

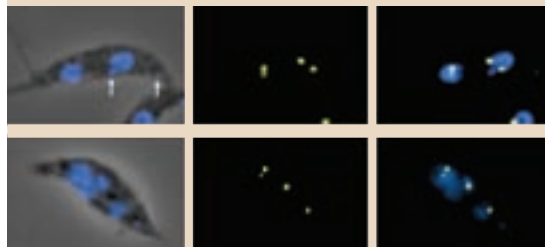
Parasitologie

Les infections par des protozoaires parasites sont un problème majeur de santé publique surtout dans les pays en développement. Le paludisme en est la plus répandue et dévastatrice. D'autres maladies parasitaires, leishmaniose, trypanosomiase africaine et toxoplasmose par exemple, sont aussi responsables d'une morbidité et d'une mortalité significatives dans les régions où elles sont endémiques. Une caractéristique remarquable commune à la majorité des parasites étudiés à l'Institut Pasteur est que leur survie dépend de leur capacité d'adaptation à deux hôtes distincts : l'insecte vecteur et les mammifères réservoirs, dont l'homme. La lutte contre ces maladies s'appuie donc sur des interventions au niveau des parasites, de l'hôte ou des insectes vecteurs.

TRYPANOSOME, LEISHMANIE ET TOXOPLASME

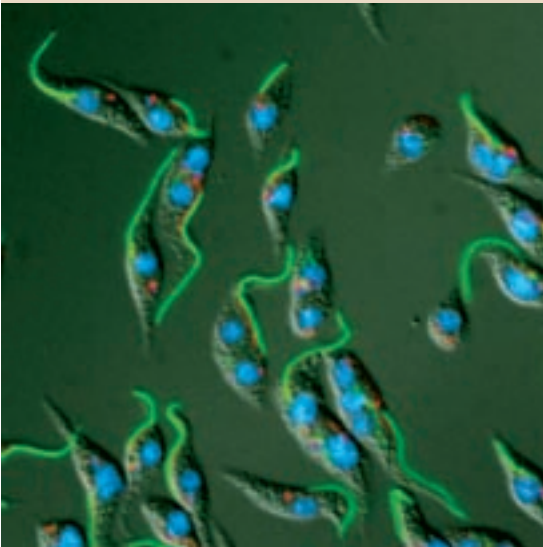
Un nouveau groupe s'intéresse à la biologie des trypanosomes, agents de la maladie du sommeil en Afrique. L'analyse fonctionnelle par ARN interférence (ARNi) a été développée. L'implication de ce processus dans la mitose et le contrôle de l'abondance des ARN issus des transposomes a été démontrée ainsi que l'activité ARNi dans le contrôle de pseudogènes. Il a été démontré que le flagelle est essentiel à la morphogénèse du Trypanosome et à sa mobilité. Plus de 50 gènes codant des protéines flagellaires ont été identifiés et leurs fonctions définies. De plus, le trypanosome est devenu un excellent modèle pour l'étude de maladies humaines liées à des défauts des cils et flagelles, puisque le parasite utilise un système semblable à celui des autres eucaryotes pour la construction de son flagelle. Les leishmanies sont responsables de pathologies très diverses, les "leishmanioses". Dans le tube digestif des insectes vecteurs, les leishmanies sont extracellulaires (promastigote). Mais elles sont intracellulaires (amastigote) chez le mammifère et localisées dans une vacuole des macrophages. Un modèle reposant sur l'inoculation de promastigotes de *Leishmania major* ou *L. amazonensis* dans le derme de l'oreille de

Trypanosomes sauvages ou de la lignée TbAGO1-/-, les chromosomes (jaunes) ne sont pas répartis également à la mitose. L'ADN est représenté en bleu.



souris a été développé. Ce modèle d'infection, associé à l'usage de souris transgéniques dont les leucocytes phagocytaires sont aisément décelables et de leishmanies exprimant des protéines repérables par fluorescence, permet la caractérisation des processus par lesquels les leishmanies s'établissent et persistent dans le derme des mammifères. On a ainsi pu caractériser la séquence d'évènements au site d'inoculation et dans le ganglion lymphatique drainant, y suivre le devenir des parasites et tester de nouvelles thérapeutiques locales. La re-programmation de leucocytes dendritiques induite par le développement intracellulaire de *L. amazonensis* est aussi en cours d'étude.

Trypanosomes dont l'assemblage du flagelle (vert) a été perturbé. L'ADN est représenté en bleu, les corps basaux et le filament d'adhésion en rouge.



Comment les leishmanies adaptent-elles leur virulence aux signaux de l'hôte mammifère ? Le but est ici de cibler ces voies de signalisation pour développer de nouvelles thérapies. Une approche génétique vise à élucider le rôle des protéines kinases ERK/MAPK dans la virulence du parasite. Des lignées de *L. major* et *L. donovani* exprimant des MPK couplées à une protéine fluorescente ont été construites et l'importance de deux de ces kinases dans le développement intracellulaire du parasite a été montrée. Des études visent à déterminer la localisation cellulaire de ces kinases, leurs interactions et leurs substrats. Les cellules NKT du foie sont activées lors de l'infection par *L. donovani*. Cette réponse participant à la réponse inflammatoire précoce, est spécifique du lipophosphoglycane de forte affinité pour la molécule présentatrice CD1d.

Les réponses T à l'infection par des parasites intracellulaires diffèrent selon les caractéristiques génétiques de l'hôte. L'induction de la réponse aberrante Th₂, cause de la sensibilité des souris BALB/c à *L. major*, et la réponse Th₁ chez les souris résistantes à l'infection, sont étudiés. Des facteurs intrinsèques aux cellules T jouent un rôle dans la maturation d'une réponse Th₂ chez les souris sensibles et des composants de

l'immunité innée participent au développement d'une réponse Th₁ chez les souris résistantes.

Les souris C57BL/6 développent, après infection orale par *Toxoplasma gondii*, une iléite résultant d'une forte réponse Th₁. Le rôle clé des cellules NKT de l'intestin et de l'IL-15 produite par les cellules épithéliales a été récemment mis en évidence. Rapidement après l'infection, les souris développent une importante activité cytotoxique qui dépend de l'IL-15. Des composants de l'immunité innée et en particulier TLR₉ semblent importants pour la maturation d'une réponse Th₁ dans ce modèle d'inflammation intestinale.

PLASMODIUM

Les aspects de la biologie du *Plasmodium* pendant les phases de son cycle qui sont cibles de stratégie vaccinale sont particulièrement étudiés. Le passage du parasite à travers la barrière intestinale du moustique est étudiée. Les gènes de carboxypeptidases intestinales ont été caractérisés. Certaines de ces enzymes sont impliquées dans le développement de *P. falciparum* chez le moustique et pourraient être la cible d'un vaccin destiné à bloquer la transmission du parasite. Des gènes dont l'expression dans les glandes salivaires des moustiques dépend de la présence de parasites, ont été identifiés. Des travaux récents visant à comprendre la biologie du sporozoïte chez son hôte mammifère utilisent *P. berghei* fluorescent et des techniques d'imagerie *in vivo*. Ils ont révélé de nombreuses interactions hôte-parasite inattendues ainsi que l'importance de la mobilité du parasite chez l'anophèle et le mammifère. La pénétration rapide du sporozoïte dans les hépatocytes repose sur son cytosquelette et sur des ligands parasitaires mal connus. La mise au point d'une technique de mutagenèse conditionnelle permettant d'inactiver spécifiquement au stade sporozoïte tout gène d'intérêt, devrait faciliter notre perception de la fonction des protéines de surface du parasite dans l'invasion cellulaire. En outre, les formes intra-hépatiques du parasite peuvent induire une immunité contre une infection ultérieure. Il est donc important de caractériser les interactions entre hépatocyte et parasite

nécessaires au développement de ce dernier, donc les protéines que le parasite exprime à ce stade.

Les facteurs de virulence des stades sanguins de *P. falciparum* impliqués dans le paludisme grave (paludisme gestationnel et anémie) et les stratégies d'échappement immunitaire, constituent d'autres axes de recherche importants. L'adhérence des globules rouges parasités (GRP) à la chondroïtine sulfate A (CSA) du placenta joue un grand rôle dans le paludisme gesta-

tionnel. Le produit de l'un des gènes *var* est responsable de la liaison des GRP à CSA et les domaines impliqués sont identifiés. Ils sont en cours de validation en tant que candidats vaccins pour la prévention du paludisme gestationnel. La caractérisation de la cytoadhérence des anneaux a permis de mettre en évidence le rôle de la "Ring surface Protein 2" (RSP 2) dans ce phénomène. Après invasion des globules rouges par *Plasmodium*, cette protéine se retrouve dans un complexe protéique

Moustique Anopheles gambiae principal vecteur du paludisme.

Le CEPIA, CEntre de Production et d'Infection des Anophèles, est une plate-forme qui produit pour divers programmes et équipes de recherche des moustiques du genre Anopheles agent du paludisme.



à la surface d'hématies parasitées mais aussi d'hématies non parasitées. Il joue peut-être un rôle dans l'anémie sévère paludéenne. En ce qui concerne le transport intracellulaire de protéines parasitaires vers la membrane du GR infecté, la caractérisation des voies de sécrétion spécifiques à *P. falciparum*, devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles dans l'adhérence des GRP aux cellules endothéliales de l'hôte. Des progrès spectaculaires concernant les mécanismes moléculaires de la variation antigénique de *P. falciparum*, la stratégie qu'il utilise pour contourner les mécanismes de défense de l'hôte ont été réalisés en 2005. Des constituants salivaires de l'anophèle augmentent le caractère infectieux des *Plasmodium* transmis par piqûre. Le rôle de la salive du moustique dans l'activation des mastocytes cutanés et son implication dans la réponse immune anti-*plasmodium* sont étudiés. Non seulement des cytokines immunosuppressives sont induites par la piqûre mais l'histamine produite par les mastocytes favorise le développement de l'infection. La connaissance de ce qui détermine l'issue d'une infection par *P. falciparum* est cruciale en ce qui concerne la mortalité et la morbidité palustres. La résistance aux médicaments est actuellement un grave problème pour le contrôle du paludisme : l'analyse de cibles de médicaments a révélé pour la première fois une résistance *in vitro* aux dérivés de l'artésémisine. Le *Ring Erythrocyte Surface Antigen* (RESA), inséré dans la membrane et le cytosquelette du GR au moment de l'infection, représente un nouveau facteur de virulence puisque son association au cytosquelette du GR protège ce dernier de la déstabilisation par la fièvre. La capacité des GRP à former des rosettes ("rosetting") avec des GR sains, et l'absence d'anticorps dissociant ces rosettes, sont les deux seuls facteurs associés au paludisme grave de l'enfant. Un modèle de ce phénotype a été créé avec un variant varO, ce qui a permis de montrer la contribution du "rosetting" à la virulence. La mise en évidence de réponses précoces communes à la plupart des "stress" infligés aux parasites ouvre clairement de nouvelles perspectives. Un système expérimental de rate humaine perfusée devrait permettre de comprendre le rôle de cet organe dans l'élimination du parasite

et la modulation du phénotype parasitaire. Ce système a permis de visualiser la disparition rapide de GRP traités par l'artésunate dans la pulpe rouge selon deux mécanismes différents. La mise en évidence de profils d'activation distincts des lymphocytes T dans l'anémie grave et le neuro-paludisme, indique qu'il s'agit de deux syndromes différents.

Les recherches sur le développement d'un vaccin anti-paludique se sont poursuivies. Le stade hépatique de *P. falciparum* représente une cible prometteuse pour les approches vaccinales. Chez le singe, LSA3 s'est révélée être la seule molécule capable d'induire une protection contre *P. falciparum* indépendamment de la souche de parasite. L'injection à des volontaires d'un long peptide de MSP3 combiné à des adjuvants, base d'un vaccin visant à interrompre la phase érythrocytaire, s'est révélée capable d'induire des réponses remarquables. Les anticorps produits inhibent la croissance érythrocytaire de *P. falciparum* *in vitro* en présence de monocytes. En outre, ils provoquent une très forte inhibition de la parasitémie chez des souris humanisées infectées par *P. falciparum*. Ces résultats montrent pour la première fois l'activité anti-parasitaire, *in vitro* et *in vivo*, d'anticorps produits chez l'homme par un candidat vaccin. D'autres candidats vaccins fondés sur des protéines recombinantes de la surface du mérozoïte, produites dans le système baculovirus, sont en cours d'évaluation.

