

**DESC 2004**  
<http://www.inserm-u511.jussieu.fr/>

Dominique Mazier  
 CHU Pitié-Salpêtrière  
 INSERM U511  
 Mazier@ext.jussieu.fr

**VOILÀ UNE ARME DE DESTRUCTION MASSIVE  
 QUI N'INTÉRESSE PERSONNE.**

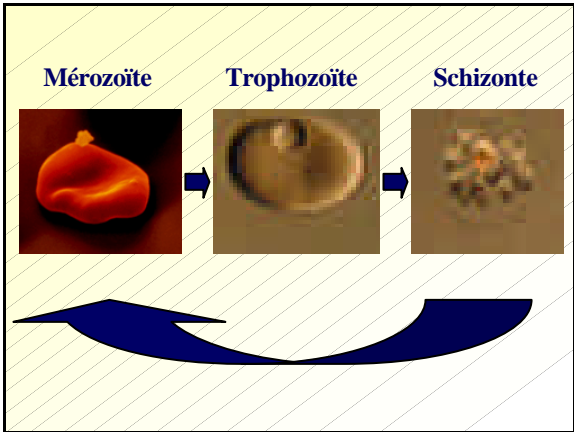
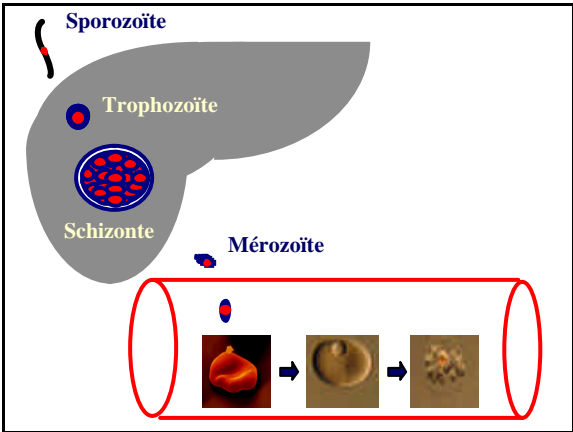


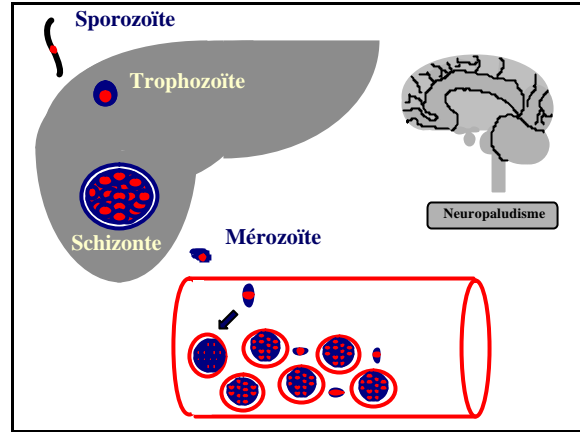
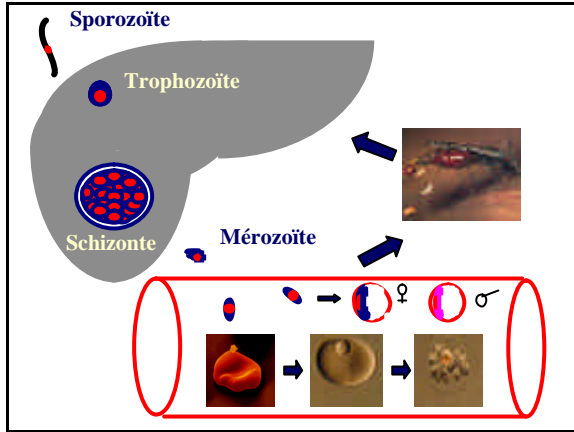
LE PALUDISME TUE PRÈS DE 2 MILLIONS D'AFRICAINS PAR AN.  
 ENSEMBLE, ARRÊTONS CETTE HECA TOMBE.



**Paludisme**

- Infection par
  - *Plasmodium falciparum*
  - *P. vivax*
  - *P. malariae*
  - *P. ovale*
- Population à risque
  - Plus de 40% de la population mondiale
- Mortalité
  - Plus de 2 millions / an

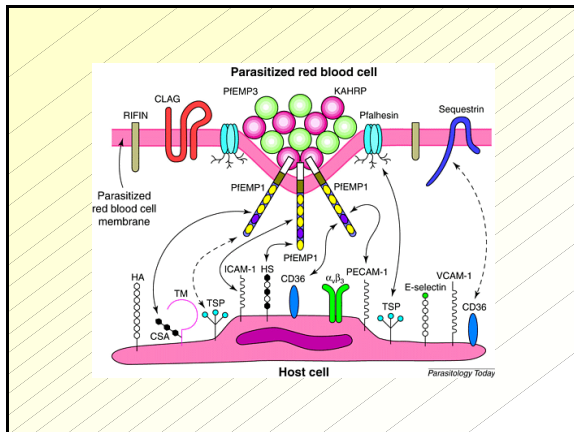




### Neuropaludisme

- Complication majeure d'une infection à *P. falciparum*
- Symptômes
  - Fièvre importante
  - Convulsions
  - Coma
  - Rupture de la barrière hémato-encéphalique

Sang Périphérique	Organe profond



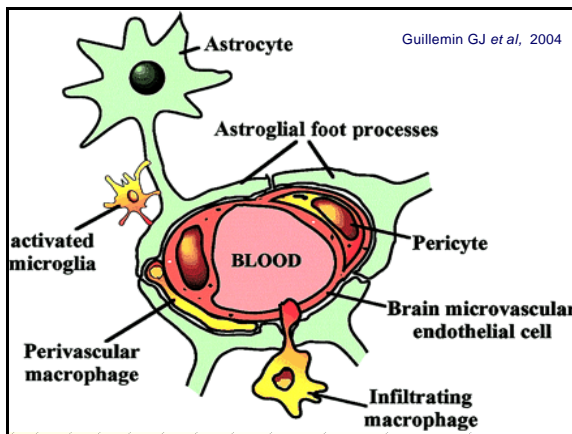
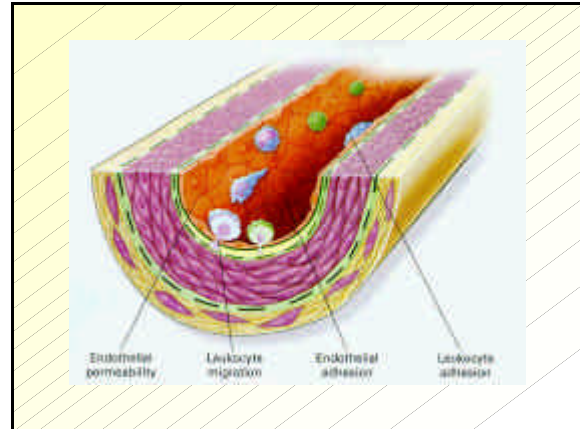
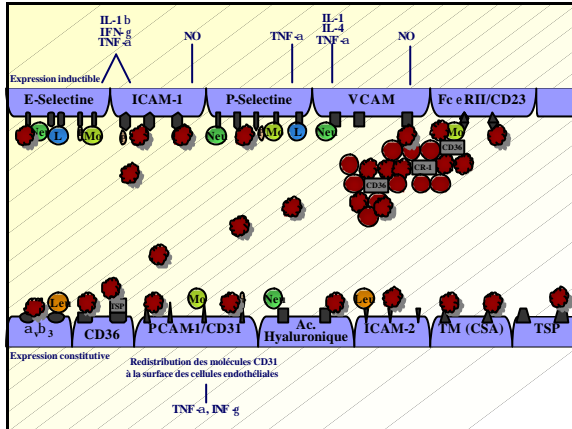
### Physiopathologie du neuropaludisme

**Théorie mécanique:**  
observations histologiques du cerveau (post-mortem)

**Théorie inflammatoire:**  
données épidémiologiques + données expérimentales

↓

**État inflammatoire**  
\*médiateurs solubles (cytokines, NO...)  
\*cellules du système immunitaire (monocytes, lymphocytes T...)



### 1. Cytoadhérence

- Séquestration GRP (majoritairement les GRP knobs positifs), est associée à la survenue du coma
- Peu ou pas de formes matures circulantes: tous les isolats de *P. falciparum* cytoadhèrent.
- L'occlusion complète des microvaisseaux sur des coupes de cerveau de patients décédés de neuropaludisme n'est que très rarement observée.

**La cytoadhérence seule n'explique pas tous les troubles neurologiques observés.**

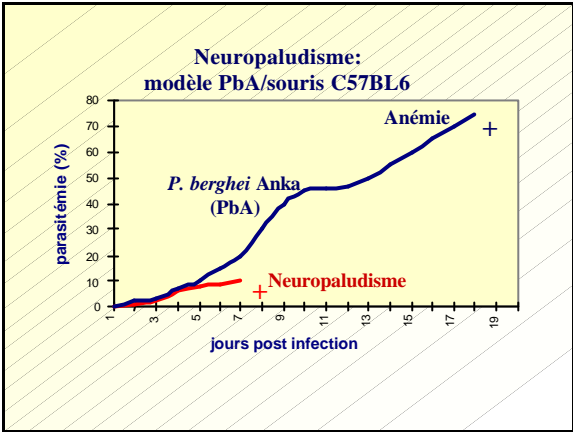
### Rôle des lymphocytes T

- souris *nude* → résistance au neuropaludisme
- T CD4+ et T CD8+ (déplétion avec des anticorps, déficience génétique)
- → T indispensables pour le développement du neuropaludisme

### Neuropaludisme:

**modèle PbA/souris C57BL6**

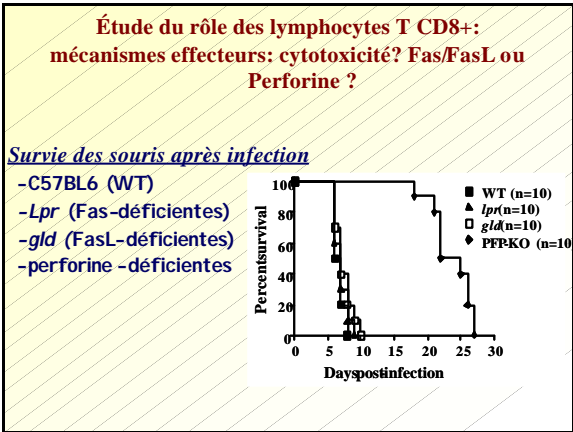
- *Plasmodium berghei* ANKA, clone 1.4; Souris C57BL/6
- Injection intra péritonéale de 10<sup>6</sup> GRP/souris (6-8 semaines d'âge)
- Neuropaludisme fatal entre 6 et 10 jours post-infection
  - 1) Ataxie
  - 2) mono-, héli-, para- ou tétraplégie
  - 3) Convulsions
  - 4) Coma et mort



### Modèle expérimental

- Plasmodium berghei* ANKA, clone 1.4 Souris C57BL/6
- Histopathologie du cerveau par comparaison à l'Homme

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. berghei</i> ANKA
<b>Séquestration</b>		
GRP	+++	+
Lymphocytes	+	+++
Monocytes	+	+++
<b>Hémorragies et lésions vasculaires</b>		
	++	+++



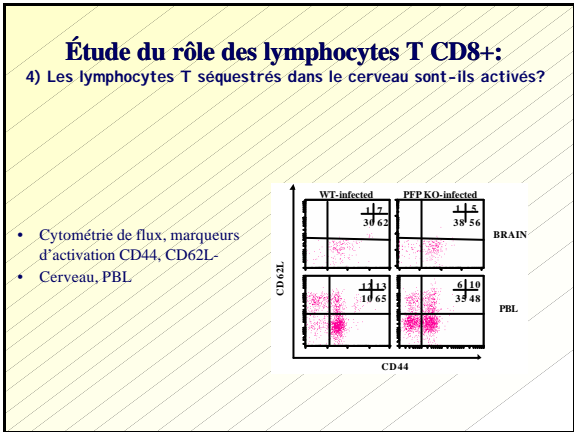
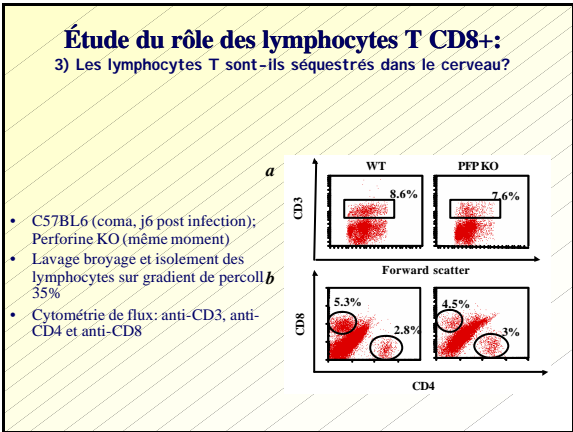
### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 2) Histopathologie du cerveau

- C57BL6 (coma, j6 post infection); Perforine KO (même moment)
- Perfusion intracardiaque (PFA4%) et isolement du cerveau
- Inclusion paraffine, coupes
- Coloration H&E

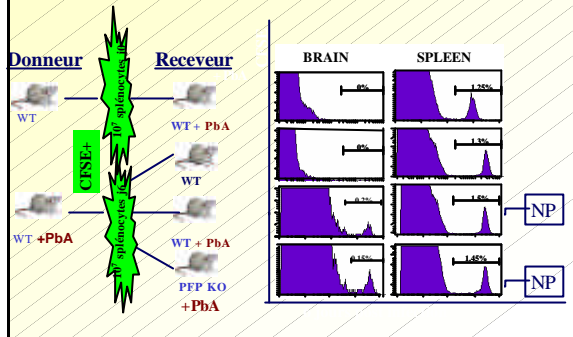
Non infecté

C57BL6 (j6)

Perforine KO (j6)

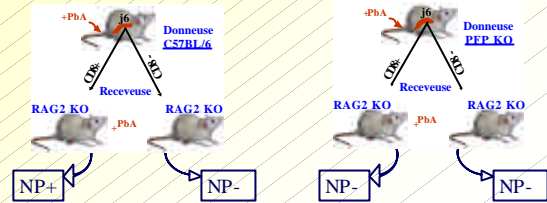


### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 4. Rôle de la séquestration cérébrale des lymphocytes T



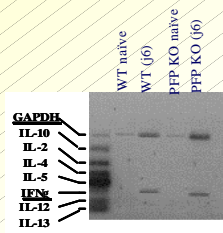
### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 5) Analyse de la coopération avec les CD4+

- C57BL/6 ou perforine KO (j6 post infection)
- Préparation des splénocytes
- Purification des lymphocytes CD8+ à l'aide des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD8 (Miltenyi Biotech)



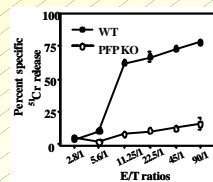
### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 6) Etude *ex vivo* des fonctions CD8+

- 1) Expression de cytokines (Kit PCR multiplex):  
ARNm extraits de ces cellules (QIAGEN)



### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 6) Etude *ex vivo* des fonctions CD8+

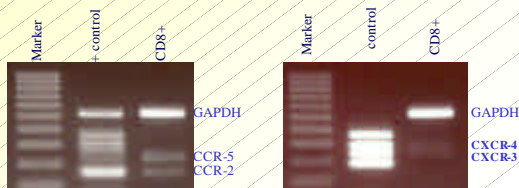
- 2) Test de cytotoxicité redirigée « chromium release »:  
Cibles: P815  
Effecteurs: CD8+ purifiés souris infectées: WT et PFP KO (j6) stimulés *in vitro* par anti-CD3



### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: 7) Profil de migration cérébral: expression des chimiorécepteurs

7) Profil de migration cérébral: expression des chimiorécepteurs

- Purification de lymphocytes CD8+ du cerveau
- (pool de 10 souris): WT (j6) et PFP KO (j6)
- Extraction d'ARN (Qiagen)
- RT-PCR multiplex:
  - 1) Kit chimiorécepteurs CXCR (1-5)
  - 2) Kit Chimiorécepteurs CCR (1-5)



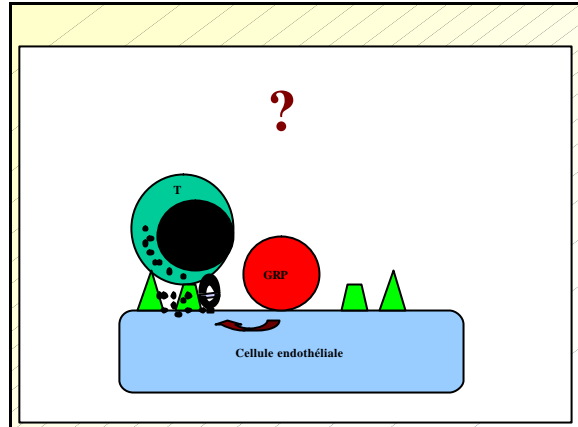
### Étude du rôle des lymphocytes T CD8+: Conclusions (1)

- Dans les organes lymphoïdes secondaires (rate), les lymphocytes T CD8+ se différencient en effecteurs cytotoxiques, capables de tuer leur cible par des mécanismes perforine-dépendant.
- Ces lymphocytes T CD8+ acquièrent un profil de migration spécifique (**CCR-2, CCR-5 et CXCR-3**) permettant leur migration cérébrale.
- Dans le cerveau, le contexte inflammatoire (créé par la présence du parasite) favorise leur recrutement.

## Étude du rôle des lymphocytes T CD8+:

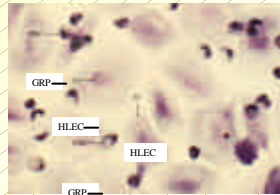
Conclusions (2)

- Le recrutement cérébral des lymphocytes T CD8+, mais pas des T CD4+, coïncide avec l'induction du neuropaludisme
- Les CD8+ recrutés ont une action cytotoxique à l'origine du développement de la pathologie
- Cibles? cellules endothéliales cérébrales (cf: histopathologie)? autres?
- Le profil de migration (chimiorécepteurs) semble jouer un rôle (ex CCR-5 -/-).

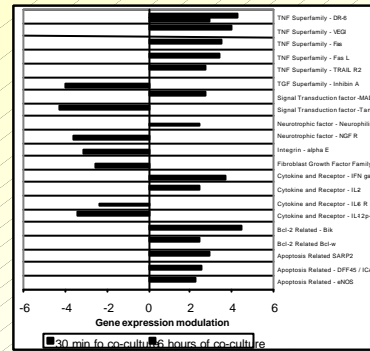


### Modèle expérimental

- Cellules endothéliales pulmonaires humaines primaires (HLEC)
- Souches et clones de *P. falciparum* : Palo Alto, FCR3, 3D7...
- Co-cultures HLEC-PRBC ? Adhérence



### Étude du transcriptome différentiel de HLEC activées ou non par des GRP.



### Étude du transcriptome différentiel de HLEC activées ou non par des GRP.

- Surexpression de gènes codant des molécules pro-apoptotiques et pro-inflammatoires: *Fas*, *Fas L*, *Bad*, *Bax*, *DR6*, *Caspase 3*...
- Surexpression de gènes codant des molécules impliquées dans le stress oxydant : *iNOS*, *eNOS* ...
- Répression de gènes codant des molécules impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire: *intégrines*, *FGF-3*, *CDK2*, *IAP-2*...

⇒ **Induction d'apoptose et de stress oxydant dans les cellules endothéliales**

### Vérification phénotypique

### METHODOLOGIE: APOPTOSE

❖ Quantification de la dégradation de l'ADN génomique: test ELISA (kit ROCHE)

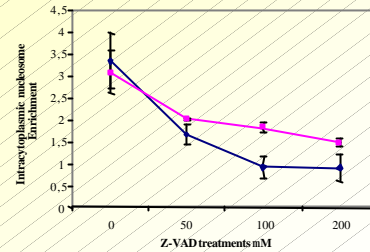
Dosage des nucléosomes intracytoplasmiques

❖ Test de dépolarisation de la membrane mitochondriale: (kit MitoCapture de CALBIOCHEM)

Sonde fluorescente qui change de couleur selon l'état de la membrane mitochondriale

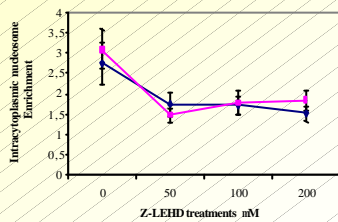
- ✓ verte                   dépolarisation
- ✓ rouge                 membrane est intacte

### Rôle des caspases

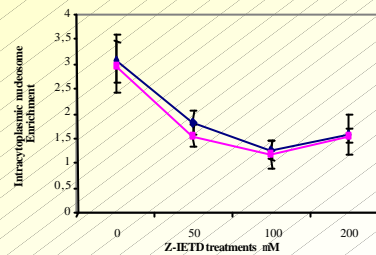


⇒ L'apoptose induite est dépendante des caspases.

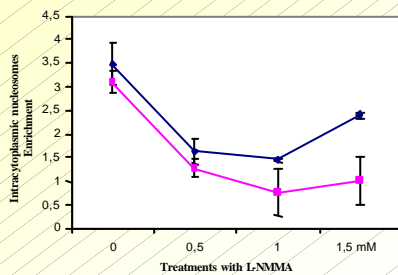
### Rôle de la caspase 9



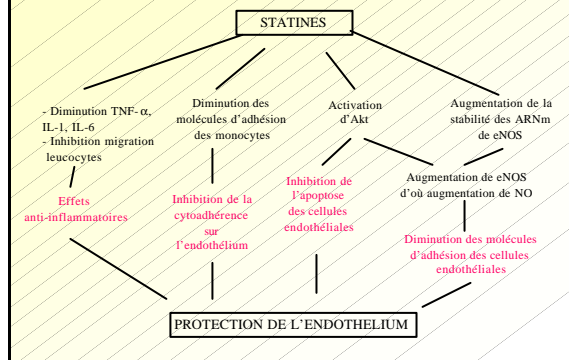
### Rôle de la caspase 8

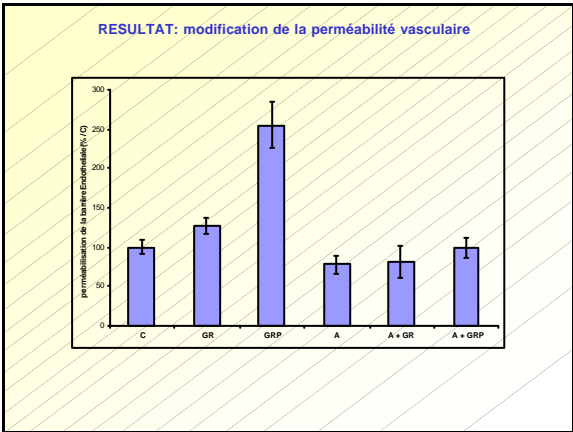
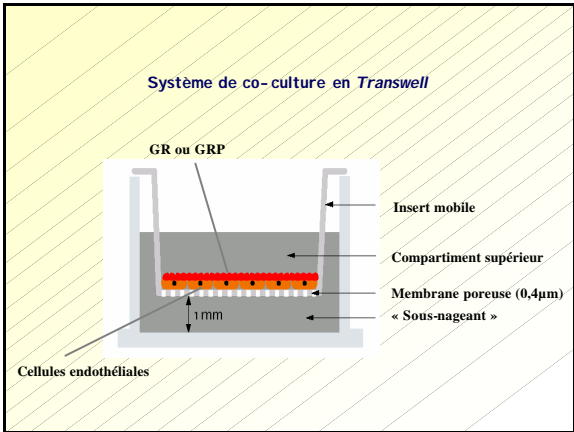
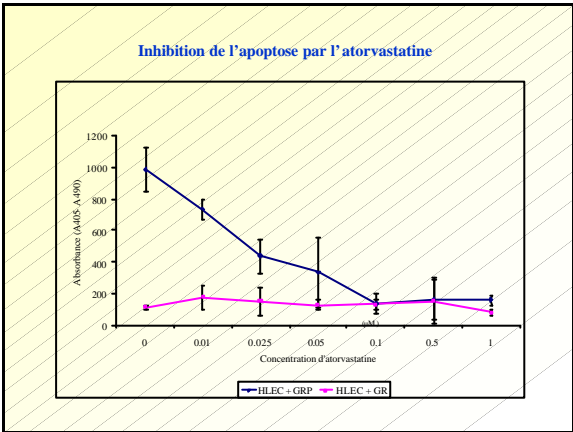
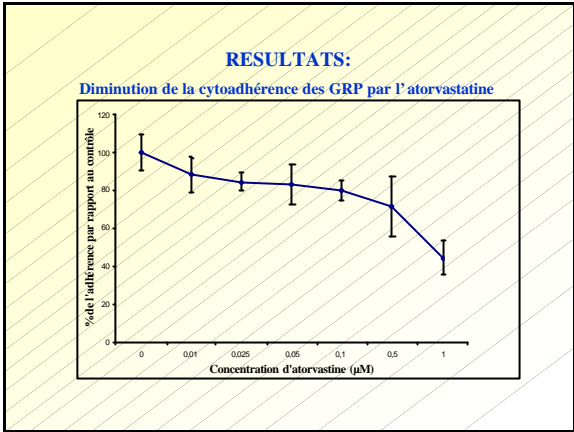
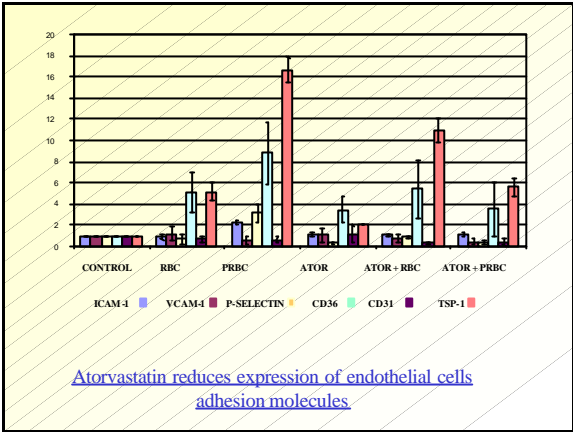


### Rôle du NO dans cette apoptose induite



### EFFETS DES STATINES SUR L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE





**Synthèse**  
**?????**

## 1. Cytoadhérence

Séquestration GRP( majoritairement les GRP knobs positifs), est associée à la survenue du coma

- Peu ou pas de formes matures circulantes: tous les isolats de *P. falciparum* cytoadhèrent.
- L'occlusion complète des microvaisseaux sur des coupes de cerveau de patients décédés de neuropaludisme n'est que très rarement observée.
- Souris perforine KO sont résistantes bien que les GRP adhèrent (Nitcheu *et al.* 2003).

**La cytoadhérence seule n'explique pas tous les troubles neurologiques observés.**

## 2. Inflammation

OUI

## 2. Lymphocytes T

OUI

**Mais petit nombre...**

