), la dérivation de la CQ a permis d'obtenir la FQ, molécule présentant une activité antipaludique très prometteuse. En effet, si les activités antimalariques de la FQ et de la CQ sont relativement identiques sur des souches de *Plasmodium* sensibles à la CQ, la FQ est particulièrement active in vitro sur des souches résistantes à la CQ. En outre, la FQ s'est révélée active sur des isolats de terrain sensibles ou résistants à la CQ provenant de plusieurs régions du globe (Gabon, Sénégal, Cambodge) (Pradines *et al.*, 2001; Pradines *et al.*, 2002; Atteke *et al.*, 2003; Chim *et al.*, 2004). In vivo, la FQ est 5 fois plus active que la CQ sur *P. vinckei* CQ-sensible et jusqu'à 20 fois plus sur une souche *P. vinckei* CQ-résistante (Delhaes *et al.*, 2001). L'étude des modifications des substituants du noyau quinolinique et de la chaîne latérale de l'amine tertiaire a montré que la FQ restait le meilleur composé en terme d'activité antimalarique sur de souches de *Plasmodium* sensibles ou résistantes à la CQ (Biot *et al.*, 1997). De même, la synthèse d'énantiomères FQ(+) et FQ(-) a permis de comparer l'activité de chaque isomère optique au mélange racémique, ce dernier s'étant révélé le plus actif in vivo (Delhaes *et al.*, 2002).

La FQ possédant donc un très fort potentiel antimalarique, les laboratoires Sanofi-Synthélabo ont entrepris des études précliniques et le composé (FQ, SSR97193) est actuellement en phase II d'essais cliniques.

Parmi les questions pouvant se poser lors de l'introduction d'un nouveau médicament, et parallèlement aux critères imposés par les essais cliniques, l'influence potentielle du médicament sur la réponse immune observée lors de l'infection prend tout son intérêt. De plus, actuellement de façon générale se pose le cas du traitement des enfants pour lesquels aucun test n'est spécifiquement réalisé, les doses adultes étant souvent adaptées en fonction du poids. Dans ce contexte, connaissant l'incidence du paludisme chez les enfants et disposant d'un modèle d'infection palustre dans lequel l'âge de l'hôte influence l'issue de l'infection et la réponse immune développée, nous avons proposé d'étudier l'effet du traitement curatif à la FQ sur la réponse immune observée lors de l'infection de rats jeunes par *Plasmodium berghei*, en comparaison avec un traitement à la CQ.

Pour cela, des rats F344 âgés de 4 semaines ont été infectés par *P. berghei* et traités avec la FQ à raison de 25mg/kg (voie i.p.) administrée quotidiennement pendant 4 jours à compter de J6 post infection. Dans le même temps, à titre comparatif, un groupe d'animaux reçoit les mêmes doses de CQ et les contrôles du PBS ; le même schéma est également réalisé sur des rats sains. Nous avons ainsi pu examiner l'influence du traitement à la FQ vs CQ, chez des rats sains et infectés, sur les paramètres cliniques et immunologiques (Tableau V).

Tableau V. Effet du traitement à la FQ de rats jeunes infectés ou non par *P. berghei* sur les paramètres cliniques et immunologiques caractéristiques de l'infection

	rats sains	rats infectés traités PBS	rats infectés traités FQ
Parasitémie	-		
Survie	100%	0%	100%
Paramètres spléniques à J13			
index de splénomégalie ^a	3,5	38,9	5,8
distribution cellulaire			
cellules B	++	+	++
cellules T	++	+	++
CD4+CD25+	+	++	+
cellules NK	+	-	+
prolifération			
sécrétion d'IFN- γ (ConA, α -CD3)	++	-	++
Paramètres sériques à J13			
distribution cellulaire			
cellules B	++	+++	+
cellules T	++	+	++
CD4+CD25+	+	++	+
IL-10			
IgG2c spécifiques			

^a l'index de splénomégalie est le rapport du poids de la rate en g sur celui de l'animal en kg

Nous avons ainsi montré que l'administration de la FQ aux rats jeunes susceptibles permettait de les guérir. En effet, dès la première injection de FQ, une réduction de 75% de la parasitémie est observée et aucun parasite n'est détecté à compter de la deuxième injection, et ceci jusqu'à J40 post infection. De façon intéressante, la clearance parasitaire dans le cas du traitement à la CQ est significativement moins rapide qu'avec la FQ. L'étude de la réponse proliférative des cellules spléniques à différents mitogènes a montré que les cellules purifiées de rats jeunes présentaient une diminution de la prolifération par rapport aux rats sains quel que soit le stimulus. Ces résultats s'inscrivent tout à fait dans le cadre de l'immuno-suppression malariale décrite dans la malaria expérimentale (pour revue, (Weidanz, 1982). Nous avons également observé qu'un traitement à la FQ ou à la CQ n'influence pas la réponse proliférative chez des rats sains. Cependant, alors que le traitement à la CQ aggrave encore l'immuno-suppression observée au cours de l'infection par *P. berghei*, il semble que le traitement à la FQ permette de l'éviter, puisque la réponse proliférative observée chez les rats traités à la FQ était comparable à celle des rats sains, voire même augmentée dans le cas d'une stimulation avec la PHA ou la ConA (Figure 6). Il est connu que la CQ a une action immuno-suppressive que ce soit dans le contexte du paludisme ou non ; quant au rôle de la FQ dans la restauration de la réponse proliférative, il est intéressant de le rapprocher des résultats de Kovjazin et coll. montrant que le groupement ferrocène (groupement présent dans la FQ et pas dans la CQ) stimule par lui-même la prolifération des lymphocytes in vivo (Kovjazin *et al.*, 2003).

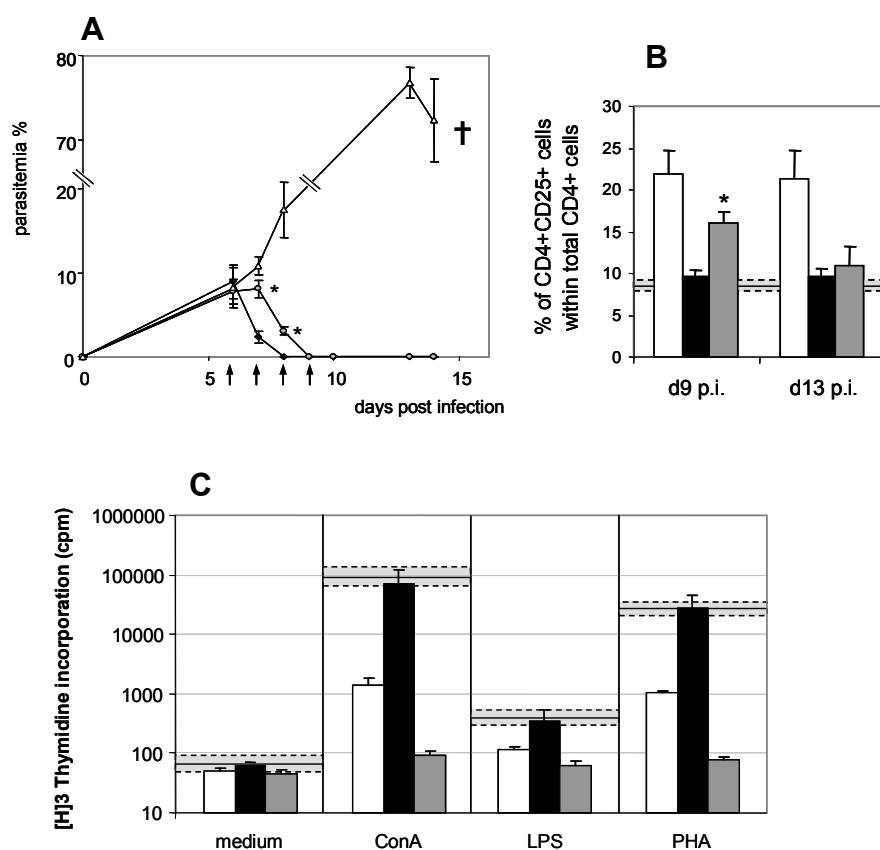


Figure 6: Effect of CQ on the course of infection and on immune responses of infected young rats. **A**, Course of *P. berghei* ANKA infection in Fischer rats treated with FQ (◆), CQ (○) or vehicle (Δ). Results are presented as mean \pm sem of one representative experiment out of three where $n = 6$. Arrows indicate the four i.p. administrations of FQ / CQ. * $P < 0.05$ with FQ-treated rats. †, death of all rats. **B**, Blood CD4+CD25+ cells within total CD4+ cells at days 9 and 13 p.i. in *P. berghei* infected rats treated with vehicle (white bars), FQ (black bars) or CQ (grey bars). * $P < 0.005$ with FQ-treated infected rats. **C**, Proliferation of spleen cells prepared from infected rats (d13 p.i.) treated with vehicle (white bars), FQ (black bars) or CQ (grey bars). Spleen cells were cultured in presence of ConA, LPS or PHA. Shaded areas surrounded by broken lines represent mean \pm sem of non-infected rats. The data are those of a representative experiment with triplicate wells per experimental determination for each rat ($n = 4$).

Concernant la sécrétion d'IFN- γ par les cellules spléniques, nous avons également observé que le traitement à la FQ ou à la CQ rétablissait cette sécrétion, abolie par l'infection palustre chez les rats non traités. Cependant, ce rétablissement n'était pas observé dans le cas d'une stimulation par le LPS, laissant supposer que les macrophages des rats infectés présentent un défaut d'activation. Dans ce sens, il a été observé que le pigment malarique inhibe la production de NO et de TNF- α par les macrophages de souris, suite à une stimulation par le LPS (Taramelli *et al.*, 1995). Par la suite il était tentant de tester si les observations faites sur la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les cellules spléniques suite à un traitement avec la FQ pouvaient être attribuées à un ou plusieurs types cellulaires. Nous avons donc analysé la distribution cellulaire dans la rate mais également au niveau sanguin. Nous avons ainsi montré que les traitements de rats infectés à la FQ ou à la CQ rétablissaient la distribution cellulaire au même niveau que chez les rats sains, alors que l'infection palustre affectait profondément cette distribution. Les variations observées étaient sensiblement identiques aux niveaux sanguin et splénique. En ce qui concerne les cellules TCR+CD8+ et NKT, les rats infectés traités à la FQ présentaient des taux supérieurs à ceux observés chez les rats sains. Concernant les cellules B, il est intéressant de noter que l'infection palustre affecte différemment leurs taux selon qu'il est observé dans la rate ou dans le sang. Ainsi, alors que dans la rate les taux de cellules B sont considérablement diminués chez les rats infectés (14,7% contre 28,4% chez les rats sains), on observe une forte augmentation au niveau du sang (40% contre 24,4% chez les rats sains). Il est connu que le *Plasmodium* est un puissant activateur des cellules B (Donati *et al.*, 2004) et le fait que l'on retrouve beaucoup plus de parasites dans le sang que dans la rate pourrait expliquer nos observations. L'effet du traitement à la FQ sur les cellules B est lui aussi différent dans la rate, où la situation est rétablie au niveau des rats sains, et dans le sang, où les taux de cellules B sont diminués en deçà de ceux observés chez les rats sains. Nous avons par la suite observé que les traitements FQ ou CQ n'influencent pas la réponse IgG2c spécifique observée lors de l'infection des rats jeunes par *P. berghei*, et ceci bien que la parasitémie soit redevenue nulle très rapidement. Ceci souligne que l'initiation de la réponse IgG2c se fait très précocement au cours de l'infection, et que une fois initiée, cette réponse ne dépend pas de la parasitémie.

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que le traitement à la FQ ne présente aucune toxicité immunologique et permet malgré son action très rapide la mise en place d'une réponse immune effectrice. Il est intéressant de noter que la FQ pourrait être également efficace en cas d'immunodépression ; en effet, nous avons observé que cette molécule permet de guérir des rats Nude de l'infection palustre ; ceci ne semble pas être le cas pour la CQ puisque Myint Lwin et coll. ont observé une efficacité réduite de la chloroquine chez des

souris déficientes en cellules T (Myint *et al.*, 1987). Il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie cette propriété que semble posséder la FQ ; en effet les populations susceptibles de prendre un traitement anti-paludique présentent souvent une réponse immune altérée du fait principalement d'autres infections (HIV, schistosomes).

5- Etude des infections mixtes *Schistosoma mansoni* – *Plasmodium berghei* : de l'influence sur la pathologie à la caractérisation des gènes impliqués

Ce travail a fait en partie l'objet du DEA d'Hélène Lallet (2003). Il a été mené en partie en collaboration avec le laboratoire du Professeur D. Dunne à Cambridge (Grande Bretagne). Un article sur ce sujet a été publié en 2006 :

Pierrot C, Wilson S, Lallet H, Lafitte S, Jones FM, Daher W, Capron M, Dunne DW and J. Khalife (2006) Identification of a Novel Antigen of *Schistosoma mansoni* Shared with *Plasmodium falciparum* and Evaluation of Different Cross-Reactive Antibody Subclasses Induced by Human Schistosomiasis and Malaria. *Infection and Immunity*. **74**, 3347-3354.

Des études épidémiologiques ont montré, depuis quelques années, une extension des zones d'endémie de la malaria et de la bilharziose. Cette extension, outre les problèmes qu'elle pose du fait de l'augmentation de nombre de personnes exposées, a comme conséquence l'apparition de régions où les deux parasites coexistent. De ce fait, de nombreuses personnes sont infectées par *Plasmodium* et *Schistosoma* et la pathologie ainsi que les réponses immunes à chaque parasite s'en retrouvent considérablement modifiées. Ainsi, il a été montré que les réponses IgG3 et IgE dirigées contre l'antigène d'œuf de schistosome et contre la Glutathion-S transférase de *S. haematobium* étaient augmentées chez les enfants bilharziens lorsqu'ils étaient également infectés par *P. falciparum* (Mutapi *et al.*, 2000; Remoue *et al.*, 2003). Chez ces mêmes enfants, ont été détectés des taux d'IFN- γ , IL-10 et récepteur soluble au TNF α (paramètres associés à la morbidité dans la bilharziose) supérieurs à ceux observés chez les enfants mono-infectés par *S. haematobium*.

Inversement, plusieurs études immuno-épidémiologiques sur l'influence d'une infection chronique par schistosome sur la susceptibilité à *Plasmodium* ont été réalisées. Ainsi, il a été montré que l'incidence des cas de paludisme chez des enfants sénégalais était augmentée en cas d'infection par *S. mansoni*, cette augmentation étant plus importante lorsque la charge parasitaire en œufs était élevée (Sokhna *et al.*, 2004). Cependant, deux études récentes ont reporté que l'infection par *S. haematobium* avait un effet protecteur sur l'infection par *P. falciparum* chez des enfants, effet mesuré par l'évaluation de la parasitémie ainsi que des signes cliniques (Briand *et al.*, 2005; Lyke *et al.*, 2005). Les bases immunologiques d'une telle influence ont été peu étudiées, cependant, il est concevable qu'elle puisse s'exercer soit via le réseau des cytokines, soit par la présence d'une réponse

cellulaire et/ou humorale croisée, due à des antigènes ou épitopes communs entre les deux parasites. Ainsi, très récemment, Lyke et coll. ont montré chez des enfants co-infectés par *S. haematobium* et *P. falciparum* des taux d'IL-4 sérique inversement corrélés avec le délai d'apparition de l'infection palustre mesuré au cours d'une saison de transmission (Lyke *et al.*, 2006). Parallèlement, et venant conforter l'hypothèse d'une réponse humorale croisée entre les deux parasites, les travaux de Naus et coll. ont montré une forte corrélation entre les réponses humorales spécifiques dirigées contre des antigènes de *P. falciparum* et *S. mansoni*, chez des individus bilharziens et impaludés (Naus *et al.*, 2003). Cette corrélation semble résulter de la présence d'épitopes communs aux deux parasites et d'anticorps cross-réactifs induits par *P. falciparum* et d'isotype IgG3 majoritairement.

Des modèles expérimentaux de coinfection ont été étudiés chez la souris ; cependant, il est difficile d'établir un consensus quant à l'influence des infections mixtes car celle-ci varie en fonction de la souche de souris et de la souche de *Plasmodium* utilisées, ainsi que de la chronologie d'une infection par rapport à l'autre, comme en témoignent les résultats résumés dans le tableau VI.

Tableau VI. Effets des infections mixtes *S. mansoni* – *Plasmodium* observés sur la pathologie à *Plasmodium* chez la souris, en fonction de la souche de souris, de la souche de *Plasmodium* et de la chronologie des infections.

souche de souris	souche de <i>Plasmodium</i>	chronologie des infections <i>S.mansoni</i> / <i>Plasmodium</i> ^a	effet sur la pathologie à <i>Plasmodium</i> chez les souris coinfectées		ref.
			parasitémie ^b	survie (survie des contrôles) ^c	
Swiss	<i>P. berghei</i>	Sm – 49 j – Pb	Pie ↑	35% (100%)	(Legesse <i>et al.</i> , 2004)
CBA	<i>P. berghei</i>	Sm – 28 j – Pb	pas d'effet	pas d'effet	(Lwin <i>et al.</i> , 1982)
		42 j	"	"	
		63 j	"	"	
		84 j	"	"	
CBA	<i>P. yoelii</i>	Sm – 28 j – Py	pas d'effet	pas d'effet	(Lwin <i>et al.</i> , 1982)
		42 j	"	"	
		63 j	Pie ↑	"	
		84 j	Pie ↑	"	
CBA	<i>P. chabaudi</i>	Sm – 28 j – Pc	pas d'effet	pas d'effet	(Lwin <i>et al.</i> , 1982)
		42 j	"	"	
		63 j	Pie ↓	"	
		84 j	Pie ↓	"	
A/J	<i>P. chabaudi</i>	Sm – 56 j – Pc	Pie ↓	100% (0%)	(Yoshida <i>et al.</i> , 2000)
C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	Sm – 56 j – Pc	Pie ↑	60% (100%)	(Yoshida <i>et al.</i> , 2000)
C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	Sm – 56 j – Pc	Pie ↑	90% (100%)	(Helmbly <i>et al.</i> , 1998)

^a la chronologie des infections précise le nombre de jours (j) entre l'infection par *S. mansoni* (Sm) et l'infection palustre (Pb, *P. berghei* ; Py, *P. yoelii* ; Pc, *P. chabaudi*).

^b les variations de parasitémie (Pie) sont indiquées en termes d'augmentation (↑) ou de diminution (↓) par rapport aux souris mono-infectées par *Plasmodium*.

^c la survie des souris mono-infectées par *Plasmodium* est donnée entre parenthèses.

Il semble cependant que, chez des souris CBA ou A/J, l'infection par *S. mansoni* diminue la pathologie observée lors d'une infection par *P. chabaudi*, lorsque celle-ci survient au moins 8 semaines après l'infection par *S. mansoni* (Lwin *et al.*, 1982; Yoshida *et al.*, 2000). Par contre, le même schéma de coinfection appliqué à des souris C57BL/6 aboutit à une exacerbation de la maladie (Yoshida *et al.*, 2000). Chez les souris A/J, la capacité à résoudre l'infection palustre observée chez les animaux coinfectés est associée à une augmentation de la production d'IFN- γ . Ceci suggère donc que la modulation de la réponse immune serait due à une cross-régulation des réponses Th1 et Th2 par le parasite *S. mansoni* (Yoshida *et al.*, 2000).

Néanmoins, malgré une influence évidente des infections mixtes sur la pathologie, et contrairement aux études réalisées chez l'homme, aucune réactivité croisée humorale n'a pu être mise en évidence chez la souris, entre *S. mansoni* et *P. chabaudi* (Helmbly *et al.*, 1998). Le modèle rat étant connu pour produire une forte réponse humorale contre les parasites *S. mansoni* et *P. falciparum*, il nous a semblé être approprié pour l'étude d'infections mixtes et plus particulièrement pour l'analyse des bases moléculaires d'une réaction croisée. Nous avons donc proposé d'évaluer, dans un premier temps, l'impact de l'infection par *S. mansoni* sur l'évolution de l'infection par *P. berghei*. Pour cela, différents protocoles d'infections mixtes ont été réalisés, faisant varier l'âge des rats, la charge parasitaire et la chronologie d'une infection par rapport à l'autre. Ainsi, nous avons observé lors d'une expérience, que des rats âgés de 4 semaines coinfectés le même jour par les deux parasites présentaient une survie de 43% (3 rats sur 7) alors que les contrôles mono-infectés par *P. berghei* succombaient tous à l'infection. Malheureusement, ce résultat s'est révélé non reproductible. Néanmoins, les analyses sériques menées lors de ces expériences ont montré, de façon très reproductible, que les sérums de rats mono-infectés par *P. berghei* présentaient une réaction croisée avec des antigènes de *S. mansoni*, l'inverse n'étant pas observé. Ces résultats, confirmés sur un grand nombre d'échantillons par ELISA et western blot, nous ont conduits à caractériser un antigène de *S. mansoni* impliqué dans l'induction de la réponse humorale croisée.

Ainsi, le criblage d'une banque d'expression de *S. mansoni* par un pool de sérums de rats infectés par *P. berghei* a permis d'identifier un gène, nommé SmLRR, codant pour une protéine de 54kDa. La comparaison de la séquence d'acides aminés déduite avec la banque GenBank a montré une identité importante de la SmLRR avec la sds22 de *Schizosaccharomyces pombe*, protéine régulatrice de la protéine phosphatase de type 1 (PP1), elle-même cruciale dans le déroulement du cycle cellulaire de la levure. La SmLRR ayant été identifiée suite à l'observation d'une réaction croisée entre *S. mansoni* et *Plasmodium*, nous avons recherché des orthologues chez *P. berghei* et *P. falciparum*

(banque PlasmoDB). Nous avons ainsi identifié chez *P. falciparum* un cadre ouvert de lecture, nommé PfSDs. Par la suite, une démarche d'analyse *in silico* a ouvert une nouvelle voie de recherche au laboratoire et actuellement, de nombreux paralogues à la PfSDs chez *P. falciparum* et orthologues chez *S. mansoni* et *Toxoplasma gondii* sont en cours d'étude. Toutes ces protéines, ainsi que la SmLRR se sont révélées appartenir à la famille des protéines riches en Leucine (Leucine Rich Repeat, LRR). Ainsi, la SmLRR contient 7 domaines LRR putatifs, domaines connus pour être impliqués dans les interactions protéine – ligand. Dans ce sens, au vu des homologies de la SmLRR avec la sds22 de *S. pombe*, et ayant cloné au laboratoire la PP1 de *S. mansoni*, nous avons réalisé des expériences de 'pull-down' avec la SmLRR et la PP1 de *S. mansoni* (SmPP1). Nous avons ainsi observé une interaction entre ces deux protéines, suggérant que la SmLRR pourrait moduler l'activité de la phosphatase PP1 chez *S. mansoni*.

Parallèlement, afin de vérifier si la SmLRR pouvait être à la base de la réaction croisée entre *Plasmodium* et *S. mansoni*, nous avons testé l'immunoréactivité de sérums d'infection palustre avec la protéine recombinante. Ainsi, dans un premier temps, nous avons montré qu'une infection expérimentale par *P. berghei* produisait des anticorps dirigés contre la SmLRR. Par la suite, en collaboration avec l'équipe de D. Dunne (Cambridge, UK), nous avons observé que des sérums d'enfants Kenyans mono-infectés par *P. falciparum* présentaient des taux significatifs d'anticorps dirigés contre la SmLRR. Une corrélation positive a été établie entre les taux d'IgG3 anti-*Plasmodium* et anti-SmLRR. Les réponses IgG1 bien qu'existantes ne présentaient pas de corrélation significative. Concernant la réponse IgG4, bien que l'infection palustre induise de forts taux d'IgG4 anti-*Plasmodium*, aucune réponse croisée anti-*S. mansoni* ou anti-SmLRR n'a été détectée. Ce profil de corrélations entre les réponses anti-*Plasmodium* et anti-SmLRR dépendant de l'isotype est semblable à celui décrit avec les antigènes totaux de *S. mansoni* (Naus *et al.*, 2003), suggérant ainsi que cette protéine contribuerait au moins en partie à la réactivité croisée observée.

Afin de vérifier que les anticorps coss-réactifs étaient effectivement induits par l'infection palustre, nous avons réalisé des expériences de déplétion ; pour cela, les sérums d'infection ont été incubés en présence d'antigènes de *Plasmodium* avant d'être testés pour leur réactivité avec la SmLRR. Nous avons ainsi observé une diminution de la réactivité allant de 40 à 80%.

Par la suite, nous avons analysé l'évolution de la réponse humorale anti-SmLRR chez des sujets infectés par *S. mansoni*. Cette étude a été réalisée sur une cohorte de 219 individus Ougandais âgés de 7 à 50 ans provenant d'une région co-endémique pour *S. mansoni* et *P. falciparum*. Les sérums ont été prélevés avant l'administration d'un traitement anti-bilharzien et analysés pour leur réactivité avec les antigènes d'œuf et de vers adulte de schistosome,

avec la SmLRR recombinante et avec les antigènes de *Plasmodium*. Nous avons observé, comme lors de l'étude portant sur les enfants Kenyans, que les réponses IgG3 anti-*Plasmodium* et anti-schistosome (et notamment anti-SmLRR) sont corrélées positivement entre elles. Cependant, elles ne sont corrélées ni avec l'intensité de l'infection palustre, ni avec celles de l'infection bilharzienne. Il est à noter qu'une telle corrélation avec l'infection palustre avait été observée chez les enfants Kenyans. Il est donc possible que ce type d'association soit un phénomène dépendant de l'âge.

Une observation nouvelle apportée par l'étude sur la communauté Ougandaise est la corrélation positive entre les taux d'IgG4 anti-schistosome (anti-œuf, vers adulte, et SmLRR) avec l'intensité de l'infection bilharzienne, alors que les réponses IgG4 anti-SmLRR et anti-*Plasmodium* sont fortement corrélées entre elles. En résumé, il semble que l'infection par *Plasmodium* induise une réponse IgG3 cross réactive avec la SmLRR, alors qu'une infection chronique et de forte intensité par *S. mansoni* induise une réponse IgG4 anti-schistosome, donc anti-SmLRR, corrélée avec les IgG4 anti-*Plasmodium*.

A ce stade, il est important de noter que les anticorps d'isotype IgG3, comme IgG1, sont connus pour être effecteurs aussi bien dans le paludisme, où ils interviennent dans les mécanismes d'inhibition cellulaire dépendante d'anticorps (ADCI), que dans la schistosomiase où ils sont impliqués dans la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) (Khalife *et al.*, 1989; Oeuvray *et al.*, 1994; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). Cependant, l'isotype IgG4 a été décrit comme bloquant puisque capable d'interférer avec la destruction des larves de schistosome par les éosinophiles et avec l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* (elle-même médiée par les IgG3) (Groux *et al.*, 1990) (cf Tableau I). Dans notre étude il est donc possible que les IgG4 et les IgG3 cross-réactifs induits respectivement par *S. mansoni* et *P. falciparum* jouent des rôles totalement différents.

En conclusion, l'ensemble de ce travail nous a permis de caractériser une nouvelle protéine de *S. mansoni* à la base de réactions croisées entre ce parasite et *Plasmodium*. De plus, des analyses de corrélation ont permis de montrer que ces deux parasites induiraient des sous classes différentes d'IgG cross-réactifs. Par ailleurs, cette étude a ouvert une nouvelle voie de recherches au sein de notre laboratoire sur les protéines riches en leucine chez *P. falciparum*. Cette thématique a fait l'objet du sujet de Master 2^{ème} année de N. Dupont et de la thèse de W. Daher (Daher *et al.*, 2006b; Daher *et al.*, 2006c).

Partie 2

Recherche actuelle et Perspectives

Etude de l'infection expérimentale du rat par *Plasmodium berghei* : vers la compréhension des mécanismes à la base de la susceptibilité / résistance dépendante de l'âge

► Introduction

► Le modèle d'infection palustre âge-dépendant chez le rat

► Comment protéger les rats jeunes ?

► Perspectives

Quels sont les mécanismes à la base du transfert de protection aux rats jeunes ?

Pourquoi les rats jeunes sont ils susceptibles à l'infection palustre ?

1- Introduction

Rôle de l'âge dans l'évolution de l'infection palustre

Chez l'homme, l'issue de l'infection palustre dépend de l'espèce de parasite infectant (caractéristiques phénotypiques et génotypiques), de l'intensité de transmission, ainsi que de la susceptibilité génétique et du statut immunitaire de l'hôte. Ce dernier paramètre peut être lui-même influencé par la présence d'autres infections, comme on l'a vu en partie 1 de ce mémoire. Cependant, l'âge de l'hôte constitue un facteur majeur impliqué dans la susceptibilité à l'infection palustre. Ainsi, alors que les adultes vivant en région endémique acquièrent une protection contre l'exposition chronique au parasite, de très fortes morbidités et mortalités sont observées chez les enfants de moins de 5 ans (Baird, 1995; Murphy *et al.*, 2001). Les observations faites en zones d'endémie pourraient laisser penser que l'acquisition d'une résistance et d'une réponse immune protectrice serait due à une exposition au parasite pendant plusieurs années. En effet, si l'on exclue les nouveaux nés qui semblent relativement protégés pendant 2 à 5 mois après la naissance, on observe un risque de malaria sévère très élevé chez les jeunes enfants, risque qui diminue graduellement jusqu'à l'adolescence (Snow *et al.*, 1998). Dans le même sens, Kurtis et coll. ont observé pendant ou juste après la puberté une diminution âge-dépendante de la fréquence et de l'intensité d'infection (Kurtis *et al.*, 2001). Les enfants se protégeraient donc suite à des expositions répétées grâce à des mécanismes neutralisant les effets cliniques du paludisme et contrôlant la charge parasitaire. Cependant, ce modèle d'immunité acquise en fonction de l'âge ne permet pas d'expliquer les observations faites sur des populations migrant de régions non endémiques vers des régions endémiques. En effet, alors que les adultes en contact depuis peu avec le parasite sont, dans un premier temps, plus susceptibles que leurs enfants au paludisme sévère, ils développent par la suite une immunité anti-parasitaire beaucoup plus rapidement que les enfants (Baird, 1998; Baird *et al.*, 1998). A ces observations viennent s'ajouter celles concernant la prévalence du neuropaludisme, particulièrement présent chez les très jeunes enfants : alors que chez des nouveaux-nés de moins de 6 mois il est possible d'observer une très forte parasitémie sans signe clinique, le risque de neuropaludisme semble augmenter avec l'âge de l'enfant et la répétition des expositions (Wagner *et al.*, 1998).

Les mécanismes conduisant à une immunité protectrice vis-à-vis de l'infection palustre semblent donc très complexes et largement influencés par l'âge de l'hôte. Cependant, il est difficile de déterminer si l'acquisition d'une immunité protectrice très lente chez les enfants est due à une différence constitutive dans les réponses immunes entre enfants et adultes ou

à une différence d'exposition à plusieurs variants antigéniques du parasite. Il est donc crucial de disposer d'un modèle expérimental où de tels facteurs, et plus particulièrement l'âge de l'hôte est pris en compte. Dans ce contexte, nous avons développé chez le rat un modèle d'infection dont l'issue est dépendante de l'âge de l'hôte. Toutefois, avant de présenter ce modèle, il est nécessaire de rappeler brièvement ce qui est connu de l'immunité anti-*Plasmodium*, aussi bien chez l'homme, que dans les modèles expérimentaux.

Immunité anti-*Plasmodium* chez l'homme

La réponse immune anti-*Plasmodium* chez l'homme fait intervenir à la fois une réponse cellulaire et une réponse dépendante des anticorps. Le rôle des cellules CD4⁺ a pu être montré indirectement grâce à des études immuno-épidémiologiques menées chez des individus coinfestés avec le VIH, présentant donc un déficit en cellules CD4⁺. Ainsi, Cohen et coll. ont observé que les individus coinfestés développaient une infection par *Plasmodium* plus sévère (Cohen *et al.*, 2005). Au cours de ces études, il a été également montré que l'infection par le VIH altère les réponses anticorps dirigées contre des antigènes de surface du parasite (Mount *et al.*, 2004). Le rôle des anticorps quant à lui a pu être démontré par des expériences de transfert de sérum où le sérum provenant d'individus immuns pour *Plasmodium* permet de protéger des individus naïfs (Cohen *et al.*, 1961). De plus, plusieurs études ont montré que les cytokines de type 1 sont importantes dans l'induction d'une réponse immune anti-*Plasmodium* puisqu'une production d'IFN γ est liée à des infections moins sévères chez les enfants (Luty *et al.*, 1999) et que le TNF α inhibe la croissance parasitaire in vivo (Hernandez-Valladares *et al.*, 2006). Cependant, une production trop importante de ces cytokines lors d'une infection palustre pourrait avoir l'effet inverse. En effet, des productions élevées de TNF α et d'IFN γ sont associées à des formes sévères de paludisme (McGuire *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995; Lyke *et al.*, 2004). Pour réguler ces réponses inflammatoires excessives des cytokines régulatrices (IL-10, TGF β) semblent intervenir. Ainsi, il a été montré que la capacité de produire de l'IL-10 par des cellules en contact avec un antigène de *Plasmodium* est associée à la résistance à *Plasmodium* (Kurtis *et al.*, 1999). En revanche, une production trop précoce de ces cytokines au cours de l'infection a plutôt un effet négatif puisque une induction de TGF β , tôt au cours du cycle érythrocytaire est associée à une croissance plus rapide du parasite (Walther *et al.*, 2005). Une régulation très fine de la production de cytokines est donc nécessaire pour l'acquisition d'une protection contre *Plasmodium*.

Si ces études menées chez l'homme ont permis de mettre en relation certains paramètres immunologiques avec la résistance ou la susceptibilité à *Plasmodium*, elles ne permettent pas d'expliquer directement quels sont les mécanismes de protection.

Etude de la réponse immune dans des modèles de malaria expérimentale

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de protection vis-à-vis de *Plasmodium*, la réponse anti-*Plasmodium* a été étudiée dans différents modèles chez la souris infectée par des espèces de parasite touchant spécifiquement les rongeurs (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, *P. yoelii*). Selon les modèles d'infection l'issue sera fatale ou non mais aucun modèle ne va permettre de reproduire toutes les caractéristiques de l'infection observées chez l'homme en terme de pathologie et de réponse immune (Li *et al.*, 2001).

Des études menées au cours du cycle hépatique ont montré que les mécanismes de protection peuvent faire intervenir les lymphocytes T CD8+, les NKT, les anticorps et des cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN γ (Doolan *et al.*, 1999; Oliveira-Ferreira *et al.*, 2001; Sano *et al.*, 2001; Schmiege *et al.*, 2003; Rathore *et al.*, 2005). Lors du cycle érythrocytaire, ce sont les lymphocytes T CD4+, les NKT, les NK, les lymphocytes B, les macrophages et l'IFN γ qui interviennent dans la protection (Kobayashi *et al.*, 2000; McGilvray *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Mannoor *et al.*, 2001; Mannoor *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). En revanche, les cellules CD4+CD25+ ont plutôt un rôle négatif (Hisaeda *et al.*, 2004). Comme c'est le cas chez l'homme, les études sur le cycle érythrocytaire ont montré que le contrôle de l'infection nécessite une modulation très fine de la réponse immune par les cytokines. Ainsi, en début d'infection est observée une réponse innée proinflammatoire : les cellules dendritiques activées produisent de l'IL-12 capable d'activer les NK, elles-mêmes productrices d'IFN- γ (Li *et al.*, 2001). Les cellules T $\gamma\delta$, les neutrophiles et les macrophages interviennent également à ce stade via notamment la production de facteurs directement ou indirectement toxiques pour le parasite, tels que l'IL-1 β , le TNF α , le NO ou encore des radicaux oxygénés (Malaguarnera *et al.*, 2002). Les cellules T CD4+ prennent alors le relais et participent au contrôle de l'infection par la production de cytokines Th1 (IFN- γ) puis Th2. Les cellules Th2 sont en effet cruciales pour le développement d'une immunité protectrice de part leur capacité à activer les cellules B productrices d'anticorps, elles-mêmes indispensables à l'élimination des parasites. Parallèlement, une réponse régulatrice, caractérisée notamment par la production des cytokines IL-10 et TGF β , possède un rôle essentiel dans la régulation des réponses Th1 proinflammatoires.

L'ensemble des études réalisées chez la souris a donc permis d'éclaircir les mécanismes de la réponse immune anti-*Plasmodium*. Cependant ces études ont toutes été réalisées sur des souris adultes et n'ont pas pris en considération le facteur de l'âge qui peut avoir un impact sur la progression de l'infection comme c'est le cas chez l'homme.

2- Le modèle d'infection palustre âge-dépendant chez le rat

Présentation du modèle

Afin de prendre en compte l'impact de l'âge sur l'issue de l'infection par *Plasmodium*, nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier les profils immunologiques observés en fonction de la susceptibilité / résistance âge-dépendante. Dans un premier temps, une étude comparative de l'infection dans les modèles souris et rat avec différentes souches de *Plasmodium* a permis de montrer que le modèle d'infection rat / *P. berghei* Anka était approprié pour l'étude des variations âge-dépendantes des paramètres immunologiques au cours de l'infection palustre. En effet, chez la souris BALB/c ou C57Bl/6 aucune évolution âge-dépendante de l'infection par *P. berghei* Anka n'a été observée : toutes les souris, quel que soit leur âge, succombent à l'infection entre J20 et J35, après avoir développé une parasitémie élevée, surtout dans le cas des BALB/c. Notons cependant que les souris C57Bl/6 âgées de 4 semaines présentent une mortalité plus rapide (J8-J9) que les adultes. D'après l'observation des signes cliniques, cette mortalité précoce peut être attribuée à un neuropaludisme.

En revanche, chez le rat Fischer infecté par *P. berghei*, nous avons observé une issue de l'infection dépendante de l'âge des animaux le jour de l'inoculation. Ainsi, les rats adultes de 8 semaines développent une faible parasitémie et vont se débarrasser du parasite en 3 semaines. Ils deviendront également protégés vis-à-vis de nouvelles infections par *Plasmodium* puisque lorsque ces rats seront réinfectés aucun parasite ne pourra être détecté dans le sang. Les rats jeunes de 4 semaines, quant à eux, développent une parasitémie très élevée, perdent plus de poids que les rats adultes et vont tous mourir dans un délai de 13 à 16 jours. Au cours de l'infection, les rats jeunes et adultes sont également fortement anémiés et présentent une importante splénomégalie.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-après publié en 2003 dans *Experimental Parasitology*.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Experimental Parasitology 104 (2003) 81–85

Experimental
Parasitologywww.elsevier.com/locate/yexpr

Research Brief

Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats

Christine Pierrot, Estelle Adam, Sophia Lafitte, Claude Godin,
Daniel Dive, Monique Capron, and Jamal Khalife*

Unité INSERM 547, IFR 17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof. Calmette, Lille 59019, France

Received 11 November 2002; received in revised form 3 June 2003; accepted 1 July 2003

Human malaria is a major public health problem in a number of developing countries. Despite significant progress in the knowledge of the disease as well as the availability of effective drugs, the global morbidity and mortality continue to be very high in children under 5 years of age (Baird, 1998; Miller et al., 1994; Murphy and Breman, 2001). From human immuno-epidemiological studies, it seems that the underlying pathophysiological determinants in children are still controversial. Part of limitation towards a more complete characterisation of immunological mechanisms according to the age of the host is the lack of suitable laboratory animal models. Interestingly, the use of rat model showed in pioneering experiments performed almost 50 years ago, that age profoundly influenced the peak parasitemia and mortality in rats infected with *Plasmodium berghei* (Singer et al., 1955; Zuckerman and Yoeli, 1954). In this model, it has been shown that parasitemia and survival to *P. berghei* infection were inversely related to the age of the rat (Smalley, 1975). Rats younger than 4 weeks had a mortality rate in excess of 90%, while rats over 7-week old were able to control the infection completely (Singer et al., 1955). Subsequently, it was demonstrated that the varying susceptibility of rats could not be only explained by the age-related availability of reticulocytes (Smalley, 1975).

Over the past several years, the use of resistant, susceptible, and genetically deficient mice, together with different *Plasmodium* strains allowed to dissect in depth immunological mechanisms in adult mice (for review Langhorne et al., 1989, 2002; Li et al., 2001; Taylor-Robinson, 1995). From these studies, it was clear that both cellular and humoral immune responses are required to control and clear blood parasites. Moreover, resistance can be transferred by spleen cells from adult infected mice to naïve adult mice, which may not necessarily be indicative of what is required in young animals. In this context, it is important to note that there are no clear studies reporting the effect of age on the course of malaria infection, mainly in infant or young mice. A previous work studying the effect of ageing on male mice showed that there is no influence on the outcome of a lethal infection by *P. berghei*, although the aged mice (12-month old) survived longer than the adult mice (12-week old) (Greenberg et al., 1953).

The aim of the present study was to investigate the effect of the age of mice on the course of malaria infection using a lethal strain of *P. berghei* ANKA (PbA), by following parasitological and clinical

parameters as well as mortality. Along the same line and using the same *Plasmodium* strain, we have evaluated the effect of the age of rats on the course of infection. For this purpose, male BALB/c mice and C57Bl/6J mice (known to develop experimental cerebral malaria) and Fischer F344 rats were purchased from Harlan, France. The age, body weight, and haemoglobin levels of mice and rats at the beginning of the experiments are listed in Table 1. All throughout the different experiments we used *P. berghei* ANKA (kind gift from I. Landau, Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France), which was adapted and maintained for at least three to four successive passages on C57Bl/6 mice, BALB/c mice, and F344 rats. First of all, preliminary experiments were done in order to determine the size of inoculum required to reach 100% mortality in the youngest animal group, allowing subsequently to follow up the infection according to the age of the host. Accordingly, different sizes of inoculum (10^4 , 10^5 , 10^6 , and 10^7 infected red blood cells) were tested and results showed that 10^6 infected red blood cells were lethal for 100% of both 4-week-old BALB/c and C57Bl/6 mice. However 10^7 infected red blood cells were required to be lethal in 4-week-old Fischer rats. Thus these inoculum sizes were used to follow up the outcome of infection, according to the age of host.

In BALB/c mice (Fig. 1, ■), analysis of blood smears in a kinetic study showed that there were no significant differences in the levels of parasitemia between the different groups of age (Figs. 1A–C). It is relevant to notice that there was no difference of parasitemia during the early phase of infection (<10 days post-infection) and that the peak of parasitemia appeared during the same period in all age groups tested. When C57Bl/6 mice were analysed (Fig. 1, ◇), we observed that parasitemia levels were much lower than those observed in BALB/c mice with a maximum of difference between days 12 and 20 post-infection. However, as can be seen in Figs. 1A–C, the different age groups of C57Bl/6 mice did not show any significant difference in their levels of parasitemia. From these results, it therefore appeared that there is no relation between the age of BALB/c or C57Bl/6 mice and parasitemia during PbA infection.

In order to document malarial disease, we investigated body weight changes, anaemia, and neurological symptoms. When analysing curves of body weight of infected animals in comparison to age-matched controls, we observed a loss of weight reaching 45% for the 4-week-old mice just before death in both strains of mice (data not shown). Although no clear relationship was noticed between body weight changes and age of either BALB/c or C57Bl/6 during infection, we did observe that loss of

* Corresponding author. Fax: +33-3-20-87-78-88.

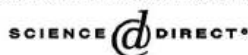
E-mail address: jamal.khalife@pasteur-lille.fr (J. Khalife).

Etude des réponses immunes âge-dépendantes au cours de l'infection

Disposant d'un modèle d'infection palustre dont l'issue est dépendante de l'âge, nous avons étudié les réponses immunes au cours de l'infection, dans le but de pointer d'éventuelles différences en fonction de l'âge. Pour cela, différents paramètres cellulaires et humoraux ont été étudiés chez des rats jeunes (4 semaines) et adultes (8 semaines). En effet, une différence des réponses IgG2c avait déjà été observée entre les rats de 4 / 6 semaines dans l'article précédemment présenté. D'autre part, la très forte splénomégalie observée au cours de l'infection, ainsi que le rôle connu de la rate dans la clairance parasitaire (Yap *et al.*, 1994; Alves *et al.*, 1996) nous ont orientés vers l'analyse des types cellulaires dans la rate.

Cette analyse a révélé que les rats jeunes ont une proportion plus importante d'IL-10 sérique et de cellules CD4+CD25+ dans la rate. En revanche, les rats adultes présentent des taux d'IgG2c spécifiques, isotype sous le contrôle de cytokines de type Th1 chez le rat, plus importants. Les rats adultes ont également une proportion plus importante de NK, NKT, lymphocytes B, lymphocytes T CD8+ et macrophages dans la rate.

Les résultats détaillés de cette analyse sont présentés dans l'article ci-après publié en 2003 dans *International Journal for Parasitology*.

Available online at www.sciencedirect.com

International Journal for Parasitology xx (2003) xxx–xxx

www.parasitology-online.com

The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses

Estelle Adam^a, Christine Pierrot^a, Sophia Lafitte^a, Claude Godin^a, Abdelhadi Saoudi^b,
Monique Capron^a, Jamal Khalife^{a,*}

^aINSERM U547, IFR 17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, France^bINSERM U563, Hôpital Purpan, Toulouse, France

Received 15 April 2003; received in revised form 16 June 2003; accepted 16 June 2003

Abstract

In this study, we investigated how the age of rats would affect the course of infection of and the immune response to *Plasmodium berghei*. Both young (4-week-old) and adult rats (8-week-old) can be infected with *P. berghei* ANKA strain, with significantly higher levels of infected red blood cells in young rats. While 100% of young rats succumbed to infection, adult rats were able to clear blood parasites and no mortality was observed. Analysis of cellular distribution and circulating cytokines demonstrated the persistence of CD4 + /CD25 + T cells and high expression of circulating interleukin-10 (IL-10) during the progression of infection in young-susceptible rats, whereas high levels of CD8 + T cells and natural killer T cells are detected in adult-resistant rats. Analysis of antibody isotypes showed that adult rats produced significantly higher levels of interferon- γ (IFN- γ)-dependent IgG2c antibodies than young rats during infection. Further evaluation of the role of IL-10, IFN- γ and of immune cells showed that only the adoptive transfer of spleen cells from adult-resistant rats was able to convert susceptibility of young-susceptible rats to a resistant phenotype. These observations suggest that cell-mediated mechanisms are crucial for the control of a primary infection with *P. berghei* in young rats.

© 2003 Published by Elsevier Ltd. on behalf of Australian Society for Parasitology Inc. All rights reserved.

Keywords: Rat; Malaria; Age; *Plasmodium berghei*; Cell-mediated immunity; Cytokine

1. Introduction

In humans, the outcome of malaria infection depends upon the parasite species, its genotypic and phenotypic characteristics, the host genetic susceptibility and immune status. Most of the morbidity and mortality occurs in children <5 years old, whereas adults living in endemic areas acquire protection against chronic exposure (Baird, 1998; Murphy and Breman, 2001). Previous work studying newly infected individuals showed that protective immunity develops more rapidly in adults than in children, a fact which could be related to different immune responses between children and adults (Baird, 1995). More recently, a relationship between puberty and resistance to *Plasmodium falciparum* has been observed (Kurtis et al., 2001). The observed age-related decrease in the frequency and density

of parasitaemia is greatest during or just after puberty (15–20 years old), however, this relationship is not apparent in the years just before puberty (12–14 years old). In children, severe infection with *P. falciparum* is frequently associated with hyperparasitaemia, severe anaemia, hypoglycaemia or cerebral malaria. The underlying pathophysiological determinants are still largely disputed. Evidence from children infected with *P. falciparum* suggests a major role for interferon- γ (IFN- γ) in protective immune responses against reinfection (Luty et al., 1999). However, subsequent work showed that an increase in proinflammatory cytokines (IFN- γ and tumour necrosis factor, TNF- α) and interleukin (IL)-10 correlates with disease severity (Perkins et al., 2001), raising again the question of the relative role of IFN- γ as well as TNF- α in protection and/or disease in infected children.

In experimental malaria, the most comprehensive work on immune responses has been carried out using adult mouse models. From these studies, it is clear that cellular and humoral-mediated responses are required to control

* Corresponding author. Tel.: +33-3-20-87-79-68; fax: +33-3-20-87-78-88.

E-mail address: jamal.khalife@pasteur-lille.fr (J. Khalife).

3- Comment protéger les rats jeunes ?

En s'appuyant sur les résultats obtenus lors de l'étude des paramètres immunologiques au cours de l'infection, plusieurs approches immunothérapeutiques ont été envisagées afin de protéger les rats jeunes. Le but était de tenter de convertir le profil de la réponse immune observé chez les rats jeunes susceptibles vers celui observé chez les rats adultes, afin de tester la participation ou non des différents marqueurs dans la protection.

Des approches décevantes...

Dans un premier temps, connaissant le rôle de l'IFN- γ et de la réponse humorale dans l'immunité protectrice contre *Plasmodium*, et sachant que chez le rat l'isotype IgG2c est sous contrôle de l'IFN- γ , il était tentant de s'intéresser à cette réponse IgG2c plus importante chez les rats adultes. Une première approche a donc consisté à administrer de l'IFN- γ recombinant aux rats jeunes infectés. Cependant, comme cela est présenté dans l'article précédent, bien qu'observant une augmentation des IgG2c spécifiques suite à l'administration d'IFN- γ , aucune variation de parasitémie ni de mortalité n'est observée en comparaison avec les rats jeunes contrôles. L'induction de la réponse IgG2c ne semble donc pas suffisante pour un contrôle de la parasitémie chez les rats jeunes ; de même, l'IFN- γ délivré en phase précoce de l'infection ne participe pas à ce contrôle par d'autres voies que la réponse IgG2c.

Une seconde caractéristique des réponses immunes observées chez les rats jeunes / adultes infectés par *P. berghei* est la présence d'une réponse régulatrice plus importante chez les rats jeunes. En effet, nous avons observé des taux d'IL-10 sérique importants et un maintien de l'augmentation des cellules CD4+CD25+ dans la rate jusqu'à la mort des animaux. Afin de tester si cette réponse régulatrice pouvait contribuer à la susceptibilité des rats jeunes, nous avons tenté de l'inhiber. Pour cela, nous avons neutralisé d'une part la production d'IL-10 par l'administration d'un anticorps polyclonal anti-IL10, et d'autre part les cellules CD4+CD25+ par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD25. Cependant, bien que ces traitements se soient révélés efficaces comme en témoignent les taux d'IL-10 (article Int. J. Parasitol.) et de cellules CD4+CD25+ (Fig. 7) chez les animaux traités, aucune variation de parasitémie ni de survie n'a été observée chez ces animaux.

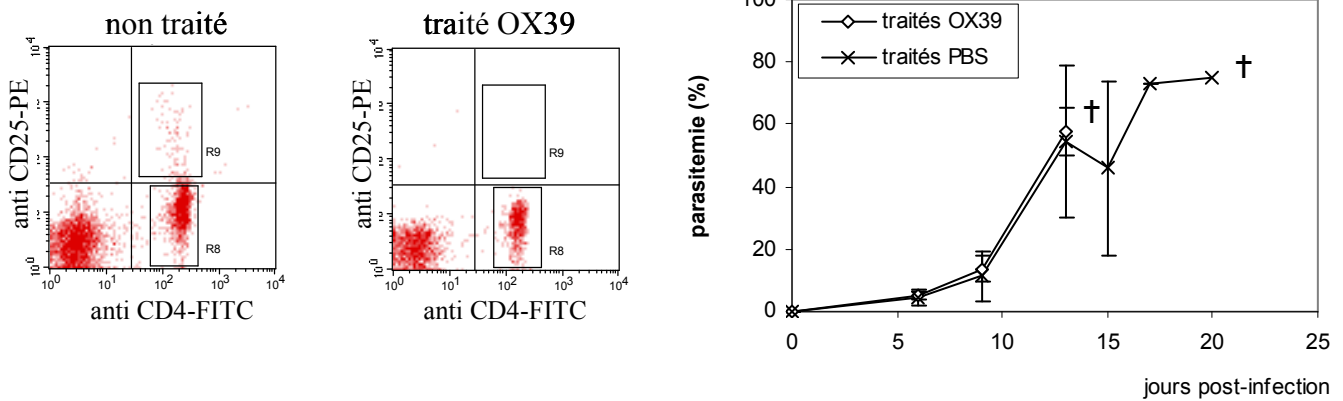


Figure 7. Evolution de l'infection par *P. berghei* chez des rats jeunes après administration d'un anti-CD25. Les rats jeunes ont reçu 4 x 1mg d'anticorps monoclonal anti-CD25 (clone OX39) par voie intra péritonéale à J-1, J2, J6 et J9 post infection. Les taux de cellules CD4+CD25+ dans le sang ont été analysés à J6 et J9 par cytométrie en flux.

La neutralisation des paramètres de la réponse immune régulatrice n'a donc pas permis de modifier l'issue de l'infection chez les rats jeunes. En ce qui concerne la neutralisation des cellules CD4+CD25+, notre observation va à l'encontre des travaux publiés chez la souris infectée par la souche létale de *P. yoelii*. En effet, Hisaeda et coll. ont montré par une approche identique, que la déplétion des cellules CD4+CD25+ dans ce modèle d'infection permettait aux souris de contrôler la parasitémie et d'échapper à la mort (Hisaeda *et al.*, 2004). Ces observations montrent que là encore, d'un modèle expérimental à l'autre, les résultats peuvent être totalement contradictoires, soulignant les précautions à prendre avant l'extrapolation à l'homme. Cependant, nos résultats nous ont conduits à une autre réflexion ; en effet, il est difficile d'imaginer que l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD25 ait pour seule conséquence la neutralisation des cellules CD4+ portant le marqueur CD25. De nombreuses autres cellules activées peuvent présenter ce marqueur, et notamment les cellules NK. Nous avons donc envisagé que notre traitement ait pu dépléter également in vivo d'autres cellules, potentiellement effectrices. Afin de tester cette hypothèse, nous avons reproduit ces administrations chez des rats adultes, afin d'observer une éventuelle aggravation des signes cliniques et parasitologiques. Cependant, bien que notre traitement ait été encore une fois efficace, aucune modification de parasitémie n'a été observée.

Dans notre modèle il semble donc que les cellules CD4+CD25+ ainsi que la forte production d'IL-10 soient plutôt des indicateurs d'un mauvais pronostic.

Avant d'éliminer totalement une possible intervention des anticorps IgG2c dans la protection et de l'IL-10 dans la susceptibilité, nous avons tenté de combiner les deux approches présentées ci-dessus, c'est-à-dire la neutralisation de l'IL-10 en même temps que

l'administration d'IFN- γ . Cependant, une fois encore les rats jeunes traités n'ont pas présenté la moindre variation de parasitémie par rapport aux contrôles (article Int. J. Parasitol.).

... aux approches plus concluantes : le rôle de la réponse cellulaire

Ayant eu peu de succès avec nos précédentes approches nous nous sommes tournés vers une approche cellulaire. En effet, dans l'analyse des réponses immunes observés chez les rats jeunes / adultes, nous avons également observé des différences dans la composition de la rate des animaux susceptibles / résistants. Ainsi les cellules B, T CD8⁺ et NKT sont présentes en quantités et proportions plus importantes dans les rates des rats adultes au cours de l'infection. Afin de tester le rôle de la réponse cellulaire dans la protection, nous avons choisi de transférer des cellules spléniques de rats adultes infectés à des rats jeunes, plutôt que de neutraliser ces cellules chez l'animal adulte.

Des expériences préliminaires de transfert de cellules marquées au CFSE nous ont conduits à choisir la voie intra-veineuse pour l'administration des cellules. En effet, lors d'un transfert par voie intra-péritonéale, les cellules transférées n'étaient pas détectées dans le sang des animaux, elles restaient au niveau du péritoine et disparaissaient très rapidement. Par la suite, nous avons réalisé des transferts de cellules spléniques de rats adultes infectés prélevées à J6 post infection. Cette démarche était motivée par la présence importante à J6 de cellules NKT chez ces rats adultes infectés. Cependant, les rats jeunes sains (contrôles) ayant reçu ces cellules ont développé une très forte parasitémie et ont tous succombé à l'infection. Les parasites contenus dans les cellules spléniques de rats adultes ont donc suffi à installer une infection chez ces rats jeunes, et ce malgré une très faible parasitémie sanguine observée chez les adultes à ce stade de l'infection (< 5%) et malgré la manipulation des cellules au cours de leur préparation avant d'être transférées.

Nous avons donc par la suite transféré des cellules spléniques obtenues à partir de rats adultes ayant résolu leur infection, c'est-à-dire obtenues à J25 post infection.

Ayant essayé plusieurs échecs auparavant, nous avons été très surpris (et contents !) de constater que les rats jeunes infectés par *P. berghei* ayant reçu, le jour de l'inoculation, 150M de cellules provenant de rats adultes débarrassés développaient une très faible parasitémie et contrôlaient parfaitement leur infection. Cette expérience a été reproduite depuis sur un total de 60 rats et seul 1 rat jeune receveur n'est pas parvenu à contrôler l'infection et a succombé. Parallèlement, des rats contrôles recevant des cellules spléniques provenant de rats adultes sains ont tous succombé à l'infection (n = 15). Cette observation

souligne que les cellules doivent être préactivées par le parasite pour pouvoir transférer une protection aux rats jeunes.

Forts de ces résultats, nous avons alors cherché à comprendre par quel(s) mécanisme(s) les rats jeunes receveurs étaient protégés.

Dans un premier temps, nous avons montré que la protection dépend du nombre de cellules transférées puisque 10 millions de cellules ne protègent pas les rats jeunes, 50 millions en protègent la moitié et à partir de 80 millions de cellules tous les rats survivent. D'autre part, le transfert de protection serait bien dû à un mécanisme cellulaire et non à certains composés ou produits cellulaires puisque les rats jeunes ayant reçu des cellules spléniques lysées de rats immuns sont toujours susceptibles suite à l'infection par *P. berghei*. Enfin, nous avons observé que les cellules de rats protégés conservent leur capacité à conférer la protection longtemps après une première infection, au minimum 100 jours après l'inoculation des parasites.

Afin d'éclaircir les mécanismes et de déterminer plus particulièrement les cellules impliquées dans le transfert de protection, nous avons combiné deux stratégies : d'une part des déplétion / enrichissement en certains types cellulaires avant transfert, et d'autre part une analyse transcriptomique des cellules spléniques capables de transférer la protection. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces expériences, présenté dans l'article ci-après (accepté pour publication dans *J. Immunol*), nous a conduits à montrer le rôle des cellules T et des neutrophiles dans le transfert de protection aux rats jeunes.

Contribution of T Cells and Neutrophils in Protection of Young Susceptible Rats from Fatal Experimental Malaria¹

Christine Pierrot,^{*} Estelle Adam,^{2*} David Hot,[†] Sophia Lafitte,^{*} Monique Capron,^{*} James D. George,[‡] and Jamal Khalife^{3*}

In human malaria, children suffer very high rates of morbidity and mortality. To analyze the mechanisms involved in age-dependent protection against malaria, we developed an experimental model of infection in rats, where young rats are susceptible to *Plasmodium berghei* and adult rats control blood parasites and survive thereafter. In this study, we showed that protection of young rats could be achievable by adoptive transfer of spleen cells from adult protected rats, among which T cells could transfer partial protection. Transcriptome analysis of spleen cells transferring immunity revealed the overexpression of genes mainly expressed by eosinophils and neutrophils. Evaluation of the role of neutrophils showed that these cells were able to transfer partial protection to young rats. This antiparasitic effect was shown to be mediated, at least in part, through the neutrophil protein-1 defensin. Further adoptive transfer experiments indicated an efficient cooperation between neutrophils and T cells in protecting all young recipients. These observations, together with those from *in vitro* studies in human malaria, suggest that the failure of children to control infection could be related not only to an immaturity of their adaptive immunity but also to a lack in an adequate innate immune response. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 1713–1722.

In human malaria caused by *Plasmodium falciparum* infection, there are at least 1–2 million deaths annually, mainly in children under the age of 5 years. To understand this age-related susceptibility and protection of humans to malaria infection, several epidemiological studies have addressed the issue of whether the immune response to malaria in children and adults is different. There may be several mechanisms potentially involved in immune hyporesponsiveness in young mice and humans, such as developmental immaturity of APCs thus influencing establishment of effective T cell-APC interactions (1, 2), incomplete signaling because of low expression of CD40L on T cells (3), and/or impaired responsiveness to TLR ligands leading to a lack of appropriate cytokine production (4). Whether these deficiencies are still present in 1- to 5-year-old infants has not yet been established.

Comparison of cell-mediated activity or circulating cytokine levels in children and adults in different areas of malaria transmission found Th1-like responses in childhood tending to a Th2-like response in adulthood (5–10). Similarly, analysis of IgG subclasses indicated a predominance of IgG1, IgG3, and IgE during adulthood, features of a Th2-like response (11–17). These studies

were conducted under conditions of chronic exposure to malaria, and there have been no studies characterizing immune responses in detail in children and adults after a primary exposure to malaria. However, in newly infected individuals, Baird (18) observed that protective immunity developed more rapidly in adults than in children.

In experimental malaria, the most extensive work on immune responses has been conducted using adult mouse models with no clear studies on the effects of age. From these studies, it appears that cellular and humoral responses are essential actors in the control and clearance of malaria parasites (for review, see Refs. 19–21). Analysis of cellular immunity demonstrated that CD4⁺ T cells (22–24) and B cells (22, 25) are associated with protection against malaria through the control of growth of blood parasite stages. Although there has been some controversy as to the function of NK T cells (26–29), it has been reported that NK cells play a crucial role during the early phase of infection (30–32). In a recent work, we showed that the mouse model was not suitable to study the effect of age on the course of malaria infection because different parasitological and clinical parameters were found age-independent (33). However the course and outcome of a primary infection in the rat was clearly dependent on age (33), where an increase in the number of CD8⁺ T cells and NK T cells was associated with the control of infection in adult rats. In contrast, high levels of circulating IL-10 and persistence of CD4⁺ CD25⁺ T cells were observed in young susceptible rats. *In vivo* neutralization of IL-10 or administration IFN- γ was unable to protect young infected rats from death (34). Nevertheless, susceptibility of young rats can be reversed by adoptive spleen cell transfer from immune adult rats, indicating that the cellular response present in the spleen of adult host after parasite resolution is capable of controlling infection in young host.

The studies reported here were designed to define in more detail the effector cells responsible for the transfer of protective immunity to young host, and to investigate the genes expressed in spleen cells of adult protected rats capable of transferring protection.

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 547, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; [†]Laboratoire des Biopuces, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; and [‡]GE Healthcare, Piscataway, NJ 08855

Received for publication March 29, 2006. Accepted for publication November 8, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 547 and Institut Pasteur de Lille. C.P. is a member of Institut Pasteur de Lille and J.K. is a member of Centre National de la Recherche Scientifique.

²Current address: Edois Pharma, Bioincubateur, Parc Barasarté, 70 rue du Dr Yessin, 59120 Loos, France.

³Address correspondence and reprint requests Dr. Jamal Khalife, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 547, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof. Calmette, 59019 Lille, France. E-mail address: jamal.khalife@pasteur-lille.fr

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/178-1713-10\$15.00

www.jimmunol.org

Protection des rats jeunes : quelques données complémentaires

Les résultats présentés précédemment nous montrent donc que la protection des rats jeunes par transfert serait obtenue grâce à deux types cellulaires. Dans un premier temps, les neutrophiles des rats adultes débarrassés participeraient au contrôle de la parasitémie en phase précoce, ensuite les cellules T interviendraient.

Avant de développer les projets découlant de ces observations il est nécessaire d'apporter quelques données complémentaires.

Rôle des cellules du receveur

Des expériences complémentaires réalisées sur des rats Nude ont montré que la protection n'est pas uniquement due aux cellules provenant des rats adultes. Les rats Nude sont des rats mutants athymiques présentant un faible taux de lymphocytes T extrathymiques. Quel que soit leur âge, les rats Nude succombent à l'infection par *P. berghei*, soulignant le rôle des cellules T dans la protection contre l'infection primaire. Nous avons donc tenté de les protéger grâce à un transfert de cellules spléniques totales provenant de rats Fischer débarrassés. Cependant, quelle que soit la dose de cellules administrée, aucune protection n'a été observée chez les rats Nude receveurs. Les cellules T du receveur sont donc indispensables pour l'obtention d'une protection par transfert. A ce stade, il est tentant d'imaginer qu'un dialogue s'établit entre les cellules du donneur et celles du receveur. Cet aspect de la question sera développé dans le chapitre Perspectives de ce mémoire.

Le transfert de protection n'est pas une exclusivité des cellules spléniques

Même si la rate est un organe central dans le contrôle de l'infection par *Plasmodium*, il n'en reste pas moins que les parasites évoluent principalement au niveau de la circulation sanguine, engendrant donc à ce niveau également des réponses immunes. Nous avons donc souhaité savoir si les cellules du sang (PBMC) de rats adultes protégés étaient capables, comme les cellules spléniques de transférer une protection aux rats jeunes susceptibles infectés par *P. berghei*. Ainsi, au cours d'une expérience nous avons observé que le transfert de 100 millions de PBMC à

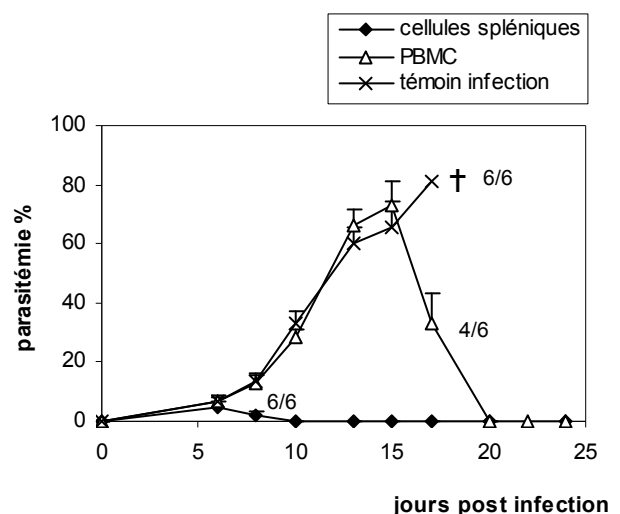


Figure 8. Parasitémie observée chez des rats jeunes infectés par *P. berghei* après transfert de cellules spléniques ou PBMC provenant de rats adultes protégés.

des rats jeunes leur permettait d'échapper à la mort, pour 4/6 d'entre eux. Cependant, au regard des parasitémies développées chez ces rats receveurs de PBMC, en comparaison à celle observée chez les receveurs de cellules spléniques (provenant des mêmes donneurs) il est clair que les mécanismes diffèrent (Fig. 8). En effet, avec les cellules totales on observe un contrôle très précoce de la parasitémie alors que les rats receveurs de PBMC développent une très forte parasitémie avant de parvenir à se débarrasser du parasite. Cette courbe de parasitémie observée chez les receveurs de PBMC n'est pas sans nous rappeler celle observée chez les receveurs de cellules T enrichies à partir de cellules spléniques, et il est intéressant de noter que l'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux a montré que les cellules T représentent 50% des PBMC.

Etude in vitro des cellules spléniques transférant la protection

Au cours du Master 2 d'Edith Bétry, nous avons tenté d'approcher par quels mécanismes les cellules spléniques et plus particulièrement les cellules T confèrent une protection aux rats jeunes. Pour cela, nous avons analysé in vitro l'activation des cellules spléniques de rats adultes protégés totales et enrichies en cellules T, ainsi que leur capacité à être activée par différents mitogènes tels que la ConA, le LPS et l'anti-CD3. Nous n'avons pas utilisé d'antigènes de *P. berghei* pouvant le mieux reproduire la réponse des cellules face à une infection par *Plasmodium*, car les antigènes de *P. berghei* ne parviennent pas à stimuler in vitro les cellules spléniques provenant de rats ayant déjà été en contact avec le parasite. Une immunosuppression provoquée par le parasite pourrait expliquer cette observation. Dans cette étude, nous avons analysé la prolifération des cellules, la sécrétion de cytokines ainsi que l'expression de marqueurs d'activation, les contrôles étant constitués de cellules spléniques provenant de rats sains de même âge. Aucune différence de prolifération n'a été observée entre les cellules transférant la protection et les cellules contrôles. Concernant la production de cytokines, il est à noter que les cellules T enrichies possèdent une très grande capacité à produire de l'IL-10 après stimulation par l'anti-CD3, supérieure à celle observée au niveau des cellules totales. Une production importante d'IFN- γ est également observée. Cependant, pour l'une comme pour l'autre de ces cytokines, aucune différence de production par rapport aux cellules contrôles n'a pu être montrée. Cependant, les cellules de rats adultes protégés présentent une inhibition de la production de TNF α par rapport aux contrôles, cette inhibition étant également retrouvée au niveau des cellules T enrichies. Le TNF α ne jouerait donc pas de rôle dans le transfert de protection, au contraire, un contrôle de la production de TNF α pourrait être nécessaire afin d'éviter des réactions inflammatoires excessives.

L'étude de l'expression des marqueurs d'activation sur les cellules T a montré que le potentiel effecteur des cellules T de rats protégés est beaucoup plus élevé que celui des

cellules T contrôles. On observe en effet une proportion plus importante de cellules ayant un phénotype effecteur CD4+OX40+CD25- et une proportion moins importante de cellules ayant un phénotype régulateur CD4+CD25+ (Fig. 9). L'OX40 étant impliqué dans la différenciation des cellules T en cellules effectrices, il serait intéressant d'étudier le rôle des cellules T OX40+ dans le transfert de protection aux rats jeunes, mais également dans la protection des rats adultes. Ce projet, ainsi que quelques données bibliographiques sur l'OX40, sont repris dans la partie Perspectives de ce mémoire.

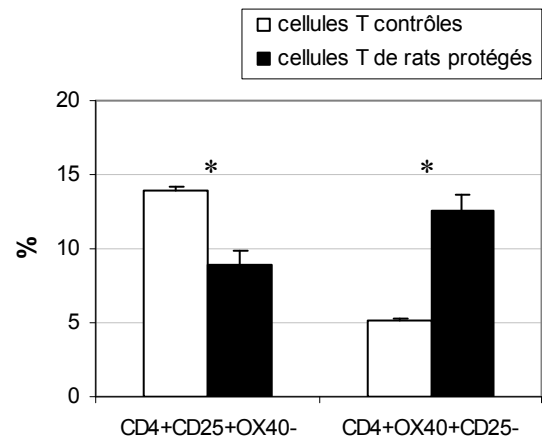


Figure 9. Proportion en % de cellules ayant un phénotype effecteur et régulateur au sein des cellules T enrichies à partir de cellules spléniques de rats adultes protégés ou de rats adultes sains ; moyenne + sem (n = 5). * p<0.02

4- Perspectives

Les différents travaux présentés dans cette seconde partie nous montrent donc le rôle des mécanismes cellulaires dans le transfert de protection aux rats jeunes susceptibles à *P. berghei*. Cependant à ce stade, deux questions majeures persistent : d'une part, quelle est la nature exacte des mécanismes à la base du transfert de protection, et d'autre part, pourquoi les rats jeunes sont-ils susceptibles à l'infection par *P. berghei*. Pour ce qui est de la première question, nous avons doré et déjà plusieurs pistes, celle des neutrophiles et des cellules T du donneur, sans oublier les cellules T du rat receveur. En ce qui concerne la seconde question, une analyse transcriptomique réalisée chez les rats jeunes et adultes au cours de l'infection doit nous permettre d'orienter nos recherches. Parallèlement, au regard des déficiences du système immunitaire du nouveau né décrites chez l'homme, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse selon laquelle la susceptibilité des rats jeunes pourrait s'expliquer par un dysfonctionnement conduisant à une incapacité à monter une réponse efficace. Organisés selon ces différentes pistes, nos projets de recherche vont donc tenter de répondre à ces deux grandes questions.

4.1- Quels sont les mécanismes à la base du transfert de protection aux rats jeunes ?

Rôle des neutrophiles

Nous avons montré que les neutrophiles de rats adultes protégés étaient capables de transférer partiellement une protection aux rats jeunes susceptibles, via notamment l'action d'un peptide anti-microbien, la défensine. Cependant, il est surprenant d'observer que les neutrophiles doivent avoir été en contact avec le parasite pour transférer la protection. En effet, les neutrophiles de rats adultes sains confèrent une protection nettement inférieure à celle observée avec ceux de rats ayant résolu leur propre infection par *P. berghei*. Or traditionnellement, les neutrophiles sont considérés comme des cellules effectrices participant à l'immunité innée non spécifique, du fait notamment de leur capacité à reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes (ou PAMP pour pathogen-associated molecular pattern) via des récepteurs invariants. Cependant, les

neutrophiles possèdent également de nombreuses propriétés nécessaires pour remplir un rôle dans l'établissement de l'immunité acquise (Ishikawa *et al.*, 2005). Ainsi, sous certaines conditions de stimulation, ces cellules peuvent synthétiser des cytokines telles que l'IL-1, le TNF α , l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF. De plus, les neutrophiles expriment de façon constitutive le CMH de classe I et après exposition au GM-CSF, à l'IFN- γ ou à l'IL-3, ils peuvent également exprimer le CMH de classe II et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Fanger *et al.*, 1997). Les neutrophiles peuvent donc agir comme des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Grâce à des protéases lysosomales ils peuvent 'processer' les antigènes et les présenter aux cellules TCD4+. De plus, la présence de cytokines pro-inflammatoires sur le site d'inflammation prolonge la durée de vie des neutrophiles, connue pour être très courte, en inhibant leur apoptose. En outre, il a été montré que les neutrophiles contribuent également à la mise en place des réponses immunes acquises par un phénomène de 'cross-présentation' : les neutrophiles ayant phagocyté des microorganismes finissent par mourir par apoptose ; les cellules dendritiques sont alors capables d'acquérir les fragments de pathogènes provenant des neutrophiles apoptotiques afin de les présenter aux cellules T. Ce phénomène a notamment été décrit dans un modèle d'infection par *Listeria monocytogenes* où les neutrophiles péritonéaux de souris infectées pouvaient servir de substrat pour une cross-présentation *in vitro* d'antigènes bactériens aux cellules T CD8+ par les cellules dendritiques (Tvinnereim *et al.*, 2004). De plus, Maletto *et coll.* ont observé, après immunisation de souris par l'ovalbumine au niveau des coussinets plantaires, la présence de neutrophiles chargés par l'antigène au niveau des ganglions lymphatiques ; ces auteurs démontrent ainsi que les neutrophiles peuvent capturer un antigène en périphérie et le transporter jusqu'aux organes lymphoïdes, ce qui contribuerait au maintien de la réponse immune (Maletto *et al.*, 2006).

Très récemment, les bases moléculaires du rôle des neutrophiles dans l'immunité acquise ont été étudiées par Puellmann *et coll.* ; ces auteurs ont observé qu'une sous population de neutrophiles humains, représentant 5 à 8% des neutrophiles périphériques, exprime un récepteur T $\alpha\beta$ à leur surface (Puellmann *et al.*, 2006). De plus, ces neutrophiles possèdent les recombinaisons RAG1 et RAG2 nécessaires pour assurer une diversité du répertoire T. Enfin, l'engagement du TcR à la surface des neutrophiles par la voie du CD3/CD28 augmente l'expression de Bcl-xL, protégeant ainsi la cellule de l'apoptose. Les neutrophiles possédant le TcR pourraient donc participer à une réponse antigène-spécifique et au recrutement d'autres neutrophiles sur le site d'inflammation. Dans notre modèle de protection conférée par le transfert de neutrophiles de rats adultes protégés, on peut donc imaginer que de tels neutrophiles 'spécifiques' contribuent au contrôle très précoce observé chez les rats jeunes receveurs.

Cependant, nous avons montré que les cellules T du donneur, mais également du receveur, étaient aussi indispensables pour une protection de la totalité des rats jeunes receveurs. Dans ce contexte, nous proposons d'étudier le mécanisme par lequel les neutrophiles confèrent la protection, et notamment le rôle d'éventuels neutrophiles 'spécifiques' ainsi que la part du dialogue entre neutrophiles et cellules T du donneur et du receveur.

Dans un premier temps, nous tenterons de mettre en évidence au sein de notre population de neutrophiles transférant la protection, la présence de neutrophiles exprimant le récepteur T. Cette analyse sera réalisée par cytométrie en flux, et pourra être complétée par une approche de Q-PCR. Si nous observons effectivement cette sous-population, nous pourrions la purifier et procéder à des stimulations *in vitro* avec l'antigène de *Plasmodium* et/ou une association anti-CD3 et anti-CD28, afin de mesurer l'activation de ces neutrophiles. Cette étude sera menée en parallèle sur des neutrophiles de rats adultes sains. Le rôle *in vivo* de cette sous-population dans le transfert de protection pourra également être évalué par déplétion des neutrophiles TcR+ avant transfert aux rats jeunes.

Dans un second temps, nous étudierons *in vitro* la coopération entre neutrophiles et cellules T par des systèmes de co-culture. Plus particulièrement, nous mesurerons la capacité des neutrophiles à activer les cellules T du receveur. Dans une première série d'expériences, nous avons pu observer que les neutrophiles de rats adultes protégés étaient capables de faire proliférer les cellules T du receveur et d'induire l'expression du marqueur OX40 à leur surface. Ces premiers résultats démontrent bien qu'un dialogue s'établit entre ces deux types cellulaires.

La combinaison de ces approches doit donc nous permettre d'approfondir le rôle des neutrophiles dans la protection des rats jeunes.

Rôle de l'OX40

Outre la démonstration d'un dialogue entre neutrophiles et cellules T, les résultats préliminaires exposés ci-dessus pointent une fois encore l'OX40. En effet, nous avons déjà observé que les cellules T capables de transférer partiellement la protection présentaient une expression plus importante de l'OX40 que les cellules contrôles; il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ces cellules T OX40+ dans le transfert de protection aux rats jeunes, d'une part, mais également dans la protection du rat adulte lors de l'infection primaire.

Quelques généralités sur l'OX40

L'OX40 ou CD134 est un membre de la super famille des récepteurs au TNF, exprimé transitoirement sur les cellules T 24 à 48h après la ligation du TCR. Initialement l'OX40 a été défini comme étant la cible d'un anticorps monoclonal, nommé OX40 également, produit, comme beaucoup d'anticorps monoclonaux chez le rat, par l'Université d'Oxford après injection à des souris de blastocytes T de rat activés (Paterson *et al.*, 1987). Par la suite, le ligand de l'OX40, nommé GP34 puis OX40-ligand (ou OX40L ou CD134L) a été identifié et plusieurs études ont montré qu'il était exprimé principalement par les cellules présentatrices d'antigène activées telles que les cellules B, les cellules dendritiques, les macrophages, mais aussi par les cellules T et les cellules endothéliales. De nombreuses études sur les réponses T primaires ont montré que la ligation de l'OX40 avec son ligand était nécessaire pour un fonctionnement optimal des cellules T ; en particulier, l'engagement séquentiel du CD28 puis de l'OX40 augmente l'expansion clonale et la différenciation des cellules T et prolonge leur durée de vie. Le nombre de cellules T mémoire généré à l'issue de la réponse immune primaire se trouve donc également augmenté. De plus, l'OX40 intervient au niveau de la réactivation des réponses mémoires (Salek-Ardakani *et al.*, 2006).

L'OX40 caractérisé à l'origine comme un marqueur d'activation est donc également une molécule costimulatrice dont les différentes propriétés en ont fait, ces dernières années, une cible immunothérapeutique de choix. Ainsi, le blocage *in vivo* de l'OX40 au cours de maladies auto-immunes telles que diabète et EAE (experimental allergic encephalomyelitis) ou au cours de pathologies allergiques et inflammatoires, conduit à l'inhibition des réponses T spécifiques d'auto-antigènes ou d'allergènes récemment activées, permettant ainsi une diminution de la pathologie, sans pour autant aboutir à une immunosuppression générale (Weinberg *et al.*, 1999; Endl *et al.*, 2006). Ces propriétés immunosuppressives ont été également utilisées dans des modèles de transplantation (Vu *et al.*, 2006). Inversement, la ligation de l'OX40 dans des modèles de tumeurs augmente l'immunité anti-cancéreuse aussi bien vis-à-vis de la tumeur primaire que des métastases (Pan *et al.*, 2002). En outre, Weinberg *et al.* ont observé que des souris traitées via la ligation de l'OX40 deviennent résistantes à la tumeur primaire mais pas à des tumeurs d'autre origine ; ces résultats montrent qu'une mémoire T spécifique de la tumeur primaire s'établit (Weinberg *et al.*, 2000). Afin de mieux comprendre le rôle de l'OX40 dans ces différentes situations pathologiques, plusieurs auteurs se sont attachés à étudier les conséquences moléculaires et biologiques de l'engagement de l'OX40 (Figure 10). Ainsi, il a été montré que la ligation de l'OX40 augmente la survie cellulaire via notamment l'augmentation de l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl (Bcl-xL, Bcl-2) (Rogers *et al.*, 2001). Une autre approche a montré qu'en absence de costimulation via l'OX40 (souris déficientes), la durée de vie des cellules T CD4⁺ activées est diminuée du fait que l'activité de la protéine kinase B (PKB ou

Akt) n'est pas maintenue dans le temps (Song *et al.*, 2004). La PKB est en effet impliquée dans la régulation des fonctions des cellules T telles que la survie ou la production de cytokines. Afin de disséquer les événements moléculaires consécutifs à la ligation de l'OX40, Weinberg et coll. ont réalisé une analyse transcriptomique sur des cellules T CD4⁺ spécifiques d'antigène après engagement de l'OX40 (via l'administration d'un anticorps anti-OX40) (Weinberg *et al.*, 2004). Ainsi, ils ont montré notamment une diminution de l'expression du gène codant pour CTLA-4 (ou CD152). Or CTLA-4 est une molécule de costimulation exprimée par les cellules T, dont la ligation avec les molécules B7 (CD80 et/ou CD86) à la surface des cellules présentatrices d'antigène a pour conséquence une inhibition des réponses T (Chambers *et al.*, 2001). La diminution de l'expression de CTLA-4 pourrait donc expliquer la rupture de tolérance observée lors de la ligation de l'OX40 (Bansal-Pakala *et al.*, 2001).

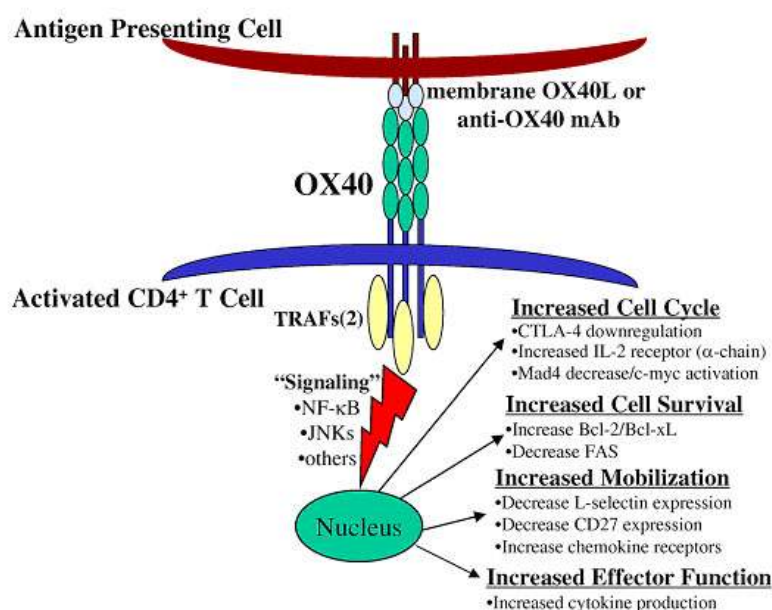


Figure 10. Modélisation des événements moléculaires et cellulaires suite à la ligation de l'OX40 (d'après Weinberg, 2004).

En outre, parallèlement aux conséquences directes de la ligation de l'OX40, il a été montré que cette molécule contrôlait également l'immunosuppression due aux cellules T régulatrices (Treg). En effet, lorsque l'OX40 est exprimé par les cellules régulatrices, son activation via un anticorps agoniste inhibe les fonctions suppressives de ces Treg et restaure la prolifération des cellules T effectrices ainsi que leur production de cytokines *in vitro*. Ainsi, dans un modèle de transplantation de moelle osseuse, Vazasina et al. ont montré que la suppression médiée par les Treg était totalement inhibée en présence d'anticorps anti-OX40 agoniste (Valzasina *et al.*, 2005). L'OX40 intervient donc au niveau des fonctions des Treg, mais également inhibe la génération des Treg productrices d'IL-10 (Tr1) (Ito *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces travaux démontre que l'OX40 est directement impliqué dans la régulation de l'immunité. Cependant, de façon surprenante, peu d'études se sont consacrées au rôle de l'OX40 dans les maladies infectieuses en général, encore moins en ce qui concerne les infections parasitaires. Zubairi et coll. ont cependant développé une thérapie utilisant les propriétés immunostimulantes de l'OX40 dans un modèle de leishmaniose viscérale (Zubairi *et al.*, 2004). Dans cette infection, l'enjeu d'une intervention immunothérapeutique réside dans la difficulté à augmenter les fonctions effectrices et le développement du granulome, sans toutefois induire une inflammation trop importante. Les auteurs ont ainsi montré que l'administration d'une protéine de fusion chimère OX40-Fc ou d'un anticorps monoclonal bloquant anti-CTLA-4 permettait d'augmenter la maturation du granulome et ses fonctions effectrices sans induire de dommages tissulaires.

Etude du rôle de l'OX40 dans la malaria expérimentale du rat

Dans notre modèle de malaria expérimentale dépendant de l'âge, différents résultats nous conduisent à nous intéresser au rôle de l'OX40 dans la protection. Nous avons déjà discuté du potentiel effecteur des cellules T capables de transférer la protection aux rats jeunes, reflété par l'expression de l'OX40 (cf. Fig. 9). De plus, une analyse des populations cellulaires mononuclées du foie au cours de l'infection par *Plasmodium* en fonction de l'âge nous a permis d'observer une très nette augmentation en nombre et en pourcentage des cellules T CD4+OX40+ à J7 post infection chez les rats adultes. Cette augmentation n'est pas observée chez les rats jeunes.

Par la suite, nous allons dans un premier temps poursuivre et compléter l'analyse de l'expression de l'OX40 mais aussi de son ligand OX40L à la surface des cellules du foie, des cellules spléniques et des PBMC au cours de l'infection des rats jeunes / adultes par *P. berghei*. Nous pouvons nous attendre à observer une augmentation au cours de l'infection, traduisant l'activation des cellules. Si, comme c'est le cas au niveau du foie, nous observons une activation supérieure chez les rats adultes, nous envisageons d'inhiber in vivo la liaison OX40-OX40L au cours de l'infection des rats adultes par l'administration d'un anticorps anti-OX40L bloquant. L'évaluation de la parasitémie nous permettra de mesurer la participation de cette liaison dans la protection. De plus, nous pourrions purifier les cellules T OX40+ de rats jeunes / adultes afin de comparer in vitro leur capacité à proliférer et à synthétiser des cytokines en réponse notamment à l'antigène de *Plasmodium*, mais aussi après stimulation par un anticorps anti-OX40 en comparaison avec la voie classique CD3/CD28.

Parallèlement, nous étudierons le rôle des T OX40+ provenant de rats adultes débarrassés dans le transfert de protection aux rats jeunes. Pour cela, différentes approches sont envisagées : d'une part le transfert de cellules T OX40+ purifiées, et d'autre part le transfert

de cellules T ou cellules spléniques totales conjointement à l'administration d'un anticorps anti-OX40L, afin de bloquer cette voie.

Dans le même temps, connaissant les rôles opposés de l'OX40 et du CTLA-4, il sera intéressant d'analyser l'expression de ce marqueur à la surface des cellules T et d'évaluer son rôle dans la susceptibilité des rats jeunes par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 bloquant.

L'ensemble de ces approches, à la fois *in vivo* et *in vitro*, sur les neutrophiles et les cellules T doit nous permettre une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la protection au cours de la malaria expérimentale du rat. Cependant, même si les rôles des neutrophiles et des T OX40+ ont été présentés comme projets séparés, les deux approches sont complémentaires, voire même intimement liées ne serait-ce que du fait qu'il a été montré que les neutrophiles sont capables d'exprimer l'OX40 à leur surface (Baumann *et al.*, 2004).

4.2- Pourquoi les rats jeunes sont-ils susceptibles à l'infection palustre ?

Cette vaste question en contient en fait au moins deux : d'une part quels sont les mécanismes qui conduisent à la mort des rats jeunes infectés par *Plasmodium*, et d'autre part, quel(s) défaut(s) présentent les rats jeunes à l'état basal par rapport aux rats adultes, pouvant contribuer à la susceptibilité.

Dans l'optique de déceler des mécanismes conduisant à la mort, nous avons réalisé une analyse des variations des transcriptomes chez les rats jeunes susceptibles et adultes résistants infectés par *P. berghei*.

Cette approche a été utilisée par Schaecher et coll. chez des souris adultes infectées par les souches létale et non létale de *P. yoelii* (Schaecher *et al.*, 2005). Ces auteurs ont observé l'expression différentielle de plusieurs gènes au niveau de la rate des animaux infectés, en fonction de la souche de *Plasmodium* utilisée, conduisant à une issue létale ou non. Ainsi, une augmentation très importante de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la glycolyse est observée en phase précoce de l'infection ; puis, alors que cette expression est maintenue chez les souris infectées par la souche létale, elle stagne chez les souris infectées par la souche létale. Inversement, en phase précoce une diminution de

l'expression des gènes associés à l'érythropoïèse est observée ; on assiste ensuite, uniquement chez les souris infectées par la souche non létale, à une augmentation très importante de l'expression de ces gènes. Ces variations de l'expression des gènes de la glycolyse et de l'érythropoïèse ont été également observées chez des souris infectées par *P. berghei* (Sexton *et al.*, 2004). Chez l'homme, une étude réalisée sur les PBMC d'enfants Kenyans infectés par *P. falciparum* a révélé une augmentation de l'expression des gènes associés à la fonction des neutrophiles et des gènes associés à l'érythropoïèse. Cette dernière observation, contradictoire avec les résultats décrits chez la souris, pourrait être expliquée notamment par la différence entre les compartiments étudiés et la souche de *Plasmodium*, et soulève le problème de l'extrapolation du modèle à la situation chez l'homme (Griffiths *et al.*, 2005).

Dans notre modèle, l'étude des variations des transcriptomes des cellules spléniques de rats jeunes au cours de l'infection, par rapport à des cellules spléniques de rats sains de même âge, a permis de mettre en évidence 24 gènes dont l'expression est augmentée et 81 gènes dont l'expression est diminuée chez les rats jeunes infectés, à J13 après l'infection, c'est-à-dire juste avant la mort de ces animaux. Une analyse poussée de ces résultats, comprenant avant tout la confirmation par Q-PCR des variations observées, en comparaison avec les rats sains mais aussi avec les rats adultes infectés, doit nous permettre de pointer les mécanismes conduisant à la mort des rats jeunes. Nous tenterons ainsi de mettre en évidence d'éventuelles réponses suppressives et/ou effectrices déficientes chez les rats jeunes, dans le but de les contourner et/ou de les inhiber. Dans ce sens, si l'analyse transcriptomique nous permet d'identifier un ou plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la susceptibilité/résistance, une stratégie d'inhibition ou induction sera envisagée.

Une autre hypothèse pourrait nous conduire vers des éléments de réponse quant à la susceptibilité des rats jeunes : ces rats jeunes succomberaient à l'infection palustre du fait d'un dysfonctionnement âge-dépendant dans l'établissement d'une réponse immune efficace. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses études montrant une telle déficience chez les nouveaux nés, due à une immaturité du système immunitaire.

Chez les nouveaux nés l'immaturité du système immunitaire s'observe à plusieurs niveaux. Tout d'abord d'un point de vue structural des différences peuvent être observées, notamment au niveau de la rate. En effet, les centres germinatifs n'apparaissent qu'à l'âge de 3 ou 4 semaines et les follicules contenant les lymphocytes B qu'à l'âge de 2 semaines (Marshall-Clarke *et al.*, 2000). Des différences s'observent également au niveau la composition cellulaire chez la souris, puisqu'à la naissance peu de cellules dendritiques et

de lymphocytes T sont observés dans la rate (Marshall-Clarke *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2003). En plus de ces différences structurales, une immaturité a été observée au niveau des cellules du système immunitaire inné et adaptatif, conduisant à une immaturité fonctionnelle. Ainsi, les neutrophiles de nouveaux nés présentent de nombreux défauts, aussi bien au niveau quantitatif, que qualitatif, influençant directement leur capacité à neutraliser une infection ; ces défauts incluent des défauts d'adhérence, de migration, de chimiotactisme et de phagocytose (Koenig *et al.*, 2004). Les cellules dendritiques de nouveaux nés expriment quant à elles de façon réduite le CMH de classe II et les molécules costimulatrices CD86 et CD40, alors qu'en parallèle l'expression des ligands correspondants est réduite sur les cellules T (Morein *et al.*, 2002). Les lymphocytes B pouvant également faire office de cellules présentatrices d'antigène, présentent également des caractéristiques immatures chez les nouveaux nés : après une activation passant par le récepteur B, il n'y a qu'une faible augmentation de CMHII et une absence de CD86 (Marshall-Clarke *et al.*, 2000). L'expression réduite de ces molécules à la surface des cellules présentatrices d'antigène entraîne une diminution de l'interaction entre ces cellules et les cellules T et conduit donc à une diminution de la capacité à présenter l'antigène chez les nouveaux nés. L'interaction réduite entre les cellules T et cellules B pourrait également entraîner le défaut de production d'anticorps observé chez l'homme. En effet, la production d'IgG et d'IgA est relativement faible dans les 12 premiers mois de la vie en réponse à des infections bactériennes et virales. A ceci s'ajoute un défaut de séroconversion chez les nouveaux nés qui se traduit par une prédominance des IgM (Siegrist, 2001).

L'immaturité fonctionnelle observée chez les nouveaux nés se traduit également par un défaut des cellules immunes à répondre à certains activateurs conservés tels que les PAMPs (motifs moléculaires conservés chez les pathogènes) et notamment le LPS. Ainsi, plusieurs travaux ont rapporté une production diminuée de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α ou INF- γ) par les macrophages, monocytes ou cellules dendritiques myéloïdes de nouveaux nés, après stimulation par le LPS (Chelvarajan *et al.*, 2004; Drohan *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2004). Une controverse existe quant à l'attribution ou non de cette observation à une expression réduite des récepteurs correspondants (Toll Like Receptor (TLR)2, TLR4 et CD14 membranaire). Cependant, il semble que, à niveau d'expression des TLR et CD14 équivalent, le défaut de production de TNF α par les PBMC soit lié, soit à une diminution de l'expression de MyD88, molécule adaptatrice impliquée dans la signalisation intracellulaire des TLR, soit à une capacité moindre à relarguer le TNF α (Levy *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2004; Levy, 2005).

Des différences expliquant l'immaturité du système immunitaire s'observent donc à tous les niveaux aussi bien structural, phénotypique et fonctionnel que lors des réponses innées et

adaptatives. Ces différences pourraient donc expliquer la grande sensibilité des enfants et des nouveaux nés aux infections et notamment au paludisme.

Dans ce contexte, nous proposons d'étudier les réponses immunes cellulaires et humorales chez le rat en fonction de l'âge. Pour cela, plusieurs approches seront mises en œuvre.

Dans un premier temps, nous étudierons à l'état basal, chez des rats sains âgés de 4 / 8 semaines, la composition cellulaire et le phénotype de différents types cellulaires connus pour participer à l'établissement des réponses immunes. L'expression de certains gènes dont les protéines correspondantes jouent un rôle dans la reconnaissance des pathogènes, à savoir les TLR, sera également évaluée par Q-PCR. En particulier, nous serons attentifs aux variations d'expression des TLR2, TLR4 et TLR9 du fait de leur rôle dans les réponses immunes dans le paludisme. En effet, Krishnegowda et coll. ont montré que le TLR2 et, dans une moindre mesure, le TLR4 sont impliqués dans la reconnaissance des glycosylphosphatidylinositols de *P. falciparum*, facteurs contribuant à la pathogénèse (Krishnegowda *et al.*, 2005). De plus, récemment, des polymorphismes observés dans les TLR4 et TLR9 ont été associés à des risques de malaria sévère chez l'enfant et à des manifestations cliniques de malaria chez la femme enceinte, démontrant le rôle de ces TLR dans la réponse immune à l'infection (Mockenhaupt *et al.*, 2006a; Mockenhaupt *et al.*, 2006b). Enfin, Coban et coll. ont démontré que l'hémozoïne, polymère hydrophobe d'hème généré par la digestion de l'hémoglobine de l'hôte par le parasite, était un ligand pour le TLR9 (Coban *et al.*, 2005).

Cette approche ciblée pourra être complétée par une approche plus globale d'étude des variations de transcriptome chez les rats sains en fonction de l'âge. Au niveau fonctionnel, nous mesurerons *in vitro* la capacité d'activation cellulaire en fonction de l'âge. Plus particulièrement, nous étudierons l'activation des cellules spléniques de rats jeunes / adultes après stimulation avec les ligands de TLR en comparaison avec des mitogènes à large spectre. L'activation cellulaire sera mesurée en termes de prolifération, de sécrétion de cytokines et d'expression de marqueurs d'activation membranaires. Cette étude sera menée tout d'abord sur des cellules spléniques totales, puis nous tenterons de cibler les populations à l'origine des différences observées.

Des expériences préliminaires ont révélé que les cellules spléniques de rats adultes présentent une plus grande capacité à proliférer que celles de rats jeunes, et ceci, quel que soit le stimulus utilisé. De même, nous observons une production supérieure d'IFN- γ par les cellules spléniques de rats adultes, après une stimulation par l'anti-CD3. Inversement, après stimulation par le LPS (ligand du TLR4), les cellules de rats jeunes produisent plus d'IFN- γ que celles de rats adultes. La même différence est observée pour la production de TNF α suite à une stimulation via le TLR4 et le TLR9. Ces résultats semblent contradictoires avec

ce qui est connu chez l'homme. Cependant ces études (présentées ci-dessus) ont été réalisées chez les nouveaux nés sur des cellules de sang de cordon. Or les rats de 4 semaines seraient assimilés plutôt à des jeunes enfants (pré-pubères) qu'à des nouveaux nés. Si dans un premier temps nous avons limité notre étude aux rats âgés de 4 / 8 semaines du fait de leur comportement différent lors de l'infection palustre, il serait malgré tout intéressant de l'élargir aux rats nouveaux nés, afin de comparer nouveaux nés, enfants et adultes. En outre, la différence de production d'IFN- γ observée suite à la stimulation par un anti-CD3 ou par le LPS nous incite à travailler sur des populations cellulaires ciblées.

Par la suite, si nous confirmons les différences observées entre rats jeunes et adultes à l'état basal, nous évaluerons leur rôle dans la susceptibilité / résistance au cours de l'infection palustre en tentant de 'corriger' ces différences. Dans ce sens, nous envisageons d'analyser le rôle des hormones sexuelles à la fois à l'état basal et au cours de l'infection par *P. berghei*.

Conclusion

Bien que faisant l'objet de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales, les réponses immunes observées au cours du paludisme soulèvent toujours de nombreuses questions, surtout lorsque l'on s'adresse aux variations dépendantes de l'âge.

Notre modèle d'infection expérimentale chez le rat mime la situation humaine en ce sens que l'issue dépend de l'âge de l'hôte infecté. Ce modèle nous a déjà permis d'associer des profils immunologiques différents en fonction de l'âge, et de montrer le rôle prépondérant des mécanismes cellulaires dans la protection. L'ensemble des projets présentés doit nous permettre de disséquer ces mécanismes et d'approcher les raisons de la susceptibilité des rats jeunes, voire de proposer des marqueurs associés avec la prédisposition à développer une forme grave de paludisme. Bien entendu, aussi relevant soit-il, ce modèle reste un modèle et il serait alors indispensable de tester chez l'homme les marqueurs identifiés dans nos études, et de les associer avec la sévérité de l'infection.

Références bibliographiques

- Adam, E., Pierrot, C., Lafitte, S., Godin, C., Saoudi, A., Capron, M., Khalife, J. (2003) The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. *Int J Parasitol* 33, 1067-1078.
- Alves, H.J., Weidanz, W., Weiss, L. (1996) The spleen in murine *Plasmodium chabaudi adami* malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg* 55, 370-378.
- Andrews, R., Rosa, L., Daines, M., Khurana Hershey, G. (2001) Reconstitution of a functional human type II IL-4/IL-13 receptor in mouse B cells: demonstration of species specificity. *J Immunol* 166, 1716-1722.
- Atteke, C., Ndong, J.M., Aubouy, A., Maciejewski, L., Brocard, J., Lebibi, J., Deloron, P. (2003) In vitro susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooue region of Gabon. *J Antimicrob Chemother* 51, 1021-1024.
- Baird, J.K. (1995) Host Age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 11, 105-111.
- Baird, J.K. (1998) Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92, 367-390.
- Baird, J.K., Masbar, S., Basri, H., Tirtokusumo, S., Subianto, B., Hoffman, S.L. (1998) Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 178, 592-595.
- Bansal-Pakala, P., Jember, A.G., Croft, M. (2001) Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance. *Nat Med* 7, 907-912.
- Baumann, R., Yousefi, S., Simon, D., Russmann, S., Mueller, C., Simon, H.U. (2004) Functional expression of CD134 by neutrophils. *Eur J Immunol* 34, 2268-2275.
- Biot, C., Glorian, G., Maciejewski, L.A., Brocard, J.S. (1997) Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J Med Chem* 40, 3715-3718.
- Biot, C., Delhaes, L., Maciejewski, L.A., Mortuaire, M., Camus, D., Dive, D., Brocard, J.S. (2000) Synthetic ferrocenic mefloquine and quinine analogues potential antimalarial agents. *Eur J Med Chem* 35, 707-714.
- Bouharoun-Tayoun, H., Ouevray, C., Lunel, F., Druilhe, P. (1995) Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 182, 409-418.
- Briand, V., Watier, L., JY, L.E.H., Garcia, A., Cot, M. (2005) Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? *Am J Trop Med Hyg* 72, 702-707.
- Capron, A., Dombrowicz, D., Capron, M. (1999) Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. *Microbes Infect* 1, 485-490.
- Capron, M., Capron, A., Torpier, G., Bazin, H., Bout, D., Joseph, M. (1978) Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur J Immunol* 8, 127-133.
- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M., Capron, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J Immunol* 126, 1764-1768.
- Cêtre, C., Pierrot, C., Maire, E., Capron, M., Capron, A., Khalife, J. (2000) Interleukin-13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *Eur Cytokine Netw* 11, 241-249.
- Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., Allison, J.P. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19, 565-594.
- Chelvarajan, R.L., Collins, S.M., Doubinskaia, I.E., Goes, S., Van Willigen, J., Flanagan, D., De Villiers, W.J., Bryson, J.S., Bondada, S. (2004) Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens. *J Leukoc Biol* 75, 982-994.
- Chim, P., Lim, P., Sem, R., Nhem, S., Maciejewski, L., Fandeur, T. (2004) The in-vitro antimalarial activity of ferrochloroquine, measured against Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 98, 419-424.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201, 19-25.
- Cohen, C., Karstaedt, A., Frean, J., Thomas, J., Govender, N., Prentice, E., Dini, L., Galpin, J., Crewe-Brown, H. (2005) Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. *Clin Infect Dis* 41, 1631-1637.
- Cohen, S., Mc, G.I., Carrington, S. (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192, 733-737.
- Combes, C., Delay, B., Jarne, P., Jourdane, J., Pointier, J.P. (1992) Seminar on "International cooperation in the field of genetic transformation in invertebrates and resistance to diseases". *Washington*, December 4-5.
- Daher, W., Biot, C., Fandeur, T., Jouin, H., Pelinski, L., Viscogliosi, E., Fraisse, L., Pradines, B., Brocard, J., Khalife, J., Dive, D. (2006a) Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malar J* 5, 11.
- Daher, W., Browaeys, E., Pierrot, C., Jouin, H., Dive, D., Meurice, E., Dissous, C., Capron, M., Tomavo, S., Doerig, C., Cailliau, K., Khalife, J. (2006b) Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 60, 578-590.
- Daher, W., Cailliau, K., Takeda, K., Pierrot, C., Khayath, N., Dissous, C., Capron, M., Yanagida, M., Browaeys, E., Khalife, J. (2006c) Characterization of *Schistosoma mansoni* Sds homologue, a leucine-rich repeat protein that interacts with protein phosphatase type 1 and interrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Biochem J* 395, 433-441.
- de Andres, B., Rakasz, E., Hagen, M., McCormik, M.L., Mueller, A.L., Elliot, D., Metwali, A., Sandor, M., Britigan, B.E., Weinstock, J.V., Lynch, R.G. (1997) Lack of Fc-epsilon receptors on murine eosinophils: implications for the functional significance of elevated

- IgE and eosinophils in parasitic infections. *Blood* 89, 3826-3836.
- de Jesus, A.R., Silva, A., Santana, L.B., Magalhaes, A., de Jesus, A.A., de Almeida, R.P., Rego, M.A., Burattini, M.N., Pearce, E.J., Carvalho, E.M. (2002) Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis* 185, 98-105.
- Delhaes, L., Blot, C., Berry, L., Maciejewski, L.A., Camus, D., Brocard, J.S., Dive, D. (2000) Novel ferrocenic artemisinin derivatives: synthesis, in vitro antimalarial activity and affinity of binding with ferroprotoporphyrin IX. *Bioorg Med Chem* 8, 2739-2745.
- Delhaes, L., Abessolo, H., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L., Brocard, J., Camus, D., Dive, D. (2001) In vitro and in vivo antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. *Parasitol Res* 87, 239-244.
- Delhaes, L., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L.A., Camus, D., Brocard, J.S., Dive, D. (2002) Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity. *ChemBiochem* 3, 418-423.
- Dombrowicz, D., Quatannens, B., Papin, J.P., Capron, A., Capron, M. (2000) Expression of a functional Fc epsilon RI on rat eosinophils and macrophages. *J Immunol* 165, 1266-1271.
- Donati, D., Zhang, L.P., Chen, Q., Chene, A., Flick, K., Nystrom, M., Wahlgren, M., Bejarano, M.T. (2004) Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 72, 5412-5418.
- Doolan, D.L., Hoffman, S.L. (1999) IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol* 163, 884-892.
- Drohan, L., Harding, J.J., Holm, B., Cordoba-Tongson, E., Dekker, C.L., Holmes, T., Maecker, H., Mellins, E.D. (2004) Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets. *Hum Immunol* 65, 1356-1369.
- Endl, J., Rosinger, S., Schwarz, B., Friedrich, S.O., Rothe, G., Karges, W., Schlosser, M., Eiermann, T., Schendel, D.J., Boehm, B.O. (2006) Coexpression of CD25 and OX40 (CD134) receptors delineates autoreactive T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 55, 50-60.
- Fanger, N.A., Liu, C., Guyre, P.M., Wardwell, K., O'Neil, J., Guo, T.L., Christian, T.P., Mudzinski, S.P., Gosselin, E.J. (1997) Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood* 89, 4128-4135.
- Greenberg, J., Nadel, E.M., Coatney, R.G. (1953) The influence of strain, sex and age of mice on infection with *Plasmodium berghei*. *Journal of Infectious Diseases* 93, 96-100.
- Griffiths, M.J., Shafi, M.J., Popper, S.J., Hemingway, C.A., Kortok, M.M., Wathen, A., Rockett, K.A., Mott, R., Levin, M., Newton, C.R., Marsh, K., Relman, D.A., Kwiatkowski, D.P. (2005) Genomewide Analysis of the Host Response to Malaria in Kenyan Children. *J Infect Dis* 191, 1599-1611.
- Groux, H., Gysin, J. (1990) Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol* 141, 529-542.
- Grzych, J.M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z.A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F., Sher, A. (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 146, 1322-1327.
- Helmbj, H., Kullberg, M., Troye-Blomberg, M. (1998) Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect Immun* 66, 5167-5174.
- Hernandez-Valladares, M., Naessens, J., Musoke, A.J., Sekikawa, K., Rihet, P., Ole-Moiyoi, O.K., Busher, P., Iraqi, F.A. (2006) Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi adami* 408XZ. *Exp Parasitol*.
- Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., Yasutomo, K. (2004) Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.
- Ho, M., Sexton, M.M., Tongtawe, P., Looareesuwan, S., Suntharasamai, P., Webster, H.K. (1995) Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 172, 838-844.
- Ishikawa, F., Miyazaki, S. (2005) New biodefense strategies by neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53, 226-233.
- Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O.A., Gilliet, M., Qin, F.X., Liu, Y.J. (2006) OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13138-13143.
- Khalife, J., Dunne, D.W., Richardson, B.A., Mazza, G., Thorne, K.J., Capron, A., Butterworth, A.E. (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 142, 4422-4427.
- Kobayashi, F., Ishida, H., Matsui, T., Tsuji, M. (2000) Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection. *J Vet Med Sci* 62, 583-587.
- Koenig, J.M., Yoder, M.C. (2004) Neonatal neutrophils: the good, the bad, and the ugly. *Clin Perinatol* 31, 39-51.
- Kovjazin, R., Eldar, T., Patya, M., Vanichkin, A., Lander, H.M., Novogrodsky, A. (2003) Ferrocene-induced lymphocyte activation and anti-tumor activity is mediated by redox-sensitive signaling. *Faseb J* 17, 467-469.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A.M., Zhu, J., Douglass, E.J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A.S., Gowda, D.C. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280, 8606-8616.
- Kurtis, J.D., Lanar, D.E., Opollo, M., Duffy, P.E. (1999) Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 67, 3424-3429.
- Kurtis, J.D., Mtalib, R., Onyango, F.K., Duffy, P.E. (2001) Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infection and Immunity* 69, 123-128.

- Lacroix, R., Mukabana, W.R., Gouagna, L.C., Koella, J.C. (2005) Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol* 3, e298.
- Lai, Y.H., Mosmann, T.R. (1999) Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J Immunol* 162, 78-87.
- Legesse, M., Erko, B., Balcha, F. (2004) Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium berghei* co-infected mice. *Acta Trop* 91, 161-166.
- Levy, O., Zarembek, K.A., Roy, R.M., Cywes, C., Godowski, P.J., Wessels, M.R. (2004) Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol* 173, 4627-4634.
- Levy, O. (2005) Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J Endotoxin Res* 11, 113-116.
- Li, C., Seixas, E., Langhorne, J. (2001) Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol* 189, 115-126.
- Luty, A.J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., Deloron, P., Nussenzweig, R.S., Kremsner, P.G. (1999) Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis* 179, 980-988.
- Lwin, M., Last, C., Targett, G.A., Doenhoff, M.J. (1982) Infection of mice concurrently with *Schistosoma mansoni* and rodent malarial: contrasting effects of patent *S. mansoni* infections on *Plasmodium chabaudi*, *P. yoelii* and *P. berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 76, 265-273.
- Lyke, K.E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C.V., Doumbo, O.K., Sztein, M.B. (2004) Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 72, 5630-5637.
- Lyke, K.E., Dicko, A., Dabo, A., Sangare, L., Kone, A., Coulibaly, D., Guindo, A., Traore, K., Daou, M., Diarra, I., Sztein, M.B., Plowe, C.V., Doumbo, O.K. (2005) Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. *Am J Trop Med Hyg* 73, 1124-1130.
- Lyke, K.E., Dabo, A., Sangare, L., Arama, C., Daou, M., Diarra, I., Plowe, C.V., Doumbo, O.K., Sztein, M.B. (2006) Effects of concomitant *Schistosoma haematobium* infection on the serum cytokine levels elicited by acute *Plasmodium falciparum* malaria infection in Malian children. *Infect Immun* 74, 5718-5724.
- Malaguarnera, L., Musumeci, S. (2002) The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 2, 472-478.
- Maletto, B.A., Ropolo, A.S., Alignani, D.O., Liscovsky, M.V., Ranocchia, R.P., Moron, V.G., Pistorresi-Palencia, M.C. (2006) Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108, 3094-3102.
- Mannoor, M.K., Weerasinghe, A., Halder, R.C., Reza, S., Morshed, M., Ariyasinghe, A., Watanabe, H., Sekikawa, H., Abo, T. (2001) Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1(+) and NK1.1(-) subsets of intermediate TCR cells which are constituents of innate immunity. *Cell Immunol* 211, 96-104.
- Mannoor, M.K., Halder, R.C., Morshed, S.R., Ariyasinghe, A., Bakir, H.Y., Kawamura, H., Watanabe, H., Sekikawa, H., Abo, T. (2002) Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169, 301-306.
- Marshall-Clarke, S., Reen, D., Tasker, L., Hassan, J. (2000) Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* 21, 35-41.
- McGilvray, I.D., Serghides, L., Kapus, A., Rotstein, O.D., Kain, K.C. (2000) Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96, 3231-3240.
- McGuire, W., Hill, A.V., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M., Kwiatkowski, D. (1994) Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371, 508-510.
- McKenzie, G.J., Fallon, P.G., Emson, C.L., Grecis, R.K., McKenzie, A.N. (1999) Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med* 189, 1565-1572.
- Mestas, J., Hughes, C.C. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738.
- Mockenhaupt, F.P., Cramer, J.P., Hamann, L., Stegemann, M.S., Eckert, J., Oh, N.R., Otchwemah, R.N., Dietz, E., Ehrhardt, S., Schroder, N.W., Bienzle, U., Schumann, R.R. (2006a) Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 177-182.
- Mockenhaupt, F.P., Hamann, L., von Gaertner, C., Bedu-Addo, G., von Kleinsorgen, C., Schumann, R.R., Bienzle, U. (2006b) Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis* 194, 184-188.
- Morein, B., Abusugra, I., Blomqvist, G. (2002) Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 207-213.
- Mount, A.M., Mwapasa, V., Elliott, S.R., Beeson, J.G., Tadesse, E., Lema, V.M., Molyneux, M.E., Meshnick, S.R., Rogerson, S.J. (2004) Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet* 363, 1860-1867.
- Murphy, S.C., Breman, J.G. (2001) Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64, 57-67.
- Mutapi, F., Ndhlovu, P.D., Hagan, P., Woolhouse, M.E. (2000) Anti-schistosome antibody responses in children coinfecting with malaria. *Parasite Immunol* 22, 207-209.
- Myint, L., Targett, G.A., Doenhoff, M.J. (1987) Reduced efficacy of chemotherapy of *Plasmodium chabaudi* in T

- cell-deprived mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81, 899-902.
- Naus, C.W., Jones, F.M., Satti, M.Z., Joseph, S., Riley, E.M., Kimani, G., Mwatha, J.K., Kariuki, C.H., Ouma, J.H., Kabatereine, N.B., Vennervald, B.J., Dunne, D.W. (2003) Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 187, 1272-1282.
- Oeuvray, C., Bouharoun-Tayoun, H., Gras-Masse, H., Bottius, E., Kaidoh, T., Aikawa, M., Filgueira, M.C., Tartar, A., Druilhe, P. (1994) Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* 84, 1594-1602.
- Oliveira-Ferreira, J., Daniel-Ribeiro, C. (2001) Protective CD8+ T cell responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 221-227.
- Pan, P.Y., Zang, Y., Weber, K., Meseck, M.L., Chen, S.H. (2002) OX40 ligation enhances primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses in an immunotherapy for hepatic colon metastases. *Mol Ther* 6, 528-536.
- Paterson, D.J., Jefferies, W.A., Green, J.R., Brandon, M.R., Corthesy, P., Puklavec, M., Williams, A.F. (1987) Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol* 24, 1281-1290.
- Pierrot, C., Begue, A., Szpirer, C., Capron, A., Capron, M., Khalife, J. (2001a) Cloning of the rat IL-5Ralpha gene: analysis of 5'-upstream region and expression by B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 328-339.
- Pierrot, C., Beniguel, L., Begue, A., Khalife, J. (2001b) Expression of a functional IL-13Ralpha1 by rat B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 969-976.
- Pierrot, C., Adam, E., Lafitte, S., Godin, C., Dive, D., Capron, M., Khalife, J. (2003a) Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp Parasitol* 104, 81-85.
- Pierrot, C., Capron, M., Khalife, J. (2003b) Molecular and functional characterization of rat IL-5 receptor: comparative analysis with its counterparts in mouse and human. *Recent Res. Devel. Biophys. Biochem*, 259-268.
- Pradines, B., Fusai, T., Daries, W., Laloge, V., Rogier, C., Millet, P., Panconi, E., Kombila, M., Parzy, D. (2001) Ferrocene-chloroquine analogues as antimalarial agents: in vitro activity of ferrochloroquine against 103 Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Antimicrob Chemother* 48, 179-184.
- Pradines, B., Tall, A., Rogier, C., Spiegel, A., Mosnier, J., Marrama, L., Fusai, T., Millet, P., Panconi, E., Trape, J.F., Parzy, D. (2002) In vitro activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 7, 265-270.
- Puellmann, K., Kaminski, W.E., Vogel, M., Nebe, C.T., Schroeder, J., Wolf, H., Beham, A.W. (2006) A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14441-14446.
- Rathore, D., Nagarkatti, R., Jani, D., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Kumar, S., McCutchan, T.F. (2005) An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. *J Biol Chem* 280, 20524-20529.
- Remoue, F., Diallo, T.O., Angeli, V., Herve, M., de Clercq, D., Schacht, A.M., Charrier, N., Capron, M., Vercruysse, J., Ly, A., Capron, A., Riveau, G. (2003) Malaria co-infection in children influences antibody response to schistosome antigens and inflammatory markers associated with morbidity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 361-364.
- Rogers, P.R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., Croft, M. (2001) OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.
- Salek-Ardakani, S., Croft, M. (2006) Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134). *Vaccine* 24, 872-883.
- Sano, G., Hafalla, J.C., Morrot, A., Abe, R., Lafaille, J.J., Zavala, F. (2001) Swift development of protective effector functions in naive CD8(+) T cells against malaria liver stages. *J Exp Med* 194, 173-180.
- Schaecher, K., Kumar, S., Yadava, A., Vahey, M., Ockenhouse, C.F. (2005) Genome-wide expression profiling in malaria infection reveals transcriptional changes associated with lethal and nonlethal outcomes. *Infect Immun* 73, 6091-6100.
- Schmieg, J., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Tsuji, M. (2003) The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect* 5, 499-506.
- Sexton, A.C., Good, R.T., Hansen, D.S., D'Ombrian, M.C., Buckingham, L., Simpson, K., Schofield, L. (2004) Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria. *J Infect Dis* 189, 1245-1256.
- Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E., Mosmann, T. (1991) Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 147, 2713-2716.
- Siegrist, C.A. (2001) Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 19, 3331-3346.
- Snow, R.W., Nahlen, B., Palmer, A., Donnelly, C.A., Gupta, S., Marsh, K. (1998) Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis* 177, 819-822.
- Sokhna, C., Le Hesran, J.Y., Mbaye, P.A., Akiana, J., Camara, P., Diop, M., Ly, A., Druilhe, P. (2004) Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J* 3, 43.
- Song, J., Salek-Ardakani, S., Rogers, P.R., Cheng, M., Van Parijs, L., Croft, M. (2004) The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat Immunol* 5, 150-158.
- Stevenson, M.M., Riley, E.M. (2004) Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4, 169-180.
- Stevenson, M.M., Urban, B.C. (2006) Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunol* 28, 5-14.
- Su, Z., Stevenson, M.M. (2002) IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168, 1348-1355.

- Sun, C.M., Fiette, L., Tanguy, M., Leclerc, C., Lo-Man, R. (2003) Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* 102, 585-591.
- Taramelli, D., Basilio, N., Pagani, E., Grande, R., Monti, D., Ghione, M., Oliaro, P. (1995) The heme moiety of malaria pigment (beta-hematin) mediates the inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Exp Parasitol* 81, 501-511.
- Taylor-Robinson, A.W. (1995) Regulation of immunity to malaria: valuable lessons from murine models. *Parasitol Today* 11, 334-342.
- Tvinnereim, A.R., Hamilton, S.E., Harty, J.T. (2004) Neutrophil involvement in cross-priming CD8+ T cell responses to bacterial antigens. *J Immunol* 173, 1994-2002.
- Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A.D., Colombo, M.P. (2005) Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)/CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 105, 2845-2851.
- Vu, M.D., Clarkson, M.R., Yagita, H., Turka, L.A., Sayegh, M.H., Li, X.C. (2006) Critical, but conditional, role of OX40 in memory T cell-mediated rejection. *J Immunol* 176, 1394-1401.
- Wagner, G., Koram, K., McGuinness, D., Bennett, S., Nkrumah, F., Riley, E. (1998) High incidence of asymptomatic malaria infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 59, 115-123.
- Walther, M., Tongren, J.E., Andrews, L., Korb, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R.F., Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S.J., Edele, F., de Souza, J.B., Sinden, R.E., Gilbert, S.C., Riley, E.M., Hill, A.V. (2005) Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23, 287-296.
- Weidanz, W.P. (1982) Malaria and alterations in immune reactivity. *Br Med Bull* 38, 167-172.
- Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C., Whitham, R.H. (1999) Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 162, 1818-1826.
- Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J.T., Urba, W.J., Alvord, G., Bunce, C., Shields, J. (2000) Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol* 164, 2160-2169.
- Weinberg, A.D., Evans, D.E., Thalhofer, C., Shi, T., Prell, R.A. (2004) The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement. *J Leukoc Biol* 75, 962-972.
- Xu, H., Hodder, A.N., Yan, H., Crewther, P.E., Anders, R.F., Good, M.F. (2000) CD4+ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. *J Immunol* 165, 389-396.
- Xu, H., Wipasa, J., Yan, H., Zeng, M., Makobongo, M.O., Finkelman, F.D., Kelso, A., Good, M.F. (2002) The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. *J Exp Med* 195, 881-892.
- Yan, S.R., Qing, G., Byers, D.M., Stadnyk, A.W., Al-Hertani, W., Bortolussi, R. (2004) Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 72, 1223-1229.
- Yap, G.S., Stevenson, M.M. (1994) Differential requirements for an intact spleen in induction and expression of B-cell-dependent immunity to *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 62, 4219-4225.
- Yoshida, A., Maruyama, H., Kumagai, T., Amano, T., Kobayashi, F., Zhang, M., Himeno, K., Ohta, N. (2000) *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol* 12, 1117-1125.
- Zubairi, S., Sanos, S.L., Hill, S., Kaye, P.M. (2004) Immunotherapy with OX40L-Fc or anti-CTLA-4 enhances local tissue responses and killing of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* 34, 1433-1440.
- Zuckerman, A., Yoeli, M. (1954) Age and sex as factors influencing *Plasmodium berghei* infections in intact and splenectomized rats. *Journal of Infectious Diseases* 94, 225-236.
- Zurawski, G., de Vries, J.E. (1994) Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 15, 19-26.

Titres et Travaux

Christine PIERROT

37 ans, née le 15/12/1968
 mariée, 3 enfants
 nationalité française

19 rue Pierre de Ronsard
 59930 La Chapelle d'Armentières
 tel: 03 20 44 22 84
 06 09 85 51 63

Unité Inserm 547 - Université de Lille 2
 'Schistosomiase, Paludisme et Inflammation'
 Institut Pasteur de Lille
 1 rue du Professeur Calmette
 59019 Lille cedex
 tel : 03 20 87 79 68
 fax : 03 20 87 78 88
 e-mail : christine.pierrot@pasteur-lille.fr

FORMATION

-
- 2001 Obtention du certificat d'autorisation d'expérimentation sur animaux vivants délivré par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Niveau 1.
- 1997 **Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé** à Lille 1
- 1993 **D.E.A. en Sciences de la Vie et de la Santé** option **Immunologie** à Lille 1
- 1992 Diplôme d'ingénieur des **Hautes Etudes Industrielles** de Lille orientation **Chimie**, option **Génie des Bio-industries**

EXPERIENCES

-
- 2003- **Chargée de Recherches** à l'Institut Pasteur de Lille, Unité Inserm U547 (Directeur Prof. M. Capron).
- 1999-02 **Chargée d'études** à l'Institut Pasteur de Lille, Unité Inserm U547 (Directeur Prof. M. Capron). Etude du modèle rat : immunogénétique, immunobiologie, comportement lors d'infections parasitaires (*Schistosoma mansoni*, *Plasmodium berghei*)
- 1997-98 **Chercheur post-doctoral**, Inserm U167 (Directeur Prof. A. Capron), Institut Pasteur de Lille. Etude du rôle des cytokines dans l'infection expérimentale du rat par *Schistosoma mansoni*; développement des outils immunologiques nécessaires.
- 1993-97 **Mémoire de Thèse**: "Caractérisation moléculaire et étude de l'expression de l'élastase de *Schistosoma mansoni*. Rôle potentiel en tant que cible et régulateur de la réponse immune". Inserm U167 (Directeur Prof. A. Capron), Institut Pasteur de Lille.
- 1992-93 **Stage de D.E.A** "Heat-shock protein de 70kDa de *Schistosoma mansoni*: clonage moléculaire, expression et étude du rôle modificateur de la réponse biologique".
 Inserm U167 (Directeur Prof. A. Capron), Institut Pasteur de Lille.

Publications internationales

1. **Pierrot, C.**, Capron, A. and Khalife, J. (1995) Cloning and characterization of two genes encoding *Schistosoma mansoni* elastase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 113-117.
2. **Pierrot, C.**, Godin, C., Liu, J.L., Capron, A. and Khalife, J. (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during parasite life-cycle. *Parasitology* **113**, 519-526.
3. Cocude, C., **Pierrot, C.**, Cêtre, C., Godin, C., Capron, A. and Khalife, J. (1997) Molecular characterization of a partial sequence encoding a novel *Schistosoma mansoni* serine protease. *Parasitology*, **115**, 395-402.
4. Petitprez, K., Grzych, J.M., **Pierrot, C.**, Capron, A. and Khalife, J. (1998) Molecular cloning and expression of an anti-idiotypic antibody mimicking a protective oligosaccharide of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, **84**, 38-40.
5. Cêtre, C., Cocude, C., **Pierrot, C.**, Godin, C., Capron, A., Capron, M. and Khalife, J. (1998) *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, **20**, 135-142.
6. **Pierrot, C.**, Khalife, J., Cocude, C., Cêtre, C., Godin, C. and Capron, A. (1998) Molecular cloning and sequencing of rat IL-12 p40 gene. *European Cytokine Network*, **9**, 69-73.
7. **Pierrot, C.**, Cocude, C., Cêtre, C., Godin, C., Lafitte, S., Capron, M. and Khalife, J. (1998) Expression of rat interleukin-5 and generation of neutralizing antiserum: comparative study of rat IL-5 produced in *E. coli* and insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **253**, 756-760.
8. Cocude, C., **Pierrot, C.**, Cêtre, C., Fontaine, J., Godin, C., Capron, A. and Khalife, J. (1999) Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasme kallikrein and human Factor I. *Parasitology*, **118**, 389-396.
9. Cêtre, C., **Pierrot, C.**, Cocude, C., Lafitte, S., Capron, A., Capron, M. and Khalife, J. (1999) Profiles of Th1 and Th2 cytokines after a primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. *Infection and Immunity*, **67**, 2713-2719.

10. Cêtre, C., **Pierrot, C.**, Maire, E., Capron, M., Capron, A. & Khalife, J. (2000) Intreleukin 13 and IgE production in rat experimental schistosomiasis. *European Cytokine Network*, **11**, 241-249.
11. **Pierrot C.**, Beniguel L., Bègue A., and J. Khalife. (2001) Expression of a functional IL-13 R alpha 1 by rat B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **287**, 969-976.
12. **Pierrot C.**, Bègue A., Szpirer C. Capron A., Capron M. and J. Khalife. (2001) Cloning of the rat IL-5 R alpha gene : Analysis of 5'-upstream region and expression by B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **288**, 328-339.
13. **Pierrot C.**, Adam E., Lafitte S., Godin C., Dive D., Capron M. and Khalife J. (2003) Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats. *Exp. Parasitol.* **104**, 81-85.
14. Adam E., **Pierrot C.**, Lafitte, S., Godin, C., Saoudi, A., Capron, M. and Khalife, J. (2003) The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral responses. *Int. J. Parasitol.*, **33**;1067-1078.
15. **Pierrot, C.**, S. Lafitte, D. Dive, L. Fraisse, J. Brocard, and J. Khalife. (2005) Analysis of immune response patterns in naive and *Plasmodium berghei*-infected young rats following a ferroquine treatment. *Int J Parasitol* **35**:1601-1610.
16. Daher, W., E. Browaeys, **C. Pierrot**, H. Jouin, D. Dive, E. Meurice, C. Dissous, M. Capron, S. Tomavo, C. Doerig, K. Cailliau, and J. Khalife. (2006) Regulation of protein phosphatase type 1 and cell cycle progression by PfLRR1, a novel leucine-rich repeat protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **60**:578-590.
17. Daher, W., K. Cailliau, K. Takeda, **C. Pierrot**, N. Khayath, C. Dissous, M. Capron, M. Yanagida, E. Browaeys, and J. Khalife. (2006) Characterization of *Schistosoma mansoni* Sds homologue, a leucine-rich repeat protein that interacts with protein phosphatase type 1 and interrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Biochem J* **395**:433-441.
18. **Pierrot, C.**, S. Wilson, H. Lallet, S. Lafitte, F. M. Jones, W. Daher, M. Capron, D. W. Dunne, and J. Khalife. (2006) Identification of a novel antigen of *Schistosoma mansoni* shared with *Plasmodium falciparum* and evaluation of different cross-reactive antibody subclasses induced by human schistosomiasis and malaria. *Infect Immun* **74**:3347-3354.

19. **Pierrot C.**, Adam E., Hot, D., Lafitte S., Capron, M., George, J.D. and J. Khalife. Contribution of T cells and neutrophils in protection of young susceptible rats from fatal experimental malaria. *J Immunol (in revision)*

Revue et Chapitres de livres

20. Khalife J, Cêtre C, **Pierrot C**, and Capron M. (2000) Mechanisms of resistance to *S. mansoni* infection: the rat model. *Parasitology International* **49**, 339-45.
21. **Pierrot C.**, Khalife J., Cêtre, C, Capron, A and M. Capron. (2001) Contribution des modèles expérimentaux à la compréhension de l'immunité contre la schistosomiase. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la Vie.* **324**, 1133-1140.
22. **Pierrot C.**, Capron, M. and Khalife J. (2003) Molecular and functional characterization of rat IL-5 receptor : comparative analysis with its counterparts in mouse and human." in "*Recent Research Developments in Biophysics & Biochemistry*". **3**, 259-268.

Communications internationales

- Khalife, J., **Pierrot, C.**, Cocude, C., Godin, C. & Capron, A. *Schistosoma mansoni*: clonage, expression des antigènes cibles et modificateurs de la réponse immune. Etude de la régulation de leur expression. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles, Lille, 30 mai 1995.
- **Pierrot, C.**, Godin, C., Liu, J.L., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of *Schistosoma mansoni* elastase. British Society for Parasitology Spring Meeting, University of Wales, Bangor, UK, 1-3 Apr. 1996.
- Khalife, J., **Pierrot, C.**, Godin, C. & Capron, A. Role of AP1 in Transcriptional regulation of *S.mansoni* Calreticulin. British Society for Parasitology Spring Meeting, University of Wales, Bangor, UK, 1-3 Apr. 1996.
- Cocude, C., **Pierrot, C.** Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of two *Schistosoma mansoni* serine proteases. Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, 15-19 Sept. 1996.

-
- **Pierrot, C.**, Cocude, C., Godin., C., Capron A. & Khalife, J. *Schistosoma mansoni*: Expression stade spécifique de deux serine protéases. Colloque Lille-Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 9 jan 1997.
 - **Pierrot, C.**, Cêtre, C., Cocude, C., Capron, A. & Khalife, J. Immune response polarization: Role of *Schistosoma mansoni* proteases. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 Apr. 1997.
 - Cocude, C., **Pierrot C.**, Godin, C., Capron, A. & Khalife, J. Molecular characterization of a novel *Schistosoma mansoni* Kallikrein-like protease. British Society for Parasitology Spring Meeting, UMIST, Manchester, UK, 8-10 Apr. 1997.
 - Cocude, C., **Pierrot, C.**, Cêtre, C., Capron, A. & Khalife, J. Caractérisation moléculaire d'une sérine protéase de *Schistosoma mansoni*. Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Marseille, 26-28 nov 1997.
 - Khalife, J., Cêtre, C., **Pierrot, C.**, Cocude, C., Capron, A. and Capron, M. Predominant Th2-type response after infection of rats with *Schistosoma mansoni*. Keystone Symposia, Tahoe, USA, janvier 1999.
 - **Pierrot, C.**, Cêtre, C., Capron, A., Capron, M. and Khalife, J. Molecular cloning and characterisation of rat IL-13 α 1 receptor : expression by B cells and its implication in IgE production. Congrès de l'International Society of Interferon gamma and Cytokines Research, Paris, sept 1999
 - Khalife, J., Cêtre, C., **Pierrot, C.**, Capron, A. and Capron, M. The helminth *Schistosoma mansoni* induces a Type 2 cytokine response in rat : expression and role of IL-13. Congrès de l'International Society of Interferon gamma and Cytokines Research, Paris, sept 1999.
 - **Pierrot, C.**, Begue-Marquot, A., Capron, M., Capron, A. and Khalife, J. Molecular characterization of rat IL-5 and IL-13 receptors: cellular distribution and promoter regions. Keystone Symposia, Snowbird, USA, avril 2000.
 - Khalife, J., Cêtre, C., **Pierrot, C.**, Capron, A., and Capron M. Protective Th2 type response in experimental rat Schistosomiasis. Keystone Symposia, Snowbird, USA, avril 2000.

Co-encadrement d'étudiants et stagiaires

Lydie Beniguel

Année universitaire 1999-2000. DEA des Sciences de la Vie et de la Santé, Universités de Lille 1 et Lille 2, Option Immunologie

Sujet : Caractérisation moléculaire de la chaîne $\alpha 1$ du récepteur à L'IL-13 chez le rat

Anne de Boissieu

Année universitaire 1999-2000. DU Sciences du Médicament et Sciences Biologiques, Université Lille 2

Sujet : Expression de l'IL-5 et l'IL-5R α du rat dans différents systèmes eucaryotes

Estelle Adam

2001-2003. Ingénieur d'études

Sujet : Analyse des réponses immunes dans un modèle de malaria expérimentale âge-dépendante

Hélène Lallet

Année universitaire 2002-2003. DEA des Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille 2, Filière Agents infectieux et maladies transmissibles

Sujet : Caractérisation moléculaire d'un gène de *Schistosoma mansoni* cross-réactif avec *Plasmodium berghei Anka*

Edith Bétry

Année universitaire 2005-2006. Master Recherche mention Biologie-Santé, Université de Lille2

Sujet : Contribution des mécanismes cellulaires dans la protection des rats jeunes susceptibles à la malaria expérimentale : rôle des cellules T