



Responsable : Odile PUIJALON (omp@pasteur.fr)

Résumé

La thématique centrale de l'Unité est l'analyse des facteurs qui déterminent l'issue d'une infection palustre, avec comme but de mettre au point un vaccin prévenant la pathologie palustre. Nous développons un programme intégré de recherche fondamentale sur la pathologie due à *Plasmodium falciparum* chez l'homme et dans le modèle de l'infection expérimentale du singe *Saimiri sciureus*, et des programmes sur le développement de vaccins ciblant des molécules de surface conservées des stades sanguins asexués. L'analyse intégrée de pathologie palustre comprend : l'exploration de l'activation des cellules immunocompétentes dans l'accès palustre, l'identification de nouveaux facteurs parasitaires de pathogénicité par une approche de génétique réverse et par exploration du transcriptome parasitaire à l'aide de puces à ADN, l'analyse du rôle de la rate dans un modèle expérimental d'organe perfusé et une étude multicentrique du polymorphisme parasitaire et de ses conséquences sur les réponses immunes. Le programme de développement vaccinal cible des molécules conservées de la surface du mérozoïte ou du globule rouge infecté.

Rapport d'activité

L'objectif à long terme de nos recherches est le développement de vaccins prévenant la mortalité et la morbidité palustre. Quatre groupes de recherche sont centrés sur des programmes complémentaires, incluant d'une part une analyse intégrée des interactions hôte/parasite qui conditionnent la physiopathologie du paludisme et d'autre part, le développement de vaccins. **L'analyse coordonnée des éléments contribuant à la pathologie palustre** se déroule selon quatre axes. Le premier concerne une étude de l'activation du système immunitaire dans différentes formes cliniques du paludisme à *P. falciparum*, avec le souci de mieux cerner la contribution des cellules T dans l'équilibre entre pathologie et protection. Le second axe concerne la caractérisation de facteurs parasitaires de virulence, par une approche de génétique réverse et une analyse systématique du transcriptome parasitaire dans différentes conditions physiologiques. Le troisième axe concerne l'analyse du rôle de la rate dans l'infection palustre, et en particulier son implication dans la clairance parasitaire et dans la modulation de l'expression d'antigènes de surface chez le parasite. Le quatrième axe est une étude moléculaire de la diversité des populations parasitaires circulant en zone d'endémie et de ses conséquences sur la survenue des accès, leur gravité et les réponses immunes. Le **développement de vaccins** cible des antigènes conservés de *P. falciparum* et de *P. vivax* exprimés au stade sanguin, et identifiés comme cibles de mécanismes effecteurs de la clairance parasitaire.

Une des caractéristiques de l'Unité est de privilégier les études *in vivo*, aussi bien chez l'homme que chez le singe. Ceci implique le recours à des modèles expérimentaux d'infection ainsi qu'à des collaborations sur le terrain : études d'épidémiologie moléculaire dans le cadre des Instituts Pasteur du Réseau International ; études de cas hospitaliers au Ghana ; étude de modèles expérimentaux chez le singe en Guyane et au Sri Lanka.

1. Rôle de l'activation immunitaire dans la physiopathologie du paludisme (C.Behr, S. Loizon, P.Boeuf, F. Remerand, I. Vigan, J.C.Michel).

Les formes graves du paludisme sont associées à une inflammation systémique profonde et à une accumulation locale des globules rouges parasités liée au phénomène de cytoadhérence parasitaire dans les organes profonds. La cascade des événements immunologiques qui conduit au paludisme simple ou compliqué est encore très mal connue, mais de nombreux éléments suggèrent qu'elle ne serait pas la même dans les différentes formes cliniques. Les résultats obtenus chez l'Homme et la souris suggèrent que le système inné jouerait un rôle majeur dans cette cascade, et tout particulièrement les cellules de la lignée myéloïde.

En collaboration avec l'hôpital Korle-Bu (Dr. Goka) et l'Institut Noguchi au Ghana (Dr Akanmori) et le Rigshospitalet au Danemark (Dr. Hviid et Dr.Kurtzhals), nous avons entrepris une analyse détaillée des profils de cytokines dans différentes formes cliniques du paludisme de l'enfant africain. Nos travaux antérieurs ont montré que l'anémie et le neuropaludisme sont deux syndromes immunopathologiques distincts, caractérisés par des ratios TNF α /IL-10 différents. Par marquage intracellulaire, nous avons montré que les lymphocytes T CD8^{high} et gamma delta sont les principales cellules productrices d'IFN- γ , alors que les lymphocytes T CD4⁺ représentent une importante source de TNF- α . Les lymphocytes T CD4⁺ sont par ailleurs la seule population sécrétant l'IL-10.

Pour mieux comprendre les différences observées entre les différentes formes cliniques de paludisme, nous avons développé des techniques sensibles de RT-PCR en temps réel, qui nous permettent de doser l'expression d'une quinzaine de cytokines dans les prélèvements de petit volume qui sont effectués chez les enfants en accès grave. En parallèle, nous étudions le statut phénotypique et fonctionnel des monocytes et des cellules dendritiques chez ces enfants. Les nombreuses analogies qui existent entre les désordres immunologiques de l'accès palustre grave et ceux associés au sepsis sévère nous ont conduits à entreprendre le même type d'investigation sur une cohorte de patients hospitalisés pour choc septique. En collaboration avec les unités de soins intensifs de l'Hôpital Lariboisière (Pr D.Payen) et de la Salpêtrière (Pr J.J. Rouby) à Paris, nous effectuons un suivi longitudinal de malades en choc septique ou aseptique. Nous avons montré que ces patients présentent une "dé-activation" des monocytes, qui se traduit par une baisse très importante d'expression des molécules HLA-DR, ainsi que des molécules co-stimulatrices des cellules T, CD80 et CD54, à la surface des monocytes.

Les lymphocytes T gamma delta semblent intervenir très précocement dans la régulation de l'immunité innée. Cet aspect est étudié dans le modèle d'infection par *P. falciparum* chez un hôte expérimental, le singe *Saimiri sciureus*, grâce aux nombreux outils d'exploration des réponses des cellules immunocompétentes que nous avons développés pour cet animal. Nos résultats indiquent que les lymphocytes T V gamma ? interviendraient en amont de la phase de clairance des parasites.

2. Facteurs parasitaires de pathogénicité (S. Bonnefoy, M.Diez Silva, I. Delrieu, M Guillotte, P. David, O. Natalang).

Nous utilisons une approche de manipulation génétique de *Plasmodium falciparum* dans l'étude de la virulence dans le modèle d'infection expérimentale du singe *Saimiri sciureus*. Les souches plasmodiales qui induisent une infection létale présentent des caractéristiques particulières, parmi lesquelles une délétion du gène *resa* et la présence d'un allèle particulier du locus *hrp1*. Ces deux gènes codent pour des protéines localisées dans la membrane des hématies infectées et interagissent avec d'autres protéines parasitaires et le cytosquelette érythrocytaire. Pour analyser la contribution de ces facteurs à la pathologie palustre, nous avons procédé dans un premier temps à l'inactivation du gène *resa* de la souche avirulente FUP/CB. La perte d'expression de la protéine correspondante, sans effet notable sur la croissance parasitaire *in vitro*, entraîne cependant une modification du profil d'infection *in vivo* en augmentant la parasitémie moyenne

chez tous les singes infectés. La mise au point des outils génétiques nécessaires à la mutagenèse séquentielle, est actuellement mise à profit pour l'étude de la contribution du gène *hrp1* à la pathologie. D'autres outils moléculaires, tels que des systèmes de sélection positive/négative sont en cours de développement au laboratoire.

Les contraintes liées à la faible efficacité de transfection nous ont amenés à élaborer, en parallèle au développement des outils de manipulation génétique, une stratégie alternative: l'exploration du transcriptome. Nous voulons identifier les gènes spécifiquement activés *in vivo*, qui pourraient contribuer à la virulence et à une meilleure adaptation des parasites à leur hôte. Nous mettons au point les conditions d'étude du transcriptome parasitaire dans le modèle d'infection expérimentale du singe, ainsi que dans le contexte d'infections naturelles chez l'homme. En collaboration avec la Génopole (PT2, J-Y Coppée), une plate-forme d'exploration du transcriptome de *P.falciparum* par puces à ADN a été mise en place. Les sondes, constituées de 7500 oligomères de 70 bases synthétisés d'après les données de séquence du génome parasitaire et déposés sur lames de verre, nous ont permis de cribler des ARN parasitaires extraits à différents stades du développement érythrocytaire. Les profils d'expression génétique différentielle obtenus témoignent du caractère fonctionnel de la plate-forme. En parallèle à notre utilisation des puces à ADN dans l'étude des facteurs de pathogénicité, nous coordonnons l'exploitation de cette plate-forme dans le cadre des projets de recherche de 15 laboratoires français travaillant sur différents aspects de la biologie de *P.falciparum*.

3. Recours à un système d'organe isolé-perfusé pour explorer la fonction de la rate au cours de l'infection par *P.falciparum* (P.Buffet, P.David)

La rate joue un rôle majeur au cours de l'infection palustre, aussi bien dans l'élimination du parasite que dans la modulation du phénotype parasitaire. Plusieurs systèmes expérimentaux ont en effet montré que la splénectomie de l'hôte entraînait une augmentation de la parasitémie ainsi qu'une altération du phénotype parasitaire (antigènes de surface et propriétés de cytoadhérence). Chez l'homme, la rate n'a pu être étudiée que sur des prélèvements d'autopsie, donc à un stade tardif de l'infection. Nous avons débuté un programme de recherche dont le but est d'explorer les fonctions spléniques en début d'infection, à un stade où elles pourraient conditionner l'orientation clinique. Le premier objectif a été de mettre en place un système d'organe isolé-perfusé permettant une survie de plusieurs heures de la rate *ex vivo*. Une étude de faisabilité sur dix rates de porc a abouti à des résultats très encourageants. Un réseau de collaboration a maintenant été établi avec plusieurs hôpitaux parisiens, nous donnant accès à des rates humaines prélevées chez des patients dans le cadre d'interventions sur des néoplasies gastriques ou pancréatiques. Ces rates seront perfusées avec des érythrocytes infectés par *P.falciparum*, ceci permettant d'effectuer diverses explorations fonctionnelles et immuno-histochimiques.

4. Etude de la diversité parasitaire et de ses conséquences sur la réponse immunitaire (O.Pujalon, H. Jouin, N. Noranate, M. Guillotte).

L'analyse des populations parasitaires dans diverses conditions de transmission et de leur évolution dans le temps est nécessaire à l'élaboration de stratégies de lutte rationnelles. Nous avons récemment mis en place un programme d'analyse du polymorphisme parasitaire par séquençage systématique. Nous avons étudié l'évolution temporelle sur dix ans des populations parasitaires circulant dans le village de Dielmo au Sénégal. Nous avons procédé à l'analyse de la diversité allélique des gènes *Pfcr1*, *Pfdrhr* et du locus *msp1* bloc 2. Nous avons en parallèle développé de nouvelles stratégies de typage d'isolats de terrain à l'aide d'une batterie de marqueurs microsatellites neutres. Les conséquences du polymorphisme allélique du domaine MSP-1 bloc 2 sur les réponses immunitaires ont été étudiées dans deux villages sénégalais. Nous avons montré que la présence d'anticorps contre ce domaine au début de la saison de transmission est associée à une diminution du risque d'accès clinique. Cette association est paradoxale, puisque l'on observe des profils de réactivité figés, indépendants des génotypes parasitaires présents ou passés. Contrairement à ce qui est décrit pour l'antigène variant PfEMP1, il n'y a pas accumulation de nouvelles spécificités anti-*msp1* bloc 2 à la suite de l'exposition à un nombre croissant d'allèles. L'exposition à de nouvelles souches lors d'un accès s'accompagne parfois d'une réponse de très courte durée qui revient rapidement au profil "figé", propre à chaque individu. Une réponse spécifique inappropriée ou non optimale contre les souches surinfectantes suggère un nouveau mécanisme d'évasion des parasites au système immunitaire, qui favorise une clairance partielle incomplète et un portage chronique.

En collaboration avec l'Institut Pasteur de la Guyane, nous avons étudié les réponses immunes contre des variants antigéniques dans le modèle d'infection expérimentale du singe *Saimiri*. Ceci a mis en évidence qu'il n'existe pas de relation directe entre la réponse contre l'antigène variant et la protection.

5. Le programme de développement vaccinal est centré sur des antigènes de stades érythrocytaires identifiés comme cibles de certains effecteurs de la réponse immunitaire protectrice.

Protéines de surface du mérozoïte (S.Longacre, S. Bonnet, H.Polson, S. Rosario).

Le groupe de S. Longacre développe un programme de recherche explorant la région C-terminale conservée de l'antigène de surface du mérozoïte, MSP1p19 de *P.falciparum* et de *P.vivax*, exprimée sous forme de protéine recombinante dans le système baculovirus. L'efficacité et l'immunogénicité de différentes formulations de l'antigène MSP1p19, incluant plusieurs adjuvants expérimentaux, ont été évaluées chez la souris et les macaques (singes toque et rhesus). Plusieurs essais vaccinaux ont montré que MSP-1p19 était très immunogène et induisait une protection puissante et de longue durée, contre des souches homologues et hétérologues. L'état d'avancement des recherches sur MSP-1p19 est tel que des essais de vaccination de phase 1 sont en cours de mise en place sous l'égide de l'Institut Pasteur. En parallèle, l'analyse du polymorphisme de la région C-terminale de 42 kDa de MSP1 (MSP1p42) de *P.vivax* et *P.falciparum* a été entreprise, et la réponse immunitaire dirigée contre la partie conservée C-terminale et contre les domaines polymorphes de *P.vivax* MSP-1 a été étudiée chez l'homme. Enfin, la structure cristallographique de *P.falciparum* MSP-1 p19 a été déterminée en collaboration avec l'Unité d'Immunologie Structurale. Elle confirme la notion que le repliement complexe des deux domaines EGF de MSP1p19 serait semblable dans toutes les espèces de Plasmodium. Récemment, l'évaluation d'autres antigènes de surface du mérozoïte comme candidats vaccinaux a été démarrée. De nouveaux types de modifications de ces antigènes ainsi que de nouveaux adjuvants sont en cours d'étude.

R23 : (O. Pujalon, M.Huynh Quan Dat, A Schneider, M. Guillotte).

L'antigène R23 est la cible d'anticorps opsonisant les érythrocytes infectés par *P.falciparum*. L'immunisation de singes *Saimiri* avec une dose minimale de cet antigène en Alum peut induire une protection efficace. Nous étudions en quoi la spécificité fine des anticorps induits chez la souris, le rat, le singe par l'immunisation avec l'antigène R23 influence la reconnaissance de la surface du globule rouge infecté, et poursuivons des recherches pour optimiser l'immunogénicité de ce candidat.

Mots-clés: Paludisme, Pathologie, Diversité, Vaccin, Génétique Moléculaire

Site Web de l'unité

> [Plus d'informations sur notre site web](#)

Publications de l'unité

> [Toutes les publications sur notre base de données](#)

Personnel

Secrétariat	Chercheurs	Stagiaires	Autre personnel
LECUILLER Frédérique, (flecuil@pasteur.fr)	BEHR Charlotte, C.R.1, CNRS, (charlotte.behr@pasteur.fr) BONNEFOY Serge, C.R., IP, (sbf@pasteur.fr) DAVID Peter, D.R.2, CNRS (pdavid@pasteur.fr) LONGACRE Shirley, D.R.2, CNRS (longacre@pasteur.fr) MICHEL Jean-Claude, C.L., Réseau IP, (jcmichel@pasteur.fr) PUIJALON Odile, Chef d'Unité, C.L., IP (omp@pasteur.fr)	BOEUF Philippe, Stagiaire étudiant (thèse) BONNET Sarah, Chercheur post-doctoral (CDD, IP) DIEZ SILVA Monica, Stagiaire étudiante (thèse) DELRIEU Isabelle, Chercheur post-doctoral (CDD, IP) NATALANG Onguma, Stagiaire étudiante (thèse) REMERAND Francis, Stagiaire étudiant (thèse) SCHNEIDER Achim, Chercheur post-doctoral (CDD, IP) VIGAN Inès, Stagiaire post-doctoral (INCO-DC)	FAGNIERES Plamenna, Technicienne, IP GUILLOTTE Micheline, Technicienne, IP (mguillot@pasteur.fr) HUYNH QUAN DAT Myoura, Technicienne, IP (dat@pasteur.fr) JOUIN Hélène, Ingénieur, IP (hajouin@pasteur.fr) LOIZON Séverine, Ingénieur, CNRS (sloizon@pasteur.fr)

Rapports d'activité 2002 - Institut Pasteur


[Début de page](#)


[Sommaire](#)


[Portail Institut Pasteur](#)

En cas de problèmes, de remarques, ou de questions concernant cette page Web écrire à rescom@pasteur.fr