

50376  
1984  
313

50376  
1984  
313

EFFETS IMMUNODEPRESSEURS DES LIPOPROTEINES SERIQUES INDUITES

AU COURS DU PALUDISME EXPERIMENTAL DES RONGEURS A

PLASMODIUM CHABAUDI



à mes parents

à mes frères et sœurs

à Bénédicte

à mes amis

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biologie et de Biochimie parasitaire et fongique (Unité 42, INSERM) du Professeur Alain VERNES, sous la direction du Professeur Daniel CAMUS et la collaboration du Docteur Pierre MAUROIS.

Monsieur le Professeur MONTREUIL, je vous suis reconnaissant de la formation dans votre laboratoire de Biochimie. Je vous remercie d'avoir accepté la Présidence du Jury de cette thèse.

Monsieur VERNES, Directeur de l'Unité 42 de l'INSERM, je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer au Jury de cette thèse. Je vous exprime ma respectueuse gratitude.

Mademoiselle le Professeur SPIK, je vous suis reconnaissant de la formation biochimique sous votre ancienne direction et vous remercie d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Monsieur le Professeur FRUCHART, je suis très honoré de pouvoir bénéficier de votre haute compétence en physiopathologie des lipoprotéines. Vous me témoignez actuellement dans votre laboratoire la bienveillante attention, que celle-ci s'exprime lors du jugement de ce travail.

Monsieur le Professeur BIGUET, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'accueillant au sein de votre équipe de recherche.

Monsieur le professeur CAMUS, je vous remercie pour les conseils que vous m'avez dispensés concernant mon initiation dans le domaine complexe de l'immunologie.

Docteur MAUROIS, je te remercie sincèrement pour la collaboration constante, pour la disponibilité que tu m'as réservées dans l'évolution de ce travail.

Docteur DEI-CAS, je te suis profondément reconnaissant pour l'amitié et l'aide particulière que tu m'as apportées dans l'obtention d'un travail qui m'a permis d'aller au terme de ma thèse.

A tout le personnel de l'Unité 42, je vous remercie pour la sympathie que vous me témoignez.

Ce travail a contribué aux communications et publications suivantes :

#### PUBLICATIONS

GOMARD PH., VU DAC N., MAUROIS P., CAMUS D.

Influence of malaria on a preexisting antibody response to heterologous antigens.

Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), 1982, 133 D, 313-326.

VU DAC N., MAUROIS P., CAMUS D., VERNES A.

Immunosuppression as consequence of a lipoprotein dysregulation during rodent malaria.

A soumettre pour publication au European Journal of Immunology.

GOMARD PH., VU DAC N., CAMUS D.

In vitro anti-tetanus toxoid antibodies production.

Soumis pour publication à Immunology letters.

#### COMMUNICATIONS

CAMUS D. VU DAC N., GOMARD PH., MAUROIS P.

Rôle immunopathologique des lipoprotéines induites au cours du paludisme.

II. Immunorégulation de la production d'anticorps hétérospécifiques.

2ème Conférence Internationale sur le paludisme et les babésioses. Annecy, 19-22  
Septembre 1983.

VU DAC N., MAUROIS P., BOUMA M.E., FRUCHART J.C., VERNES A.

Rôle immunodépresseur des lipoprotéines de basse densité induites au cours du

paludisme de rongeur.

Journées du GERLI (Groupe d'étude et de recherche sur les lipoprotéines).

Touquet, (19-21 Juin 1984).

Publications et Communications dans le cadre du travail effectué dans le Département Lipides Lipoprotéines et Centre de Technologie Biomédicale INSERM, Faculté de Pharmacie de Lille, sous la direction du Professeur FRUCHART.

#### PUBLICATIONS

\_ VU DAC N., DUTILLEUL P., CHEKKOR A., FRUCHART J.C.

Latex Immuno Assay, a rapid and sensitive method for determination of serum Lipoprotein Lp (a).

Soumis pour publication au Journal of Lipid Research. (Avril 1984)

Révisé en Octobre 1984

-CHEKKOR A., VU DAC N., DUTILLEUL P., FRUCHART J.C.

Latex Immuno Assay, a rapid and sensitive method for determination of the factor FVIII R : Ag.

Soumis pour publication à Thrombosis Research. (Février 1984)

Révisé en Septembre 1984.

#### COMMUNICATIONS

\_ CHEKKOR A., DUTILLEUL P., VU DAC N., FRUCHART J.C.

Sensitive Latex Immuno Assay for determination of the factor FVIII R : Ag.

European meeting on plasma proteins in Clinical diagnosis. Milan. Italy, October. 5-6, 1983.

\_ VU DAC N., FRUCHART J.C.

Latex Immuno Assay, a rapid and sensitive method for determination of serum Lipoprotein Lp (a).

International Symposium on Monoclonal antibodies and inborn errors of metabolism, Brugge, Belgium, October, 20-22, 1983.

\_ VU DAC N., DAUNIZEAU A., CHEKKOR A., DUTHILLEUL P., FRUCHART J.C.

Latex Immuno Assay, a rapid and sensitive method for determination of serum Lipoprotein Lp (a).

36 th National meeting of the American Association for Clinical Chemistry.

29 Juillet au 3 Aout 1984 , Washington DC , USA.



## ABREVIATIONS

Apo	:	Apolipoprotéines
AT	:	Anatoxine tétanique
cpm	:	coups par minute
Con A	:	Concanavaline A
CM	:	Chylomicron
HDL	:	High Density Lipoprotein
HDLc	:	Lipoprotéines de haute densité isolées du sérum de chiens soumis à un régime riche en cholestérol
J	:	Jour
LDL	:	Low Density Lipoprotein
LDL-In	:	Low Density Lipoprotein-Inhibitor
LPL	:	Lipoprotein lipase
LCAT	:	Lecithine Cholesterol Acyl Transferase
Milieu HBSS	:	"Hank's Balanced Salt Solution"
Milieu RPMI	:	
1640	:	Milieu "Rosewell Park Memorial Institute 1640"
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
UI	:	Unité Internationale
ULF	:	Unité de Flocculation
VLDL	:	Very Low Density Lipoprotein

# TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	
A. PARASITOLOGIE	3
I - INTRODUCTION	3
II - HISTORIQUE	4
III - CYCLE DU PALUDISME HUMAIN	4
1) Le cycle sexué sporogonique	5
2) Le cycle asexué schizogonique	
a) La phase exoérythrocytaire	
b) La phase érythrocytaire	
IV - PALUDISME DES RONGEURS A <u>Plasmodium chabaudi</u>	7
B. DYSREGULATION IMMUNOLOGIQUE AU COURS DU PALUDISME	8
I - L'HYPERGAMMAGLOBULINEMIE	8
II - L'IMMUNODEPRESSION	9
1) La réponse anticorps	9
2) Les macrophages	10
3) Les lymphocytes	11
C. LES LIPOPROTEINES	12
I - GENERALITES	12
II - STRUCTURE	12
III - CLASSIFICATION	13
IV - LES APOLIPOPROTEINES	13
1) L'apolipoprotéine B	14
2) l'apolipoprotéine E	14
V - RECEPTEURS DES "Apo B,E"	15
VI - METABOLISME DES LIPOPROTEINES	16
1) Chylomicrons	16
2) VLDL	17
3) LDL	17
4) HDL	18
5) Les lipoprotéines particulières	19

VII - PERTURBATION DU METABOLISME DES LIPOPROTEINES AU COURS DU PALUDISME	20
VIII - ROLE IMMUNOREGULATEUR DES LIPOPROTEINES	21
1) Généralités	21
2) Mécanisme	22

## MATERIELS ET METHODES

I - ANIMAUX	23
II - INFECTION	23
III - ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES	23
IV - CARACTERISATION DES LIPOPROTEINES	24
1) Dosage des lipides et des protéines	24
2) Electrophorèse en gel d'Acrylamide SDS	24
V - MARQUAGE DES LIPOPROTEINES A L'IODE -125	24
VI - METHODE DE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES ANTICORPS ANTI- ANATOXINE TÉTANIQUE EN PHASE SOLIDE	25
1) Couplage de l'anatoxine tétanique au Sépharose-CNBr	25
2) Marquage de l'anatoxine tétanique à l'Iode 125	26
3) Dosage des anticorps anti-anatoxine tétanique	26
VII - ETUDES <u>in vivo</u> : REPONSE ANTICORPS ANTI ANATOXINE TÉTANIQUE	28
1) Réponse anticorps préexistante	28
a) Immunisation	
b) Infection ou injection de lipoprotéines	
c) Réponse anticorps	
2) Réponse anticorps primaire	28
a) Effet de l'infection sur la réponse primaire	
b) Effet des lipoprotéines sur la réponse primaire	
VIII - ETUDES <u>in vitro</u> : TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE	29
1) Préparation des cellules spléniques	29
2) Lymphoprolifération stimulée par la Con A	30
3) Capacité de réponse à la stimulation mitogénique des cellules spléniques de souris infectées	30

4) Effet des sérums de souris infectées sur la lympho- prolifération	30
5) Effet des lipoprotéines sur la lymphoprolifération	30
IX - ETUDES <u>in vitro</u> : RECEPTEURS DES $^{125}\text{I}$ -VLDL	32
1) Caractérisation de la fixation	32
2) Récepteurs des $^{125}\text{I}$ -VLDL : Nombre de récepteurs et affinité cellulaire	32
3) Spécificité de la fixation	33
RESULTATS	
A. LIPOPROTEINES DE SOURIS SAINES ET DE SOURIS INFECTEES	34
I - COMPOSITION EN LIPIDES ET PROTEINES	34
II - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES DES VLDL	34
III - MARQUAGE RADIOACTIF DES VLDL	34
B. ETUDES <u>in vivo</u> : REPOSE ANTICORPS	35
I - DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-ANATOXINE TETANIQUE	35
II - INFECTION ET REPOSE ANTICORPS PREEXISTANTE	36
III - EFFET DES LDL SUR LA REPOSE ANTICORPS PREEXISTANTE	37
IV - INFECTION ET REPOSE ANTICORPS PRIMAIRE	41
V - EFFET DES LIPOPROTEINES SERIQUES DE SOURIS INFECTEES SUR LA REPOSE ANTICORPS PRIMAIRE	43
C. ETUDES <u>in vitro</u> : TRANSFORMATIONS LYMPHOBLASTIQUE	45
I - CAPACITE DE REPOSE A LA STIMULATION MITOGENIQUE DES CELLULES SPLENIQUES DE SOURIS INFECTEES	45
II - EFFET DES SERUMS DE SOURIS INFECTEES SUR LA LYMPHO- PROLIFERATION	50
III - EFFET DES LIPOPROTEINES DE SOURIS INFECTEES SUR LA LYMPHOPROLIFERATION	51
IV - CINETIQUE D'ADDITION DES VLDL PAR RAPPORT A LA Con A	53
D. ETUDES <u>in vitro</u> RECEPTEURS DES $^{125}\text{I}$ -VLDL	55
I - CARACTERISATION DE LA FIXATION DES $^{125}\text{I}$ -VLDL SUR LES LYMPHOCYTES	55
II - RECEPTEURS DES $^{125}\text{I}$ -VLDL	57
1) Nombre de récepteurs par lymphocyte	58
2) Affinité des $^{125}\text{I}$ -VLDL vis à vis des récepteurs	59

III - SPECIFICITE DE LA FIXATION DES $^{125}\text{I}$ -VLDL SUR LES RECEPTEURS	62
DISCUSSION	65
CONCLUSION	70
BIBLIOGRAPHIE	

## INTRODUCTION

Le paludisme induit chez les hôtes vertébrés un état d'immuno-dépression. Plusieurs fonctions immunes comme la réponse anticorps in vivo contre différents antigènes (1,2,3), la transformation lymphoblastique in vitro (4,5), sont sévèrement déprimées. Le mécanisme de l'immunodépression est expliqué par la défection des fonctions macrophagiques (6,7) et lymphocytaires (8,9). Toutefois les facteurs responsables de ce phénomène ne sont pas encore bien élucidés. Les études sur le rôle immunorégulateur des substances parasitaires isolées des globules rouges infectés montrent des résultats contradictoires (10,11). En outre, les effets de différentes fractions du sérum de l'hôte infecté sur les fonctions immunes ne sont pas encore étudiés.

A l'opposé, le rôle immunorégulateur des lipoprotéines humaines et animales est un aspect bien documenté parmi les mécanismes variés régulant les fonctions immunes. A la concentration infra-physiologique, les lipoprotéines peuvent inhiber la transformation lymphoblastique in vitro (12,13,14) et la réponse anticorps in vivo (15,16).

Au cours du paludisme humain (17,18) et des rongeurs à Plasmodium chabaudi (19), l'augmentation très marquée des lipoprotéines de basse densité (VLDL et LDL) a été décrite. Ces différentes raisons, nous ont amené à nous intéresser au rôle immunorégulateur des lipoprotéines nouvellement apparues au cours de l'infection palustre expérimentale des rongeurs.

Par comparaison à l'infection, nous étudions les effets des lipoprotéines sériques de souris saines de contrôle et de souris impaludées sur la réponse anticorps anti-anatoxine tétanique (AT) in vivo et la transformation lymphoblastique stimulée par la Concanavaline A (Con A) in vitro.

Des récepteurs spécifiques des lipoprotéines situés sur la membrane des

lymphocytes ont été décrits et la fixation des lipoprotéines sur ces récepteurs serait la première étape primordiale par laquelle les lipoprotéines exercent leurs effets immunorégulateurs (13,20). Pour cette raison, nous étudions finalement de façon comparative, la capacité des lipoprotéines les plus immuno inhibitrices, les VLDL provenant des souris impaludées, de se fixer sur les récepteurs des lymphocytes.

# GENERALITES



## A. LE PALUDISME

### I - INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose de l'homme et d'autres vertébrés dont les manifestations pathologiques les plus connues dérivent de la présence de protozoaires du genre Plasmodium dans les erythrocytes. La forme infestante, le sporozoïte, est transmise par un hôte définitif, l'anophèle femelle, à l'hôte intermédiaire vertébré. Le Plasmodium évolue chez ces deux hôtes successivement et selon un cycle bien déterminé.

Chez l'homme cette parasitose atteint encore des centaines de millions d'individus dans les zones inter-tropicales d'endémie palustre. Malgré les progrès réalisés le paludisme est encore responsable de millions de décès annuels, surtout chez les enfants.

### II - HISTORIQUE

Les principales étapes de la découverte de la maladie sont les suivantes : en 1880, Laveran découvre l'agent pathogène, le Plasmodium, dans le sang circulant. La transmission de cet agent par des moustiques du genre Anopheles a été mise en évidence par Roos et Grassi en Italie en 1898. En 1948 Short et Garnham mettent en évidence l'existence d'un cycle exo-érythrocytaire tissulaire dans le foie.

Différentes espèces de Plasmodium ont été décrites depuis 1880. Chez l'homme, 4 espèces sont principalement rencontrées : P.vivax, P.malariae, P.ovale et P.falciparum (le plus pathogène).

Chez les singes et lémuriens 19 espèces sont décrites. P.knowlesi

étant la plus utilisée en recherche dans les laboratoires.

Quatre espèces parasitent les rongeurs, P.berghei , P.yoelii , P.vinckei et P.chabaudi et sont fréquemment utilisées dans les laboratoires.

### III - CYCLE DU PALUDISME HUMAIN

Il existe 2 phases successives de multiplication du protozoaire parasite chez ses hôtes. La phase de multiplication sexuée dite sporogonique s'effectue presque totalement chez l'anophèle, et la phase de multiplication asexuée dite schizogonique s'effectue chez le vertébré.

#### 1) Le cycle sexué sporogonique

Certains mérozoites circulant dans le sang, après avoir envahi de nouvelles hématies subissent une transformation sexuée en gamétocytes mâles et femelles. Ceux-ci restent quiescents un certain temps dans le sang de l'hôte vertébré. Ces gamétocytes sont ingérés par l'anophèle femelle au cours d'un repas sanguin. Les microgamétocytes mâles donnent naissance à 8 gamètes mâles. La fécondation au niveau de l'estomac du moustique donne formation à un zygote mobile qui traverse l'épithélium intestinal et la membrane basale du tube digestif. Ce zygote se fixe sur la paroi externe, s'y développe pour donner des oocystes.

Après une intense activité nucléaire et cytoplasmique les oocystes deviennent matures et libèrent dans l'hémolymphe les sporozoites encore non infectieux à ce stade. Ceux-ci gagnent les glandes salivaires où ils terminent leur maturation. Devenus infectieux ils sont à l'occasion d'un repas sanguin, injectés par l'anophèle à un nouvel hôte vertébré.

## 2) Le cycle asexué schizogonique

Il s'effectue en 2 phases successives chez le vertébré, une phase hépatique de multiplication dite exoérythrocytaire, puis une seconde phase dans les hématies, dite érythrocytaire.

### a) La phase exoérythrocytaire.

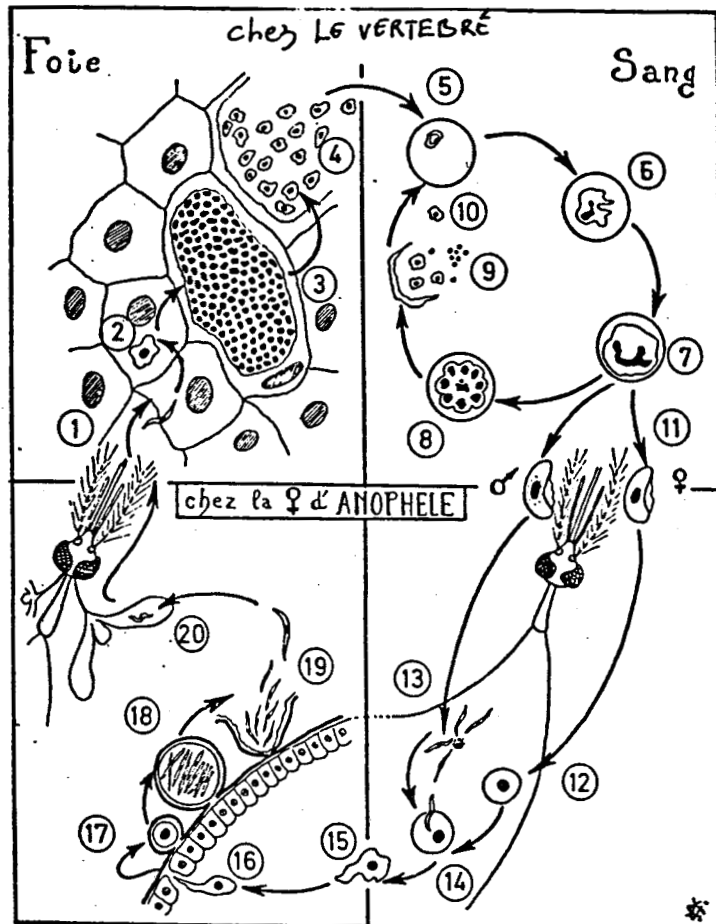
Cette phase débute dès l'injection des sporozoïtes. Ceux-ci en 15 à 20 minutes doivent pénétrer dans un hépatocyte. Après de nombreuses multiplications, en 15 à 18 jours chaque sporozoïte aura donné naissance dans l'hépatocyte à un schizonte géant pouvant contenir 10 000 noyaux. Arrivés à maturité, les schizontes hépatiques libèrent dans la circulation sanguine, les parasites sous forme de mérozoïtes.

Dans les hépatocytes la dormance plus ou moins prolongée de certains schizontes serait à l'origine des rechutes ou des temps de latence observés surtout avec P.vivax.

### b) La phase érythrocytaire.

Les mérozoïtes doivent rapidement en moins de 20 minutes pénétrer dans un globule rouge. Puis en 48 à 72 heures, selon l'espèce plasmodiale en cause, se produisent une augmentation de la masse cytoplasmique puis des multiplications nucléaires. Le Plasmodium dans le globule rouge passe par les stades morphologiques successifs suivants : trophozoïtes, corps amœboïdes, schizontes et aboutit au corps en rosace. A ce stade la lyse de l'hématie parasitée libère dans la circulation de nouveaux mérozoïtes qui doivent infester de nouveaux globules rouges. Certains mérozoïtes se différencieront dans le globule rouge en gamétocytes et initieront un nouveau cycle sexué.

Cette phase de multiplication érythrocytaire est la seule responsable des



BU  
LILLE

**FIGURE 1 :**

Cycle évolutif des Plasmodium chez le moustique et chez le vertébré.  
Principaux stades : gamète femelle (12), gamètes mâles (13), oocyste (17), sporozoïte (19), schizonte intra - hépatique (3), mérozoïte (4), Schizonte jeune (6), schizonte agé (7), corps en rosace (8), mérozoïte (10).

manifestations pathologiques chez l'homme et les vertébrés. Elle aboutit à la libération de substances pyrogènes dans la circulation, responsables des accès de fièvre palustre et surtout elle détruit les hématies et provoque une anémie.

#### IV - PALUDISME DES RONGEURS à Plasmodium chabaudi

Nous avons travaillé uniquement avec l'espèce plasmodiale P.chabaudi, qui infeste les rongeurs et a été découverte en Centre Afrique par J. Landau en 1965 (Rf). Cette souche a été adaptée depuis, au passage sur souris dans les laboratoires. Dans cette espèce la durée du cycle schizogonique sanguin, qui seul nous intéresse pour nos expériences, est de 24 heures environ. De plus, nous signalerons que l'évolution des stades érythrocytaires est assez synchrone. Finalement, la reproductibilité des perturbations métaboliques, spécialement des lipoprotéines, nous a permis d'étudier la relation entre perturbation métabolique et la régulation du système immunitaire de l'hôte.

La rédaction de ce paragraphe a été réalisée à partir des bibliographies suivantes :

- GARNHAM. O.C.C. : Malaria parasites and other haemosporia. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1966.
- KILLICK - KENDRICK. R. and PETERS. W. : Rodent malaria. Academic Press. London. New York. San Francisco. 1978.
- GOLVAN. Y. - J. : Eléments de parasitologie médicale. Flammarion. Ed.. 1978.

## B. DYSREGULATION IMMUNE AU COURS DU PALUDISME

Le Plasmodium induit chez son hôte vertébré deux principales altérations du système immunitaire : l'hypergammaglobulinémie et paradoxalement l'immunodépression.

### I - HYPERGAMMAGLOBULINEMIE

L'hypergammaglobulinémie se traduit par une production désordonnée d'immunoglobulines (IgG et IgM principalement) dont le taux augmente considérablement au cours de l'infection (21,22). Une faible partie de ces immunoglobulines est dirigée contre le parasite (21), la présence d'auto-anticorps étant aussi décrite (23). Néanmoins, la spécificité anticorpale de la majeure partie de ces immunoglobulines reste encore inconnue. Ce phénomène suggère que les clones lymphocytaires autres que ceux impliqués dans la réponse spécifique vis à vis du parasite, sont recrutés durant l'infection. La stimulation non spécifique des cellules B (24) et l'augmentation de la production d'anticorps non spécifiques ont aussi été observés au cours du paludisme de rongeurs (25).

Le mécanisme responsable de ce phénomène n'est pas encore bien connu. Il serait possible que les substances parasitaires puissent induire cette dysrégulation immunitaire, car l'extrait des globules rouges parasités peut stimuler la synthèse du DNA des lymphocytes in vitro (26). Une substance provenant de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite, l'hématine, exerce aussi un pouvoir mitogénique sur les lymphocytes (27).

## II - IMMUNODEPRESSION

Le paludisme induit chez l'hôte vertébré un état d'immunodépression. D'une manière générale, la parasitose favorise l'implantation de tumeurs, l'installation d'infections virales, bactériennes, parasitaires, et la survie d'allogreffes cutanées.

La principale manifestation de l'immunodépression se traduit par une forte diminution de la réponse aux exoantigènes. Les mécanismes responsables de ce phénomène sont en général expliqués par l'altération des fonctions macrophagiques et lymphocytaires.

### 1) La réponse anticorps

La réponse anticorps contre de nombreux exoantigènes est fortement diminuée au cours du paludisme. L'observation de la faible réponse humorale aux vaccinations des populations des régions impaludées a été décrite (1,28). La suppression de plusieurs réponses anticorps contre l'anatoxine tétanique (1), le polysaccharide méningococcique (2), les salmonella "0" (3) est aussi démontrée dans les cas de paludisme humain.

Dans le paludisme des rongeurs où l'interférence des facteurs nutritionnels et parasitaires rencontrés dans le paludisme humain est éliminée, il est plus facile d'étudier rigoureusement la dépression de la réponse immune. De nombreux auteurs ont démontré l'immunodépression vis à vis des différents antigènes Thymo-dépendants et Thymo-indépendants comme les globules rouges de mouton (29), l'anatoxine tétanique (30), le dextran (31), le "Moloney leukemia virus" (32).

Cependant l'hypothèse souvent émise selon laquelle les substances d'origine plasmodiale seraient responsables de cette altération immune reste à étudier. En effet, selon les modes d'obtention (surnageant de culture ou extrait

soluble à partir des globules rouges parasités), les résultats sont différents en ce qui concerne le poids moléculaire de la substance isolée et ses actions possibles sur la réponse immune (10,11).

## 2) Les macrophages

Au cours de l'infection l'importante masse de globules rouges parasités ou des débris parasitaires circulants ingérés par les macrophages peut aboutir à des modifications de la fonction phagocytaire et de la présentation par ces derniers de l'antigène aux lymphocytes (6,33). La fonction "auxiliaire" des macrophages dans l'induction de la réponse immune in vitro est fortement diminuée, la réponse anticorps anti-globules rouges de cheval des cellules spléniques est supprimée en présence des macrophages provenant des souris impaludées (7) ; elle est restituée en remplaçant les macrophages de souris impaludées par ceux de souris saines.

Les macrophages peuvent sécréter des facteurs monokines d'activation des lymphocytes capables d'augmenter la prolifération lymphocytaire stimulée par les lectines (Con A, PHA). Au cours du paludisme des rongeurs, le taux de ces facteurs monokines d'activation des lymphocytes serait diminué d'une part, et d'autre part il est possible que les macrophages secrètent des substances immunodépressives vis à vis des lymphocytes stimulées (4,34).

Néanmoins le désordre de la fonction macrophagique a été démontré comme intimement lié aux lymphocytes, car lors de l'infection par P.yoelii, les souris athymiques (nu/nu) et les souris euthymiques (nu/+) traitées par le sérum anti-thymocytes sont capables de répondre in vivo de façon analogue à des souris normales au polysaccharide SSSIII de pneumocoque (antigène T-indépendant mais macrophage dépendant), et in vitro aux globules rouges de mouton (8).



### 3) Les lymphocytes

Le paludisme humain et des rongeurs induit une forte diminution des lymphocytes T et B. Chez les souris impaludées par P.berghei, les tissus lymphoïdes de la rate sont réduits de 69 % à 2 % (35). Le nombre de lymphocytes T et B de la rate de souris impaludées est fortement diminué (9, 36), tandis que les cellules "nulle" voient leur nombre augmenter (9).

Chez l'homme, plusieurs études confirment la diminution des lymphocytes T et B circulants dans le sang (37,38).

## C. LES LIPOPROTEINES

### I - GENERALITES

Les lipoprotéines (Lp) sont des complexes de haut poids moléculaire solubles dans les milieux biologiques aqueux, composés de lipides (cholestérol, triglycérides, phospholipides) et de glycoprotéines spécifiques appelées apolipoprotéines (Apo) avec lesquelles les lipides sont capables de se combiner.

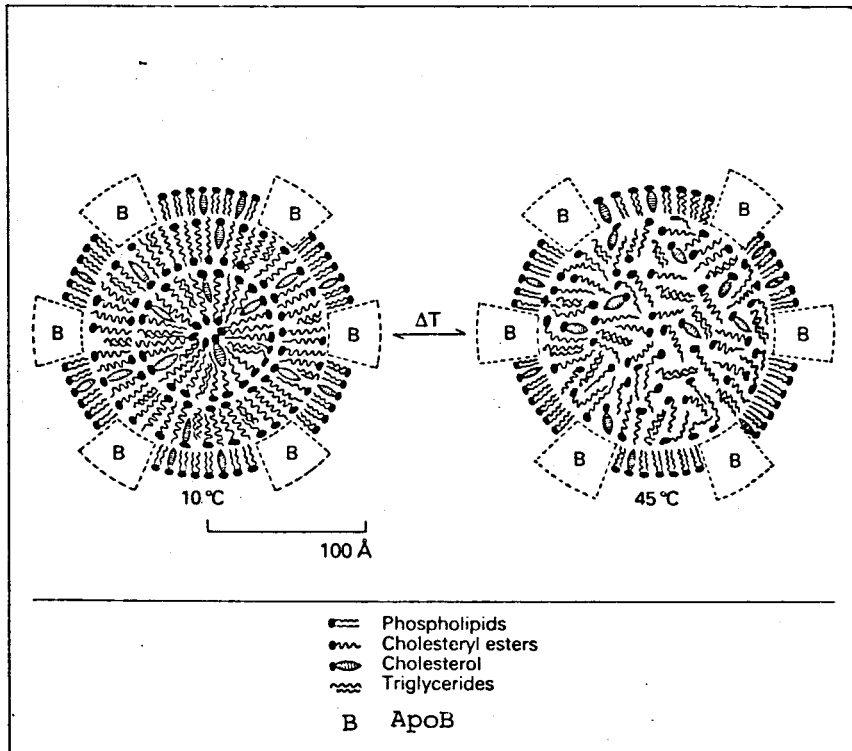
Les lipoprotéines représentent des unités fonctionnelles de transporteurs des lipides dans le sang. C'est par les apolipoprotéines que les cellules reconnaissent et captent les lipoprotéines.

L'importance des lipides en biologie et en biochimie tient essentiellement aux rôles qu'ils jouent comme éléments de structure des membranes cellulaires (cholestérol et phospholipides) et comme substrats énergétiques (acides gras, triglycérides).

### II - STRUCTURE

Les différentes classes de lipoprotéines sont variées quant à leurs taille et composition. Elles présentent cependant une structure commune attribuée à leur forme de particules pseudomicellaires dont la partie hydrophile superficielle est assurée par l'arrangement des phospholipides et apolipoprotéines, et la partie hydrophobe composée de triglycérides et cholestérol estérifié forme le noyau de ces particules globulaires (39) (Figure 2).

### III - CLASSIFICATION



**FIGURE 2**

Structure des lipoprotéines de basse densité LDL



Les lipoprotéines sont séparées et préparées par ultracentrifugation de flottaison en fonction de leur densité. Les lipides ont une densité inférieure à 0,9 g/ml, les protéines une densité supérieure à 1,28 g/ml, les lipoprotéines ont une densité intermédiaire. Les propriétés physiques des lipoprotéines (densité et mobilité électrophorétique) ont permis de les répartir en 4 classes principales : CM (chylomicrons), VLDL (very low density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins) et HDL (high density lipoproteins).

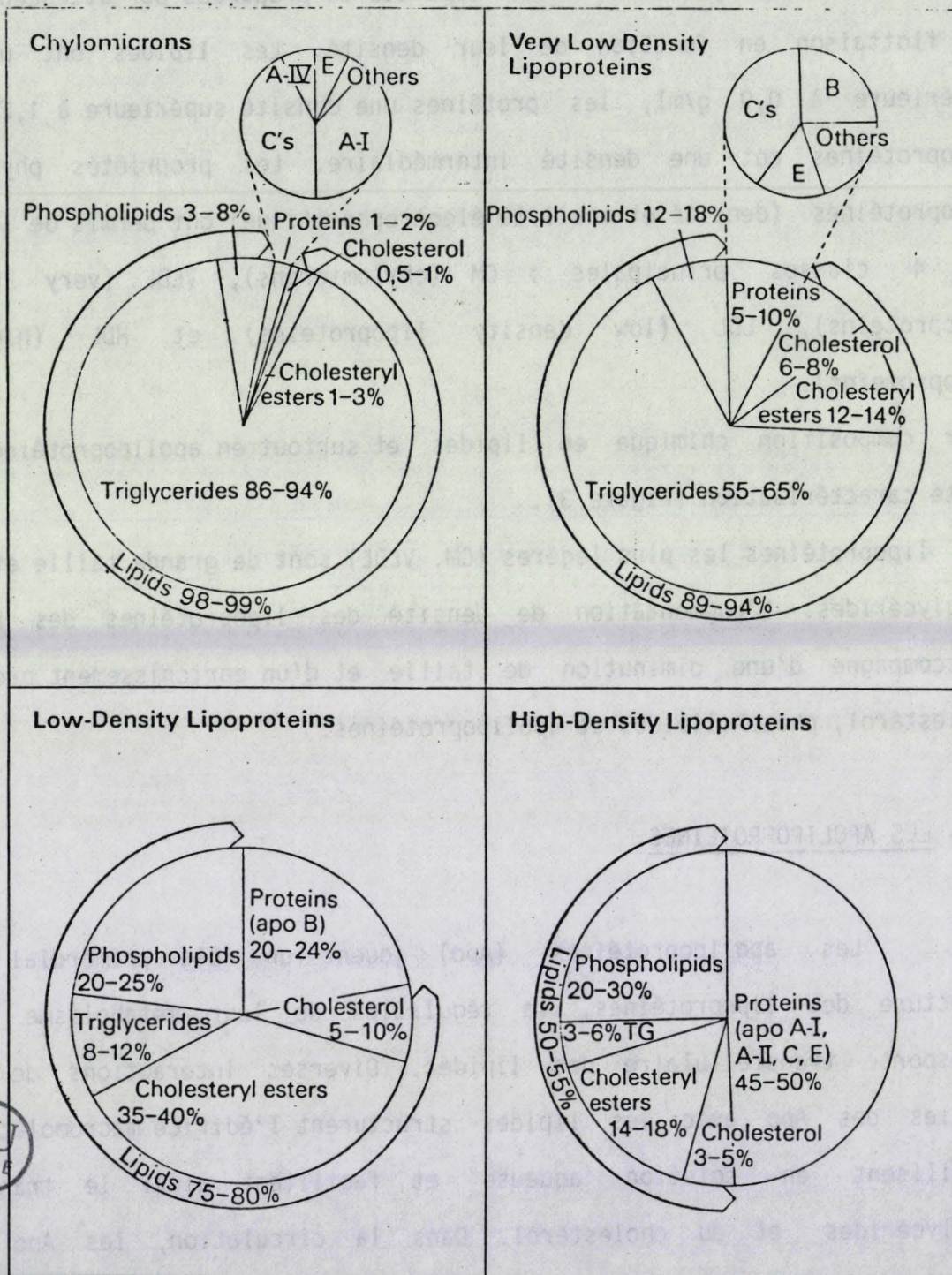
Leur composition chimique en lipides et surtout en apolipoprotéines complète cette caractérisation (Figure 3).

Les lipoprotéines les plus légères (CM, VLDL) sont de grande taille et riches en triglycérides. L'augmentation de densité des lipoprotéines des LDL aux HDL s'accompagne d'une diminution de taille et d'un enrichissement progressif en cholestérol, phospholipides et apolipoprotéines.

#### IV - LES APOLIPOPROTEINES

Les apolipoprotéines (Apo) jouent un rôle primordial dans la structure des lipoprotéines, la régulation de leur métabolisme et dans le transport transcellulaire des lipides. Diverses interactions de certaines parties des Apo avec les lipides structurent l'édifice macromoléculaire, le stabilisent en solution aqueuse et facilitent ainsi le transport des triglycérides et du cholestérol. Dans la circulation, les Apo sont des cofacteurs importants des enzymes lipolytiques régularisant le métabolisme des lipoprotéines (Apo A-I, Apo C-I et Apo C-II). Enfin la captation des lipides transportés, par les cellules réceptrices, dépend des interactions entre Apo (Apo B-100, Apo E) et leurs divers récepteurs cellulaires spécifiques.

Toutefois nous voulons insister sur la description de deux Apo : l'Apo



**FIGURE 3**

Composition en lipides et en apolipoprotéines des lipoprotéines sériques humaines .



B et l'Apo E dont le rôle est primordial dans les expériences que nous avons menées.

### 1) Apolipoprotéines B

Glycoprotéine, sous unité structurale des CM, VLDL et LDL, l'Apo B est synthétisée dans l'intestin et le foie. Deux sous unités ont été décrites (40) :

- Apo B-48 de poids moléculaire 265.000, synthétisée au niveau de l'intestin, est une sous unité structurale des CM.
- Apo B-100 de poids moléculaire 549.000, synthétisée au niveau du foie, est l'Apo structurale des VLDL, IDL et LDL.

L'Apo B-100 se fixe sur les sites récepteurs communs aux Apo B et Apo E de nombreuses cellules. comme les fibroblastes hépatocytes, lymphocytes (13,20,41).

### 2) Apolipoprotéines E

L'Apo E, de poids moléculaire 34.000 daltons (299 acides aminés) peut être identifiée immunologiquement dans toutes les classes de lipoprotéines (42). Quatre isoformes différentes par la composition en Arginine et Cystéine sont identifiées (43) et n'interagissent pas de la même façon vis à vis des sites récepteurs des Apo E (cas des Apo E-2 des VLDL). La plus forte concentration des Apo E se situe au niveau des VLDL où elles constituent de 10 à 20 % des protéines totales. Il existe en outre une corrélation entre la concentration sérique en Apo E et le taux de triglycérides sérique (44).

L'Apo E est importante dans la fixation des CM "remnant". VLDL "remnant" et HDL<sub>1</sub> sur les sites récepteurs des Apo E des hépatocytes en vue

de leur métabolisme (44,46). Une sous fraction des HDL sériques provenant de chiens soumis à un régime riche en cholestérol, appelée les HDL<sub>C</sub> et dont l'apolipoprotéine majeure est de type Apo E, a permis la mise en évidence des sites récepteurs communs aux Apo B et Apo E (d'où la désignation "sites Apo B. E") des cellules périphériques. et des sites récepteurs spécifiques des Apo E des hépatocytes (47).

La plus grande affinité des Apo E par rapport aux Apo B vis à vis des sites récepteurs communs réside dans le plus grand nombre de résidus d'Arginine, acide aminé indispensable pour la fixation des lipoprotéines sur les récepteurs cellulaires (13,48).

#### V - RECEPTEURS DES "APO B, E"

Protéine de poids moléculaire environ 160000 daltons, ce récepteur est sensible aux protéases et aux modifications chimiques (acétylation, polymérisation par le glutaraldéhyde). Il est insensible aux glycosidases (49, 50). Le récepteur possède deux sites fonctionnels : site de fixation extra plasmalemmé et site d'internalisation intra plasmalemmé. Les récepteurs se regroupent en "coated pits" (51) n'occupant que 2 % de la surface cellulaire (Figure 4).

L'interaction entre récepteurs et résidus d'Arginine et Lysine des Apo B et Apo E est responsable de la fixation des lipoprotéines sur les récepteurs cellulaires. Ainsi une particule d'Apo E-HDL<sub>C</sub> se fixe avec 4 récepteurs alors qu'une particule d'Apo B-LDL (moins riche en Arginine) se fixe avec un seul récepteur (52).

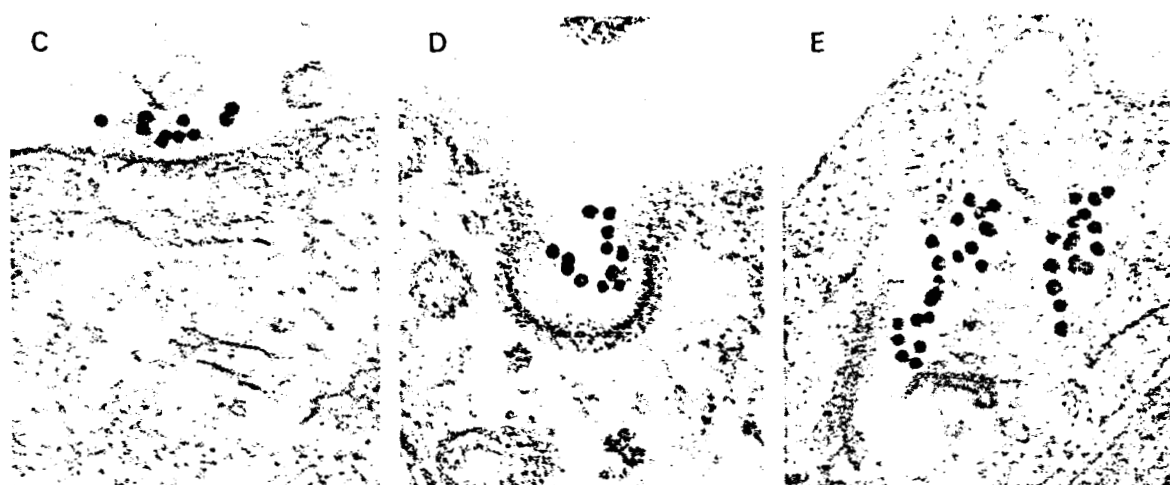


FIGURE 4

Distribution topographique des LDL conjuguées à l'or sur la surface des fibroblastes. Fixation au niveau des "coated pits" (C). internalisation (D) et intra localisation (E) des LDL conjuguées à l'or (52).

## VI - METABOLISME DES LIPOPROTEINES

### 1) Chylomicrons

Les chylomicrons sont formés au niveau de l'intestin par l'association des triglycérides resynthétisés à partir des produits de la digestion alimentaire (glucose ou monoglycérides et acides gras) et des Apo AI, Apo AII, Apo AIV et B-48 synthétisées par la muqueuse intestinale (53). Les CM passent dans la lymphe puis dans la circulation sanguine où ils incorporent des Apo E et Apo C des HDL et échangent des Apo A (54). Au niveau de la surface de l'endothélium des capillaires de divers tissus, dont le tissu adipeux, les triglycérides sont lipolysés sous l'action de la LIPOPROTEINE LIPASE (LPL). L'activité de cet enzyme est activée par l'Apo CII, cédée par les HDL aux CM. Au



cours de ce catabolisme les particules résiduelles ou CM "remnants" sont, soit recyclées dans d'autres lipoprotéines ("surface remnants" transférées aux HDL<sub>3</sub>), soit captées par l'hépatocyte ("core remnants") via des récepteurs des Apo E (55,56).

## 2) VLDL

Plus de 90 % des triglycérides présents dans le plasma prélevé à jeun sont synthétisés par le foie qui les secrète sous forme de VLDL. Ce sont des particules hétérogènes en taille (densité : 0,950 à 1,006 g/ml), de composition homogène. (environ 60 % - 70 % de triglycérides, 10 % - 15 % de phospholipides et cholestérol et 10 % d'Apo dont les principales sont des Apo C, Apo B, Apo E).

Le catabolisme intravasculaire des VLDL en IDL et ensuite en LDL implique deux types essentiels d'activité enzymatique :

- l'activité LPL (lipoprotéine - lipase)
- l'activité LECITHINE CHOLESTEROL ACYL TRANSFERASE (LCAT) qui réalise l'estérification du cholestérol libre. Cette activité est régulée par un échange d'Apo entre les VLDL et HDL.

Durant ce processus de dégradations successives, l'Apo B-100 des VLDL n'est pas échangée et se retrouve au niveau des LDL, tandis que la majorité des Apo E et Apo C sont transférées aux HDL.

## 3) LDL

La formation des LDL résulte de la dégradation intravasculaire des VLDL. Leur catabolisme se situe au niveau des cellules périphériques. La première étape est la fixation des LDL sur les sites récepteurs spécifiques

(récepteurs Apo B, E) dont l'existence a été mise en évidence au niveau de nombreuses cellules (fibroblastes, cellules du muscle lisse artériel, lymphocytes) et tissus (tissu adipeux, ovaire, muscle strié, rein thymus, rate) (13,20,41). Après la fixation, les LDL sont internalisées dans la cellule et hydrolysées par les enzymes lysosomiales en acides aminés et cholestérol libre (57) dont l'augmentation de la concentration va réguler trois mécanismes :

1) Suppression de l'activité de l'hydroxyméthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG Co A Reductase). enzyme clé de la synthèse de novo du cholestérol (par l'inhibition de la synthèse de cette enzyme) (58, 59).

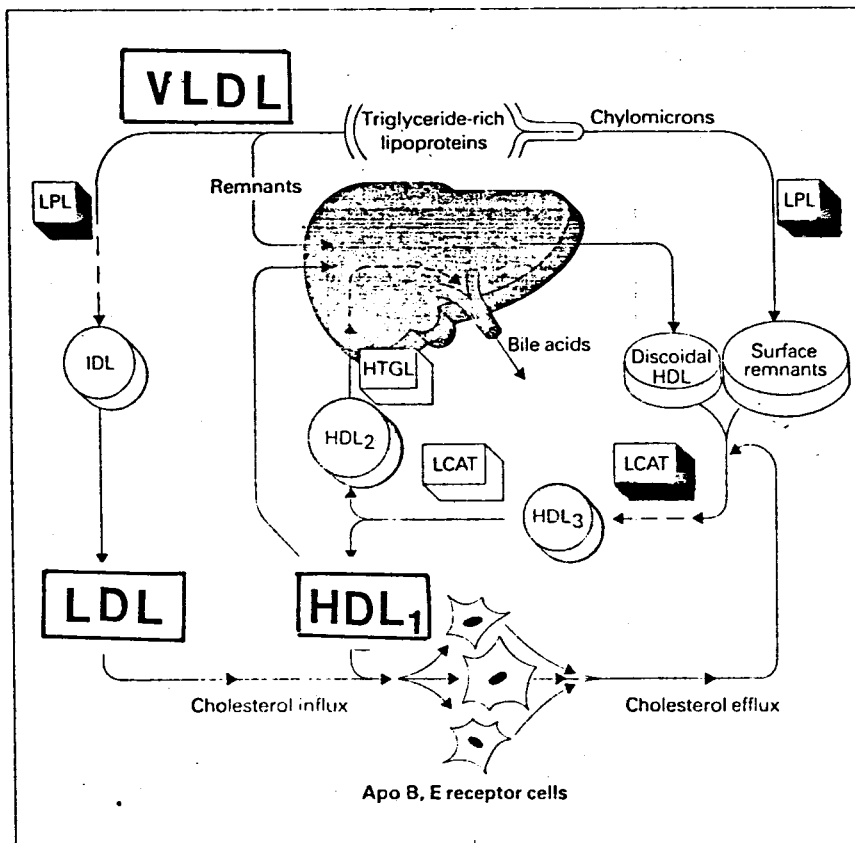
2) Stimulation de l'activité de l'acyl cholestérol transférase (ACAT), ainsi l'excès de cholestérol sera stocké sous forme estérifiée (60).

3) L'inhibition de la synthèse des récepteurs des LDL pour éviter de nouveaux afflux du cholestérol extracellulaire (61).

L'ensemble de ce processus régulateur a pour but d'éviter la surcharge en cholestérol des tissus périphériques.

#### 4) HDL

Contrairement au métabolisme des CM, VLDL, LDL, de nombreux aspects du métabolisme des HDL restent encore obscurs, notamment la synthèse des HDL natives discoïdales par le foie et l'intestin. Cependant il était admis que les HDL étaient formées essentiellement dans le plasma. par l'association des HDL natives discoïdales et les "surface remnant" des CM (62). L'action de la LCAT va estérifier le cholestérol libre conduisant à une molécule hydrophobe qui va être repoussée au centre de la HDL. La place ainsi laissée libre est occupée par une nouvelle molécule de cholestérol non estérifié issue des cellules, qui sera à son tour soumise à l'action de la LCAT et ainsi de suite, transformant la forme discoïdale en forme globulaire (63).



**FIGURE 5**

métabolisme des lipoprotéines CM , VLDL , LDL et HDL .



La formation des HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>1</sub> résulte de l'association des Apo C , phospholipides et cholestérol libéré par le catabolisme des VLDL aux HDL<sub>3</sub> et de l'action de la LCAT (64, 65). Les HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>1</sub> retournent au foie où elles sont catabolisées (66).

Les HDL<sub>1</sub> riches en Apo E occupent une place décisive dans le métabolisme du cholestérol car d'une part elles peuvent ramener le cholestérol provenant des cellules vers le foie (67) et d'autre part elles peuvent déplacer la fixation des LDL sur les cellules périphériques par leur plus grande affinité vis à vis des récepteurs communs avec l'Apo B des LDL (13). Le métabolisme des lipoprotéines est schématisé par la figure 5.

#### 5) Les lipoprotéines particulières

Dans certaines conditions de régime riche en cholestérol (cas humains et animaux) on obtient :

- 1) des HDL<sub>1</sub> appelées HDL<sub>C</sub> (68) dont l'Apo majeure est Apo E.
- 2) des VLDL appelées des  $\beta$ -VLDL avec des caractéristiques suivantes :
  - position électrophorétique  $\beta$  (au lieu de pré- $\beta$ )
  - composition en Apo : essentiellement Apo B et Apo E en pourcentage notable (25 %).
  - composition en lipides : 40 % de triglycérides et 35 % de cholestérol libre et estérifié.

Ces  $\beta$ -VLDL sont d'origine hépatique (69) ou proviennent de la lipolyse des CM (70) (cas de lapin), tandis que leur catabolisme est assuré en grande partie par les macrophages.

De récentes études biochimiques et morphologiques montrent que dans certaines conditions les macrophages peuvent absorber et dégrader une quantité considérable de lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont :

- des  $\beta$ -VLDL (71)
- des LDL dont la charge est modifiée (72) : malondialdéhyde-LDL, dextran sulfate-LDL, acétyl-LDL.

Dans ces cas les macrophages sont appelés "cellules éboueuses" ou "Scavengers cells". Le captage des  $\beta$ -VLDL par les macrophages donne suite au dépôt du cholestérol dans la cellule et à la formation des "foam cells" (73,74).

Les conséquences de ce processus sur les fonctions immunologiques des macrophages restent encore inconnues.

#### VII - PERTURBATION DU METABOLISME DES LIPOPROTEINES AU COURS DU PALUDISME

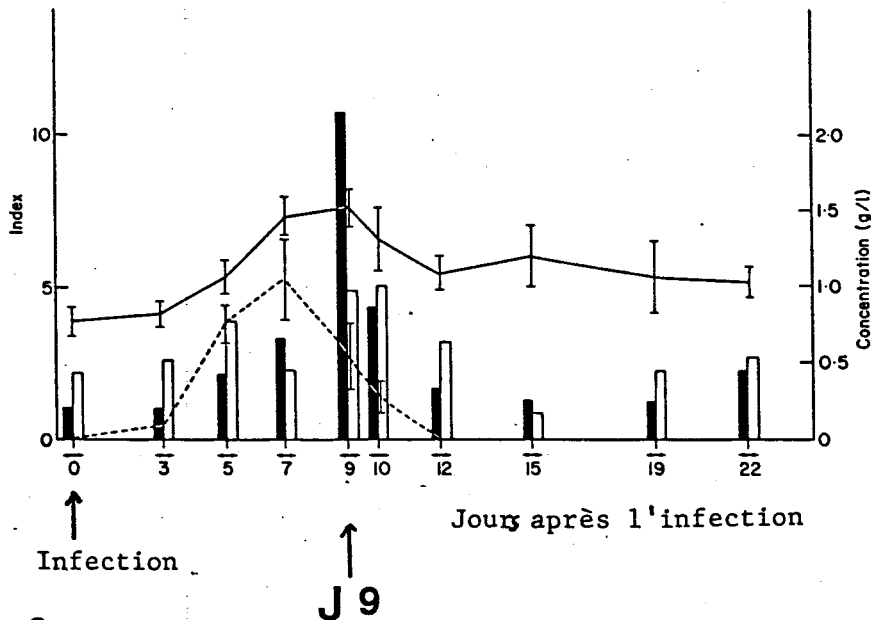
Au cours du paludisme humain à P.falciparum (17,18) et des rongeurs à P.y.yoelii 17X YM et à P.chabaudi AJ (19). l'augmentation très marquée des lipoprotéines riches en triglycérides, CM et VLDL, IDL et LDL a été décrite (Figures 6, 7).

Chez les souris impaludées par P.chabaudi l'augmentation de ces lipoprotéines s'explique :

1) par la chute de l'activité lipoprotéine lipase (LPL) du tissu adipeux. La diminution de l'activité lipolytique vis à vis des triglycérides contenus dans les CM et les VLDL entraîne ainsi leur accumulation dans le sang. Au niveau des capillaires, le pouvoir activateur du sérum vis à vis de la LPL est diminué, ce phénomène serait lié à la composition en apolipoprotéines des VLDL (75).

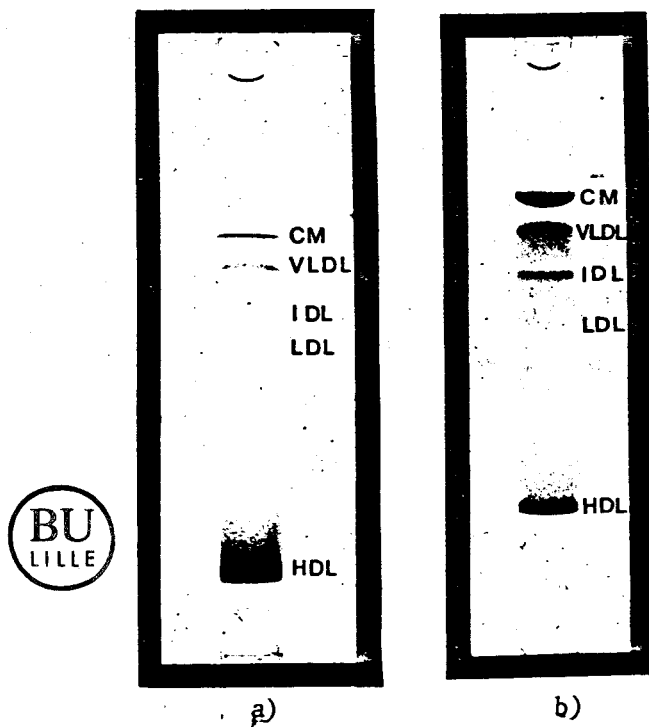
2) par la synthèse accrue des VLDL par le foie, l'excès des acides gras provenant de la lipolyse du tissu adipeux provoque la synthèse accélérée des lipoprotéines riches en triglycérides, les VLDL (76).

#### VIII - ROLE IMMUNOREGULATEUR DES LIPOPROTEINES



**FIGURE 6**

Cinétique de l'augmentation des lipides sériques au cours de l'infection par P. chabaudi. Evolution de l'index de la parasitémié, ---, index d'hépatomégalie, —, triglycérides, ■, cholestérol total, □ (19).



**FIGURE 7**

Répartition des lipoprotéines en électrophorèse en gel d'acrylamide: ( a ) sérum de souris saines de contrôle, ( b ) sérum de souris au jour J9 de l'infection par P.chabaudi (19)

## 1) Généralités

Depuis la localisation. au niveau du sérum des sujets atteints d'hépatite virale, d'une fraction de densité légère capable d'inhiber la fonction T lymphocyte humain (formation des rosettes E avec les érythrocytes de mouton) par Chisari et Edgington en 1976 (77), de nombreux chercheurs se sont intéressés au rôle immunorégulateur des lipoprotéines.

Une sous fraction des LDL de densité 1,050-1,063 g/ml était d'abord isolée du sérum de sujets normaux et appelée LDL-In (LDL-inhibitor) par Curtiss et Edgington (12). Cette fraction de lipoprotéine inhibe fortement in vitro la prolifération lymphocytaire stimulée par les lectines mitogéniques ou les cellules allogéniques. Curtiss et al, (15,16) ont ensuite montré que les LDL-In sont capables d'inhiber in vivo la réponse anticorps anti-globule rouge de mouton chez les souris.

Par la suite, la capacité d'inhibition de la lymphoprolifération par les CM, VLDL provenant du sérum des sujets hyperlipémiques (78) ou les CM, VLDL provenant du sérum des sujets normo-lipémiques (79) a été démontrée. Enfin Morse et al. ont systématiquement étudié l'effet inhibiteur de toutes les classes de lipoprotéines humaines sur la lymphoprolifération ; les résultats montrent que ces dernières sont toutes capables d'inhiber cette fonction immune (80). Des résultats identiques ont été obtenus avec des lipoprotéines de rats (81) et de souris saines (14).

D'une manière générale, les lipoprotéines de différentes espèces exercent leurs effets immunodépresseurs à des concentrations infra-physiologiques. En fonction de la quantité en protéine, l'immunodépression va décroissant des : lipoprotéines de basse densité aux lipoprotéines de haute densité.

## 2) Mécanisme d'immunorégulation par les lipoprotéines

Actuellement les contributions respectives de la partie apolipoprotéinique et de la partie lipidique aux mécanismes cellulaires de l'immunodépression ne sont pas encore bien établies. Cependant, de nombreuses données biochimiques et immunologiques ont permis de différencier 3 principales étapes :

### a) Fixation des lipoprotéines

Les récepteurs spécifiques des Apo B-LDL In (20), des Apo E-HDL<sub>c</sub> (13), des Apo -VLDL de rat (81) situés sur la surface membranaire des lymphocytes sont responsables de l'étape initiale au cours de laquelle les cellules immunes cibles reconnaissent et captent les lipoprotéines. Les cellules cibles seraient des T et B lymphocytes et non des macrophages (82).

### b) Interaction lipoprotéines - membrane cellulaire

Les lipoprotéines exercent l'action inhibitrice sur les étapes initiales et membranaires de la stimulation lymphocytaire par les lectines mitogéniques comme l'accumulation des ions  $Ca^{++}$  (13), des GMP cycliques (guanosine 3', 5' monophosphate) (83).

### c) Régulation du métabolisme intra-cellulaire

L'inhibition de la synthèse de protéine préreplicative (84), des stérols (85,86) et du DNA sera l'étape finale par laquelle les lipoprotéines régulent la prolifération lymphocytaire.



## MATERIELS ET METHODES

## MATERIELS ET METHODES

### I - ANIMAUX

Les souris femelles Swiss (élevage JANVIER) et C 57-BL 6 (élevage IFFA CREDO) âgées de 8 à 12 semaines sont utilisées pour l'infection et les études immunologiques.

### II - INFECTION

#### 1) Mode d'infection

Les souris sont infectées avec la souche Plasmodium chabaudi AJ par injection intrapéritonéale de  $10^6$  globules rouges parasités (dans 0,5 ml de milieu 199) par souris (Milieu 199 de Flow. Asnières. France). L'infection est ainsi obtenue par "passage mécanique".

#### 2) Contrôle de l'infection

La parasitémie (pourcentage de globules rouges parasités/globules rouges totaux) est mesurée par la lecture de frottis sanguins fixés par le Méthanol et colorés par le colorant de Giemsa (Merck-RFA).

### III - ISOLEMENT DES LIPOPROTEINES

Les animaux étant toujours soumis à un jeûne de 10 heures avant d'être prélevés, les sérums poolés de souris saines de contrôle ou de souris au 9ème jour de l'infection sont additionnés d'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodic) à raison d'1mg/ml. Les VLDL, LDL et HDL sont isolées par ultracentrifugation séquentielle de flottaison aux densités successives de 1,006,

1,063, 1,210 g/ml ajustées avec KBr (Bromure de potassium) selon Havel et al. (87). Les CM sont préalablement isolés par 1 heure d'ultracentrifugaison à 20.000 g (sur BECKMAN L8-55. USA).

La fraction sérique de densité supérieure à 1,210 est appelée sérum délipoprotéinisé.

#### IV - CARACTERISATION DES LIPOPROTEINES

##### 1) Dosages des lipides et des protéines

Les cholestérols (libres et estérifiés), triglycérides et phospholipides sont dosés en utilisant le "Kit" Boehringer (Boehringer-RFA). Les protéines sont dosées selon la technique décrite par Lowry (88).

##### 2) électrophorèse en gel d'Acrylamide-SDS

L'électrophorèse en gradient discontinu d'acrylamide-SDS est réalisée dans les conditions décrites par Laemmli (89) avec la solution de Tris-Glycine 0,024 M, pH 8,6 et 0,1 % SDS, comme tampon de migration. Le gel d'arrêt contient 3 % d'acrylamide et 1 % de SDS, le gradient de gel de séparation varie de 5 % à 20 % et contient 1 % de SDS. Les lipoprotéines sont préalablement chauffées à 100° C pendant 1 minute en présence de 0,1 % de SDS, 6,5 µg (en protéine) de VLDL sont déposés et la migration s'effectue à 7,5 mA par plaque de gel (9 x 13 x 0,15 cm) pendant 18 heures. La coloration est réalisée avec le bleu de Coomassie dans le mélange méthanol-acide acétique-H<sub>2</sub>O (10:10:4). La décoloration est effectuée dans le mélange méthanol-acide acétique-H<sub>2</sub>O (8:1:16).

#### V - MARQUAGE DES LIPOPROTEINES A L'IODE -125

Le marquage radioactif des lipoprotéines est réalisé avec l'Iode 125,

selon la méthode au Chlorure d'Iode (ICl) de Mc Farlane (90), modifiée par Fidge et Poulis (91).

Les lipoprotéines (VLDL et HDL) sont dialysées contre le Tampon d'iodination contenant 0,4 M de glycine et ajusté à pH 10,0 avec NaOH. (le volume final de lipoprotéines ajusté de 2 ml avec le même tampon, la concentration en protéine est de 355  $\mu$ g à 387  $\mu$ g/ml).

Cinquante  $\mu$ l d'ICl 0,0033 M dans NaCl 2 M sont additionnés à 50  $\mu$ l de Na-<sup>125</sup>I contenant 0,2 à 1 mCi d'Iode 125 dilué dans une solution de NaOH 0,01 N. (Iode 125 : activité spécifique 100 mCi/ml-AMERSHAM. France). Le mélange ICl/Na-<sup>125</sup>I est transféré dans la solution de lipoprotéines et mélangé immédiatement au Vortex. L'Iode 125 libre non fixée sera éliminé par chromatographie sur une colonne de Sephadex G25 (0,8 cm x 13 cm) préalablement équilibrée par le tampon 0,4 M Glycine -NaOH. pH 10,0. La fraction de lipoprotéine marquée est dialysée intensivement contre NaCl 0,15 M puis filtrée sur filtre millipore 0,45  $\mu$ m.

#### VI - METHODE DE DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-ANATOXINE TETANIQUE :

TECHNIQUE RADIOIMMUNOLOGIQUE EN PHASE SOLIDE (selon Repetti et Gill, 1980, (92)).

Les anticorps anti-anatoxine tétanique (AT) sont mesurés par la fixation directe de l'anticorps sur l'antigène couplé au Sépharose activé au CNBr (Pharmacia, France), suivie par la fixation de l'antigène marqué à l'Iode 125 sur le site libre de l'anticorps.

##### 1 - Couplage de l'AT - SEPHAROSE

6 mg d'AT (équivalent à 1500 ULF d'AT) sont ajoutés à la solution de 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> + NaCl 1 M (5 ml) contenant 1 g de Sépharose-CNBr. La réaction s'opère à 4° C pendant une nuit. L'AT non fixée est éliminée par lavage du gel

avec le même tampon. La réactivation des groupements actifs se fait avec l'éthanolamine 1 M à pH 8 pendant une heure. Les protéines absorbées de façon non-covalente sont éliminées par 3 lavages successifs dans les tampons 0,1 M actétate + NaCl 1 M, pH 4 et 0,1 M borate + NaCl 1M, pH 8. Enfin. 3 lavages du gel avec le tampon Phosphate 0, 1 M pH 7,4 sont effectués et le Sépharose couplé à l'AT est conservé dans un volume final de 20 ml du même tampon additionné de  $\text{NaN}_3$  à 1 mg/ml.

### 2) Marquage de l'AT à l'Iode 125

2 mg d'AT (500 ULF AT) sont marqués à l'iode 125 selon la méthode à la Chloramine-T (93) : 0, 5 mCi (activité spécifique 100 mCi/ml) de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  en solution NaOH 0,01 N (50  $\mu\text{l}$ ) sont ajoutés à la solution d'AT. Après mélange. 100  $\mu\text{l}$  de Chloramine-T à 2,5 mg/ml (tampon borate 0,4 M pH 8) sont ajoutés et mélangés immédiatement au Vortex. On ajoute ensuite rapidement 100  $\mu\text{l}$  de Metabisulfite à 2,5 mg/ml pour arrêter la réaction.

La majorité de l'Iode 125 non fixée sera éliminée par chromatographie sur Sephadex G-25 (0,8 cm x 13 cm) tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4. De nombreuses dialyses sont effectuées pour éliminer complètement de l'Iode libre (tampon Phosphate).

### 3) Dosage des anticorps anti-AT

Deux types de tampons sont utilisés :

Tampon de dosage : Phosphate 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,1M + Tween 20 à 1ml/L + BSA à 2 g/L +  $\text{NaN}_3$  à 1 g/L.

Tampon de lavage : Phosphate 0,1 M pH 7,4 + NaCl 0,1M + Tween 20 à 1 ml/L.

Cinquante  $\mu\text{l}$  d'échantillon à doser ou de solutions standards à différentes concentrations en anticorps anti-AT (Institut Pasteur. Paris) (de 0,04 à 4 UI/ml) sont placés dans un tube Eppendorf contenant  $5 \cdot 10^{-2}$  ULF AT-Sépharose

dilué dans 200  $\mu$ l de tampon de dosage. L'incubation se fait à 37°C pendant 2 heures puis à 4°C pendant une nuit sous faible agitation rotative. L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages (tampon de lavage) (aspirer le surnageant après centrifugation à 1000 g - 5 mn).

De  $1^{125}$ I-AT ( $3 \cdot 10^{-2}$  ULF) dilué dans 50  $\mu$ l de tampon de dosage est ajouté dans chaque tube où 200  $\mu$ l de tampon de dosage sont préalablement additionnés au culot de gel.

La deuxième incubation est effectuée dans les mêmes conditions que la première. L'excès de  $1^{125}$  I-AT sera éliminé par 3 lavages et le culot contenant les complexes anticorps-antigènes marqués est transféré dans un tube à hémolyse et la radioactivité mesurée au compteur gamma (Mini GAMMA. LKB. France).

## VII - ETUDES in vivo : REPONSE ANTICORPS ANTI-ANATOXINE TETANIQUE

### 1) Réponse anticorps préexistante

#### a) Immunisation

L'immunisation des souris se réalise avec 2 injections intra-musculaires d'anatoxine tétanique (AT) IPAD T Pasteur (Institut Pasteur Paris) correspondant à 1,2 ULF antigène (dilué dans 0,2 ml d'eau physiologique) par souris et par injection. Le jour J -30 correspond à la première immunisation et le jour J -15 la deuxième immunisation.

#### b) Infection des souris ou injection de lipoprotéines :

Au jour J 0 les différents lots de souris recevront soit ( $10^6$ ) globules rouges parasités, soit des LDL provenant de souris impaludées ou de souris saines (l'étude de la seule fraction LDL résulte de la base bibliographique bien fournie sur les LDL-In de Curtiss (16)).

Les LDL sont injectées par voie intra-veineuse à raison de 2 doses par souris (une dose correspond à la quantité de LDL obtenue à partir d'une souris donneuse), la quantité protéine variant de 20 à 43  $\mu\text{g}$  selon les séries d'ultracentrifugation préparative.

#### c) Réponse anticorps

A différents moments suivant l'infection ou injection de LDL (J20, J35 et J45) les souris sont sacrifiées et leurs taux d'anticorps anti-AT mesurés par la technique radioimmunologique en phase solide.

### 2) Réponse primaire anticorps

Pour l'étude de cette réponse, en plus des souris Swiss habituellement utilisées nous avons choisi la souche de souris C57 BL6 (IFFA CREDO) en raison de son homogénéité génétique et de la non spécificité d'espèce des lipoprotéines

déjà démontrée (88).

a) Effet de l'infection sur la réponse primaire

L'immunisation des souris à raison de 1,2 ULF par souris Swiss et de 1,6 ULF par souris C57 BL6 est effectuée au jour J 0. A différents moments avant ou après l'immunisation les souris sont infectées par P.chabaudi . aux jours J -14, J -9, J -7, J 0, J +7, J +13, J +20. Trente cinq jours après l'immunisation les souris sont sacrifiées et les taux d'anticorps anti-AT sont mesurés.

Certains lots de souris impaludées à J -9, J -7 avant l'immunisation seront sacrifiés au jour J 15 pour l'étude comparative de l'effet des lipoprotéines sur la réponse primaire anticorps.

b) Effet des lipoprotéines sur la réponse primaire

Deux jours avant l'immunisation, les souris reçoivent par voie intra-veineuse les VLDL, LDL, HDL ou le sérum délipoprotéinisé provenant de souris saines ou de souris impaludées depuis 9 jours. Les doses de lipoprotéines de souris saines ou infectées injectées (en mg/souris) sont : 0,052 mg et 0,132 mg pour les VLDL ; 0,071 mg et 0,096 mg pour les LDL ; 0,500 mg et 0,740 mg pour les HDL, 33 et 38 mg pour les sérums délipoprotéinisés.

Quinze à dix sept jours après l'immunisation, les souris sont sacrifiées et leurs taux d'anticorps mesurés.

VIII - ETUDES in vitro : TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

1) Préparation des cellules spléniques

La rate de souris prélevée stérilement est coupée en petits morceaux puis écrasée sur une toile de nylon disposée dans un couvercle de boîte de Petri contenant 5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco, France).

Les cellules sont filtrées sur toile de nylon et lavées 3 fois dans 20 ml de RPMI 1640 (centrifugation à 300 g -15 mn, à 4°C).

2) Lymphoprolifération stimulée par la Con A (Concanavoline A)



Les cellules spléniques sont cultivées dans des plaques à microtitration à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules/puits dans 0,2 ml de RPMI 1640 additionné de Pénicilline (100 UI/ml), Streptomycine (50  $\mu\text{g/ml}$ , Glutamine (2 mM), 2-Mercaptoéthanol ( $5 \cdot 10^{-5}$  M), et 2 % de sérum de veau foetal, selon les conditions décrites par Hsu et al. (14).

La Con A (IBF, France) est ajoutée à la quantité optimale de 0,25  $\mu\text{g}$  dans chaque puits de culture. Après 48 H d'incubation à 37°C dans l'air humide contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ , on ajoute 0,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Méthyl-thymidine (CEA, Saclay, France) dans chaque puits. Les cellules sont récupérées, après 16 H d'incubation dans les mêmes conditions) sur filtre en fibres de verre en utilisant un récupérateur automatique de cellules (Mash II, harvester, Mash II, Osi, France). La radioactivité incorporée dans le DNA est mesurée au compteur Beta (Intertechnique SL 4000) en utilisant l'Aqualuma (Lumac, Schaesberg, Nederland) comme scintillateur. Les résultats sont exprimés par la moyenne de cultures tripliquées pour chacune des conditions expérimentales.

### 3) Capacité de réponse à la stimulation mitogénique

Les cellules spléniques provenant de souris saines ou de souris impaludées depuis différents jours sont soumises à la stimulation mitogénique à la Con A (0,25  $\mu\text{g/culture}$ ). L'étude de la réponse en fonction de la concentration en Con A (de 0,062  $\mu\text{g}$  à 2  $\mu\text{g/culture}$ ) et du nombre de cellules (de  $2 \cdot 10^5$  à  $20 \cdot 10^5$ /culture) est réalisée avec les cellules spléniques qui répondent le moins à la Con A (cellules spléniques des souris au J7 et au J9 de l'infection).

### 4) Effets sur la lymphoprolifération des sérums prélevés à différents moments de l'infection

Les sérums (pools) provenant de souris saines ou de souris au J7, au J9 de l'infection sont ajoutés aux cultures immédiatement après la Con A à des concentrations en protéine allant de 500 à 6000  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5) Effet des lipoprotéines sur la lymphoprolifération

Les fractions de VLDL, LDL, HDL, sérum délipoprotéinisé provenant de souris saines, ou de souris impaludées depuis 9 jours sont ajoutées immédiatement après la Con A.

(VLDL : de 1 à 100  $\mu\text{g/ml}$  ; LDL : de 5 à 180  $\mu\text{g/ml}$ . ; HDL : de 50 à 320  $\mu\text{g/ml}$  ; sérum délipoprotéinisé : de 2500 à 25000  $\mu\text{g/ml}$ ).

L'étude de l'influence de la cinétique d'addition des lipoprotéines sur la stimulation mitogénique s'effectue à T -4 H et T + 4 H par rapport à l'addition de la Con A réalisée à T<sub>0</sub>. Pour chaque lipoprotéine les différentes concentrations sont testées, le volume maximal ne dépassant pas 40  $\mu\text{l}$  et les différents volumes de milieu de culture étant ajustés pour obtenir un volume final de 240  $\mu\text{l}$  par culture dans tous les cas, les cultures sont toujours réalisées en triplicettes.

## IX - ETUDES in vitro : SITES RECEPTEURS DES $^{125}\text{I}$ -VLDL

### 1) Caractérisation de la fixation des $^{125}\text{I}$ -VLDL sur les lymphocytes.

Cette étude est effectuée selon Ho et al. (94) avec des modifications du milieu d'incubation des cellules avec les VLDL marquées et des conditions de centrifugation pour obtenir le culot de cellules ayant fixées les lipoprotéines. Les cellules spléniques de souris saines sont préalablement cultivées (48 H) dans le milieu RPMI 1640 supplémenté d'antibiotiques et de 2 % de sérum délipoprotéinisé isolé à partir de souris saines et dans les conditions d'incubation habituelles. Les cellules viables (Coloration au bleu trypan) sont recueillies et lavées 3 fois dans le milieu HBSS (Gibco, France),  $10^7$  cellules dont plus de 95 % identifiées morphologiquement comme lymphocytes sont resuspendues dans 1 ml de HBSS et placées dans les tubes de verres siliconés (Serva, RFA).

3,5  $\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines ou de souris impaludées sont ajoutées et incubées à 4°C et à 37°C pendant des temps variables (de 0 heure à 4 heures). Après l'incubation, l'élimination des  $^{125}\text{I}$ -VLDL libres est effectuée par 3 lavages dans du HBSS (prélèvement du surnageant après centrifugation à 1200 g pendant 5 minutes et à 4°C). Le culot de cellules est ensuite prélevé et placé dans un tube à hémolyse. La radioactivité est mesurée au compteur gamma (Mini Gamma LKB).

### 2) Récepteurs des $^{125}\text{I}$ -VLDL : nombre de récepteurs et affinité cellulaire.

L'étude de régression Scatchard (95) est réalisée avec des concentrations croissantes de  $^{125}\text{I}$ -VLDL de 0,125  $\mu\text{g}$  à 7,68  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de HBSS contenant  $10^7$  cellules. L'incubation dure une heure à 4°C. Le nombre de

récepteurs par cellule et l'affinité de fixation moyenne sont calculés selon Curtiss et Edgington (20).

### 3) Spécificité de la fixation des $^{125}\text{I}$ -VLDL

La spécificité de la fixation des VLDL marquées sur les récepteurs des lymphocytes est étudié par la compétition des différentes substances non marquées. Nous nous intéressons principalement aux VLDL de souris impaludées en raison de leur plus grande affinité cellulaire. Différents ratio de VLDL de souris saines et de souris impaludées, des IgG de souris (Litton, Bionétics, France), de la Con A (IBF, France), des sérums de souris saines et infectées, ainsi que les sérums délipoprotéinisés correspondants, et des substances solubles plasmodiales (préparées selon E. Aissi-Yehouessi (96)), sont incubés avec les lymphocytes spléniques ( $10^7$  cellules/ml de HBSS) et une heure à  $4^\circ\text{C}$ .  $3,5\mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -VLDL sont ensuite ajoutés dans le milieu et incubés une heure à  $4^\circ\text{C}$ .

## **RESULTATS**

## A. LIPOPROTEINES DE SOURIS SAINES ET DE SOURIS INFECTEES.

### I - COMPOSITION EN LIPIDES ET PROTEINES

Les lipoprotéines apparues au décours de l'infection et principalement les VLDL présentent une augmentation importante des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides (Tableau 1). Les triglycérides sont augmentés de 2,8 fois, le cholestérol total de 3,7 fois, les phospholipides de 4,7 fois et les protéines de 2,5 fois par rapport aux VLDL des souris saines de contrôle. Les LDL de souris impaludées présentent une légère augmentation de ces composants. Nous notons une baisse du cholestérol estérifié (2 fois) au niveau des HDL de souris impaludées.

### II - PROPRIETES ELECTROPHORETIQUES DES VLDL

L'électrophorèse des VLDL en gel d'acrylamide - SDS montre une augmentation des protéines de poids moléculaire semblable aux Apo B et aux Apo E humaines (Figure 9) au niveau des VLDL provenant des souris impaludées.

### III - MARQUAGES DES VLDL A L'IODE 125

Le marquage des VLDL par la méthode au chlorure d'Iode présente un rendement de 25 %, cette méthode permettant de marquer de façon plus sélective la partie protéinique des lipoprotéines. En effet 93 % de la radioactivité se trouve au niveau des protéines précipitées par l'acide trichloroacétique à 15%. Environ 8 % de la radioactivité est retrouvée dans la fraction lipidique en traitant les VLDL marquées par l'isopropanol. (Le marquage des VLDL par la méthode classique à la Chloramine T donne un rendement inférieur à 1 % (91)).

## B. ETUDES IN VIVO : REPOSE ANTICORPS



TABEAU 1 : COMPOSITION EN LIPIDES DES LIPOPROTEINES SERIQUES DES SOURIS SAINES DE CONTROLE ET DES SOURIS INFECTEES A J9 ,

Composition en $\mu\text{g/ml}$ de sérum	V L D L		L D L		H D L	
	sSC	sI	sSC	sI	sSC	sI
TRIGLYCERIDES	533	1533	103	126	003	532
CHOLESTEROL TOTAL	79	295	116	161	450	655
CHOLESTEROL LIBRE	54	214	64	111	238	450
CHOLESTEROL ESTE- RIFIE	25	81	52	49	215	104
PHOSPHOLIPIDES (PC, LysoPC. SM.)	199	954	135	258	659	699
PROTEINES	103	263	142	192	997	1482

sSC : souris Saines de Controle , sI : souris infectées ,

PC:phosphatidylcholine, LysoPC: lysophosphatidylcholine ,SM:sphingomyeline.

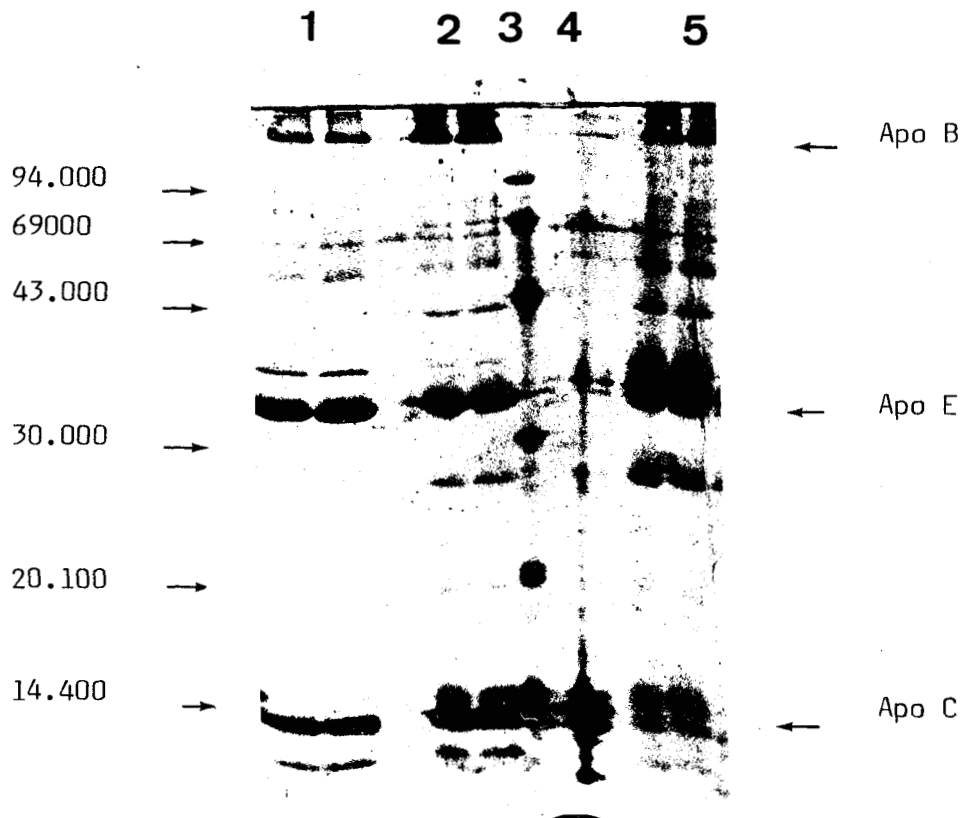


Figure 9 . Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS des VLDL .

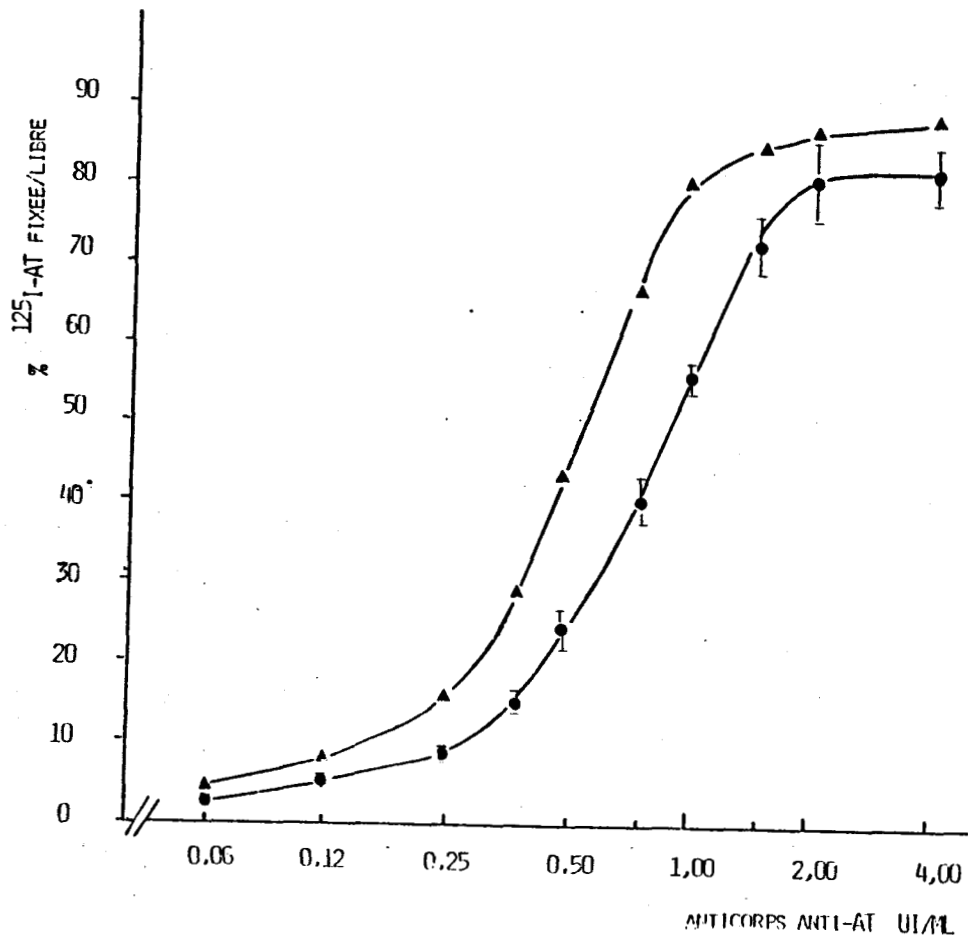
6,5  $\mu$ g de VLDL provenant des souris saines (1), des souris impaludées à J9,5 (2) à J 8,5 (5) , ainsi que les marqueurs de poids moléculaire (3) et les VLDL humaines<sup>(4)</sup> sont déposés dans chaque puit. Le gradient du gel est de 5% à 20%.

#### I - DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-ANATOXINE TETANIQUE (AT)

La technique radioimmunologique en phase solide que nous adoptons pour les études de la réponse immune présente une bonne sensibilité (seuil de détection : 0,06 UI/ml d'anticorps anti-AT), de faibles variations intra-séries et inter-séries, (4 % et 6 % respectivement) et une réaction non-spécifique négligeable ( $^{125}$ I-AT fixé/libre du blanc inférieur à 0,7 %).

Après la fixation de l'anticorps sur le Sépharose-AT, deux quantités d'antigène marqué à l'Iode 125 sont utilisés :  $3 \cdot 10^{-2}$  ULF pour le dosage des faibles quantités d'anticorps (réponse primaire) et  $7 \cdot 10^{-2}$  pour le dosage des fortes quantités d'anticorps (réponse anticorps préexistante) (Figure 10).





**FIGURE 10** : Dosage Radioimmuno logique en phase solide des anticorps anti-AT. L'anatoxine couplée au Sépharose 4B est ajoutée à raison de  $5 \cdot 10^{-2}$  ULF:tube, l'anatoxine marquée à l'Iode 125 à raison de  $3 \cdot 10^{-2}$  ULF/tube, ( ▲ ) (total de  $23225 \pm 1020$  cpm), ou de  $7 \cdot 10^{-2}$  ULF/tube, ( ● ) (total de  $54553 \pm 1863$  cpm). Chaque point représente la moyenne de 2 dosages  $\pm$  écart-type.

## II - INFECTION ET REPONSE ANTICORPS PREEXISTANTE

Les souris sont immunisées contre l'AT 30 jours et 15 jours avant l'infection par P.chabaudi réalisée au J 0. Les taux d'anticorps anti-AT sont mesurés aux J 10, J 30, J 45 après l'infection. La chute du taux d'anticorps est progressive, d'environ 75 % au J 45 par rapport au J 0 (Figure 11). L'inhibition de la réponse secondaire au cours du paludisme de rongeurs avait été décrite (97). L'infection par P.chabaudi diminue la réponse anticorps préexistante, comme le montrent nos résultats.

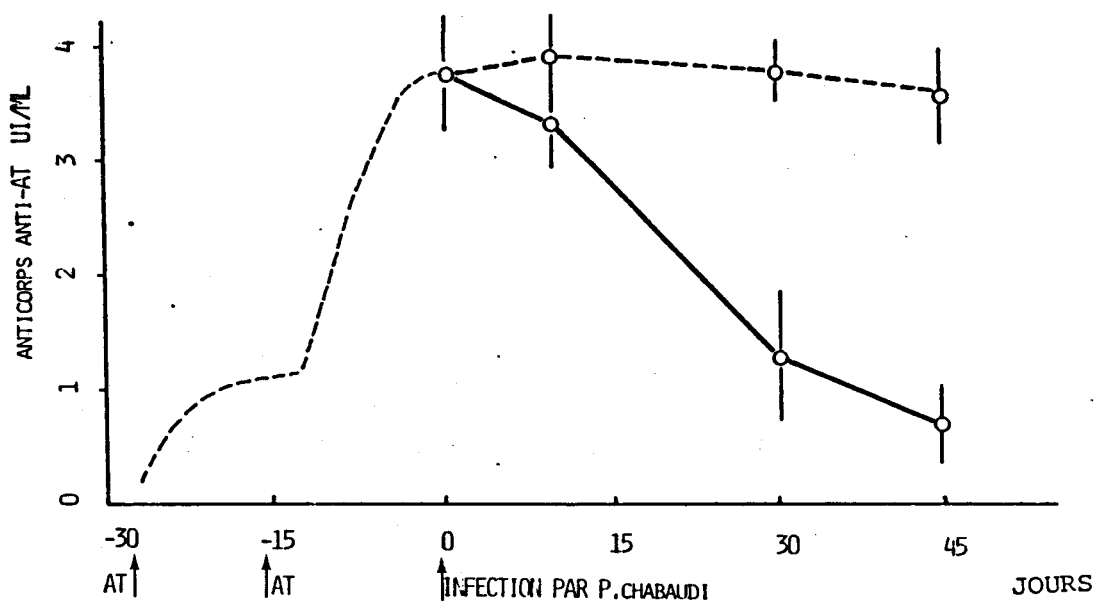


FIGURE 11

Taux d'anticorps anti-AT après infection par P.chabaudi. Les souris sont immunisées contre l'anatoxine 15 jours et 30 jours (1,2 ULF/souris) avant l'infection. Les taux d'anticorps sont mesurés à différents jours suivant l'infection. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  écart-type de la moyenne) d'un lot de 5 à 8 souris. (----) : souris saines : (—), souris impaludées.

### III - EFFETS DES LDL SUR LA REPOSE ANTI-CORPS PRE-EXISTANTE

Comme les LDL-In décrites par Curtiss et al. (16) sont capables d'inhiber la réponse anticorps anti-globule rouge de mouton chez les souris, nous avons entrepris en premier lieu l'étude de l'effet des LDL isolées du sérum, de souris saines ou de souris impaludées, sur la réponse anticorps anti-AT pré-existante.

Les sérums de souris récoltés au 9<sup>e</sup> jour de l'infection sont utilisés pour l'isolement des LDL car à ce moment, l'augmentation des lipoprotéines sériques de basse densité est maximale.

Quinze jours après la deuxième immunisation, au J 0 les souris reçoivent l'injection de LDL à raison de 25  $\mu\text{g}$ /souris. Les taux d'anticorps sont mesurés aux J 10, J 30 et J 45. Les LDL sériques de souris saines ne provoquent pas de diminution du taux d'anticorps, au contraire les LDL sériques de souris impaludées qui induisent une diminution de 75 % du taux d'anticorps comparable à celle observée dans le cas d'infection palustre expérimentale (Figure 12).

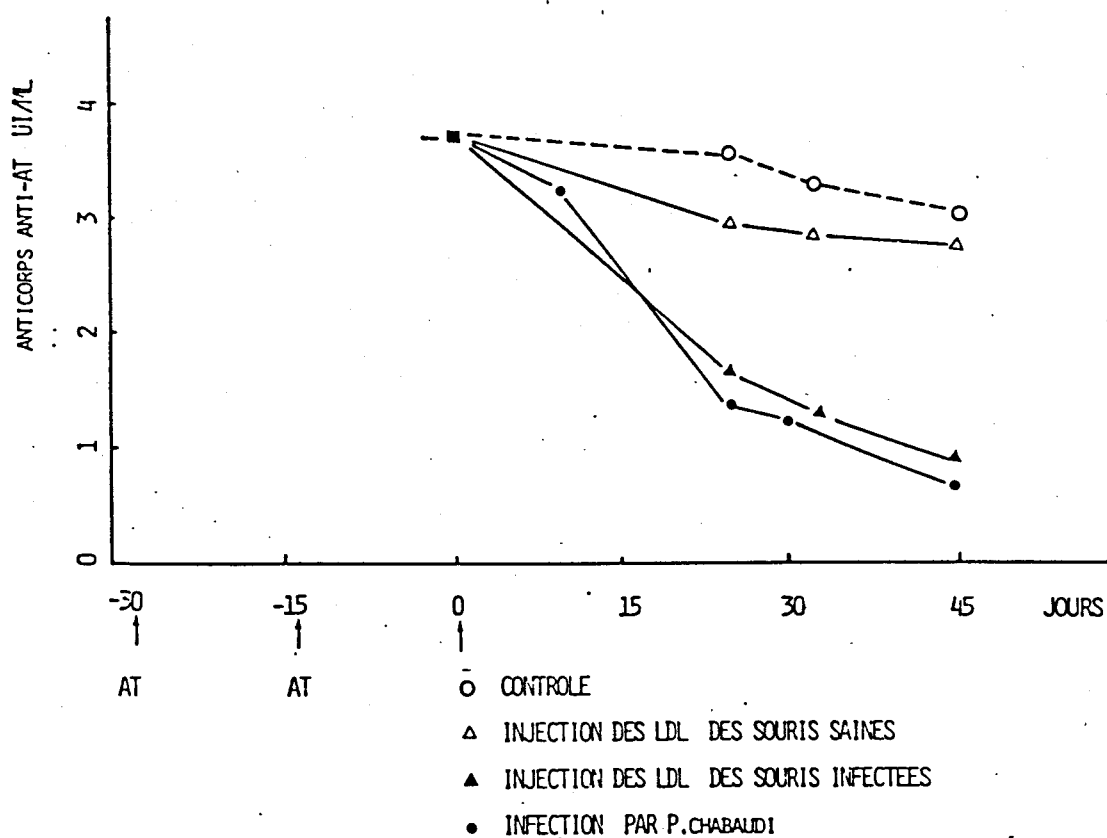


FIGURE 12 :

Taux d'anticorps après injection des LDL. Les souris immunisées reçoivent chacune 25  $\mu\text{g}$  de LDL (correspondant à 2 doses souris/souris) provenant du sérum de souris saines (  $\Delta$  ), ou de souris impaludées (  $\blacktriangle$  ). Les souris non infectées (  $\circ$  ), et les souris impaludées (  $\bullet$  ) sont utilisées comme contrôle. Chaque point représente la moyenne d'un lot de 5 à 8 souris.

Comme la quantité de LDL sérique peut fluctuer d'une expérience à l'autre d'une part et que la quantité des LDL au cours de l'infection est 2 fois supérieure à celles des souris saines de contrôle non infectées d'autre part (19), nous avons étudié l'effet immunosuppresseur des LDL en fonction des doses souris, une dose correspondant aux LDL isolées par souris. Le taux d'anticorps n'est pas significativement modifié par l'injection de 1 dose ou 3 doses souris de LDL sériques de souris saines, tandis que la diminution du taux d'anticorps est importante dans le cas de l'injection des LDL sériques de souris impaludées, la diminution est de 58 % et 76 % avec 1 dose souris et 3 doses souris respectivement (Figure 13).

Les LDL-In humaines inhibent la réponse anticorps primaire surtout au niveau de l'induction de cette réponse immune (16). Nous avons montré que les LDL de souris impaludées peuvent diminuer la sécrétion des anticorps anti-AT (104).

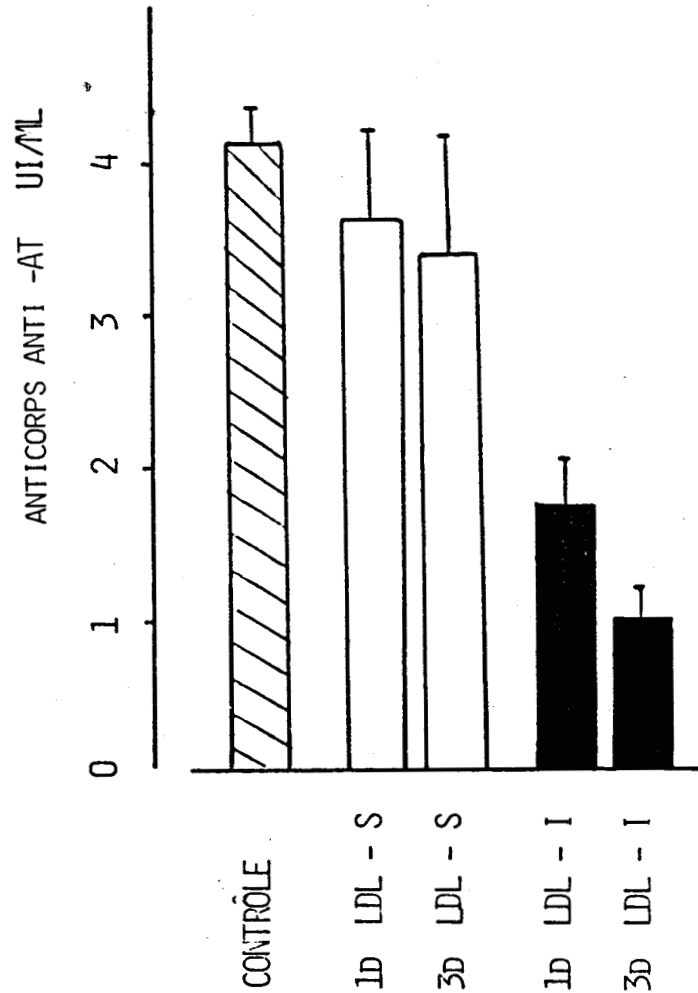


FIGURE 13 :

Taux d'anticorps anti-AT après injection des LDL à des doses variables. Les souris immunisées reçoivent soit 1 dose souris, soit 3 doses souris de LDL. Les résultats sont exprimés par la moyenne ( $\pm$  écart type à la moyenne) d'un lot de 5 à 8 souris. (  $\square$  ), LDL de souris saines, (  $\blacksquare$  ), LDL de souris impaludées.

#### IV - INFECTION ET REPOSE PRIMAIRE ANTICORPS

Les différents lots de souris sont infectés par P.chabaudi avant ou après le J 0 de l'immunisation à l'AT. A J 35 les taux d'anticorps sont mesurés. La diminution du taux d'anticorps est très marquée chez les souris impaludées avant l'immunisation, elle est de 88 % à 93 % par rapport aux souris de contrôle non infectées. Le taux d'anticorps diminue de 67 % à 73 % chez les souris impaludées au même jour ou 7 jours après l'immunisation, tandis que la diminution du taux d'anticorps est nettement moins marquée quand l'infection est effectuée aux périodes plus avancées de la production des anticorps, notamment aux jours 13 et 20 après l'immunisation (Figure 14).

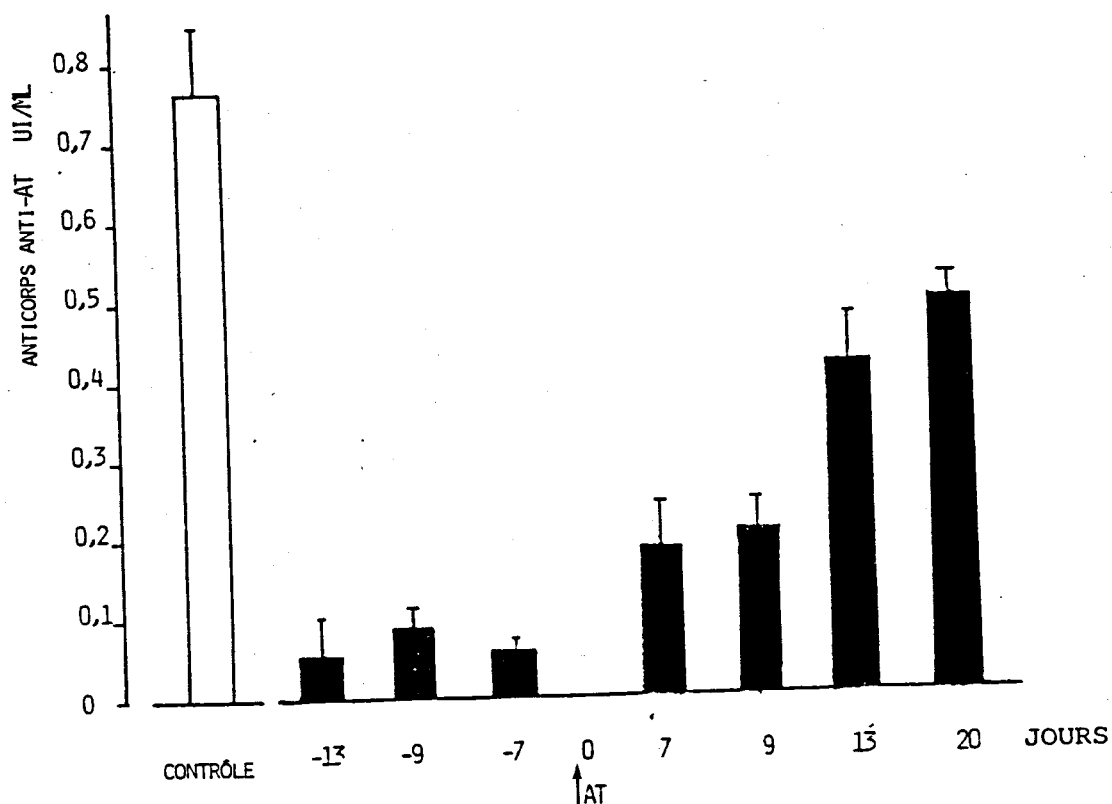


FIGURE 14 :

Taux d'anticorps anti-AT après infection par P.chabaudi. Les souris sont infectées soit 7, 9, ou 13 jours avant l'immunisation, soit 7, 9, 13, ou 20 jours après l'immunisation (1,6 ULF AT/souris). Les taux d'anticorps sont déterminés 35 jours après l'immunisation. Les résultats sont exprimés par la moyenne (  $\bar{x}$  écart-type à la moyenne) d'un lot de 8 souris. (  $\square$  ), souris non infectées de contrôle, (  $\blacksquare$  ), souris impaludées.

La production des anticorps anti-AT atteignant son maximum vers 15<sup>ème</sup> jour suivant l'immunisation, nous avons étudié l'influence de l'infection, réalisée 9 jours et 7 jours avant l'immunisation, sur le taux d'anticorps mesuré à J 15. Par rapport aux souris saines de contrôle, les souris impaludées présentent une forte diminution du taux d'anticorps anti-AT, de 90 à 92 % (Figure 15).

Nos résultats confirment la suppression de la réponse anticorps primaire contre de nombreux antigènes (3,30). Cependant la particularité de la souche Plasmodium chabaudi (infection synchrone, aigue, et non fatale) nous permet de constater que le maximum d'inhibition de la réponse est surtout obtenu quand l'immunisation est réalisée au moment de l'augmentation des lipoprotéines de basse densité (jour J 9 de l'infection).

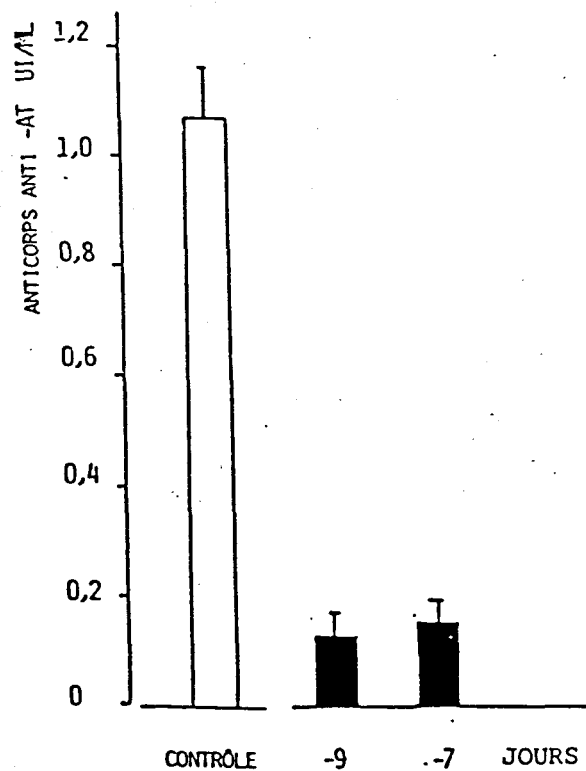


FIGURE 15 :

Taux d'anticorps anti-AT après infection par P.chabaudi. Les souris sont infectées 7 jours ou 9 jours avant l'immunisation (1,6 ULF AT/souris). Les taux d'anticorps sont déterminés 15 jours après l'immunisation. ( □ ), souris non infectées de contrôle, ( ■ ), souris impaludées. Les résultats sont exprimés par la moyenne ( ± écart-type à la moyenne) d'un lot de 8 souris.

V - EFFETS DES LIPOPROTEINES SERIQUES DE SOURIS IMPALUDUEES SUR LA REPONSE PRIMAIRE ANTICORPS

L'infection déprimant fortement la réponse primaire anticorps, il était intéressant d'apprécier l'influence des différentes fractions lipoprotéiniques isolées du sérum de souris impaludées sur cette réponse immune. L'injection des principales lipoprotéines sériques de souris saines de contrôle ou de souris au jour 9 de l'infection est réalisée à raison de 2 doses souris par souris, 2 jours avant l'immunisation à l'AT (jour J0). Quinze jours plus tard les taux anticorps sériques anti-AT sont mesurés.

Les VLDL de souris impaludées provoquent la plus forte inhibition de la production d'anticorps anti-AT, de l'ordre de 82 %, suivies par les LDL de souris impaludées avec 68 % d'inhibition.

Les VLDL de souris saines n'inhibent que de 30 %, tandis que les LDL, HDL, le sérum délipoprotéinisé de souris saines et les HDL et le sérum délipoprotéinisé de souris impaludées ne modifient pas de façon significative la réponse primaire anticorps anti-AT. (Figure 16).

L'inhibition de la réponse anticorps anti-globule rouge de mouton par les HDL de souris saines (1,3 mg/souris) a été décrite (98). Dans nos expériences une dose correspondant à 0,50 mg de HDL de souris saines et à 0,75 mg de HDL de souris impaludées, ne provoquent pas d'inhibition de la réponse anticorps.

Ainsi, seules les lipoprotéines de basse densité, VLDL et LDL, isolées du sérum de souris au jour 9 de l'infection peuvent exercer une action inhibitrice marquée sur la réponse primaire anticorps spécifiques.



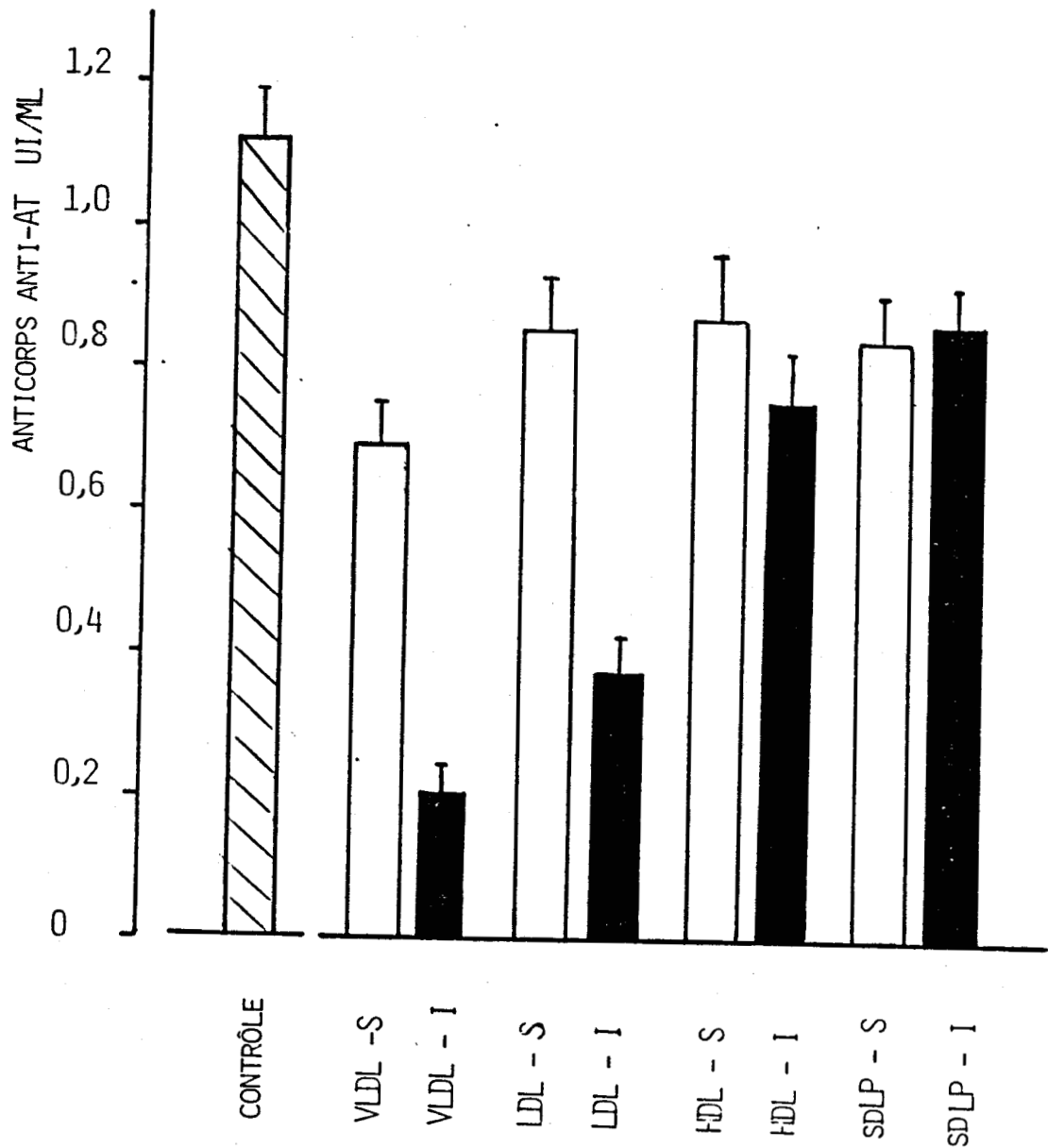


FIGURE 16 :

Taux d'anticorps après injection des lipoprotéines. Deux jours avant l'immunisation (1,6 ULF AT/souris), les souris reçoivent des lipoprotéines isolées du sérum de souris saines ( □ ), du sérum de souris impaludées ( ■ ) ou du sérum délipoprotéinisé (sd LP). Les taux d'anticorps sont mesurés 15 jours après l'immunisation. Les résultats sont exprimés par la moyenne ( ± écart - type à la moyenne) d'un lot de 5 à 8 souris.

## C - ETUDES IN VITRO : TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

### I - CAPACITE DE REPONSE A LA STIMULATION MITOGENIQUE DE CELLULES SPLENIQUES DE SOURIS IMPALUDEES

Les cellules spléniques sont prélevées aux périodes bien précises de l'infection par P.chabaudi et stimulées par le mitogène Con A (Concanavaline A). Cette expérience est réalisée dans le but d'étudier la relation entre l'intensité de l'infection, les modifications des lipoprotéines de basse densité et la capacité de réponse des lymphocytes spléniques à la stimulation mitogénique.

Les résultats montrent qu'au jour 7 de l'infection, jour où la parasitémie est maximale (60 % de globules rouges parasités), la capacité de réponse des cellules spléniques diminue de 55 % par rapport à celle des cellules spléniques de souris saines de contrôle. La capacité de réponse des cellules spléniques prélevées au jour 9 de l'infection diminue de façon très marquée ; la diminution est de 90 %. A partir de ce moment la parasitémie commence à décroître fortement (parasitémie de 10 à 15 %) alors que l'augmentation des VLDL et LDL atteint son maximum. Au jour 12 de l'infection, la parasitémie n'est plus détectable et la répartition des lipoprotéines redevient presque normale ; la réponse des cellules spléniques à la Con A est comparable pour les animaux infectés et les animaux sains de contrôle (Figure 17).

Ainsi, la plus forte diminution de la capacité de réponse des cellules spléniques à la stimulation par la Con A est obtenue non au pic de la parasitémie mais plutôt au moment où l'on observe le maximum d'augmentation des lipoprotéines sériques de basse densité. Ceci confirme les observations précédemment décrites au cours du paludisme des rongeurs à P.berghei (4) et du paludisme des primates à P.falciparum (5).

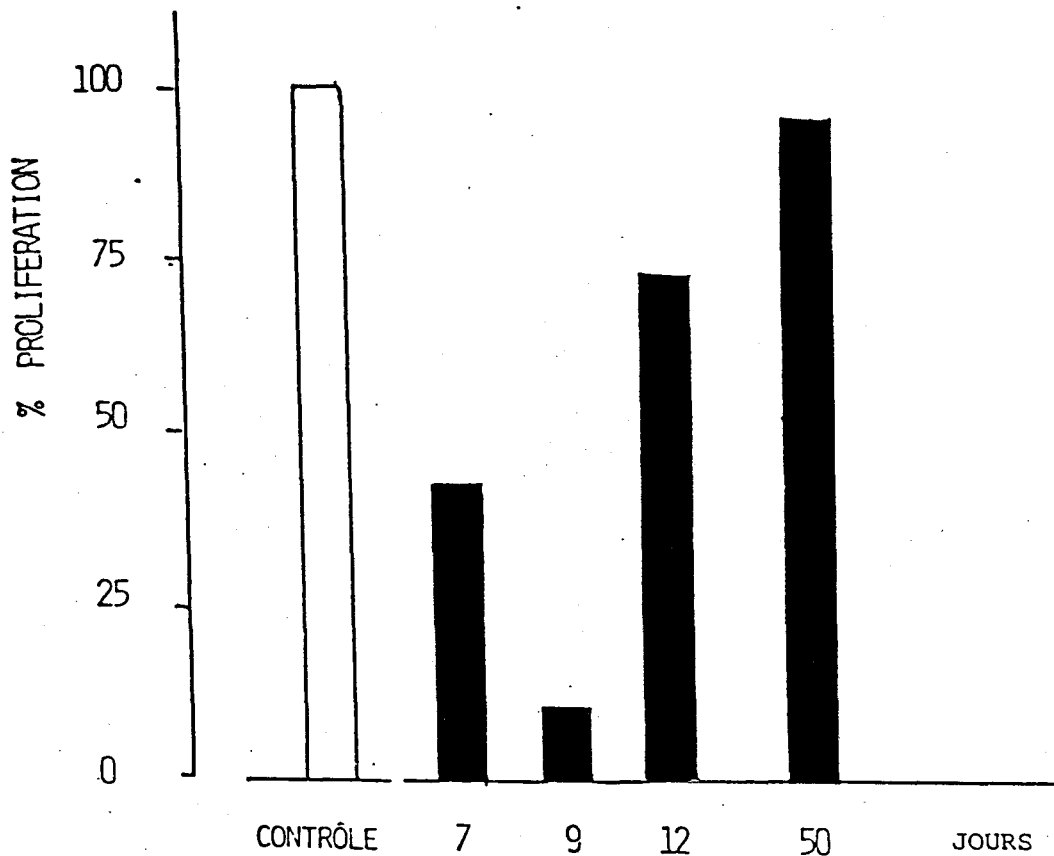


FIGURE 17 :

Capacité de réponse à la stimulation mitogénique de cellules spléniques de souris infectées. Les cellules spléniques prélevées chez des souris à différents jours de l'infection sont stimulées par la Con A à raison de  $0,25 \mu\text{g}/\text{culture}$  de  $5 \cdot 10^5$  cellules. Les résultats exprimés représentent la moyenne de cultures tripliquées. Trois souris dont les cellules ne sont pas mélangées sont étudiées pour chaque point tripliqué. ( ■ ), cellules spléniques de souris infectées, ( □ ), cellules spléniques de souris saines (contrôle 100 % de prolifération).



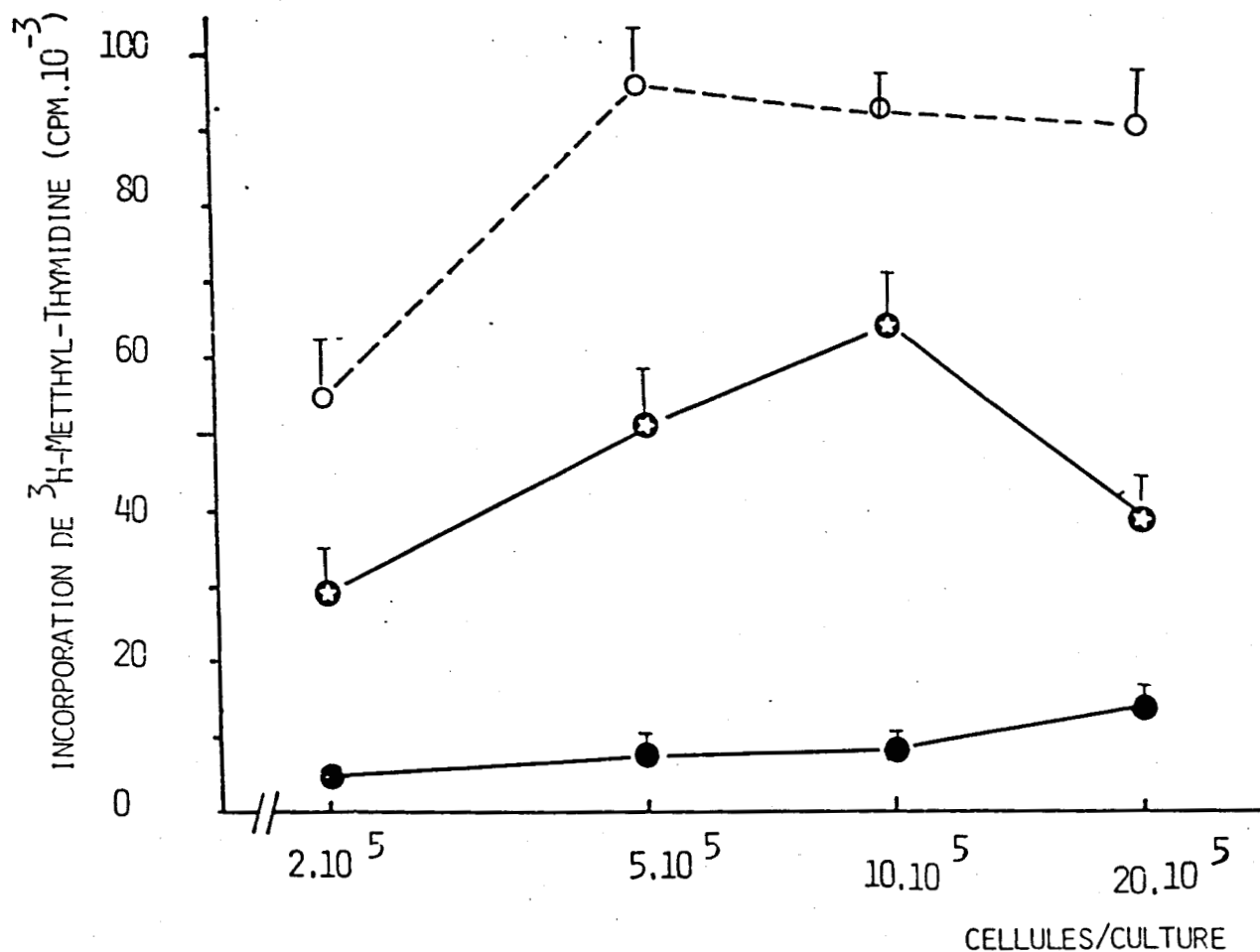


FIGURE 18 :

Réponse à la Con A des cellules spléniques en fonction de leur nombre. Toutes les cultures sont stimulées à raison de  $0,25 \mu\text{g}$  de Con A par culture. Chacun des points représente la moyenne calculée sur trois cultures ( $\pm$  écart-type).

(○) souris saines - (⊕) souris infectées depuis 7 jours.

(●) souris infectées depuis 9 jours.



Le nombre des lymphocytes T et B de la rate étant fortement diminué au cours du paludisme des rongeurs (9), il nous a semblé nécessaire d'étudier la réponse à la stimulation mitogénique en fonction du nombre de cellules et de la concentration en mitogène. Les résultats montrent que les cellules spléniques prélevées au jour 9 de l'infection répondent très faiblement à la stimulation mitogénique indépendamment du nombre de cellules (figure 18) et de la concentration en Con A (Figure 19).

Nous avons ainsi montré que la diminution de la réponse des lymphocytes à la stimulation mitogénique est absolue. Il semble impossible dans ces conditions de conclure à une activation de cette fonction immune en se basant sur l'index de réponse calculé à partir du nombre total de cellules spléniques comme l'on fait d'autres auteurs (99).

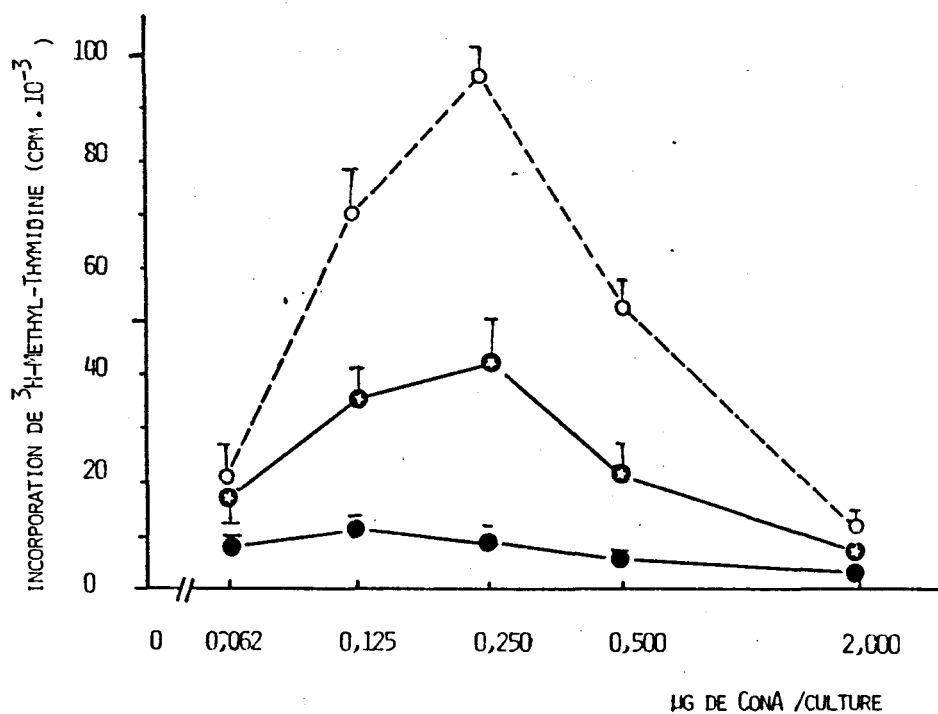


FIGURE 19 :

Capacité de réponse en fonction de la concentration de Con A. Les cellules spléniques des souris au jour 7 et au jour 9 de l'infection ont stimulées par la Con A à différentes concentrations (0,06 µg à 2 µg/0,2 ml de culture de  $2 \cdot 10^5$  cellules). Chaque point représente la moyenne de 3 cultures ( $\pm$  écart-type). ( ○ ) souris saines de contrôle, souris au jour 7 de l'infection ( ☆ ), souris au jour 9 de l'infection ( ● ).

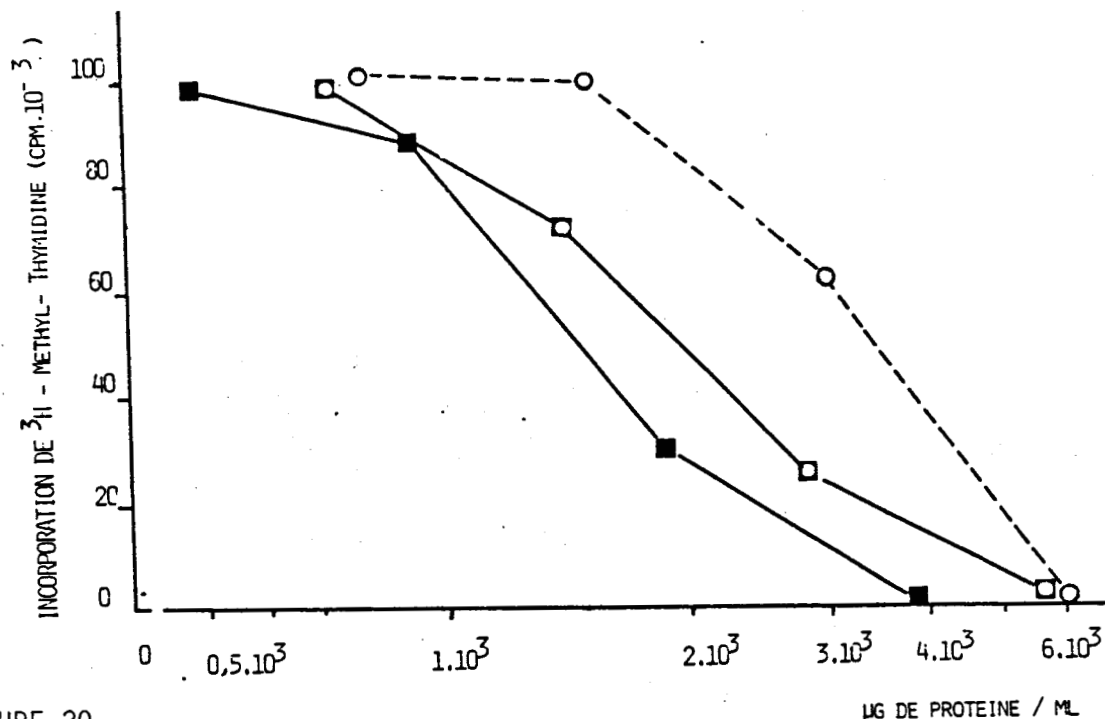


FIGURE 20

Effet des sérums de souris impaludées sur la lymphoprolifération. Différentes quantités de sérum de souris saines (○), de souris au jour 7 (□), au jour 9 (■) de l'infection, sont ajoutées dans les cultures de cellules spléniques stimulés par la Con A (0,25 µg/culture). Chaque point représente la moyenne (± écart-type) de 3 cultures.

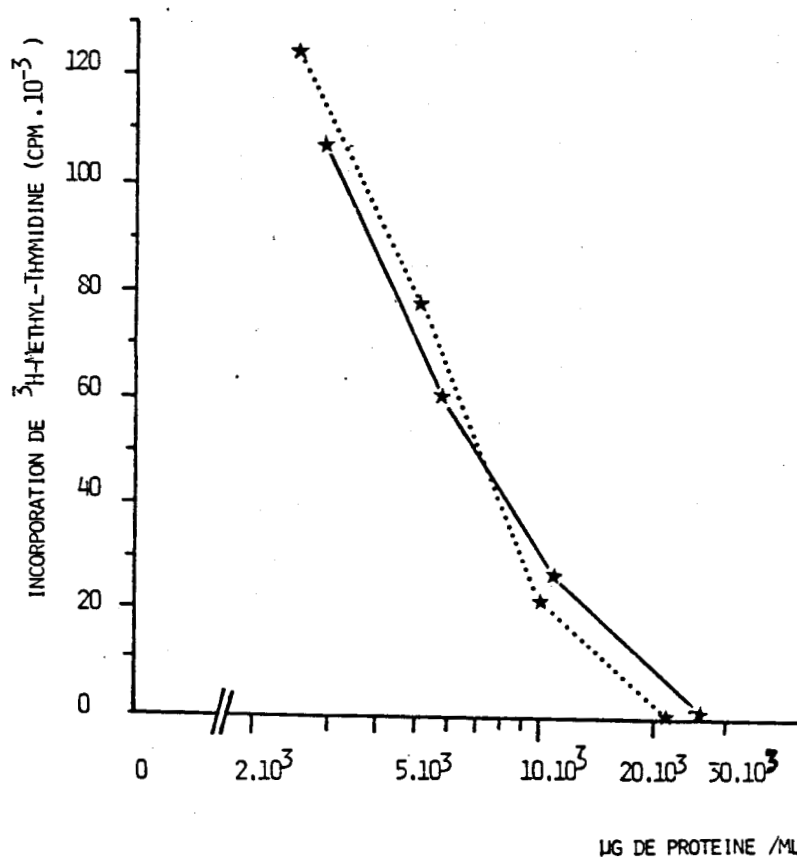


FIGURE 21 :

Effet des sérums délipoprotéinisés sur la lymphoprolifération. souris saines (★---★), souris au jour 9 de l'infection (★—★). Mêmes conditions expérimentales que pour la figure 20.

## II - EFFETS DES SERUMS DE SOURIS INFECTEES SUR LA LYMPHOPROLIFERATION

L'étude de la prolifération lymphocytaire a été réalisée avec les cellules spléniques de souris saines. L'influence des sérums de souris impaludées depuis 7 ou 9 jours sur la lymphoprolifération a été particulièrement étudiée dans cette expérience, en fonction de la quantité de sérum ajouté en  $\mu\text{g}$  de protéine par ml de milieu de culture. Le maximum d'inhibition de la lymphoprolifération est obtenu avec le sérum des souris prélevé au jour 9 de l'infection. Une inhibition de 50 % est ainsi observée avec une concentration de 1410  $\mu\text{g/ml}$  de sérum du J9 de l'infection, 1950  $\mu\text{g/ml}$  de sérum du J7 de l'infection et de 3400  $\mu\text{g/ml}$  de sérum de souris saines (Figure 20). Nos résultats montrent que le sérum de souris impaludées par P.chabaudi inhibe plus fortement la lymphoprolifération que le sérum de souris saines. Des résultats similaires ont été obtenus avec des sérums de singes infectés par P.falciparum (100).

La plus forte inhibition de la prolifération lymphocytaire provoquée par le sérum prélevé au jour 9 de l'infection coïncide avec l'augmentation des lipoprotéines sériques de basse densité observée à cette période de l'infection. La faible capacité de réponse des lymphocytes spléniques au jour 9 de l'infection, suggère que les lipoprotéines sériques présentes au jour 9 de l'infection doivent intervenir dans ce processus d'inhibition. En effet les sérums délipoprotéinisés provenant de souris saines ou de souris impaludées ne montrent qu'une faible action inhibitrice sur cette fonction immune (figure 21). Une inhibition de 50 % n'est obtenue qu'avec environ 6000  $\mu\text{g/ml}$  de sérum délipoprotéinisé.

### III - EFFETS DES LIPOPROTEINES DE SOURIS IMPALUDEES SUR LA LYMPHOPROLIFERATION

Compte tenu des résultats précédemment observés nous rapportons dans ce chapitre les résultats observés à partir des différentes fractions lipoprotéiniques et non lipoprotéiniques du sérum de souris impaludées depuis 9 jours ainsi que du sérum de souris saines. Les effets sont appréciés sur la réponse des lymphocytes spléniques de souris saines vis-à-vis de la Con A et en fonction de la quantité de lipoprotéines exprimée en  $\mu\text{g/ml}$  de culture.

Dans ces conditions, une inhibition de 50 % est obtenue avec  $43 \mu\text{g/ml}$  de VLDL,  $63 \mu\text{g/ml}$  de LDL et  $86 \mu\text{g/ml}$  de HDL du sérum de souris saines, résultats en accord avec ceux précédemment rapportés par HSU et coll. (14).

Des inhibitions beaucoup plus marquées sont observées lorsque l'on utilise les fractions lipoprotéiniques de basse densité isolées des souris impaludées. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales une inhibition de 50 % de la lymphoprolifération est obtenue avec  $7 \mu\text{g/ml}$  de VLDL et  $21 \mu\text{g/ml}$  de LDL. Au contraire, la fraction HDL de souris impaludées ne permet pas d'obtenir un résultat significativement différent de celui obtenu avec la fraction HDL de souris saines.

L'inhibition totale de la lymphoprolifération provoquée par les VLDL et les LDL sériques de souris impaludées est obtenue avec des concentrations nettement inférieures à celles de ces lipoprotéines dans le sérum ; elle est obtenue avec  $19 \mu\text{g/ml}$  en culture par rapport à  $263 \mu\text{g/ml}$  de sérum pour les VLDL et avec  $53 \mu\text{g/ml}$  en culture par rapport à  $198 \mu\text{g/ml}$  de sérum pour les LDL. Au contraire, les concentrations de VLDL et LDL de souris saines capables d'induire une inhibition complète en culture ne diffèrent pas de celles observées dans le sérum.

Elle est 13,8 fois moindre pour les VLDL et 3,6 fois moindre pour les LDL de souris impaludées, et d'environ 5 fois moindre pour les HDL de souris



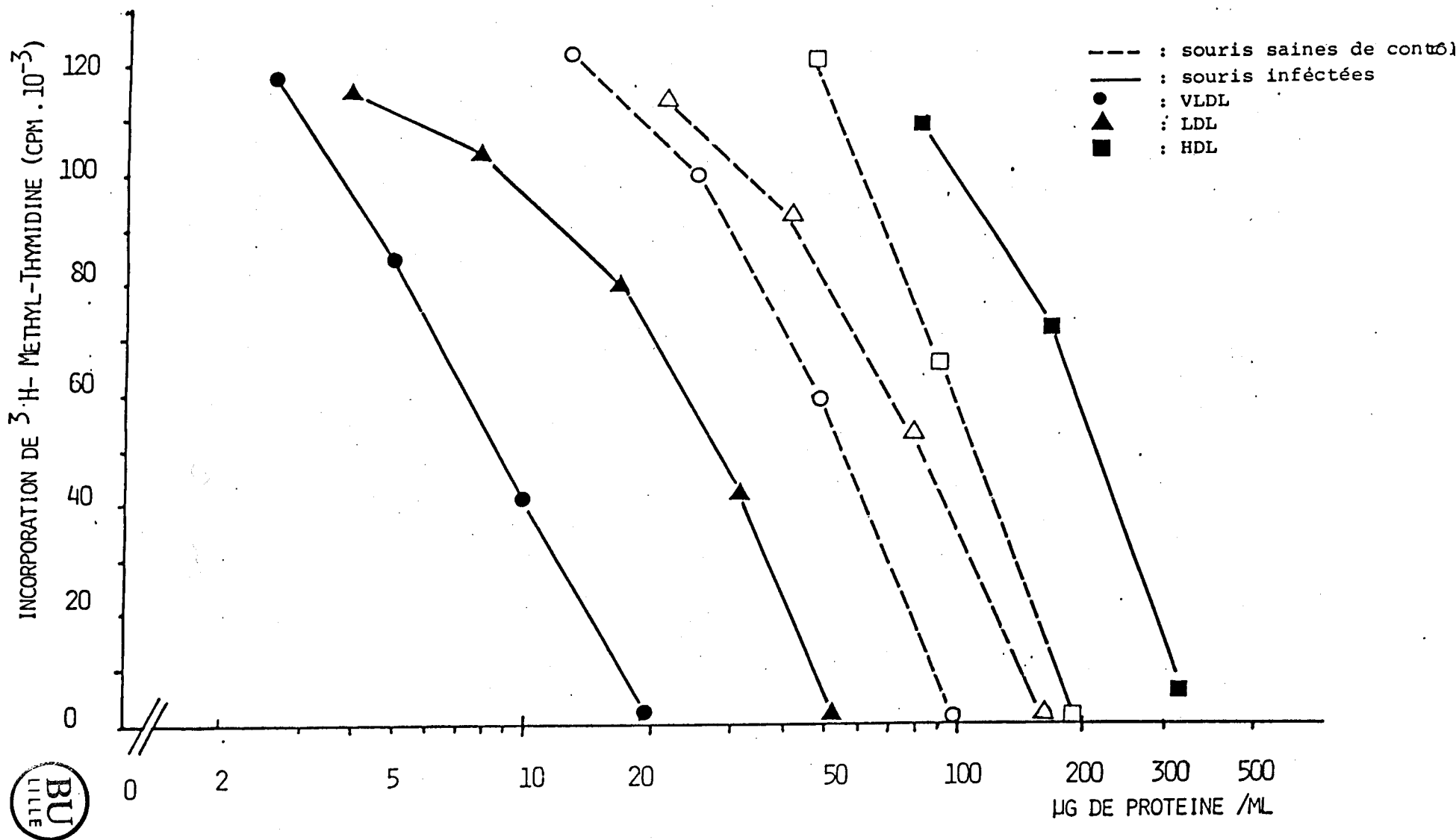


FIGURE 22 : Effet des lipoprotéines sériques sur la lymphoprolifération. Les lipoprotéines isolées du sérum des souris saines (----), ou du sérum des souris au jour 9 de l'infection (—) sont ajoutées dans les cultures immédiatement après la Con A ( $0,25 \mu\text{g}/\text{culture}$  de  $5 \cdot 10^5$  cellules). Les résultats sont exprimés par la moyenne de 3 cultures.

saines ou infectées (Tableau 1).

les VLDL de souris saines et plus encore les VLDL de souris impaludées sont les lipoprotéines les plus inhibitrices de la lymphoprolifération stimulée par la Con A.

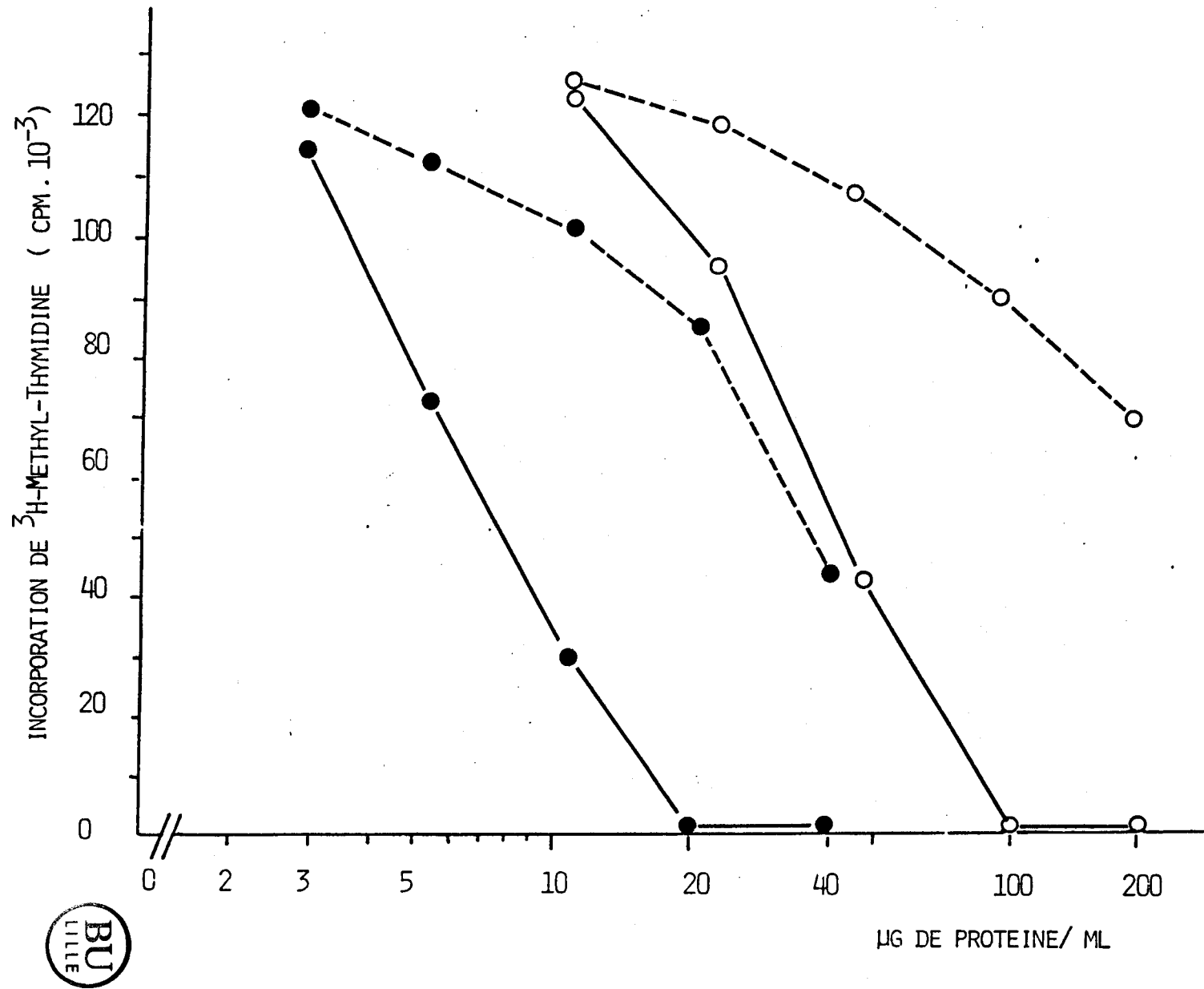
#### IV - CINETIQUE D'ADDITION DES VLDL PAR RAPPORT AU MITOGENE Con A

Les lipoprotéines inhibent la lymphoprolifération en bloquant l'initiation de la synthèse du DNA provoquée par le mitogène (81). Il était donc important de vérifier ce mécanisme à propos des lipoprotéines les plus inhibitrices, les VLDL.

Les VLDL de souris saines ou de souris impaludées sont ajoutées dans le milieu de culture 4 heures avant ou 4 heures après la Con A. Les résultats montrent qu'une fois la synthèse du DNA initiée par la Con A, les VLDL n'agissent que faiblement sur celle-ci. En effet pour 20  $\mu\text{g/ml}$  de VLDL de souris impaludées ajoutées 4 heures avant la Con A, l'inhibition de la synthèse du DNA est complète. Elle n'est plus que de 31 % quand ces VLDL sont ajoutées 4 heures après la Con A. Il en est de même pour les VLDL de souris saines ; 98  $\mu\text{g/ml}$  de VLDL ajoutées 4 heures avant la Con A inhibent complètement la synthèse du DNA, alors qu'ajoutées 4 heures après la Con A, elles n'inhibent que de 25 %. Cependant à la concentration de 40  $\mu\text{g/ml}$ , les VLDL de souris impaludées ajoutées 4 heures après la Con A, peuvent encore inhiber fortement la synthèse du DNA (74 % d'inhibition) (figure 23).

L'inhibition de la lymphoprolifération par les lipoprotéines s'exerce par un mécanisme spécifique de blocage de l'initiation de la synthèse du DNA induite par la lectine mitogénique, et non par cytotoxicité ou par interaction possible entre les VLDL et la Con A (101).

L'inhibition de la synthèse du DNA stimulée par le mitogène dépend ainsi du temps d'addition des lipoprotéines, mais surtout de leur concentration et de leur nature.



**FIGURE 23** : Cinétique d'addition des VLDL par rapport au mitogène Con A. Les VLDL sériques provenant des souris saines (O), ou des souris infectées (●), sont ajoutées dans les cultures 4 heures avant la Con A (—), ou 4 heures après la Con A (----). Les résultats sont exprimés par la moyenne de 3 cultures.



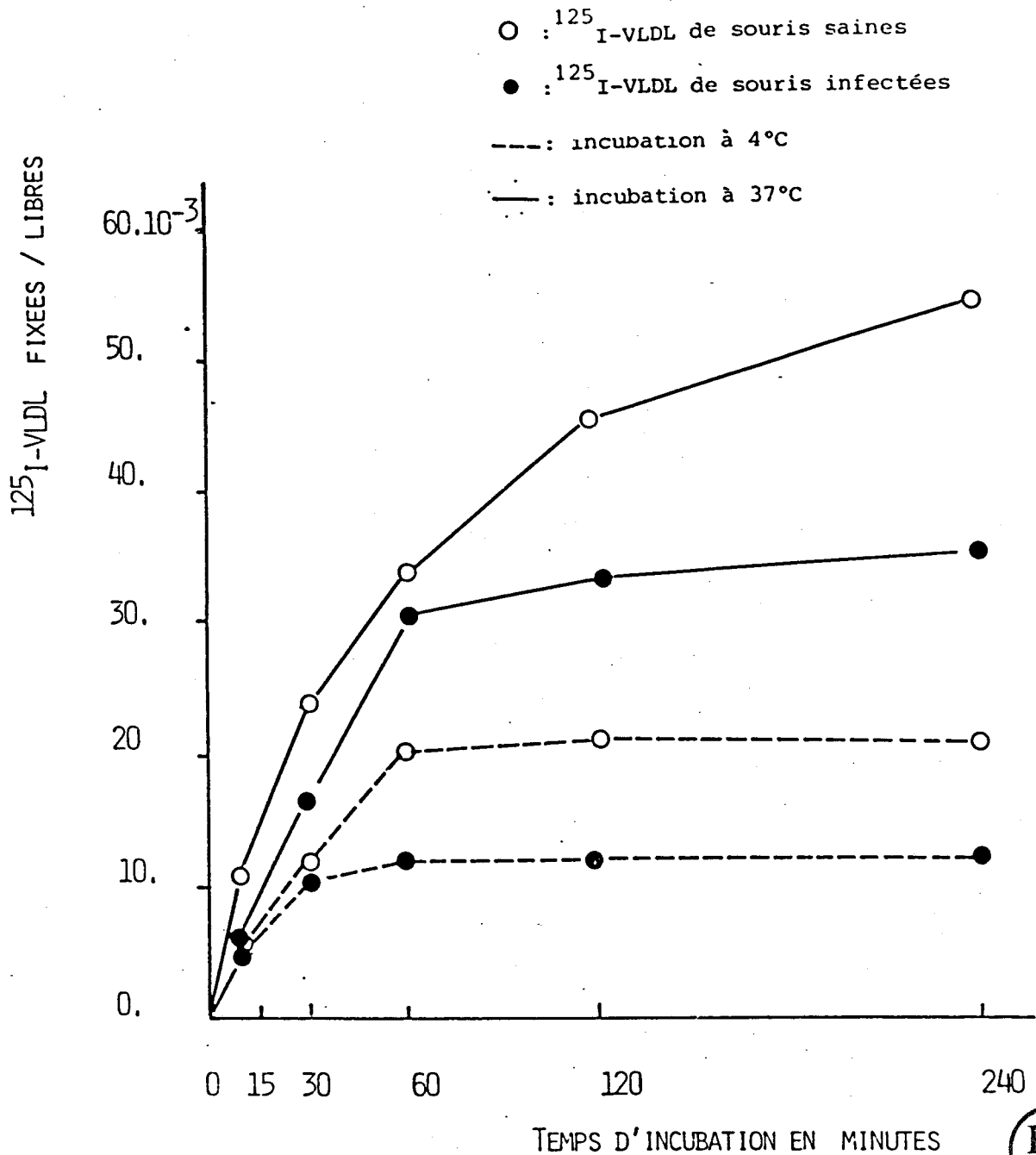
## D. ETUDES IN VITRO DES RECEPTEURS DES $^{125}\text{I}$ -VLDL

Comme la fixation des lipoprotéines sur les sites récepteurs spécifiques de la membrane des lymphocytes est l'étape primordiale par laquelle les lipoprotéines exercent leur action immunodépressive (13,20,81) il apparaissait important de déterminer comment les VLDL se comportaient vis à vis des lymphocytes.

### I - CARACTERISATION DE LA FIXATION DES $^{125}\text{I}$ -VLDL SUR LES LYMPHOCYTES

Les cellules spléniques de souris saines sont pré-incubées pendant 48 heures en absence de lipoprotéines, plus de 95 % d'entre elles étant identifiées morphologiquement comme des lymphocytes. Les  $^{125}\text{I}$ -VLDL sont ajoutées dans le milieu HBSS contenant  $10^7$  cellules et l'incubation a lieu à 4°C ou 37°C pendant des temps variant de 0 à 4 heures. La fixation des  $^{125}\text{I}$ -VLDL sur les lymphocytes s'effectue rapidement puis s'arrête après 60 minutes d'incubation à 4° C. Le pourcentage de  $^{125}\text{I}$ -VLDL fixées/libres des souris impaludées est plus faible que celui observé avec les  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines. A 37° C la fixation des  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris impaludées s'arrête après 60 minutes d'incubation alors que celle des  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines continue jusqu'à la 4ème heure d'incubation. Le rapport des VLDL fixées/libres après 60 minutes à 37° C comparé à celui à 4°C est de 1,7 fois plus grand pour les  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines et 2,6 fois plus grand pour les  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris impaludées (Figure 24). Ces résultats suggèrent que les VLDL sont internalisées dans les cellules lymphocytaires (20,81,94).

Comme l'ont décrit de nombreux auteurs (20,94), les caractéristiques observées ci-dessus traduisent bien la fixation et l'internalisation des VLDL au niveau des lymphocytes spléniques. Nous avons montré de plus que les VLDL de souris impaludées saturent les récepteurs avec un nombre inférieur de molécules fixées par rapport aux VLDL de souris saines.



**FIGURE 24** : Caractérisation de la fixation des  $^{125}\text{I}$ -VLDL sur les lymphocytes. Les lymphocytes spléniques étaient préincubés 48 heures dans un milieu ne contenant pas de lipoprotéines.  $3,5\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines ( $126\ \text{cpm}/\text{ng}$ , ou  $3,5\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris infectées ( $187\ \text{cpm}/\text{ng}$ ) sont ajoutées dans chaque tube contenant  $10^7$  cellules/ml de milieu HBSS. L'incubation est effectuée à 4°C (----), ou à 37°C (—) pendant des temps variables. Chaque point représente la moyenne de 2 tubes (variation inférieure à 8,5 %).

## II - RECEPTEURS DES $^{125}$ I-VLDL (fig. 25)

Le nombre de récepteurs des VLDL est estimé à 4°C selon l'analyse Scatchard modifiée (95). Les  $^{125}$  I-VLDL de souris saines saturent les récepteurs des lymphocytes à raison de 520 ng/10<sup>7</sup> cellules, les  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées à raison de 62 ng/10<sup>7</sup> cellules.

Le nombre de récepteurs par lymphocyte est de 22029 pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris saines et de 1588 pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées. L'affinité moyenne de fixation (K) à la demi-saturation pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris saines est de  $0,44 \times 10^8$  Litres/Mole, elle est de  $0,95 \times 10^9$  Litres/Mole pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées.

Ainsi les VLDL de souris impaludées ont une affinité 21,7 fois supérieure à celle des VLDL de souris saines. Un même nombre de récepteurs sera saturé par 8,3 fois moins de VLDL de souris impaludées.

La plus grande affinité des VLDL de souris impaludées pourrait être à l'origine d'une plus grande activité immunosuppressive : en effet, ceci a été démontré dans les cas des LDL-In par rapport aux LDL (20), et des HDL<sub>C</sub> par rapport aux LDL (13).

Le détail des calculs du nombre de récepteurs par cellule et l'affinité moyenne de fixation est décrit ci-dessous :

### 1) Nombre de récepteurs par lymphocyte

Le nombre des récepteurs des VLDL est estimé à 4°C par l'étude de régression Scatchard modifiée (95). Les  $^{125}$  I-VLDL de souris saines sont ajoutées à des concentrations de 0,12 µg/ml à 7,68 µg/ml et les  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées de 0,12 µg/ml à 2,4 µg/ml. L'extrapolation à la saturation quand le rapport  $^{125}$  I-VLDL fixées/libres est égal à zéro donne 62 ng de  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées et 520 ng de  $^{125}$  I-VLDL de souris saines fixées par 10<sup>7</sup> lymphocytes (Figure 25).

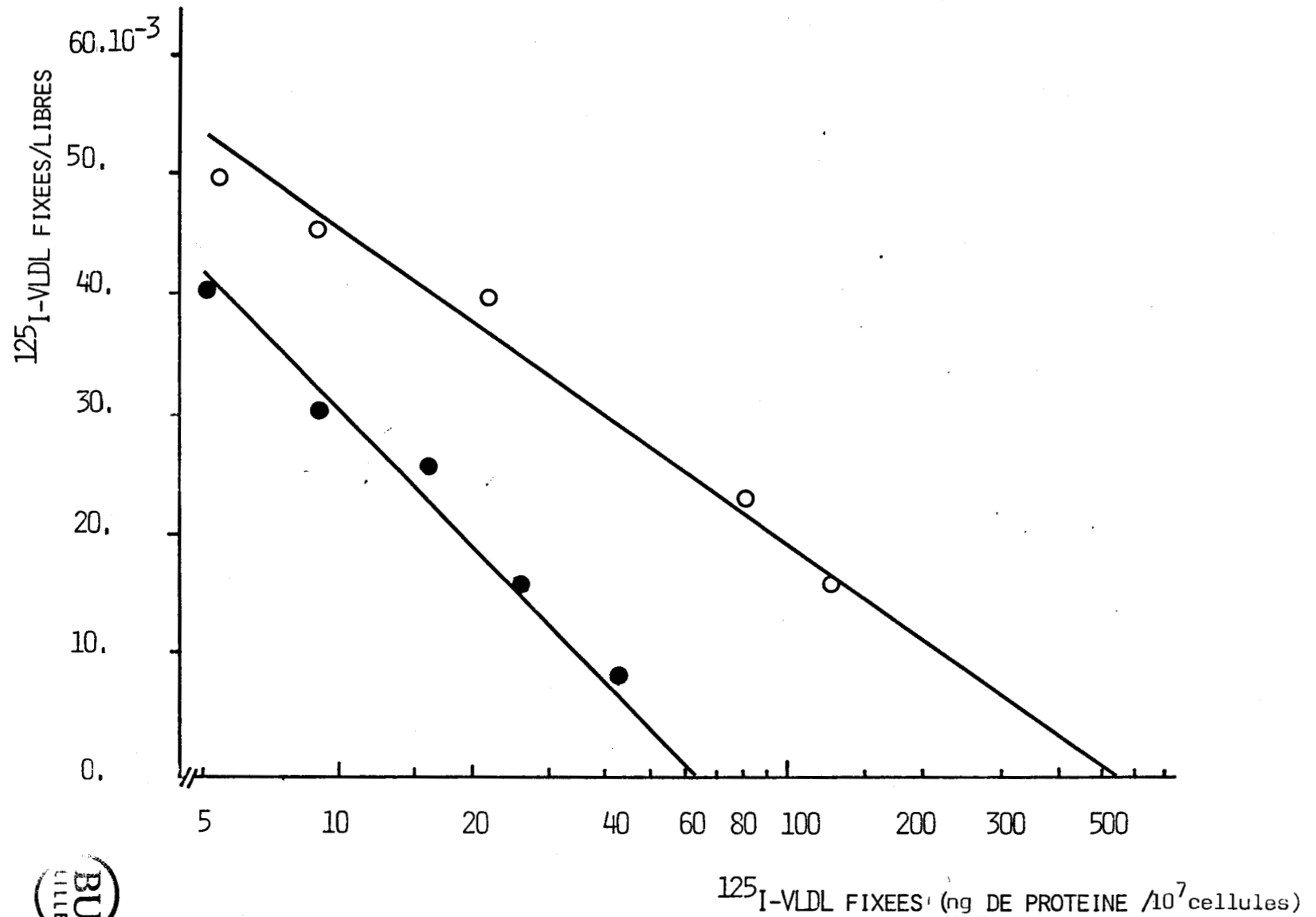


FIGURE 25 : Estimation du nombre de molécules de  $^{125}\text{I}$  - VLDL fixées par lymphocyte selon la méthode de régression Scatchard. De  $0,12\ \mu\text{g}$  à  $7,6\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$  - VLDL de souris saines (○), ou de  $0,12\ \mu\text{g}$  à  $2,4\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$  - VLDL de souris impaludées (●) sont ajoutés dans chaque tube contenant  $10^7$  cellules, et incubés à  $4^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. Chaque point représente la moyenne de 2 tubes.

La masse moléculaire des VLDL est estimée par les calculs à partir de la taille de ces lipoprotéines mesurée au microscope électronique. Le diamètre moyen des VLDL de souris saines est de 325 Å et celui des VLDL de souris impaludées est de 420 Å (\*). Ceci donne des masses moléculaires de  $12,62 \times 10^6$  et  $27,34 \times 10^6$  Daltons (102).

Le pourcentage en protéine des VLDL de souris saines est de 11,26 % et celui des VLDL de souris impaludées est de 8,63 % (Tableau 1).

Considérant que chaque molécule de lipoprotéine se fixe sur un récepteur (20), le nombre de récepteurs par cellule est égal à :

$$\frac{\text{quantité de protéine à la saturation} \times \text{nombre d'Avogadro}}{\text{masse moléculaire des VLDL en protéines}} \div \text{nombre total des cellules}$$

Le nombre de récepteurs/lymphocyte pour les  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris saines est

$$\frac{\frac{520 \cdot 10^{-9} \times 6,02 \cdot 10^{23}}{1,421 \times 10^6}}{10^7} = 22029 \text{ récepteurs/lymphocyte}$$

Le nombre de récepteurs/lymphocyte pour les  $^{125}\text{I}$ -VLDL de souris impaludées est

$$\frac{\frac{62 \cdot 10^{-9} \times 6,02 \cdot 10^{23}}{2,350 \cdot 10^6}}{10^7} = 1588 \text{ récepteurs/lymphocyte}$$

## 2) Affinité des $^{125}\text{I}$ -VLDL vis à vis des récepteurs

L'affinité moyenne de fixation (K) du ligand sur le récepteur est

\* La mesure en microscopie électronique a été réalisée par Mme BOUMA M.E. ,

U 9 - INSERM , St Antoine Paris . Nous tenons à la remercier .



calculée à la demi-saturation par la formule :

$$\frac{(L_f \times R_f)}{(L_1) (R_1)}$$

$(L_f \times R_f)$  représente la concentration molaire du complexe ligand fixé - récepteur,  $(L_1)$  la concentration molaire du ligand libre et  $(R_1)$  la concentration molaire des récepteurs libres. Dans notre cas, la concentration molaire des récepteurs libres est égale à :

$(n \times N \times c)$  où  $n$  = nombre de récepteurs inoccupés par cellule

$N$  = nombre de cellules totales

$c$  = concentration molaire d'un récepteur

$(c = 1,65 \cdot 10^{-24}$  selon Curtiss et Edgington (20) ).

Ainsi l'affinité moyenne de fixation ( $K$ ) pour les  $^{125}$  I-VLDL est égale à :

$$\frac{(^{125} \text{ I-VLDL fixées})}{(^{125} \text{ I-VLDL libre}) (n \times N \times c)}$$

La demi-saturation des récepteurs donne des concentrations molaires de VLDL libres de  $22,87 \cdot 10^{-9}$  M/L pour les VLDL de souris saines et de  $1,05 \cdot 10^{-9}$  M/L pour les VLDL de souris impaludées (figure 25).

L'affinité moyenne de fixation pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris saines est

$$\frac{182,90 \times 10^{-15}}{22,87 \cdot 10^{-9} (11014 \times 10^7 \times 1,65 \times 10^{-24})}$$

$$K = 0,44 \cdot 10^8 \text{ Litres/mole}$$

L'affinité moyenne de fixation pour les  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées est

$$\frac{13,19 \times 10^{-15}}{1,05 \times 10^{-9} (794 \times 10^7 \times 1,65 \cdot 10^{-24})}$$

$$K = 0,95 \cdot 10^9 \text{ Litres/mole}$$

### III - SPECIFICITE DE LA FIXATION DES $^{125}$ I-VLDL SUR LES RECEPTEURS

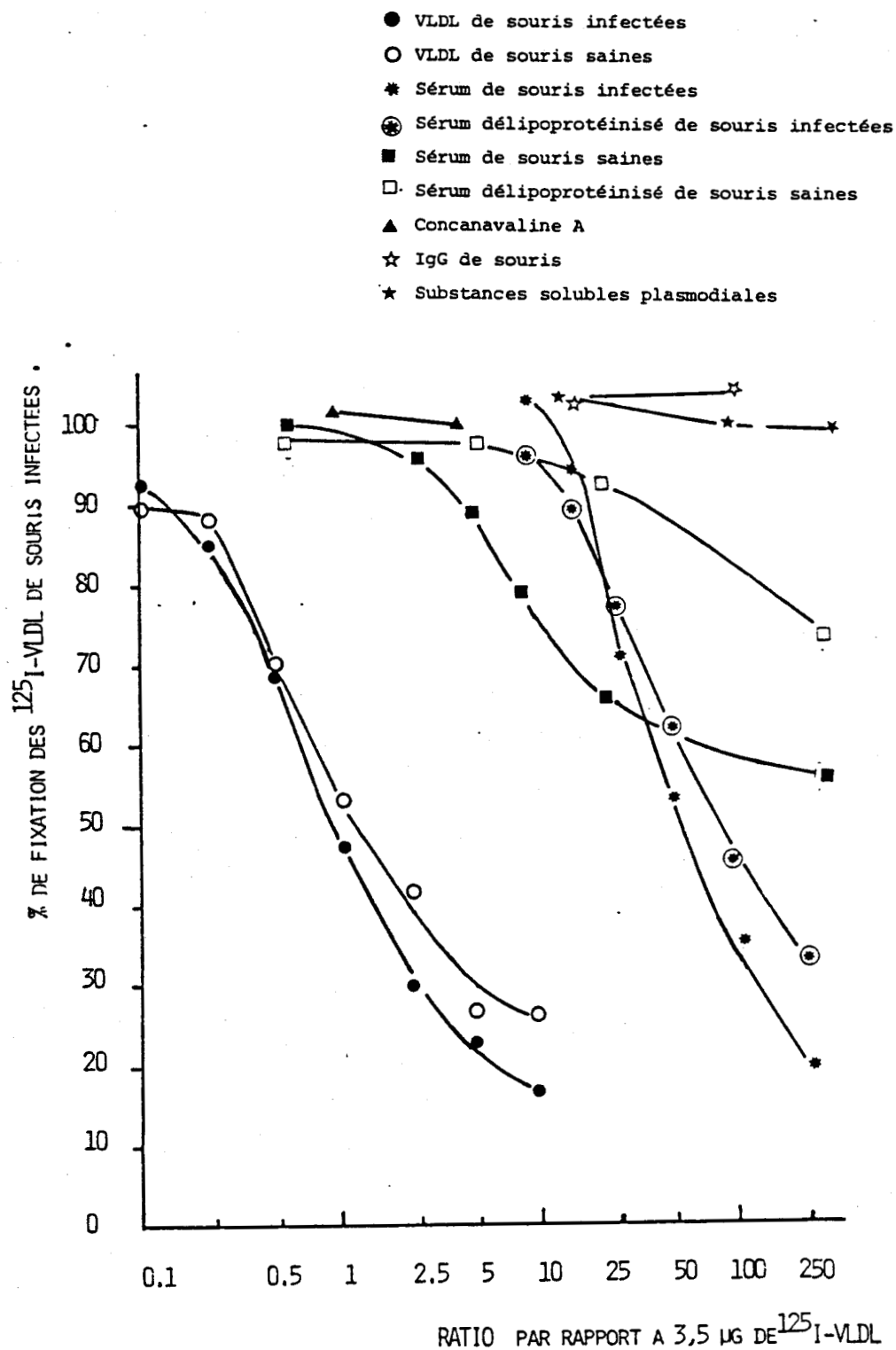
La spécificité de la fixation des  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées est particulièrement étudiée par l'inhibition compétitive et séquentielle.

Les différentes concentrations de VLDL non marquées de souris saines ou de souris impaludées ainsi que les sérums, substances plasmodiales solubles Con A, IgG de souris sont préincubés à 4°C pendant 60 minutes avec les lymphocytes, puis les  $^{125}$  I-VLDL sont ajoutées et incubées 60 minutes supplémentaires à 4°C

Il est supposé que le premier ligand une fois fixé sur la cellule sera maintenu et ne sera pas libéré lors de l'incubation du deuxième ligand radio-marqué (20).

Les résultats de la figure 26 montrent que les VLDL non marquées de souris saines et de souris impaludées inhibent fortement la fixation secondaire des  $^{125}$  I-VLDL de souris impaludées. Une inhibition de 50 % est obtenue avec un rapport en protéine de 1,4 fois et 1 fois par rapport aux VLDL marquées. L'inhibition de 50 % est observé avec des ratios de 54 fois pour les sérums impaludés, de 82 fois pour les sérums impaludés et délipoprotéinisés. Au ratio de 250 fois, les sérums de souris saines n'inhibent que 41 %, les sérums délipoprotéinisés de souris saines inhibent 23 % de la fixation des VLDL marquées. Les IgG de souris ne modifient pas la fixation des  $^{125}$  I-VLDL, même à de fortes concentrations. La Con A, à la concentration de 16,5 µg/ml (la concentration utilisée pour la stimulation des lymphocytes est de 1,02 µg/ml), n'inhibe pas la fixation des VLDL marquées. Ces résultats suggèrent que les molécules possédant des sites de fixation communs par leurs apolipoprotéines peuvent entrer en compétition avec les Apo-VLDL pour la fixation sur des récepteurs spécifiques. La compétition est fonction de la concentration de ces molécules. Ainsi les sérums récoltés au jour 9 de l'infection, plus riches en Apo-VLDL, inhibent la fixation des VLDL marquées à des concentrations plus faibles que les sérums de souris saines. Le fait que les sérums

délipoprotéinisés des souris impaludées puissent entraver fortement la fixation des  $^{125}$ I-VLDL suggère que ces sérums contiennent des Apo-protéines libres et plus particulièrement des Apo-E (103). Enfin, nous noterons que les substances solubles plasmodiales et les IgG de souris n'interagissent pas dans le mécanisme de fixation des VLDL et par la suite dans le mécanisme d'immunodépression exercé par ces dernières.



**FIGURE 26 :** Spécificité de la fixation des  $^{125}\text{I}$ -VLDL sur les lymphocytes. Différents produits à des ratios croissants (par rapport aux  $^{125}\text{I}$ -VLDL) sont étudiés. Les conditions de la fixation compétitive sont décrites dans le texte. Chaque point représente la moyenne de 2 tubes.

## **DISCUSSION**

Les lipoprotéines humaines et animales sont connues pour leur activité immunorégulatrice. Au cours du paludisme humain et des rongeurs, une dyslipoprotéïnémie caractérisée par l'augmentation importante des lipoprotéines de basse densité, VLDL et LDL, a été mise en évidence dans notre laboratoire (17,18,19). Nos présents travaux avaient pour but d'étudier la relation entre les lipoprotéines nouvellement apparues et l'état immunodépressif observé chez l'hôte infesté. Notre démarche a consisté à étudier, premièrement, les propriétés immunologiques des lipoprotéines isolées de souris impaludées et deuxièmement, les modalités de l'action de ces lipoprotéines sur les cellules immunes cibles.

Les résultats obtenus montrent que les lipoprotéines de basse densité isolées de souris impaludées sont capables d'inhiber in vivo la réponse anticorps anti-AT et in vitro la transformation lymphoblastique stimulée par la Con A. L'intensité de l'inhibition est similaire à celle observée au cours de l'infection expérimentale. Il est important de préciser que ces lipoprotéines agissent aux doses (ou concentrations) inférieures à celles observées chez les souris impaludées.

In vivo, les premières études des propriétés immunologiques des LDL isolées de souris impaludées montrent que celles-ci sont capables d'inhiber la réponse anticorps préexistante anti-AT de l'ordre de 75 %, avec des doses injectées de 25  $\mu\text{g}$ /souris (104). Au jour 9 de l'infection la concentration des LDL est d'environ 192  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sérum. Les VLDL s'avèrent, suite à l'étude systématique des principales lipoprotéines, être les plus immunoinhibitrices de la réponse anticorps anti-AT. Les VLDL isolées de souris impaludées et injectées à la dose de 130  $\mu\text{g}$ /souris provoquent 82 % d'inhibition de la réponse anticorps, leur concentration étant de 263  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sérum (le volume sanguin d'une souris est de 2 ml environ). Il est intéressant de noter qu'à des doses équivalentes les VLDL et LDL isolées de souris saines ne provoquent pas de diminution

significative de la réponse anticorps.

In vitro, les VLDL et LDL de souris impaludées sont les plus inhibitrices de la lymphoprolifération stimulée par la Con A. Une inhibition de 50 % est obtenue avec des VLDL à 7  $\mu\text{g/ml}$ , et des LDL à 22  $\mu\text{g/ml}$ . Ces mêmes lipoprotéines aux concentrations de 20  $\mu\text{g/ml}$  et de 52  $\mu\text{g/ml}$  respectivement, sont capables d'inhiber complètement la lymphoprolifération.

A des concentrations identiques, les VLDL et LDL de souris saines ne provoquent respectivement que 8 % et 35 % de diminution de la réponse à la stimulation mitogénique.

Nos études, in vitro aussi bien qu' in vivo, montrent qu'il existe une relation étroite entre l'immunodépression observée lors de l'infection par Plasmodium chabaudi et les lipoprotéines de basse densité nouvellement apparues. En effet, in vitro, l'inhibition maximale de la prolifération des lymphocytes spléniques de souris impaludées ainsi que celle de souris saines en présence du sérum de souris impaludées coïncide avec le maximum du pic d'augmentation des VLDL et LDL, c'est-à-dire au jour 9 de l'infection et non au jour 7 du pic de parasitémie. La lymphoprolifération est revenue presque à la normale une fois que la dyslipoprotéïnémie a disparu. In vivo, nous constatons que l'inhibition de la réponse anticorps anti-AT est d'autant plus marquée quand l'antigène est administré au moment proche du pic d'augmentation des lipoprotéines de basse densité. Cette observation est en faveur de l'action des lipoprotéines dans les premières étapes de l'initiation d'une réponse anticorps spécifique décrite par plusieurs auteurs (15,16,98).

L'activité immunodépressive des lipoprotéines isolées de souris impaludées, en particulier des VLDL, pourrait être expliquée par trois principaux aspects :

premièrement par leur plus grande affinité vis-à-vis des récepteurs au niveau des cellules immunes cibles, deuxièmement par leur concentration augmentée et



enfin par leur composition biochimique modifiée.

Actuellement il est encore difficile d'apprécier la contribution respective des parties lipidique et apolipoprotéinique dans l'effet immunorégulateur des lipoprotéines. Cependant, la partie apolipoprotéinique est essentielle pour la reconnaissance des lipoprotéines par les récepteurs spécifiques des lymphocytes. La fixation des lipoprotéines par les récepteurs est l'étape primordiale par laquelle les lipoprotéines peuvent exercer l'activité immunoinhibitrice (13,20,81). Nos résultats démontrent l'existence des récepteurs lymphocytaires des VLDL. Le nombre de récepteurs par cellule est de 22.029 vis-à-vis des VLDL de souris saines, (ce nombre étant de 31.000 environ pour les VLDL de rat (81)), et de 1588 vis-à-vis des VLDL de souris impaludées.

L'étude de régression Scatchard montre que l'affinité cellulaire des VLDL de souris impaludées est 21,7 fois plus grande que celle des VLDL de souris saines. Les coefficients d'affinité moyenne étant de  $0,95 \times 10^9$  litres/mole et  $0,44 \times 10^8$  litres/mole respectivement.

Il a été démontré que les lipoprotéines qui possèdent une affinité plus grande pour les récepteurs des lymphocytes, exercent de façon plus importante leur activité immunosuppressive ; c'est le cas des LDL-In par rapport aux LDL (13) et des ApoE - HDL<sub>C</sub> par rapport aux ApoB - LDL (20). Ainsi il est plausible d'attribuer l'activité immunosuppressive maximale des VLDL de souris impaludées due à leur plus grande affinité par rapport à celle des VLDL de souris saines envers les récepteurs des cellules immunes cibles.

Les résidus d'Arginine des ApoE et ApoB ont été démontrés comme responsables de la fixation des lipoprotéines sur les sites récepteurs (105,106). L'augmentation de l'affinité d'une lipoprotéine est fonction de celle du nombre de résidus d'Arginine (20). Les VLDL de souris impaludées présentent des sous-unités distinctes au niveau des apolipoprotéines de poids moléculaire

équivalent à celui des ApoE humain. La modification de ces apolipoprotéines au niveau des VLDL pourrait être à l'origine de la plus grande affinité cellulaire de ces dernières.

Au cours de l'infection, consécutivement à la chute de l'activité de la lipoprotéine lipase (75) et à une biosynthèse accrue des VLDL par le foie (76), les VLDL et LDL voient leur concentration augmentée de 3,3 et 1,4 fois. Cette augmentation pourrait encore renforcer l'activité immunoinhibitrice. Cependant le fait, qu'aux doses équivalentes ou supérieures, les VLDL et LDL de souris saines ne modifient pas de façon significative la réponse anticorps in vivo suppose que les lipoprotéines n'agissent pas seulement en fonction de leur quantité. Les résultats sur la lymphoprolifération in vitro confortent cette hypothèse.

En conséquence, l'activité immunoinhibitrice pourrait être fonction de la composition biochimique des VLDL et LDL apparues lors de l'infection. En particulier, les VLDL voient leur cholestérol augmenté de 3,7 fois, les triglycérides de 2,8 fois, les phospholipides de 4,7 fois et les protéines de 2,5 fois.

Au niveau cellulaire, l'effet inhibiteur des lipoprotéines sur la synthèse du cholestérol s'exerce au niveau de HMG CoA réductase par le cholestérol lui-même (86). L'inhibition de la synthèse du cholestérol par les lipoprotéines a été aussi démontrée dans le cas des lymphocytes (85,86). Il n'est pas exclu que le cholestérol des lipoprotéines agisse sur un autre mécanisme indépendant de la synthèse des stérols, car il a été démontré que le cholestérol peut diminuer la fluidité membranaire des lymphocytes et inhiber tout évènement associé à la stimulation mitogénique y compris la synthèse du DNA (107-108). Par ailleurs les LDL-In, dont les lipides neutres (triglycérides et cholestérol) enlevés par l'heptane et contenant encore des phospholipides, peuvent inhiber la lymphoprolifération ; ainsi il n'est pas exclu que les

phospholipides pourraient contribuer à l'effet immuno inhibiteur des lipoprotéines (109).

Il est donc possible que, du fait de l'augmentation du cholestérol et des phospholipides, les VLDL et LDL de souris infectées pourraient exercer une immunodépression avec une efficacité plus grande.

Le rôle des substances d'origine plasmodiale dans l'immunodépression n'est pas encore bien élucidé. A partir d'une même souche de Plasmodium berghei et selon les méthodes d'obtention (surnageant de culture des globules rouges parasités ou extrait soluble des globules rouges parasités), les produits injectés peuvent stimuler la réponse anticorps humorale anti globule rouge de mouton (10) ou au contraire, inhiber cette réponse (11). Les substances parasitaires et débris parasitaires peuvent agir au niveau de la défection de la fonction macrophagique (6,7).

Au cours de l'infection par Plasmodium chabaudi il a été démontré que l'hématine isolée (des débris parasitaires) des globules rouges parasités est dotée d'un pouvoir mitogénique sur la lymphoprolifération in vitro et est capable de stimuler in vivo la production des IgG et des anticorps anti albumine bovine et transferrine humaine (27). L'hématine pourrait ainsi expliquer l'hypergammaglobulinémie (21,22) et l'augmentation des cellules "nulles" observées au cours du paludisme (9).

Son action est cependant contradictoire avec la dépression de la réponse anticorps contre ces antigènes observées au cours de l'infection naturelle (104).

La survie du Plasmodium chez l'hôte suppose que celui-ci puisse induire les substances inhibitrices de la réponse anticorps spécifiques d'une part (3,29,30,104) et les substances stimulatrices de la réponse anticorps non spécifiques d'autre part (21).

Les lipoprotéines sont classées parmi les substances immunosuppressives

naturelles, car elles agissent sur différentes fonctions immunes, aux concentrations infra-physiologiques et sans spécificité d'espèce (13,15). Les lipoprotéines maintiennent ainsi l'homéostasie immunologique. Au cours du paludisme, à la suite de la perturbation du métabolisme des lipoprotéines, les lipoprotéines de basse densité dont la quantité est augmentée, et la composition en Apolipoprotéines et en lipides est changée, inhibent de façon encore plus importante les fonctions immunes. La diminution des lymphocytes T et B circulants et des organes immuns au cours de divers paludismes humains et animaux (9,37,38) pourrait être la conséquence directe de l'action des lipoprotéines nouvellement apparues, et de ce fait expliquer la diminution, voire la suppression de la fonction immune de réponse à anticorps.

## CONCLUSIONS

Au terme de cette thèse, nous avons démontré que les lipoprotéines VLDL et LDL sériques provenant de souris impaludées par P.chabaudi peuvent inhiber de façon similaire à l'infection, les fonctions immunes telles la réponse anticorps anti-anatoxine tétanique in vivo et la transformation lymphoblastique stimulée par la Con A in vitro. Le mécanisme de l'immunodépression est expliqué en premier lieu par la plus grande affinité des VLDL de souris impaludées vis à vis des récepteurs lymphocytaires, conséquence vraisemblable de la modification des apolipoprotéines (semblable aux ApoE humains). En deuxième lieu l'augmentation du cholestérol dont l'action sur la fluidité membranaire et le rôle inhibiteur de la synthèse des stérols intra-cellulaire sont bien connus, pourrait jouer un rôle remarquable. L'augmentation des VLDL et LDL au cours de l'infection ne fait que renforcer encore ce phénomène d'immunoinhibition.

A côté des nombreux travaux tendant à mettre en évidence l'activité

immunosuppressive spécifique directe de telle ou telle molécule issue du parasite ou de l'un de ses stades biologiques, nous avons démontré dans notre travail l'existence d'un mécanisme original d'immunodépression où le parasite n'agit pas directement mais où les perturbations qu'il entraîne sur le métabolisme des lipoprotéines sont la source des phénomènes d'immunodépression.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Mc GREGOR, I.A., BARR, M.- Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1962, 56 : 364.
2. MICHEL, J.C., LAGRANGE, P.H., HURTEL, B.- Parasite Immunol., 1979, 1 : 267.
3. WILLIAMSON, W.A., GREENWOOD, B.M.- Lancet, 1978, 2 : 1328.
4. WEINBAUM, F.I., WEINTRAUB, J., NKUMAH, F.K., EVANS, C.B., TIGELAR, R.E., ROSENBERG, Y.J.- J.Immunol., 1978, 121 : 629.
5. TAYLOR, D.W., SIDDIQUI, W.A.- Ann. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 27 : 738.
6. LOOSE, L.D., COOK, J.A., DIHOZIO, N.R.- Proc. Helminth. Soc. Washington, 1972, 39 : 484.
7. WARREN, H.S., WEIDANZ, W.P.- Eur. J. Immunol., 1976, 6 : 816.
8. MORGES, W., WEIDANZ, W.P.- Exp. Parasitol., 1980, 50 : 188.
9. KRETTLI, A.U., NUSSENZWEIG, R.- Cell. Immunol., 1974, 13 : 440.
10. LIEW, F.Y., DHALIWAL, S.S., TEH, K.L.- Immunol., 1979, 37 : 35.
11. KHANSARI, N., SEGRE, M., SEGRE, D.- J. Immunol., 1981, 127 : 1889.
12. CURTISS, L.K., EDGINGTON, T.S.- J. Immunol., 1976, 116 : 1452.
13. HUI, D.Y., HARMONY, J.A.K., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W.- J. Biol. Chem., 1980, 225 : 11775.
14. HSU, K.L., GHANTA, V.K., HIRAMOTO, R.N.- J. Immunol., 1981, 126 : 1909.
15. CURTISS, L.K., DE HEER, D.H., EDGINGTON, T.S.- J. Immunol., 1977, 118 : 648.
16. CURTISS, L.K., DE HEER, D.H., EDGINGTON, T.S.- Cell Immunol., 1980, 49 : 1.
17. MAUROIS, P., VERNES, A., CHARET, P., NOUVELOT, A., BECQUET, R., GIARD, R.- Ann. Trop. Med. Parasit., 1979, 73 : 491.
18. VERNES, A., DEI CAS, E., DUTOIT, E., MAUROIS, P., GENTILINI, J.L.- Path. Biol., 1980, 28 : 457.
19. MAUROIS, P., CHARET, P., NOUVELOT, A., FRUCHART, J.C., VERNES A., BIGUET, J.- Ann. Trop. Med. Parasit., 1980, 74 : 17.
20. CURTISS, L.K., EDGINGTON, T.S.- J. Clin. Invest., 1978, 61 : 1298.
21. ABELE, D.C., TOBIE, J.E., CONTACOS, P.G., EVANS, C.B.- Am. J. Trop. Med. Hyg., 1965, 14 : 191.
22. TOBIE, J.E., ABELE, D.E., WOLFF, S.M., CONTACOS, P.G., EVANS, C.R.- J. Immunol., 1966, 97 : 498.
23. GREENWOOD, B.M., MULLER, A.S., VALKERGERG, H.A.- Clin. Exp. Immunol., 1971,

24. FREEMAN, R.R., PARISH, C.R.- Clin. Exp. Immunol., 1978, 18 : 89.
25. POELS, L.G., VAN NIEKERK, C.C.- Exp. Parasitol., 1977, 42 : 235.
26. GREENWOOD, B.M., VICK, R.M.- Nature, 1975, 257 : 592.
27. GOUMARD, PH.- Thèse de 3e cycle de Biochimie, Université de LILLE I, 1983.
28. GREENWOOD, B.M., BRADLEY-MOORE, A.M., PALIT, A., BRYCESON, A.D.M.- Lancet, 1972, 1 : 169.
29. BARKER, L.R.-. Journal of Infection Diseases, 1971, 123 : 99.
30. VOLLER, A. et al.- Parasitologie , 1972, 23 : 152.
31. Mc BRIDE, J.S., MICKLEM, H.S.- Clin. Exp. Immunol., 1981, 44 : 74.
32. WEDDERBURN, N.- Nature, 1973, 242 : 471.
33. BROWN, I.N., WATSON, S.R., SLJIVIC, V.S.- Infect. Immunol., 1977, 16 : 456.
34. WYLER, D.J.- Bulletin of the World Health Organization. 1979, 57 (Suppl I) : 239.
35. KRETCHMAR, W. JERUSALEM, C.Z.- Tropenmed. Parasit., 1963, 14 : 279.
36. GRAVELY, S.M., et al.- Infection and Immunity, 1976, 14 : 178.
37. WYLER, D.J.- Clin. Exp. Immunol., 1976, 23 : 471.
38. ADE-SERRANO, M.A., OSUNKOYA, B.O.- World Health Organization. Technical Report 1976, Series N° 579, Ref. N° 69, p. 21.
39. SATA, T., HAVEL, R.J., JONES, A.L.- J.Lipid. Res., 1972, 13 : 757.
40. KANE, J.P., HARDMAN, D.A., PAULUS, H.E.- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1980, 77 : 2465.
41. KONAVEN, P.T., BASU, S.K., GOLDSTEIN, J.L., BROXN, M.S.- Endocrinology, 1979, 104 : 610.
42. RALL, S.C., WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W.- J. Biol. Chem., im Druck, 1982.
43. ZANNIS, V.I., BRESLOW, J.L.- Biochem., 1981, 20 : 1033.
44. BLUM, C.B., ARON, L., SCIACCA, R.- J. Clin. Exp., 1980, 66 : 1240.
45. CHAO, Y.S., WINDLER, E.E., Chen, G.C., HAVEL R.J.- J. Biol. Chem., 1979, 254 : 11360.
46. HAVEL, R.J., CHAO, Y.S., WINDLER, E.E., KOLITE, L., GUO, L.S.S.- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1980, 77 : 4349.
47. MAHLEY, R.W., HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., WEISGRABER, K.H.- J. Clin. Invest.



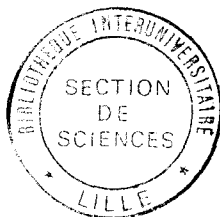
1981, 68 : 1197.

48. MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., PITAS, R.E., WEISGRABER, K.H., BROWN, J.H., GROSS, E.- J. Biol. Chem., 1977, 252 : 7279.
49. GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S.- Acad. Press., New York, 1976.
50. GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S.- Ann. Rev. Biochem., 1977, 46 : 897.
51. ROBENEK, H., HESZ, A., GRUNWALD, J., RASSAT, J., THEMANN, H.- Personal communication in Lipid metabolism and atherosclerosis, Ed. Schattaver Verlag, Stuttgart, 1982.
52. INNERARITY, T.L., KEMPNER, E.S., HUI, D.Y., MAHLEY, R.W.- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1981, 78 : 4378.
53. SCHWARTZ, D.E., LIOTTA, L., SCHAEFER, E.J., BREVER, H.B., Jr.- Circulation, 58 suppl., 2 : 11.
54. TALL, A.R., GREEN, P.H.R., GLICKMAN, A.R., RILEY, J.W.- J. Clin. Invest., 1977, 64 : 977.
55. CARRELLA, M., COOPER, A.D.- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1979, 76 : 338.
56. HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W.- J. Biol. Chem., 1981, 256 : 5646.
57. GOLDSTEIN, J.L., DANA, S.E., FAUST, J.R., BEAUDET, A.L., BROWN, M.S.- J. Biol. Chem., 1975, 250 : 8487.
58. BROWN, M.S., DANA, S.E., GOLDSTEIN, J.L.- J. Biol. Chem., 1974, 249 : 789.
59. CLIN, J., CHANG, T.Y.- J. Biol. Chem., 1981, 256 : 6304.
60. GOLDSTEIN, J.L., DANA, S.E., BROWN, M.S.- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1974, 71 : 4288.
61. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L.- Cell, 1975, 6 : 307.
62. TURNER, P., MILLER, N., CHRYSTIE, I., COLTART, J., MISTRY, P., NICOLL, A., LEWIS, B.- Lancet, 1979, 1 : 645.
63. HAMILTON, R.L., WILLIAMS, M.C., FIELDING, C.R., HAVEL, R.J.- J. Clin. Invest., 1976, 58 : 667.
64. NICHOLS, A.V., GONG, E.L., BLANCHE, P.J.- Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 100 : 391.
65. SCHMITZ, G., ASSMANN, G., MELNIK, B.- Clin. Chim. Acta, 1982, 119 : 225.
66. RACHMILEWITZ, D., STEIN, O., ROHEIM, P.S., STEIN, I.- Biochim. Biophys., 1972, 270 : 414.
67. SHERILL, B.C., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W.- J. Biol. Chem., 1980, 255 : 1804.
68. MAHLEY, R.W.- Atherosclerosis Reviews, New York, 1979, 5 : 1.



69. MELCHIOR, G.W., MAHLEY, R.W., BUCKHOLD, D.K.- J. Lipid. Res., 1981, 22 : 598.
70. ROSS, A.C., ZILVERSMIT, D.B.- J. Lipid. Res., 1977, 18 : 169.
71. MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., BROWN, M.S., HO, Y.K., GOLDSTEIN, J.L.- J. Lipid. Res., 1980, 21 : 970.
72. BASU, S.K., BROWN, M.S., HO, Y.K., GOLDSTEIN, J.L.- J. Biol. Chem., 1979, 254 : 7141.
73. SCHAFFNER, R., TAYLOR, K., BARTUCCI, E.J., FISCHER-DZOGA, K., BEESON, J.H., GLASGOV, S., WISSLER, R.W.- Am. J. Pathol., 1980, 100 : 57.
74. PITAS, R.E., INNERARITY, T.L., WEINSTEIN, J.N., MAHLEY, R.W.- Arteriosclerosis 1981, 1 : 177.
75. AL RIFAI, W., MAUROIS, P., FRUCHART, J.C., CHARET, P.- Biochimie, 1982, 64 : 127.
76. MAUROIS, P., CHARET, P., FOURNET, B., FRUCHART, J.C.- Ann. Parasitol., 1981, 56 : 9.
77. CHISARI, F.V., EDGINGTON, T.S.- J. Exp. Med., 1975, 142 : 1092.
78. WADDELL, C.C., TAUNTON, O.D., TWOMEY, J.J.- J. Clin. Invest., 1976, 58 : 950.
79. CHISARI, F.V.- J. Immunol., 1977, 119 : 2129.
80. MORSE, J.H., WITLE, L.D., GOODMAN, D.S.- J. Exp. Med., 1977, 146 : 1791.
81. YI, P.I., BECK, G., ZUCKER, S.- Int. Arch Allergy appl. Immun., 1981, 65 : 8.
82. CURTISS, L.K., EDGINGTON, T.S.- J. Immunol., 1977, 118 : 1966.
83. HUI, D.Y., HARMONY, J.A.K.- Biochem. J., 1980, 192 : 91.
84. BARBU, V., AYRAULT-JARRIER, M., MAZIERE, J.C., POLONOVSKI, J.- Biochimie, 1980, 62 : 829.
85. CHEN, H.W., HEINIGER, H., KANDUTSCH, A.A.- Proc. Natl. Acad. Sci., 1975, 72 : 1950.
86. HO, Y.K., FAUST, J.R., BILHEIMER, , BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L.- J. Exp. Med., 1977, 145 : 1531.
87. HAVEL, R.J., EDER, H.A., BRAGDON, J.M.- J. Clin. Invest., 1955, 34 : 1345.
88. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.- J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265.
89. LAEMMLI, U.K.- Nature, 1970, 227-680.
90. Mc FARLANE, A.S.- Nature, Lond, 1958, 182 : 33.
91. FIDGE, N.H., POULIS, P.- Clin. Chim. Acta, 1974, 52 : 15.

92. REPETTI, C.F., GILL, T.J.- J. Immunol., Methods, 1980, 37 : 153.
93. GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M., GLOVER, J.S.- Biochem. J., 1963, 89 : 114.
94. HO, Y.K., BROWN, M.S., KAYDEN, H.J., GOLDSTEIN, J.L.- J. Exp. Med., 1976, 144 : 444.
95. SCATCHARD, G.- ANN. N.Y. Acad. Sci., 1948, 51 : 660.
96. AISSI-YEHOUESSI, E.- Thèse docteur es science pharmaceutique. Université de LILLE II, 1983.
97. Mc BRIDE, J.S., MICKLEM, H.S.- Parasit. Immunol., 1979, 1 : 141.
98. HSU, K.L.H., HIRAMOTO, R.N., GHANTA, V.K.- J. Immunol., 1982, 128 : 2107.
99. JAYAWARDENA, A.N., TARGETT, G.A.T.- Nature, 1975, 258 : 149.
100. TAYLOR, D.W., SIDDIQUI, W.A.- Infect. Immun., 1978, 21 : 147.
101. HARMONY, J.A.K., CORDES, E.H.- J. Biol. Chem., 1975, 250 : 8614.
102. EISENBERG, S.- Prog. Biochem. Pharmacol., 1979, 15 : 139.
103. FIEVET DESREUMAUX, C.- Thèse es science option Biochimie, Université de LILLE I 1980.
104. GOUMARD, PH., VU DAC, N., MAUROIS, P., CAMUS, D.- Ann. Immunol. (I.P.), 133 D : 313.
105. FILIPOVIC, I., BUDDECKE, E.- Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 88 : 485.
106. WEISGRABER, K.H., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W.- J. Biol. Chem., 1978, 253 : 9053.
107. TOYOSHIMA, S., OSAWA, T.- Exp. Cell Res., 1976, 102 : 438.
108. ALDERSON, J.C.E., GREEN, C.- F.E.B.S. Lett., 1975, 52 : 208.
109. CURTISS, L.K., EDGINGTON, T.S.- J. Immunol., 1980, 126 : 1008.



## R E S U M E

Le Plasmodium chabaudi induit chez les souris hôtes la dépression des fonctions immunes comme la réponse anticorps anti-anatoxine tétanique in vivo et la transformation lymphoblastique in vitro.

Les lipoprotéines de basse densité, VLDL et LDL, isolées des souris impaludées sont les seules fractions sériques capables de reproduire ce phénomène immunopathologique chez les souris saines de contrôle. Ces lipoprotéines, essentiellement des VLDL, sont anormales quant à leur dimension, leur composition en lipides et apolipoprotéines. D'autre part, elles possèdent une grande affinité vis à vis des récepteurs lymphocytaires. Nos travaux ont contribué à montrer l'existence d'un mécanisme d'immunodépression où le parasite n'agit pas directement, mais où les perturbations du métabolisme des lipoprotéines qu'il entraîne sont la cause de la dysrégulation immune.

MOTS CLES : Lipoprotéines de basse densité - Paludisme - Immunodépression

