UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique
Expérimentales et Moléculaires (INEM)
UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans

THÈSE

présentée par :

Jennifer PALOMO

soutenue le : **17 décembre 2013**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline Biologie des sciences du vivant / Immunologie

Etude des réponses immunitaires de l'hôte dans la pathogenèse d'infections : modèles murins de mucoviscidose et malaria

THÈSE dirigée par :

QUESNIAUX Valérie	Directrice de recherche, UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans
RYFFEL Bernhard	Directeur de recherche, UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

MAGEZ Stefan	Professeur, Vrije Universiteit Brussel
MECHERI Salahedine	Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur Paris

---

JURY :

MAGEZ Stefan	Professeur, Vrije Universiteit Brussel
MECHERI Salahedine	Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur Paris
MAZIER Dominique	Professeur, INSERM/ UPMC UMRS 945
ERARD François	Professeur, Université d'Orléans,
QUESNIAUX Valérie	Directrice de recherche, UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans
RYFFEL Bernhard	Directeur de recherche, UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans

"Sometimes science is like looking for a black cat in a dark room.

It's difficult, especially when there is no cat."

Stuart Firestein

– Remerciements –

Rédiger ma thèse, et faire le bilan de ces 3 années de dur labeur, c'est aussi l'occasion d'avoir une pensée pour toutes les personnes qui m'ont aidée, soutenue et inspirée, sans qui tout cela aurait été impossible.

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Stephan MAGEZ et le docteur Salah MECHERI pour avoir bien voulu consacrer du temps pour évaluer ce travail, et avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je suis touchée par l'intérêt que vous y avez porté. Je remercie également le professeur Dominique MAZIER d'avoir pris part à mon jury, j'en suis très honorée. J'ai une pensée particulière pour le Président du jury, le professeur François ERARD, qui m'a enseigné l'Immunologie à l'Université d'Orléans et m'a convaincue de venir réaliser mon premier stage à l'IEM. Merci François pour les nombreuses discussions qui m'ont fait avancer, et merci d'avoir toujours vérifié que je ne regrettais pas d'avoir fait ma thèse à l'INEM.

Je tiens ensuite à remercier mes deux co-directeurs, les docteurs Valérie QUESNIAUX et Bernhard RYFFEL. Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire pour mes stages de master 1 et 2, et m'avez surtout permis de faire ma thèse à l'INEM. Vous avez su rendre la phrase « ***Le CNRS est une grande famille !*** » réellement significative à l'INEM. C'est grâce à votre encadrement complémentaire, à votre soutien, à votre investissement dans ce projet et à votre passion que j'ai pu accomplir ce travail, aller au-delà de mes limites, et faire de la recherche ma propre passion.

Merci à notre collaborateur néerlandais le docteur Bob J. SCHOLTES pour sa contribution au projet mucoviscidose et pour toutes ses questions nécessitant des réponses tellement compliquées. Je remercie évidemment l'association *Vaincre La Mucoviscidose* pour le soutien financier qu'elle a apporté au cours de ces 3 années de thèse.

Je dois également un immense merci au Dr Mathilde LECLERC-FAUCONNIER qui m'a encadrée au cours de mon stage de M2. J'ai énormément appris grâce à toi et travailler à tes côtés a été formidable. Tu as toujours été présente et disponible, et tu m'as permis d'avancer techniquement, scientifiquement et personnellement. Encore aujourd'hui, merci de m'apporter ton soutien dans les moments de doute et de m'aider à progresser.

Je remercie aussi tendrement Isaz. Tu as été la première à me montrer un BAL et je n'ose pas compter le nombre de fois où ton aide fut capitale. Merci de m'avoir supportée comme coloc de bureau, de m'avoir conseillée tout au long de ma thèse, de m'avoir remontée le moral, et de m'avoir tapée sur les mains quand il le fallait. Merci pour tout.

Je voudrais aussi remercier Marie-Laure qui a été pour moi une grande source d'inspiration, de par sa joie de vivre, sa motivation et son investissement. Nos discussions, scientifiques ou non, m'ont permis d'avancer, m'ont redonné courage.
Merci pour ton aide considérable, merci pour toutes ces soirées avec R, B et LG.

Je remercie chaleureusement Marieke qui elle aussi m'a beaucoup soutenue, m'a fait aimer la bière et dont l'amitié a toujours été sans faille. Merci à Noëlline qui a toujours été là pour … attends la suite… m'encourager, partager d'excellents fous-rires et manger des M&Ms oranges. J'ai aussi un immense merci à adresser à tous mes collègues grâce à qui venir travailler à l'INEM est un plaisir, et plus particulièrement à ma Léa chérie avec qui j'adore partager de la musique, à la nouvelle Toxo Team/Aurélie récemment arrivée mais qui m'a déjà énormément aidée, à mes très chères Beb et Auré, le duo de choc parfois un peu caractériel, à ma co-thésarde Ctrl+Ludivine, à l'ex-Toxo Team Pauline et Raphaëlle, à la TB team Noria et Steph, à Corinne, à Sébastien et à Fahima, et sans oublier à notre adorable Nadège qui se plie en quatre pour nous permettre de travailler.
L'***INEM is the lab to be !*** sans aucun doute. Tous ces moments forts que nous avons partagés m'ont aussi permis d'en arriver là aujourd'hui,
et je ne les échangerais pour rien au monde.

J'ai aussi une tendre pensée pour les anciens du labo : Anne-Gaëlle qui m'a formée sur l'étude des poumons, Rodrigo, Nicolas, Nathy, Pam et Rachel. Suivre leurs traces et faire aussi bien n'est pas toujours facile.
Et faisant, moi aussi, quasiment partie des anciens du labo, je ne peux que souhaiter aux nouveaux et futurs INEMiens autant de réussite et de moment forts.

Je remercie également les différents stagiaires avec qui j'ai travaillé, et qui m'ont permis d'apprendre autant, si ce n'est plus, que je leur ai appris. Et plus particulièrement, merci à Maïlys et à Julie, 2 stagiaires extraordinaires avec qui j'ai passé des moments mémorables, ainsi qu'à Flora qui a accepté d'intégrer le projet. J'espère qu'il te rendra aussi passionnée et qu'il t'apportera autant qu'à moi.

Je voudrais remercier Céline MONTECOT-DUBOURG et Oliver RICHARD pour m'avoir transmis leur passion de l'enseignement. Etre monitrice à vos côtés a été très enrichissant, m'a appris à penser autrement et m'a confortée dans mon souhait de garder une place pour l'enseignement dans mon projet professionnel.

Merci aussi à toute l'équipe des Neuneus, mes voisins de bureau ; et surtout à Betty, Olivier P, Arnaud M, Anthony, Arnaud P, Améziane et Stéphane ; votre bonne humeur est communicative et je vous remercie pour m'avoir appris à mieux râler.

Je remercie également les ArtImmuniens, cousins germains des INEMiens, et tout particulièrement Louis et Tiffany pour votre aide sur le projet *Pseudomonas*.

J'ai aussi une pensée pour mes contacts de la Salpêtrière, Jean-François et Maurel, qui m'ont accueillie si gentiment à chaque fois que je venais pour les sporo.

Je remercie également mes collègues du CBM, Sandra et Fred pour leur aide cruciale avec les manips IRM.

Merci aux membres du CDTA qui nous aident au quotidien, les animaliers, et spécialement Amé si pressé de me voir soutenir (ou alors partir ?).

Enfin, je voudrais terminer par remercier mes proches, en commençant par mes amies adorables : Luyan dont la réussite m'a incitée à me dépasser, Laetitia, en particulier pour son aide pour les pages 36 et 79, ainsi qu'Astrid, qui a toujours encouragé ma douceur. Vous avez toutes les 3 toujours répondu présentes, et pas seulement pour faire la fête.
Depuis les bancs de la Fac, votre soutien et votre amitié ont compté énormément pour moi.

Et un immense et gigantesque merci à mes parents et à ma sœur, merci de m'avoir transmis votre entêtement, votre perfectionnisme, votre générosité et merci de m'avoir laissée me consacrer à ce travail. Merci Sousou pour m'avoir montré ce qu'est la persévérance. Merci à vous tous de m'avoir toujours soutenue et encouragée, de ne pas m'en avoir voulu pour tout ce temps passé au labo et non avec vous.
Merci de m'avoir faite telle que je suis.

Merci à tous.

– Table Des Matières –

Table Des Figures 1

Liste Des Abréviations 3

Prologue 5

Première partie 10

Introduction 11

1. Prévalence. 12
2. Symptômes et pronostic. 12
2.1. Symptômes respiratoires : 12
2.2. Symptômes digestifs : 13
2.3. Autres symptômes : 13
2.4. Pronostic : 13
2.5. Traitements : 13
3. Structure et fonctions du canal CFTR. 15
3.1. Structure du canal CFTR : 15
3.2. Fonctions de canal chlorique : 16
3.3. Fonctions régulatrices : 16
4. Mutations du CFTR. 16
4.1. Mutations de classe I : 17
4.2. Mutations de classe II : 17
4.3. Mutations de classe III : 17
4.4. Mutations de classe IV : 17
4.5. Mutations de classe V : 17
4.6. Mutations de classe VI : 18
5. Physiopathologie pulmonaire. 19
5.1. Dysfonction de CFTR et obstruction muqueuse : 19
5.2. Mucoviscidose et infections pulmonaires : 19
5.3. Mucoviscidose et inflammation pulmonaire : 22
6. Les modèles d'études de la mucoviscidose. 24
7. Les objectifs de l'étude. 25

Matériel et Méthodes 26

1. Les souris. 26
2. Traitement d'anticorps anti-IL-1β sur 8 semaines. 27
3. Challenge répété de LPS sur 5 semaines. 27
4. Infection par *Pseudomonas aeruginosa*. 27
5. Traitement d'anticorps anti-IL-1β et anti-IL-17 sur 24H. 27
6. Quantification des CFU présentes dans les poumons. 27
7. Extraction des ARN totaux. 28

8. RT-qPCR (RétroTranscription et Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative). 28
9. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). 29
10. Dosage de la Myéloperoxydase (MPO). 30
11. Histologie. 30
12. Lavage broncho-alvéolaire (BAL). 31
13. Dosage des protéines. 31
14. Analyses statistiques. 31

Résultats 32

1. L'IL-1β ne participe pas à l'homéostasie du poumon à l'état basal. 33
2. L'IL-1β participe à l'inflammation pathologique chez les mutants ΔF508, en réponse au LPS. 35
3. Difficultés d'élevage des souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$. 37
5. Etude du rôle de l'IL-17 et de l'IL-1β après une infection aiguë à *P. aeruginosa* chez les souris C57BL/6. 44
6. Etude du rôle de l'IL-17 après une infection aiguë à *P. aeruginosa* chez les souris FVB, WT et mutantes ΔF508. 46

Discussion 48

Conclusions et Perspectives 54

Deuxième partie 57

Introduction 58

I. GENERALITES SUR LA MALARIA. 59
1. Historique. 59
2. Incidence. 59
3. Spécificités de *Plasmodium*. 61
3.1. Cycle de développement du parasite. 61
3.1.a. Etapes de développement chez le moustique. 61
3.1.b. Etapes de développement chez le mammifère. 62
3.2. Les espèces spécifiques de l'homme. 64
3.3. Traitements antipaludéens. 65
4. Pathophysiologies associées à la malaria. 67
4.1. La malaria clinique. 67
4.2. La malaria sévère. 67
4.2.a. Anémie sévère. 68
4.2.b. Malaria placentaire. 68
4.2.c. Malaria pulmonaire. 68

II. LA MALARIA CEREBRALE. 71
1. Définitions. 71
2. Séquestration des hématies et neuropathologie. 72
2.1. Cytoadhérence des hématies infectées. 72
2.2. Activation de l'endothélium et inflammation. 74
2.3. Neuropathologie. 74
3. Modèles animaux. 76
3.1 Modèle primate non-humain. 76
3.2 Modèle murin. 76

III. REPONSE IMMUNE ET MALARIA CEREBRALE. 79
1. Reconnaissance du parasite et activation du système immunitaire de l'hôte. 79
1.1 Détection de *Plasmodium.* 79
1.2 Réponse immune à *Plasmodium* et malaria cérébrale. 81
2. Rôle des cellules T dans la malaria cérébrale. 84
2.1 Contribution des lymphocytes au développement de la malaria cérébrale. 85
2.1.a. Rôle des cellules T $CD8^+$ 85
2.1.b. Rôle des cellules T $CD4^+$ 87
2.2 La voie de signalisation PKC-θ. 88
3. Médiateurs de l'inflammation. 90
3.1 La voie de l'IL-12. 90
3.1.a. La famille de l'IL-12 90
3.1.b. L'interleukine 12. 91
3.1.c. IL-12 et malaria cérébrale. 91
3.2 Les interférons. 92
3.2.a L'interféron γ. 93
3.2.b Les interférons de type I. 95
3.3 Autres médiateurs de l'inflammation. 96
3.3.a Les chimiokines. 96
3.3.b TNF-α et LT-α. 97
3.3.c Granzymes et Perforine 99
IV. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE 102

Résultats 103

I. RÔLE DE LA PROTEINE PKC-Θ DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE. 103
II. RÔLE DU RECEPTEUR IL-12Rβ2 DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE. 117
III. ROLE DU RECEPTEUR AUX INTERFERONS DE TYPE I DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE. 131

Discussion 148

Conclusions et Perspectives 166

Epilogue 169

Références Bibliographiques 171

– Table Des Figures –

Première partie

Figure 1 : Thérapies en développement pour l'indication de la mucoviscidose..... 14

Figure 2 : Structure du canal CFTR..... 15

Figure 3 : Classification des mutations du canal CFTR..... 18

Figure 4 : Schéma de la structure des voies respiratoires et des transports ioniques chez un individu sain et chez un patient mucoviscidosique..... 20

Figure 5 : Prévalence des infections dominantes chez les patients mucoviscidosiques selon l'âge..... 21

Figure 6 : L'administration d'anticorps anti-IL-1β n'a pas d'effet sur l'ultra-structure des poumons..... 33

Figure 7 : L'administration d'anticorps anti-IL-1β n'a pas d'effet sur la production l'IL-1β, d'IL-6 et de CCL2 dans les poumons..... 34

Figure 8 : L'IL-1β participe à l'inflammation pathologique chez les mutants ΔF508, en réponse au LPS 36

Figure 9 : Statistiques de l'élevage de la lignée ΔF508 x IL-1R1..... 38

Figure 10 : Une faible dose de *P. aeruginosa* induit une inflammation accrue à 20H chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les d/d^{B6}..... 41

Figure 11 : L'inflammation induite par *P. aeruginosa* est identique à 6H chez les souris WT^{B6}, IL-1R1$^{-/-}$ et d/d^{B6}..... 43

Figure 12 : L'IL-1β et l'IL-17 sont impliquées dans l'inflammation induite par *P. aeruginosa* à 20H chez les souris WT^{B6}..... 45

Figure 13 : La neutralisation de l'IL-17A réduit l'inflammation induite par *P. aeruginosa* chez les souris WT^{FVB} et chez les souris d/d^{FVB} 47

Deuxième partie

Figure 14 : Populations ayant un risque de contracter la Malaria..... 60

Figure 15 : Cycle de développement de *Plasmodium*..... 62

Figure 16 : Schizogonie érythrocytaire de *Plasmodium*..... 63

Figure 17 : Complications de la malaria..... 69

Figure 18 : Adhérence des hématies infectées..... 72

Figure 19 : Images IRM d'une femme de 32 ans atteinte de malaria cérébrale..... 74

Figure 20 : Comparaison des signes de malaria cérébrale chez l'homme et chez la souris... 76

Figure 21 : Composés de *Plasmodium* et leur bio-activité..... 79

Figure 22 : Mécanismes d'interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales dans la malaria cérébrale..... 81

Figure 23 : Voie canonique de la cross-présentation sur le CMH_I..... 85

Figure 24 : Régulation du signal de transduction des récepteurs TCR/CD28 activés par PKC-θ..... 88

Figure 25 : Les membres de la famille de l'IL-12 et leurs récepteurs..... 90

Figure 26 : Sources cellulaires d'IFN-γ, dans le cerveau, après infection par *Pb*A..... 93

Figure 27 : Ligands et récepteurs de la superfamille du TNF..... 97

Figure 28 : Induction de l'apoptose par les Granzymes par la Perforine..... 99

Figure 29 : Modèle de la différenciation T_H1 en réponse à l'infection par un pathogène.... 151

Figure 30 : Modèle du développement de l'ECM après infection par *Pb*A, intégrant les différentes voies étudiées au cours de ma thèse..... 162

– Liste Des Abréviations –

ΔF508	Délétion de la phénylalanine 508
ABC	*ATP Binding Cassette*
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AP1	*Activator protein 1*
ARM	Angiographie à Résonnance Magnétique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BAFF	*B Cell Survival Factor*
BAL	Lavage Broncho-Alvéolaire
BALF	*BAL Fluid* = Liquide Lavage Broncho-Alvéolaire
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCL-	Chimiokine à motif C-C
CCR-	Récepteur de chimiokine à motif C-C
CD-	Cluster de différenciation
CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*
CFU	Unité Formant des Colonies
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CREB	c-AMP *Response Element-Binding protein*
CXCL-	Chimiokine à motif C-X-C
CXCR-	Récepteur de chimiokine à motif C-X-C
d/d^{B6}	Souris $Cftr^{tm1eur}$ portant une mutation ΔF508, de fond génétique C57Bl/6
d/d^{FVB}	Souris $Cftr^{tm1eur}$ portant une mutation ΔF508, de fond génétique FVB
DAG	Diacylglycérol
DAMP	*Danger-Associated Molecular Pattern*
DC	Cellule Dendritique
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
ECM	*Experimental Cerebral Malaria*/ Malaria cérébrale expérimentale
EMP 1	*Epithelial membrane protein 1*
ENaC	*Epithelial Sodium Channel*
et al.	*et alli* : et collaborateurs
FcεRI	Récepteur I aux IgE, de haute affinité
Flt3(L)	*Fms-Related Tyrosine Kinase 3 (Ligand)*
GPF	*Green Fluorescent protein*
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
ICAM	*Intercellular adhesion molecule*
IFN-γ	Interféron γ
IFN-γR	Récepteur à l'interféron γ
IFN-I	Interférons de type I
IFNAR	Récepteur à l'interféron de type I
IgE	Immunoglobuline E
IL-	Interleukine -

IL-12Rβ2	Sous-unité β2 du récepteur à l'interleukine 12
IL-1R1	Récepteur à l'IL-1 de type 1
IRF	*Interferon Regulatory Factor*
IRM	Imagerie à Résonnance Magnétique
KC	*Keratinocyte-derived Chemokine* ou CXCL1
LFA-1	*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*
LT-α	Lymphotoxine α
LT-β	Lymphotoxine β
LT-βR	Récepteur de la Lymphotoxine β
MPO	Myéloperoxydase
NaCl	Chlorure de Sodium
NAIP	*Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein*
NBC	*Nucleotide Binding Cassette*
NF-AT	*Nuclear Factor of Activated T-Cells*
NF-κB	*Nuclear Factor-κB*
NK	*Natural Killer*
NLRC4	*NOD-Like Receptor CARD domain-containing protein 4*
NO	Oxyde Nitrique
NT	Non Traité
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
*Pb*A	*Plasmodium berghei* ANKA
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PfEMP1	*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*
PKA	Protéine Kinase A
PKC-θ	Protéine Kinase C – θ
pRBC	*parasitized Red Blood Cells*
PRR	*Pattern Recognition Receptors*
RT	RétroTranscription
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
SNC	Système Nerveux Central
STAT-	*Signal Transducer and Activator of Transcription*
STING	*Stimulator of Interferon Genes*
TCR	Récepteur de cellule T
T_H-	*T helper-*
TLR	*Toll-Like Receptor*
TNF-α	*Tumour Necrosis Factor α*
T_{reg}	T régulatrice
VCAM	*Vascular Cell Adhesion Molecule*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
WT ou WT^{B6}	Souris de type sauvage C57BL/6
WT^{FVB}	Souris de type sauvage FVB

-Prologue-

Au cours de ces trois années de thèse effectuées à l'INEM, j'ai eu la chance de prendre part à deux projets de recherche à première vue assez éloignés, s'intéressant à des réponses immunitaires et inflammatoires impliquées dans la mucoviscidose ainsi que dans la malaria cérébrale et pulmonaire.

Ces deux pathologies touchent des organes différents, et impliquent des voies de réponses immunitaires distinctes. Cependant, dans les deux cas, les mécanismes impliqués dans les relations hôte-pathogène sont essentiels. Et malgré l'activation de voies immunes différentes, il s'agit dans les deux cas d'une inflammation excessive et non contrôlée, induisant une pathologie. En effet, qu'il s'agisse d'une hyper-inflammation induite par une perte de fonction d'un canal ionique épithélial avec surinfection, ou bien simplement induite par une réponse excessive à un parasite intra-érythrocytaire, les conséquences pour l'hôte sont l'apparition d'une pathologie inflammatoire pouvant être fatale.

Néanmoins, les résultats obtenus pour ces projets seront présentés et discutés dans deux parties séparées.

Ainsi, la première partie de ce manuscrit concernera le projet de recherche sur la mucoviscidose. Il s'agit de la pathologie létale et héréditaire la plus fréquente en Europe et en Amérique de Nord, avec à ce jour 70 000 à 100 000 patients dans le monde. Malgré une amélioration certaine des soins apportés aux patients ces dernières années, il n'existe pas de traitement curatif de la mucoviscidose, et l'espérance de vie, bien que fortement augmentée récemment, n'est toujours que de 40 ans. Cette maladie est causée par la mutation du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), codant pour un canal chlorique retrouvé au niveau des épithéliums de différents organes. La pathologie pulmonaire à l'origine de la létalité de la mucoviscidose, se définit par un mucus visqueux qui obstrue les voies respiratoires, une susceptibilité accrue aux infections chroniques (et plus particulièrement à *Pseudomonas aeruginosa*) et une inflammation excessive. L'hyperviscosité du mucus est associée avec la persistance de bactéries opportunistes, ainsi qu'avec une réponse immunitaire excessive.

Cette partie de ma thèse est intégrée au projet n°10IM1016, financé par l'association ''Vaincre La Mucoviscidose'' (VLM), et coordonné par notre collaborateur le professeur Bob J. Scholte de l'ERASMUS Medical Center de Rotterdam. Cette étude intitulée « Rôle de l'IL-1

et de l'IL-17 dans la pathologie pulmonaire mucoviscidosique, et thérapie expérimentale chez un modèle animal » a pour objectifs l'étude des mécanismes de l'inflammation pouvant être impliqués dans le développement de la pathologie, et le test de molécules à potentiel thérapeutique. Plusieurs axes ont été développés afin de répondre à ces objectifs. Une partie de l'étude est basée sur l'analyse d'échantillons de patients humains atteints de mucoviscidose (en collaboration avec l'hôpital de Rotterdam), qui permettra de définir la relation entre la progression de la pathologie et le polymorphisme du gène *Il1b*. Les autres axes de recherche sont basés sur l'utilisation de modèles expérimentaux, et plus particulièrement des souris reproduisant la mutation ΔF508, qui est la plus fréquemment trouvée chez les patients mucoviscidosiques. L'équipe de l'ERASMUS MC cherche en effet à implémenter des techniques avancées d'imagerie chez la souris, telles que l'association bioluminescence/CT scan ou encore l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), dans le but de suivre la progression de l'inflammation pulmonaire. La troisième approche mise en œuvre par l'équipe du Professeur Scholte est le développement de vecteurs lentiviraux de troisième génération qui permettraient de bloquer la voie de l'IL-1β (par l'expression du récepteur antagoniste IL-1RA). Enfin, le dernier axe de recherche associé à mon projet de thèse a été d'analyser le rôle de la voie de l'IL-1β, et la voie de l'IL-17, lors d'une infection par *P. aeruginosa*, et ce dans le contexte mucoviscidosique, par l'utilisation d'anticorps neutralisants spécifiques. Au début de ce projet, j'ai eu l'opportunité de passer quelques jours au sein du laboratoire de Rotterdam afin d'améliorer mes connaissances théoriques et pratiques sur le modèle murin de mucoviscidose. Une étape importante de ce projet était l'établissement d'une colonie de souris double-déficientes, portant la mutation ΔF508 et déficientes pour le récepteur à l'IL-1β (IL-1R1). Ceci afin de caractériser les effets induits par l'absence de la voie de l'IL-1β sur le développement d'une pathologie mucoviscidosique. L'obtention des double-mutants s'est avérée difficile et leur production insuffisante. En plus de deux ans, seulement 6 souris sur 300 présentaient le génotype double-déficient souhaité pour l'étude. Au vu de ces problèmes de croisements, nous avons pris la décision d'arrêter l'élevage et de transférer les souris restantes, à l'Université Catholique de Louvain à Brussel, au Dr Teresinha LEAL.

En parallèle de cette étude, j'ai eu l'occasion de poursuivre le projet de recherche sur la malaria, auquel j'avais participé au cours de mon stage de master 2.

La malaria, induite par *Plasmodium*, est à ce jour la parasitose la plus répandue, avec environ la moitié de la population mondiale à risque. L'infection par *P. falciparum* est responsable de plus de 650 000 décès par an, notamment à cause du développement complications sévères qui peuvent toucher plusieurs organes. Nous nous sommes intéressés à deux d'entre elles : la complication pulmonaire et la malaria cérébrale. Les complications sont provoquées par la cytoadhérence des hématies infectées par *Plasmodium* à l'endothélium vasculaire, ainsi que par le recrutement de plaquettes et de leucocytes dans les micro-vaisseaux.

Dans le cas de la malaria cérébrale, l'activation des cellules endothéliales qui en découle entraîne une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et des hémorragies localisées. Les éléments impliqués dans la pathogenèse sont mal connus. Les mécanismes cellulaires et moléculaires étant difficiles à adresser chez l'homme, l'utilisation de modèles animaux est importante afin de mieux comprendre le développement de la malaria cérébrale et de développer de nouvelles thérapies plus efficaces. Lors de ma thèse, j'ai utilisé un modèle murin de malaria cérébrale expérimentale (ECM), induite par l'infection à *Plasmodium berghei* ANKA, chez des souris C57BL/6. Nous avons concentré nos recherches sur les voies impliquées dans l'activation et le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques. En effet, les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques sont les cellules effectrices nécessaires au développement de l'ECM. Nous avons d'abord étudié le rôle de la Protéine Kinase C – θ (PKC-θ) qui est une molécule essentielle aux voies de signalisation intracellulaires des lymphocytes T. Par la suite, nous avons centré nos études sur l'implication de la voie du récepteur à l'IL-12 dans la neuro-pathogenèse. Et pour finir, nous avons précisé le rôle des interférons de type I dans le développement de l'ECM. Au cours de cette dernière étude, nous avons réalisé, en parallèle d'infections par le stade sanguin (hématies infectées par des mérozoïtes) de *Pb*A, des infections avec des sporozoïtes de *Pb*A. Ce stade pré-érythrocytique du parasite est plus précoce dans le cycle de développement de *Plasmodium* et permet donc de se rapprocher du mode d'infection humaine. Les sporozoïtes du parasite sont plus sensibles que le stade sanguin, et ils doivent être fraichement isolés de glandes salivaires de moustiques. J'ai pu avoir accès aux moustiques infectés par *Pb*A et apprendre à extraire les

sporozoïtes des glandes salivaires de moustiques grâce à la collaboration avec l'équipe du professeur Dominique MAZIER (INSERM/UPMC UMR945, Paris).

Chez l'homme, 20% des cas de malaria cérébrale sont aussi associés à une complication pulmonaire. Ainsi, lors de ces travaux, nous avons aussi analysé la pathologie pulmonaire induite par l'infection par *Pb*A. Nous avons pu mettre en évidence une disparité entre la forme cérébrale et la forme pulmonaire du paludisme murin. En effet, après infection par *Pb*A, l'absence des voies PKC-θ, IL-12Rβ2, IFN-γR ou IFNAR n'a pas eu d'effet sur le développement d'une complication dans les poumons.

Ces différentes études sur le modèle murin d'infection par *Pb*A, nous ont permis de détailler certains mécanismes impliqués dans la réponse immune associée au développement de la complication cérébrale. Ces résultats ont donné lieu à la publication de trois articles qui sont présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

– Première partie –

– Introduction –

La mucoviscidose, aussi appelée fibrose kystique, est une des pathologies héréditaires les plus courantes parmi les populations caucasiennes, bien qu'elle puisse affecter toutes les ethnies. Elle fut décrite pour la première fois en 1938 par la pédiatre américaine Dorothy Anderson qui fit clairement la distinction entre la fibrose kystique et la maladie cœliaque [1:Anderson 1938]. Et c'est en 1949 que, considérant l'hérédité autosomique récessive, Lowe *et al.* ont émis l'hypothèse d'une maladie induite par un défaut au niveau d'un seul gène [2:Lowe 1949]. Les infections respiratoires chroniques furent ensuite identifiées comme les symptômes majeurs de la mucoviscidose et traitées par antibiothérapie dans les années 1940 [3:Lubamba 2012].

La mucoviscidose est la conséquence d'un dysfonctionnement du canal chlorique CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) [4:Quinton 1983] causé par des mutations au sein du gène *CFTR*. Elle implique ainsi la production d'un mucus anormalement épais au niveau des épithéliums glandulaires de différents organes et touche les voies respiratoires, digestives et le système urogénital. Elle peut en particulier être à l'origine d'infections pulmonaires létales.

1. Prévalence.

La mucoviscidose est une maladie héréditaire de type autosomique récessive. Ainsi, les deux parents des patients atteints de mucoviscidose, ou mucoviscidosiques, sont dits 'porteurs sains' du défaut génétique et ne développent aucune pathologie. Le nombre de patients atteints de mucoviscidose dans le monde est compris entre 70 000 et 100 000 personnes. Mais ce chiffre est probablement sous-estimé, en particulier dans les zones ne possédant pas de service de santé développé. En effet, dans ces zones, seuls les symptômes sont traités et les patients mucoviscidosiques décèdent avant l'établissement d'un diagnostique correct (Organisation Mondiale de la Santé – OMS).

Pour les mêmes raisons, il est possible de remettre en question les chiffres présentant une incidence variable autour du globe, avec par exemple une prévalence très faible en Asie, où la mucoviscidose est rarement identifiée. En Europe, l'incidence de la pathologie est de 1 naissance sur 2000-3000, alors qu'un nouveau-né sur 3500 souffre de mucoviscidose aux Etats-Unis (OMS). En 2011, le Registre Français de la Mucoviscidose a recensé 6046 patients dans l'Hexagone, dont la moitié a été diagnostiquée avant l'âge de 3 mois.

2. Symptômes et pronostic.

La mucoviscidose est une pathologie qui affecte les épithéliums de différents organes. Il existe de nombreux symptômes, assez variables d'un patient à l'autre, en raison du nombre important de mutations possibles du gène *CFTR*. Parmi eux, l'augmentation de la concentration en NaCl de la transpiration est connue depuis longtemps [5:Zielenski 2000]. Sa mesure est actuellement utilisée comme test standard de diagnostique. Ces symptômes peuvent être divisés en 2 groupes majeurs, les manifestations respiratoires et les signes digestifs.

2.1. Symptômes respiratoires :

La caractéristique la plus délétère, à l'origine de la létalité de la mucoviscidose, est l'atteinte des voies respiratoires. Les patients atteints de mucoviscidose présentent une toux persistante, parfois avec mucosités, ainsi qu'une respiration sifflante ou un essoufflement. Ils sont également sujets aux infections pulmonaires récurrentes. Par exemple,

Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et *Haemophilus influenzae* sont des pathogènes fréquemment retrouvés chez ces patient, en raison d'une clairance inefficace. L'inflammation chronique en résultant est aussi impliquée dans la perte de la fonction respiratoire [6:Lyczak 2002], comme il sera expliqué dans la partie *5. Physiopathologie pulmonaire*.

2.2. Symptômes digestifs :

La mucoviscidose est également caractérisée par une atteinte du tractus gastro-intestinal. Les patients mucoviscidosiques présentent un appétit excessif mais cependant, accompagné d'une faible prise de poids, qui peut s'expliquer par le fait que le pancréas présente un dysfonctionnement dans la sécrétion d'enzymes digestives [7:Steward 2005] et les intestins une malabsorption chronique [8:Winfield 2006].

2.3. Autres symptômes :

Les patients mucoviscidosiques peuvent aussi présenter d'autres signes, selon les formes et l'évolution de la maladie. L'atteinte pancréatique peut, par exemple, conduire à une sécrétion d'insuline insuffisante, menant au diabète [7:Steward 2005]. De plus, dans 15 à 20% des cas, les patients atteints de mucoviscidose développent une pathologie biliaire et une cirrhose hépatique progressive [9:Moyer 2009]. Des douleurs articulaires et de l'ostéoporose apparaissent aussi chez certains patients [10:Paccou 2010]. Enfin, presque 100% des hommes mucoviscidosiques sont stériles en raison de l'obstruction du canal déférent.

2.4. Pronostic :

Il n'existe encore aucun traitement définitif de la mucoviscidose. Il y a encore 30 ans, les patients mucoviscidosiques atteignaient difficilement l'âge adulte. Mais l'amélioration des soins réalisée ces dernières années a permis de repousser l'espérance de vie jusqu'à 40 ans ; bien que la médiane ne se situe qu'à 28 ans.

2.5. Traitements :

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la mucoviscidose. Néanmoins, les traitements symptomatiques se sont nettement améliorés ces dernières années. Tout

d'abord les diagnostiques sont réalisés tôt (en France, un test de dépistage est fait chez tous les nouveau-nés), et beaucoup de patients sont détectés quelques mois après la naissance. Or, plus ces patients sont pris en charge tôt, plus les symptômes peuvent être réduits ou retardés [11:Antunovic 2013]. Les traitements sont complexes car ils doivent cibler différents organes, et doivent être adaptés à l'âge des patients et au degré de sévérité de la pathologie. Par exemple, les symptômes respiratoires peuvent être traités par des mucolytiques, des antibiotiques et des bronchodilatateurs. Les troubles digestifs peuvent être atténués par l'apport de suppléments en enzymes pancréatiques, en vitamines et en sels minéraux. Néanmoins, lorsque les patients atteignent les derniers stades de la pathologie, les transplantations d'organes (poumons, pancréas) doivent être envisagées.

Plus récemment, les essais cliniques se sont concentrés sur le développement de molécules thérapeutiques ciblant directement le canal CFTR, telles que l'Ivacaftor, approuvé en 2012 et spécifique de la mutation G551D [12:Ledford 2012]. Enfin, les équipes de recherche se focalisent aussi sur le développement de thérapies géniques. Malgré la difficulté de combiner l'efficacité du traitement, une immunogénicité réduite et des effets secondaires faibles, un ADN délivré par liposome est actuellement en phase II d'essai clinique (**Figure 1**).

Traitement	**Statut**	**Propriétés**	**Mutation ciblée**
Ivacaftor	Approuvé en 2012	Activation de CFTR	G551D (classe III)
Ataluren	Phase III	Force la traduction des mutations de classe I	G542X (classe I)
Lumacaftor	Phase II	Correction de CFTR	ΔF508 (classe II)
Ivacaftor + Lumacaftor	Phase II	Activation + correction de CFTR	ΔF508 (classe II)
VX661	Phase II	Correction de CFTR	ΔF508 (classe II)
Ivacaftor + VX661	Phase II	Activation + correction de CFTR	ΔF508 (classe II)
ADN liposomique	Phase IIb	Expression du gène *cftr* dans les cellules épithéliales	Toutes

Figure 1 : Thérapies en développement pour l'indication de la mucoviscidose (d'après 12:Ledford 2012).

3. Structure et fonctions du canal CFTR.

La mucoviscidose est une pathologie qui a pour origine un défaut génétique au sein du gène *CFTR*. Ce dernier est situé, chez l'homme, sur le chromosome 7, en position q31.2 et, chez la souris, sur le chromosome 6, en position A3 – 8.1cM.

3.1. Structure du canal CFTR :

Le gène *CFTR* code une glycoprotéine monomérique de 1480 acides aminés et d'environ 170kDa [3:Lubamba 2012]. Cette protéine est un canal chlorique appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). En effet, le canal CFTR possède 2 domaines intracellulaires de liaison à l'ATP : les NBDs (*Nucleotide-Binding Domains*) 1 et 2 (**Figure 2**). La protéine présente 12 domaines transmembranaires, et 2 sites de glycosylation potentiels qui se situent au niveau d'une hélice extracellulaire. Du côté intracellulaire, entre les 2 NBDs se trouve un domaine de régulation (*R-Domain*), possédant des sites de phosphorylation spécifiques de la protéine kinase A (PKA) AMPc-dépendante.

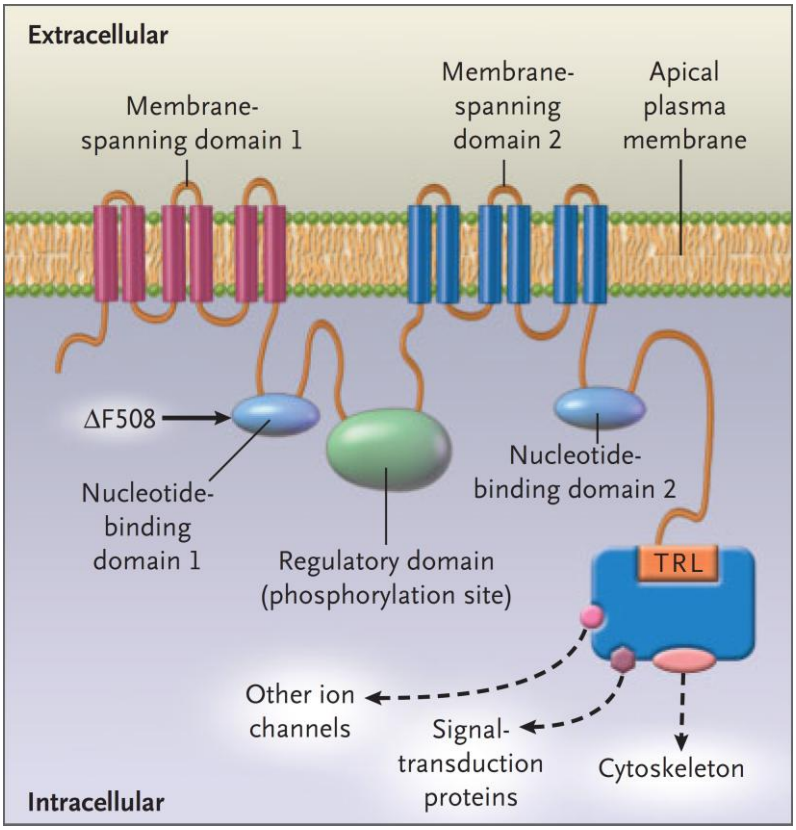


Figure 2: Structure du canal CFTR [13:Rowe 2005].

La protéine CFTR est principalement localisée au niveau des membranes apicales de cellules épithéliales polarisées [14:Denning 1992] mais peut aussi se trouver sur des cellules non épithéliales, telles que les cardiomyocytes [15:Hume 2000], les cellules musculaires lisses [16:Lamhonwah 2010], les érythrocytes [17:Decherf 2007] ou encore les cellules immunitaires comme les macrophages [18:Di 2006].

3.2. Fonctions de canal chlorique :

Le canal CFTR est un transporteur transmembranaire d'anions. L'ouverture du canal est dépendante de l'hydrolyse d'ATP en ADP. Elle permet notamment la sortie des ions Cl^- de la cellule épithéliale, favorisant ainsi l'efflux passif d'eau, et réduisant l'entrée de Na^+ (via le canal ENaC). En revanche, au niveau des glandes sudoripares, l'orientation du CFTR est inversée, expliquant ainsi la concentration accrue en Cl^- dans la transpiration des patients atteints de mucoviscidose.

3.3. Fonctions régulatrices :

En plus de sa fonction de canal chlorique épithélial, le CFTR est impliqué dans l'inhibition du canal sodique épithélial ENaC. En effet, l'activité de ce canal ENaC est augmentée au niveau des cellules épithéliales portant une mutation du gène *cftr* [3:Lubamba 2012]. Le CFTR serait également impliqué dans la régulation de plusieurs autres canaux ioniques : calcique (CaCC), potassique (ROMK), l'échangeur de sodique/proton NHE3 et une aquaporine.

Enfin, le CFTR peut avoir un rôle dans la régulation du transport d'ATP, ou bien l'expression de cytokines pro-inflammatoires [19:Vandivier 2009].

4. Mutations du CFTR.

Dans les conditions normales, l'ARNm *CFTR* est traduit au niveau du réticulum endoplasmique. La proforme de la protéine subit alors plusieurs glycosylations. La protéine correctement repliée est prise en charge par l'appareil de Golgi, pour ensuite être délivrée au niveau de la membrane apicale de la cellule. Il existe plus de 800 mutations possibles du gène *CFTR* [20:Gaspar 2013]. Elles sont classées en 6 groupes en fonction du défaut induit [3:Lubamba 2012 - 21:Kerem 2006] (**Figure 3**).

4.1. Mutations de classe I :

Dans cette première classe se trouvent 5 à 10 % des mutations, qui induisent l'apparition d'un codon 'STOP' ou non-sens. La traduction de l'ARNm étant arrêtée prématurément, la protéine tronquée est rapidement dégradée, et aucun canal CFTR n'est présent à la surface des cellules.

4.2. Mutations de classe II :

C'est à cette classe qu'appartient la mutation ΔF508, (correspondant à une protéine dont la phénylalanine 508 est délétée), qui est la plus commune, car présente sur 70% des allèles *cftr* mutées [22:O'Sullivan 2009]. La mutation ΔF508, ainsi que les autres mutations de cette classe, entraîne la production d'une protéine CFTR dont la structure tertiaire est incorrecte, et qui est rapidement dégradée. Il n'y a qu'une infime quantité de protéines CFTR présentes à la surface, et leur fonction de transporteur de Cl^- est altérée.

4.3. Mutations de classe III :

Cette classe représente à 2 à 3 % des mutations qui mènent à la synthèse d'une protéine repliée correctement, mais dont la fonction de canal chlorique est altérée (tout comme les mutations de classes IV, V et VI). En effet, les mutations de classe III induisent une modification au niveau des sites de régulation : au sein des NBDs, bloquant ainsi la fixation de l'ATP, ou au sein du site de phosphorylation par la PKA.

4.4. Mutations de classe IV :

Les mutations de ce groupe conduisent à des protéines repliées correctement et dont la fonction de canal chlorique est altérée. Dans cette classe, c'est la conductance qui est modifiée. L'activité de canal chlorique étant partielle, elle conduit à un phénotype pathologique moins sévère.

4.5. Mutations de classe V :

Les mutations de classe V induisent des modifications au niveau des sites d'épissage de l'ARNm *CFTR*. Le nombre d'ARNm *CFTR* fonctionnels étant réduit, la quantité de canal CFTR au niveau membranaire est donc aussi diminuée.

4.6. Mutations de classe VI :

Cette dernière classe correspond à des mutations qui conduisent à des protéines possédant une faible stabilité au niveau de la membrane apicale, en raison d'un renouvellement accéléré. La protéine mature et fonctionnelle est présente à la surface de la cellule en faible quantité. Elle est dite 'instable' car rapidement dégradée/recyclée [23:Haardt 1999].

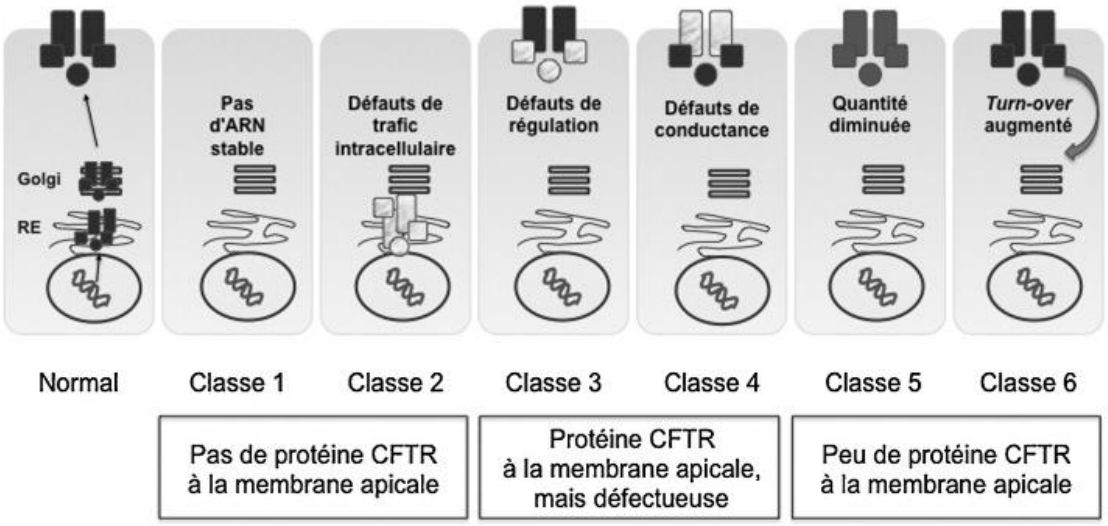


Figure 3 : Classification des mutations du canal CFTR (d'après [24:Fajac 2013]).

Les classes I, II, III, et VI correspondent à des mutations menant à un phénotype pathologique sévère en raison d'une perte importante ou totale de la fonction de canal chlorique. En revanche, les mutations de classes IV et V induisent des phénotypes pathologiques plus légers car elles causent une perte de fonction uniquement partielle de la conductance, ou bien de la stabilité de l'ARNm [3:Lubamba 2012]. En ce qui concerne la mutation ΔF508, il a récemment été montré que, non seulement le repliement de la protéine est fortement altéré, mais aussi que les rares protéines atteignant la membrane apicale présentent des fonctions de régulation et un renouvellement modifiés. La mutation ΔF508 pourrait ainsi être placée dans les classes II, III et VI [25:Thibodeau 2010].

5. Physiopathologie pulmonaire.

La pathologie pulmonaire, responsable de la mortalité et de la morbidité chez les patients mucoviscidosiques, peut être expliquée, de façon simplifiée, par 3 éléments : obstruction muqueuse, infection et inflammation [3:Lubamba 2012].

5.1. Dysfonction de CFTR et obstruction muqueuse :

La perte partielle ou totale de la fonction de canal CFTR, causée par une mutation au sein du gène *CFTR*, induit une altération plus ou moins forte du transport des ions Cl^-. Par conséquent, au niveau des épithéliums mucoviscidosiques, l'efflux de Cl^- est nettement réduit, alors que l'entrée de Na^+ est augmentée. Chez un individu sain, l'équilibre ionique créé par le canal CFTR permet le maintien d'une couche de liquide périciliaire au dessus des cellules de l'épithélium pulmonaire. Cette couche procure un milieu aqueux et peu visqueux pour que le battement des cils puisse évacuer le mucus situé au-dessus. Chez les patients atteints de mucoviscidose, la perte de fonction CFTR a pour effet d'accroître l'entrée d'eau dans les cellules, et ainsi de réduire le liquide périciliaire. La viscosité du mucus est aussi augmentée, et ce dernier n'est pas évacué efficacement des voies respiratoires (**Figure 4**). Ainsi, l'une des caractéristiques des poumons de ces patients est une hypertrophie des glandes submucosales. Cet encombrement des voies respiratoires gène la clairance mucociliaire. Et l'accumulation de mucus très visqueux est à l'origine de la sensibilité des patients mucoviscidosiques à l'infection et à l'inflammation.

5.2. Mucoviscidose et infections pulmonaires :

Alors que le rôle du canal dans le transport des ions Cl^- est assez détaillé, le lien entre les mutations *CFTR* et une augmentation de la susceptibilité aux infections est encore flou et parfois controversé. Classiquement, les patients atteints de mucoviscidose montrent une hypersensibilité aux infections, avec une prédominance de *S. aureus* chez les enfants et adolescents, et de *P. aeruginosa* chez les adultes (**Figure 4**).

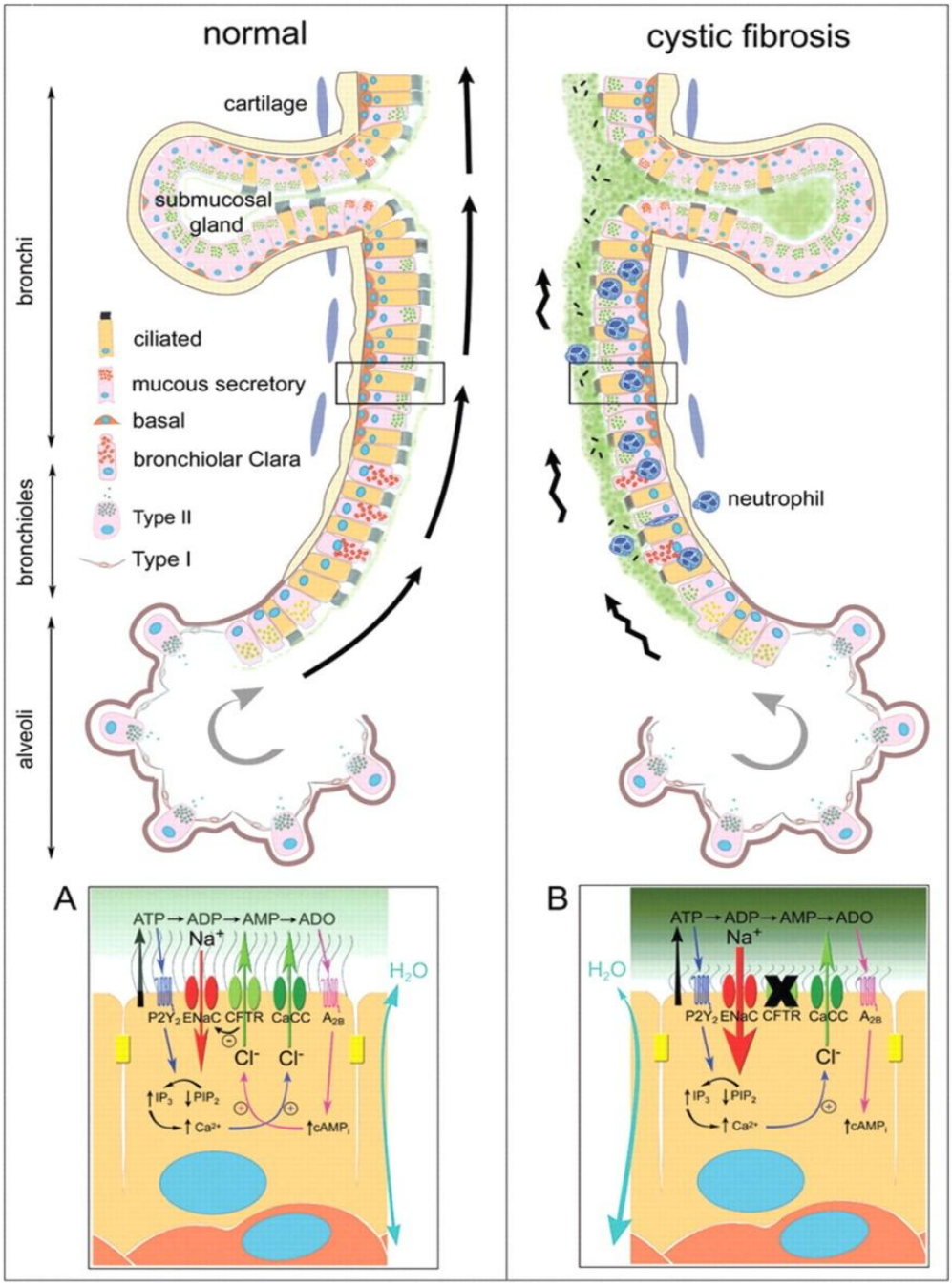
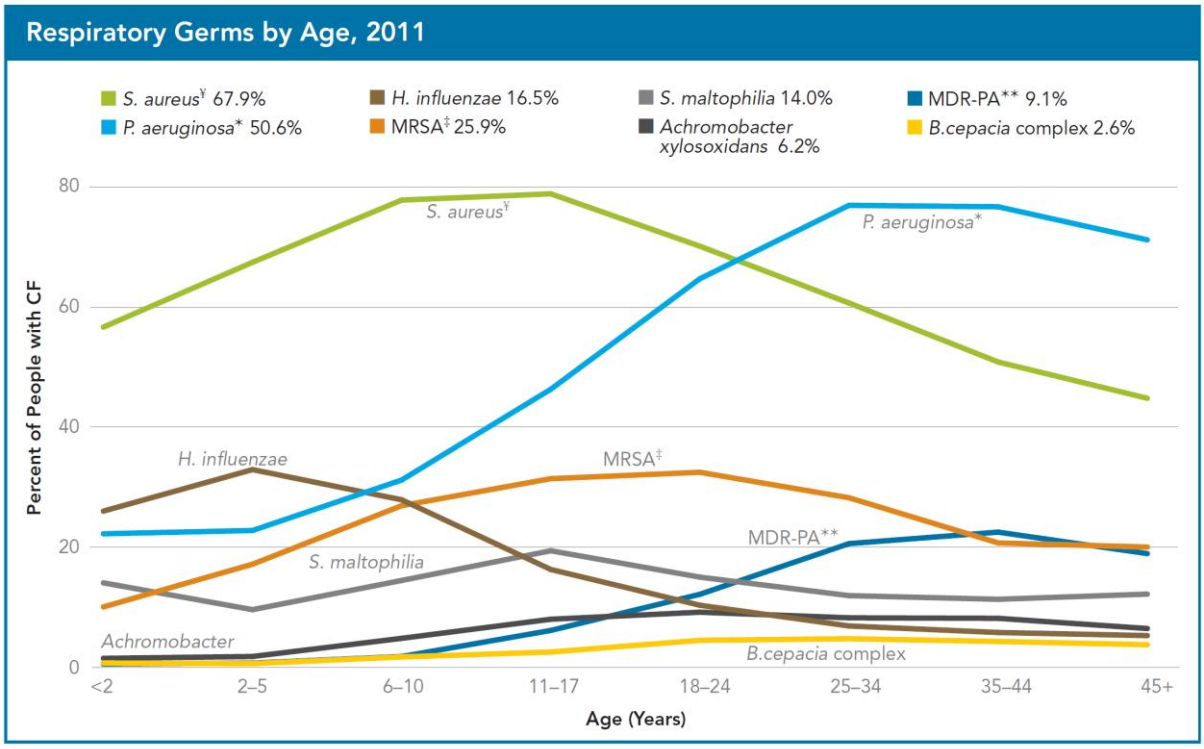


Figure 4 : Schéma de la structure des voies respiratoires et des transports ioniques chez un individu sain (A) et chez un patient mucoviscidosique (B) [26:Livraghi 2007].

P. aeruginosa est le pathogène ayant la plus forte prévalence. En effet, 54,4% de l'ensemble des patients souffrant de mucoviscidose sont positifs à la bactérie, et *P. aeruginosa* est présent chez 80% des patients de plus de 18 ans (**Figure 5**). Cette bactérie Gram – infecte les voies respiratoires inférieures, et sans traitement, induit une perte rapide des fonctions respiratoires chez les patients mucoviscidosiques. Au départ, *P. aeruginosa* est sous une forme 'planctonique' ou 'libre' qui pénètre facilement dans le mucus. Puis, les bactéries prennent une forme mucoïde avec production de biofilms. Ces biofilms, riches en exo-polysaccharides, ainsi que la viscosité du mucus, sont à l'origine de la résistance des bactéries aux antibiotiques et à l'élimination par le système immunitaire de l'hôte [20:Gaspar 2013]. Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose sont soumis à de multiples infections chroniques, qui induisent une forte inflammation des voies aériennes.



*P. aeruginosa *includes people with MDR-PA.*
***MDR-PA is multi-drug resistant* Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa).*
¥S. aureus *includes people with MRSA.*
‡*MRSA is methicillin-resistant* Staphylococcus aureus (S. aureus).

Figure 5 : Prévalence des infections dominantes chez les patients mucoviscidosiques selon l'âge [27:CFF 2012].

5.3. Mucoviscidose et inflammation pulmonaire :

Même en l'absence d'infection virale ou bactérienne, les patients présentent souvent des signes d'inflammation des voies respiratoires. En effet, des études réalisées sur des fœtus humains mucoviscidosiques (sans exposition microbiotique) ont montré une augmentation de la séquestration de leucocytes, au niveau des voies respiratoires [28:Verhaeghe 2007]. Et, des lavages broncho-alvéolaires effectués chez des enfants souffrant de mucoviscidose ont révélé des taux anormalement élevés de TNF et d'IL-8 [29:Muhlebach 2002].

Les mutations *CFTR* semblent aussi modifier la réponse innée des cellules épithéliales. En effet, certaines études *in vitro* indiquent que des cellules épithéliales portant la mutation ΔF508 montrent une signalisation NF-κB augmentée [30:Vij 2009]. De plus, des études menées *in vivo* montrent qu'au niveau des cellules épithéliales mucoviscidosiques, l'expression de TLR4 en surface est réduite alors que celle des TLR2 et 5 est augmentée. Ainsi, l'activation de ces cellules portant un *CFTR* muté, par des ligands bactériens, induit une diminution de l'activation des voies TRIF et NF-κB en aval de TLR4 [31:John 2010]. Mais une perte de fonction *CFTR* cause aussi une amplification de la réponse NF-κB dépendante en comparaison avec la réponse TRIF, provoquant ainsi une réduction de la résolution tissulaire [32:Parker 2012].

Les mutations CFTR sont également associées à une réponse immunitaire excessive, et en particulier un recrutement accru de neutrophiles. Ces derniers ont une fonction phagocytaire normale, mais présentent une résistance aux effets pro-apoptotiques du TNF, et sont en présence de quantités supérieures de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor*) importantes. Par conséquent, chez les patients mucoviscidosiques, le taux d'apoptose des neutrophiles est réduit, ces derniers perdurent longtemps dans les poumons et augmentent l'exacerbation de l'inflammation [33:Moriceau 2010].

- **La voie de l'IL-1β** :

L'IL-1β est une cytokine hautement pro-inflammatoire produite rapidement en réponse à de nombreux signaux de dangers (PAMPs et DAMPs). Elle active le recrutement de cellules immunes comme les neutrophiles, et est impliquée dans la réponse contre de

nombreux pathogènes tels que *Leishmania amazonensis* [34:Lima-Junior 2013] ou le virus de la dengue [35:Wu 2013]. Il a également été montré que *P. aeruginosa* induit la production d'IL-1β via l'activation de l'inflammasome NLRC4 (IPAF). En effet, *P. aeruginosa* possède différents motifs reconnus par les récepteurs TLRs, comme la flagelline qui active TLR5 [36:Ben Mohamed 2012]. De plus, les souches de *P. aeruginosa* retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose montrent une forte expression de variants de LPS dont la partie Lipide A est très acylée, activant donc fortement TLR4 [37:Ernst 2003]. L'activation de la caspase 1, de l'IL-1β, ainsi que la signalisation IL-1R permet un recrutement rapide de neutrophiles dans les poumons. Néanmoins, les souris déficientes pour la caspase-1, l'IL-1R ou plusieurs TLRs sont capables de contrôler l'infection à *P. aeruginosa*, à l'inverse des souris déficientes pour la molécule adaptatrice MyD88, chez qui l'ensemble des voies IL-1R et TLR (à l'exception de TLR3) sont absentes [38:Lavoie 2011].

Le rôle de l'IL-1β dans la réponse à l'infection par *P. aeruginosa* est controversé et reste à définir. En effet, des polymorphismes observés chez l'homme au sein du gène codant pour l'IL-1β semblent associés la pathologie pulmonaire [39:Levy 2009], et une étude a montré que des souris déficientes pour le récepteur IL-1R semblent protégées contre l'inflammation excessive induite lors de l'infection par *P. aeruginosa* [40:Schultz 2002]. Néanmoins, Sutterwala *et al.* ont ensuite montré que l'axe NLRC4/caspase 1 impliqué dans la sécrétion d'IL-1β pouvait être contourné par une souche virulente de *P. aeruginosa* [41:Sutterwala 2007]. Enfin, une autre équipe a rapporté que des souris déficientes pour l'IL-1R sont plus sensibles à l'infection par *P. aeruginosa* [42:Veliz Rodriguez 2012].

- **La voie de l'IL-17** :

La famille de l'interleukine 17 est constituée des interleukines 17 A, B, C, D, E et F. Le rôle des IL-17 B, C et D est encore peu connu. On leur suppose des propriétés pro-inflammatoires. L'IL-17E (ou IL-25) semble favoriser la réponse immune cellulaire de type T_H2 et inhiber la réponse de type T_H17. Enfin, les IL-17A et IL-17F ont des rôles pro-inflammatoires semblables, en particulier dans le recrutement de neutrophiles et dans la réponse immune face aux pathogènes extracellulaires [43:Gaffen 2009].

Néanmoins, les IL-17A et F ont aussi été associées à certaines maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaque, le psoriasis ou la spondylarthrite ankylosante [44:Baeten 2013]. Ainsi, il semble que l'IL-17A/F, par son rôle dans le recrutement de

neutrophiles, puisse contribuer au développement de la pathologie pulmonaire. De plus, les expectorations de patients mucoviscidosiques présentent des taux élevés d'IL-17 [45:Decraene 2010]. Ainsi, détailler le rôle de la voie de l'interleukine 17 dans la réponse à l'infection par *P. aeruginosa* au niveau de poumons mucoviscidosiques apparait important.

6. Les modèles d'études de la mucoviscidose.

Il existe plusieurs modèles qui permettent l'étude de la mucoviscidose, et en particulier des modèles *ex vivo*/*in vitro* et *in vivo*. Des études *ex vivo* sur des cellules de patients ont par exemple permis d'étudier les caractéristiques des neutrophiles activés provenant de poumons mucoviscidosiques [46:Hector 2013]. De plus, les modèles *in vitro* sont utilisés pour des essais de thérapie génique [47:Merk 2013], et ont permis d'étudier l'impact de la mutation *CFTR* sur les différentes conductances ioniques [48:Itani 2011]. Néanmoins, il est parfois difficile d'extrapoler ces résultats au niveau tissulaire ou à un organisme complexe.

Ainsi, différents modèles animaux sont également utilisés afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mucoviscidose, et afin de développer de nouvelles thérapies.

Classiquement, le modèle murin est le plus répandu et a permis de multiples avancées. En effet, il existe de nombreux modèles de souris transgéniques dont le gène *Cftr* est entièrement délété, ou certaines portent une mutation ponctuelle. Parmi ces modèles de mutation ponctuelle, des souris possèdent un gène *Cftr* muté de façon à reproduire la mutation ΔF508 au niveau protéique (mutation la plus fréquemment observée chez les patients mucoviscidosiques) [49:Wilke 2011].

Cependant, les modèles murins ne reproduisent pas l'ensemble de la pathogenèse pulmonaire et pancréatique. Ainsi, récemment, de nouveaux modèles ont été développés chez le porc [50:Rogers 2008 - 51:Rogers 2008] et chez le furet [52:Sun 2010]. En effet, les porcs et furets déficients en *CFTR* présentent une pathologie pulmonaire spontanée, avec une inflammation de voies respiratoires, une accumulation de mucus et un défaut de clairance bactérienne [53:Keiser 2011].

7. Les objectifs de l'étude.

La mucoviscidose est une atteinte des voies respiratoires causée par un dysfonctionnement du canal chlorique CFTR [4:Quinton 1983]. Elle est caractérisée par un mucus visqueux qui obstrue les voies respiratoires, une susceptibilité accrue aux infections chroniques (plus particulièrement à *P. aeruginosa*) et une inflammation excessive [3:Lubamba 2012].

Dans le carde du projet VLM n°10IM1016 intitulé « Rôle de l'IL-1 et de l'IL-17 dans la pathologie pulmonaire mucoviscidosique, et thérapie expérimentale chez un modèle animal », en collaboration avec l'équipe du professeur Bob J. Scholte de l'ERASMUS Medical Center de Rotterdam, nous avons entrepris l'étude des mécanismes de l'inflammation pouvant être impliqués dans le développement de la pathologie. Pour ce faire, trois objectifs majeurs ont été définis :

- Etablir une colonie de souris double-déficientes (portant la mutation ΔF508 et déficientes pour le récepteur IL-1R1), afin de caractériser les effets induits par l'inhibition de la voie de l'IL-1 sur le développement d'une pathologie mucoviscidosique.

- Etudier le rôle de la voie de l'IL-1β, et de celle de l'IL-17 dans la réponse à l'infection par *P. aeruginosa*, à l'aide de souris déficientes pour l'IL-1R1 ou encore avec l'utilisation d'anticorps neutralisants spécifiques.

- Analyser l'effet d'anticorps anti-IL-17 chez les souris portant la mutation ΔF508, sur l'inflammation aiguë pulmonaire induite par l'infection à *P. aeruginosa*.

– Matériel et Méthodes –

1. Les souris.

Les souris utilisées pour les expériences réalisées à Rotterdam à l'Erasmus Medical Center, dans le carde du projet VLM n°10IM1016, étaient de fond génétique C57BL/6(J), de type sauvage (WT^{B6}), ou homozygotes pour la mutation ΔF508 sur le gène *Cftr* (*Cftr*^{tm1eur} : d/d^{B6}) [54:van Doorninck 1995], ou encore double déficientes, portant la mutation *Cftr*^{tm1eur} et déficientes pour le récepteur à l'interleukine 1 de type 1 (d/d^{B6} ; IL-1R1$^{-/-}$) [55:Glaccum 1997].

Les premières souris utilisées pour les expériences réalisées à Orléans étaient de fond génétique C57BL/6(J), de type sauvage (WT^{B6}), portant une mutation ΔF508 sur le gène *Cftr* (*Cftr*^{tm1eur} : d/d^{B6}) [54:van Doorninck 1995] et déficientes pour le récepteur à l'interleukine 1 de type 1 (IL-1R1$^{-/-}$) [55:Glaccum 1997]. Puis afin de pallier aux difficultés d'élevage, nous avons utilisé les souris de fond génétique FVB, de type sauvage (FVB) et homozygotes pour la mutation ΔF508 sur le gène *Cftr* (*Cftr*^{tm1eur} : d/d^{FVB}) [54:van Doorninck 1995]. L'ensemble des animaux a été élevé au CDTA (TAAM – UPS 44, Orléans) et manipulé dans une zone EOPS (Exempte d'Organisme Pathogène Spécifique), dans le respect des recommandations fournies par le comité d'éthique du campus CNRS d'Orléans (protocole N° CLE CCO 2011-028).

2. Traitement d'anticorps anti-IL-1β sur 8 semaines.

Les souris reçoivent une injection par voie intra-péritonéale, une fois par semaine pendant 8 semaines, une dose d'anticorps anti-IL-1β (Novartis Pharma, Basel), à raison de 10 mg/kg. Les souris contrôles reçoivent 150µL de PBS. Les souris ont été euthanasiées 1 semaine après la dernière injection. (Expérience réalisée par l'équipe d'Erasmus MC)

3. Challenge répété de LPS sur 5 semaines.

Les souris reçoivent par voie intra-nasale 80µg d'endotoxine/LPS de *P. aeruginosa* [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO] dans 40µL de PBS, sous anesthésie à Isoflurane [CSP], une fois par semaine pendant 5 semaines. Les souris contrôles sont non traitées. Les souris ont été euthanasiées 24h après la dernière instillation. (Expérience réalisée par l'équipe d'Erasmus MC)

4. Infection par *Pseudomonas aeruginosa*.

Une préculture de *P. aeruginosa* (de souche 2310.55 et de sérotype IATS 011) est réalisée, à partir de colonies, dans une solution de BHI liquide 37g/l (*Brain Heart Infusion*, [Gibco]), incubée sur la nuit, à 37°C et sous agitation douce. Puis une culture de *P. aeruginosa* est réalisée à partir de la préculture. Cette dernière est diluée dans une solution de BHI liquide 37g/L, de façon à obtenir une absorbance à 600nm comprise entre 0,050 et 0,090, et incubée à 37°C et sous agitation douce. Lorsque la culture est en phase exponentielle et qu'elle atteint une absorbance de 0,40 correspondant à 2.10^8 CFU/mL (Unité Formant des Colonies/mL), un inoculum est préparé, dilué en NaCl 0,9% afin d'obtenir le titre désiré. La charge bactérienne de l'inoculum est par la suite vérifiée après étalement sur milieu BHI solide (BHI 37g/L, Agar 15g/L), et incubation à 37°C sur la nuit.

L'inoculation de *P. aeruginosa* aux souris est réalisée sous anesthésie Kétamine (Imalgène 1000®, Mérial) - Xylasine (Rompun® 2%, Bayer) administrée par voie intraveineuse. Une charge de 10^6 CFU dans 40µL sont administrées par instillation.

5. Traitement d'anticorps anti-IL-1β et anti-IL-17 sur 24H.

Les souris reçoivent par voie intra-péritonéale, une dose d'anticorps anti-IL-1β (Novartis Pharma, Basel) ou d'anti-IL-17 (Novartis Pharma, Basel), à raison de 200µg/souris, 15H puis 1H avant l'infection par *P. aeruginosa*.

6. Quantification des CFU présentes dans les poumons.

Les poumons sont placés dans des tubes Dispomix® [MedicTools, Zug, CH] avec 1,5mL de NaCl 0,9% et broyés 1 min, 2 000 rpm. Plusieurs dilutions sont réalisées à partir de l'homogénat et sont

par la suite étalées sur du milieu BHI solide (BHI 37g/L, Agar 15g/L), et incubées à 37°C sur la nuit. Les CFU obtenues peuvent ainsi être comptées.

7. Extraction des ARN totaux.

Dès leur prélèvement, les organes sont congelés dans de l'azote liquide, et conservés à -80°C.

Afin de dégrader les membranes et de préserver l'ARN, les poumons sont broyés dans du TRIzol (ou TriReagent®) froid [Sigma], dans un volume proportionnel au poids de l'organe (soit 1 mL de TRIzol pour 50-100 mg de tissu). Après une incubation de 5 min à température ambiante, nécessaire pour une bonne dissociation des complexes nucléoprotéiques, l'homogénat est centrifugé à 14000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et 0,2mL de chloroforme [Sigma] sont ajoutés avant une incubation de 10 min à température ambiante, afin d'extraire les ARN du TRIzol. Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C afin de séparer les ARN, l'ADN et les protéines en trois phases. La phase aqueuse transparente contenant l'ARN est récupérée et complétée par 0,5mL d'isopropanol [Sigma]. Après une incubation de 5 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Puis le culot d'ARN est soumis à 2 lavages à éthanol 75%, séché et repris dans 50µL d'eau exempte de RNase. Les échantillons sont incubés à 55°C pendant 15 min pour resolubiliser les ARN. La concentration en ARN et la contamination en protéines et en phénol sont mesurées au Nanodrop ND-100 [Thermo Scientific, Wilmington, USA]. L'absorbance à 280nm permet de déterminer la concentration en ARN. Les ratios des absorbances 260nm/280nm et 260nm/230nm sont mesurés pour détecter d'éventuelles contaminations, en protéines et en phénol respectivement. 2µg de chaque échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2% [Eurobio] pour vérifier leur intégrité. Les ARN ribosomiques étant présents en grande quantité, ils doivent pouvoir être observés sous forme de trois bandes bien séparées, un smear indiquant une dégradation des échantillons. L'ARN est stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

8. RT-qPCR (RétroTranscription et Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative).

Une rétrotranscription (RT) est réalisée sur l'ARN. Elle commence par une étape de dénaturation des structures secondaires éventuelles. Pour cela, 1 µg d'ARN est mélangé avec de l'eau exempte de RNase, des hexamères aléatoires et oligo$(dT)_{15}$ (0,5µg/réaction) pour un volume final de 7 µL, puis l'échantillon est chauffé pendant 5 minutes à 70°C [Thermocycleur Eppendorf TC-512, Techne, Burlington, USA]. Les ARNm sont ensuite rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit GoScript™ [Promega, Madison, WI, USA], contenant un tampon de réaction, du $MgCl_2$ 3mM, des dNTP 0,5mM, un

inhibiteur de Ribonucléase : RNasin® recombinant 1,3U/µL, et une transcriptase inverse GoScript™, dans un volume final de 22µL. Deux contrôles sont nécessaires : le premier sans ARN pour vérifier la spécificité de la rétrotranscription ; le second sans enzyme RT pour vérifier l'absence d'ADN génomique. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur, incubés 5 min à 25°C permettant la fixation des amorces, puis 1 h à 42°C afin que la transcription inverse s'effectue. Enfin, 15 minutes à 70°C inactivent l'enzyme. Les ADNc sont conservés à – 20 °C jusqu'à l'analyse.

Les ADNc sont ensuite amplifiés par qPCR à partir d'amorces spécifiques des gènes ciblés [Qiagen] et au kit GoTaq® qPCR Master Mix [Promega, Madison, WI, USA]. Les ADNc sont mis en présence des amorces spécifiques et d'un mélange du kit contenant dans un tampon la Taq polymérase, des dNTP, deux fluorophores : le Syber Green (qui fluoresce lorsqu'il est fixé à l'ADN double brin) et CXR (dont la fluorescence constante sert de référence). La réaction se déroule dans un thermocycleur-lecteur Mx3005Pro [Stratagene] selon le programme suivant : une première étape de dénaturation de 10 min à 95°C, suivie par 40 cycles composés chacun d'une dénaturation de 30 sec à 95°C, d'une phase d'hybridation des amorces de 30 sec à 56°C, et enfin d'une étape d'élongation de l'ADNc d'1 min à 72°C lors de laquelle se réalise la lecture de fluorescence. L'analyse des données se fait avec le logiciel REST-MCS Version 2 [http://www.rest.de.com/], qui permet de normaliser les niveaux d'expression à l'aide de deux gènes de ménages (*Hprt1* et *Gapdh*) et de comparer l'expression avec une condition de référence.

9. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Les poumons sont placés dans des tubes Dispomix® [MedicTools, Zug, CH] avec 1,5mL de NaCl 0,9% et broyés. Après centrifugation à 4000g, 15 min, à 4°C, le surnageant est utilisé pour le dosage des protéines. Les dosages peuvent aussi être effectués sur des échantillons de liquide de lavage broncho-alvéolaire. Tous les tests ELISA sont réalisés à partir de Kits [DuoSet ELISA, R&D System]. Des lavages au PBS 1X-Tween 0,5% et au PBS 1X sont effectués entre chaque étape.

Le premier jour, l'anticorps primaire anti-cytokine est adsorbé pendant une nuit à température ambiante sur une plaque de 96 puits [Nunc]. Le second jour, les sites de fixation non spécifiques sont saturés par du PBS-BSA1% [Eurobio]. Après 2 heures d'incubation, les échantillons à tester et la gamme étalon sont déposés et incubés 2 heures à température ambiante. L'anticorps de détection biotinylé est ensuite déposé et incubé pendant 2 heures à température ambiante. Puis, le conjugué streptavidine-peroxydase [R&D Systems, Minneapolis, USA] dilué au 1:200^{e} est déposé, laissé à incuber 20 min à température ambiante, et la révélation est réalisée par dépôt de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acide) (ABTS) complété par de l'H_2O_2 [Sigma Aldrich]. La cytokine ciblée est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 405nm [ELx800, BioTek].

10. Dosage de la Myéloperoxydase (MPO).

La Myéloperoxydase (ou MPO) est une enzyme contenue dans les polynucléaires neutrophiles présents dans le parenchyme pulmonaire. Le dosage de l'activité de cette enzyme permet donc de quantifier les neutrophiles recrutés dans le tissu. Pour cela, les poumons sont placés dans des tubes Dispomix® [MedicTools, Zug, CH] avec 1,5mL de NaCl 0,9% et broyés. Après centrifugation à 4000 g, 15 min, à 4°C, le culot est broyé une seconde fois dans 1mL de PBS - HTAB 0,5% (Hexadecyl Triméthyl Ammonium Bromide [Sigma]) - EDTA 1 mM (Ethylène Diamine Tétra-acétique [Sigma]). L'homogénat est centrifugé à 4000 g, 15 min, à 4°C. Le dosage colorimétrique est réalisé par l'ajout successif des réactifs suivants : 1 mL de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution [Gibco Life Technology BRL]), 200 µL de tampon PBS - HTAB 0,5% - EDTA 1 mM, 20µL de surnageant, 100µL d'une solution d'o-Dianisidine (1,25mg/mL [Sigma]) et 100µL de H_2O_2 0,048% [Sigma]. Les échantillons sont incubés 3 min à température ambiante, puis la réaction est arrêtée par ajout de 100µL d'azide 1% [Sigma]. Enfin, l'activité MPO est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 460nm [ELx800, BioTek].

11. Histologie.

Les poumons sont placés dans du formol 4% [Formaldéhyde, Thermo Scientific] pendant 48h, afin de fixer les tissus. Ils subissent ensuite un bain de formol 10%, un bain de rinçage à l'éthanol 60%, deux bains d'éthanol 100%, deux bains d'isopropanol, et enfin un bain de paraffine liquide [automate Logos, Milestone, Sorisole, Italy]. Les organes sont ensuite inclus en bloc de paraffine [Leica EG 1160], puis coupés en section de 3 µm d'épaisseur et fixés sur des lames de verres. Les coupes sont dans un premier temps déparaffinées dans du xylène, puis réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (100, 95 et 75%). Trois colorations différentes peuvent ensuite être utilisées :

- La coloration HE : Hématoxyline de Gill 5 min [Merck] – Erythrosine 2‰ 5 min [Reactif Ral, Bordeaux].
- La coloration PAS (qui permet de mettre en évidence la production de muco-polysaccharides) : Après un bain de 5 min d'acide périodique à 1%, les coupes sont plongées 20 min dans le Réactif de Schiff [Merck] puis 5 min en Hématoxyline de Gill [Merck]
- La coloration CAB (qui permet de mettre en évidence la présence de fibres de collagène) : Après un bain de 10 min en Hématoxyline de Weigert (100mL d'Hématoxyline 1% en éthanol 100% et 100mL de chlorure de fer 1,2% [Sigma]), les coupes sont plongées 3 min dans de l'acide Phosphomolybdique [Sigma] puis 8 min dans la solution de CAB (Aniline Bleue 7,5mg/mL, HCl 0,15M, Chromotrope 2R 30mg/mL en eau distillée, [Sigma]).

Puis les coupes sont de nouveau déshydratées par différents bains d'éthanol de concentration croissante (75, 95 et 100%) et de xylène. Enfin, les lames sont montées en Eukitt [O. Kindler GmBH, Freiburg, Germany].

12. Lavage broncho-alvéolaire (BAL).

Après euthanasie par inhalation de CO_2, une thoracotomie et une trachéotomie des souris sont effectuées afin de réaliser un lavage broncho-alvéolaire. Quatre lavages successifs de 0,5mL de NaCl 0,9% sont effectués. Les différents liquides de lavage broncho-alvéolaire (BALF) sont centrifugés à 2000 g, 10 min à 4°C. Le surnageant du premier BALF est conservé à -20°C afin de doser les cytokines par ELISA. Puis, les culots cellulaires des différents BALF d'un animal sont regroupés. Une numération des cellules totales est réalisée dans du réactif de Türk [Merck, France] afin de lyser les hématies. Puis 10^5 cellules sont centrifugées (1000 tour/min, 10 min) dans un cytospin (Thermo Shandon centrifuge). Les spots de cellules obtenus sont colorés au May-Gründwald Giemsa (Diff Quick, Medion Diagnostics AG) puis montées en Eukitt [O. Kindler GmBH]. Les différentes populations des cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, éosinophiles et neutrophiles) sont différenciées et numérées.

13. Dosage des protéines.

La quantité de protéines totales peut-être dosée dans le BALF (ou bien dans le surnageant d'homogénat de poumon), afin d'apprécier le niveau d'inflammation et d'endommagement tissulaire. Le dosage par la méthode de Bradford est effectué avec le kit BIORAD DC *Protein assay* (Biorad), selon les instructions du fournisseur. Ensuite, les protéines totales sont quantifiées par mesure de l'absorbance à 610nm [ELx800, BioTek].

14. Analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test non paramétrique de Mann-Whitney, par le logiciel GraphPad Prism [GraphPad Software, San Diego, USA]. Ce test est spécifiquement indiqué pour des groupes contenant un petit nombre d'échantillons, et dont la moyenne ne suit pas une distribution gaussienne. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme significative et représentée par * ; ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$. Une valeur $p > 0,05$ est considérée comme non significative et représentée par ns.

– Résultats –

L'objectif premier de cette étude a été d'approfondir les connaissances sur le rôle des cytokines IL-1β et IL-17 dans la pathologie mucoviscidosique, grâce au modèle murin. Dans un premier temps, des études ont été réalisées au centre Erasmus MC de Rotterdam, et les échantillons ont été analysés au laboratoire INEM d'Orléans. Le rôle de l'IL-1β à l'état basal y a d'abord été testé par l'administration d'un anticorps anti-IL-1β à des souris C57BL/6 de type sauvage (WT^{B6}) et à des souris homozygotes pour la mutation ΔF508 du gène *Cftr* (d/d^{B6}). Puis, la réponse à une stimulation répétée au LPS a été suivie chez des souris d/d^{B6} et comparée avec souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-$1R1^{-/-}$ (portant la mutation ΔF508 et déficientes pour le récepteur de l'IL-1 de type 1). Puis, des souris double-hétérozygotes $d/+^{B6}$ et IL-$1R1^{-/+}$ ont été transférées à Orléans, dans le but d'établir et d'étendre l'élevage des souris simple- et double-déficientes. Ensuite, la réponse à l'inflammation chez les mutants ΔF508 après infection par *P. aeruginosa* a été analysée. Enfin Le rôle des cytokines IL-1β et IL-17 dans la réponse à l'infection aiguë par *P. aeruginosa* a été étudié, chez les mutants ΔF508, grâce à des anticorps neutralisants spécifiques.

1. L'IL-1β ne participe pas à l'homéostasie du poumon à l'état basal.

Afin d'étudier l'importance de l'IL-1β dans les poumons à l'état basal, nous avons observé l'effet d'un traitement prolongé, réalisé sur 8 semaines, avec un anticorps anti-IL-1β chez des souris de type sauvage (WT^{B6}), ou portant la mutation ΔF508 (d/d^{B6}). L'analyse des poumons de ces souris a été réalisée une semaine après le dernier traitement anti-IL-1β.

L'analyse histologique a montré que le recrutement de cellules dans les poumons, la production de mucus et le dépôt de collagène ne varient pas entre les souris d/d^{B6} et WT^{B6}, ayant reçu ou non l'anticorps anti-IL-1β (**Figure 6**).

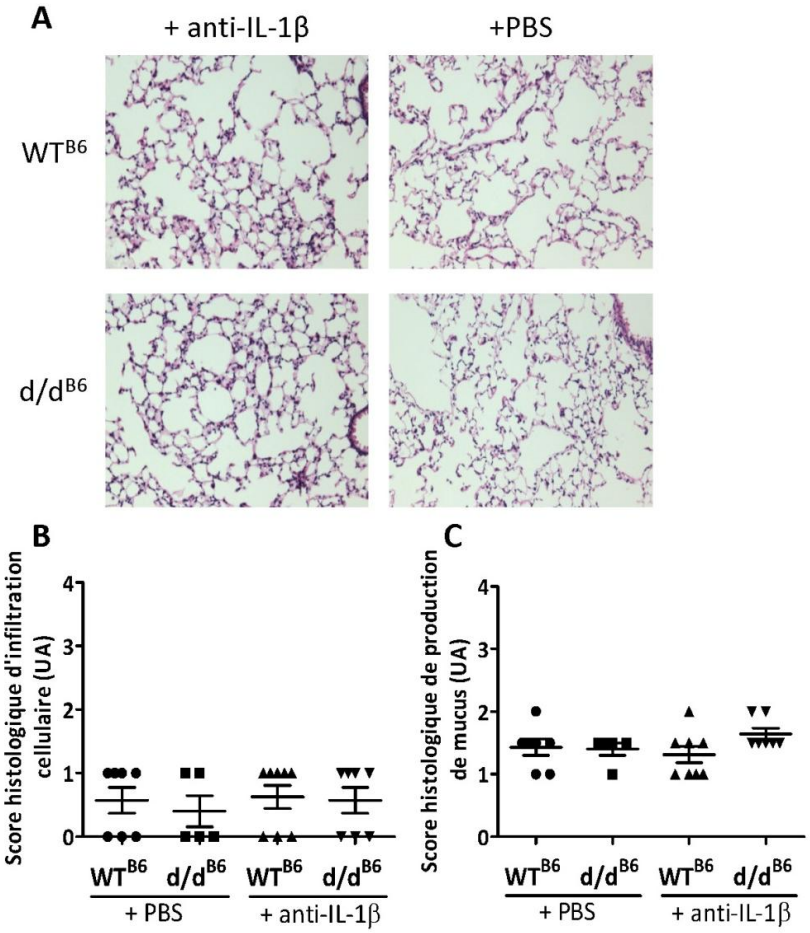


Figure 6 : L'administration d'anticorps anti-IL-1β n'a pas d'effet sur l'ultra-structure des poumons.

Des souris de type sauvage WT^{B6} et homozygotes pour la mutation ΔF508 (d/d^{B6}) ont reçu par voie intra-péritonéale, 1 fois par semaine pendant 8 semaines, un anticorps anti-IL-1β (10 mg/kg), ou du PBS. Les souris ont été euthanasiées 1 semaine après la dernière injection et la structure des poumons a été observée sur des coupes colorées en H&E, observée au grossissement 20X (A). L'infiltration cellulaire (B) a été quantifiée sur ces mêmes coupes H&E et la production de mucus (C) a été évaluée sur des coupes de poumons colorées au CAB ; les 2 indicateurs sont exprimés par un score arbitraire compris entre 0 et 5. (n = 6-8)

L'expression dans les poumons des ARNm *Il1b*, *Il6* et de *Ccl2* a ensuite été analysée par qPCR (**Figure 7**). Les résultats n'indiquent aucune différence significative d'expression entre les groupes, qu'il s'agisse de l'effet de la mutation ΔF508, ou bien de l'effet de l'administration de l'anticorps anti-IL-1β.

Par conséquent, il semble que, dans les conditions basales, sans stimulation, il n'y a pas de différence entre les souris d/d^{B6} et les contrôles WT^{B6}. Il apparait ici que, dans ce modèle de souris ΔF508 sur fond C57BL/6, il n'y a pas d'inflammation spontanée, à l'inverse de ce qui est observé chez l'homme.

De plus, l'administration d'un anticorps anti-IL-1β n'a pas d'effet sur l'ultra-structure des poumons, ni sur l'expression basale d'IL-1β, d'IL-6 et de la chimiokine CCL2, suggérant que l'IL-1β ne joue qu'un rôle mineur dans l'homéostasie à l'état basal.

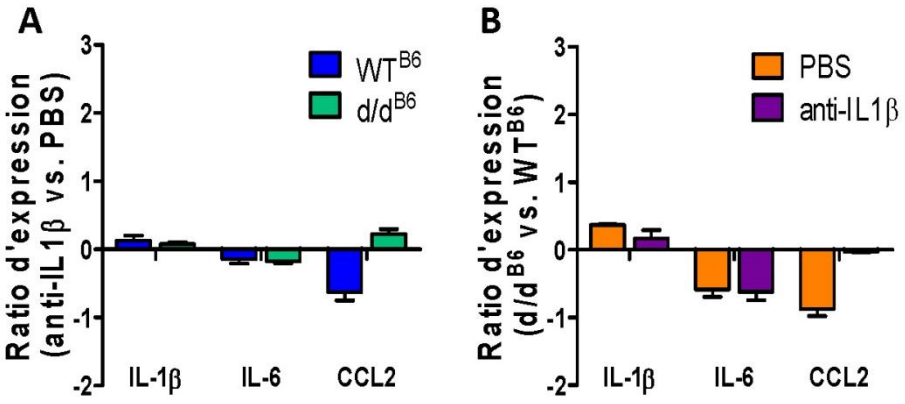


Figure 7 : L'administration d'anticorps anti-IL-1β n'a pas d'effet sur la production l'IL-1β, d'IL-6 et de CCL2 dans les poumons.

Des souris de type sauvage WT^{B6} et homozygotes pour la mutation ΔF508 (d/d^{B6}) ont reçu par voie intra-péritonéale, 1 fois par semaine pendant 8 semaines, un anticorps anti-IL-1β (10 mg/kg), ou du PBS. Les souris ont été euthanasiées 1 semaine après la dernière injection. La production d'ARNm d'IL-1β, d'IL-6 et de CCL2 a été analysée, et normalisée par l'expression de gènes de ménage (*Hprt1* et *Gapdh*). L'effet de l'administration de l'anti-IL-1β par rapport au contrôle PBS est présenté (A), et l'effet de la mutation ΔF508 par rapport au contrôle WT^{B6} est présenté en (B). (n = 6-7)

2. L'IL-1β participe à l'inflammation pathologique chez les mutants ΔF508, en réponse au LPS.

L'importance de la voie de l'IL-1β dans la réponse à l'endommagement des poumons chez les souris ΔF508 a ensuite été étudiée. Pour cela, et dans le but d'induire une situation d'endommagement chronique, une stimulation au LPS répétée 5 fois a été réalisée sur des souris d/d^{B6} et des souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$, et comparée à des contrôles WT^{B6} non traités. L'analyse a été réalisée au jour 29, soit 24H après la dernière instillation de LPS. Trois sur 6 souris d/d^{B6} sont mortes avant la fin de l'expérience, lors des instillations, alors que 100% des souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ ont survécu jusqu'au jour 29 (**Figure 8.A**). Ces résultats suggèrent que chez les mutants ΔF508, la voie de l'IL-1β est délétère dans la réponse à une stimulation répétée au LPS.

De plus, les souris d/d^{B6} présentent une perte de poids plus importante au jour 7, en comparaison avec les souris d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ (**Figure 8.B**). Cependant, les souris qui survivent retrouvent leur poids initial à 4 semaines, suggérant une induction de tolérance aux stimulations répétées de LPS. L'augmentation de cellules totales (principalement macrophages et lymphocytes) dans le BALF 24H après le dernier challenge confirme l'inflammation induite par le LPS. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les souris d/d^{B6} et les souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ (**Figure 8.C**).

Etonnamment, la chimiokine CCL2 et l'IL-6 ne sont pas augmentées dans l'homogénat de poumon après les instillations répétées de LPS (**Figure 8.D et E**). Néanmoins, ces résultats semblent corréler avec l'hypothèse de tolérance. Il semble cependant que la production d'IL-1β soit légèrement augmentée après traitement au LPS chez les deux groupes (**Figure 8.F**).

Enfin, l'analyse semi-quantitative des résultats histologiques indique une nette augmentation de l'infiltration cellulaire, de la production de mucus et du dépôt de collagène chez les souris d/d^{B6} après 5 stimulations de LPS, par rapport aux souris contrôles non traitées. De plus, il semble que ces trois paramètres soient plus faibles chez les souris d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ mais ces différences ne sont pas significatives, probablement à cause du faible effectif de souris d/d^{B6} qui survivent jusqu'au jour 29 (**Figure 8.A et G-J**).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IL-1β participe à la pathologie inflammatoire chez les mutants ΔF508, en réponse au LPS.

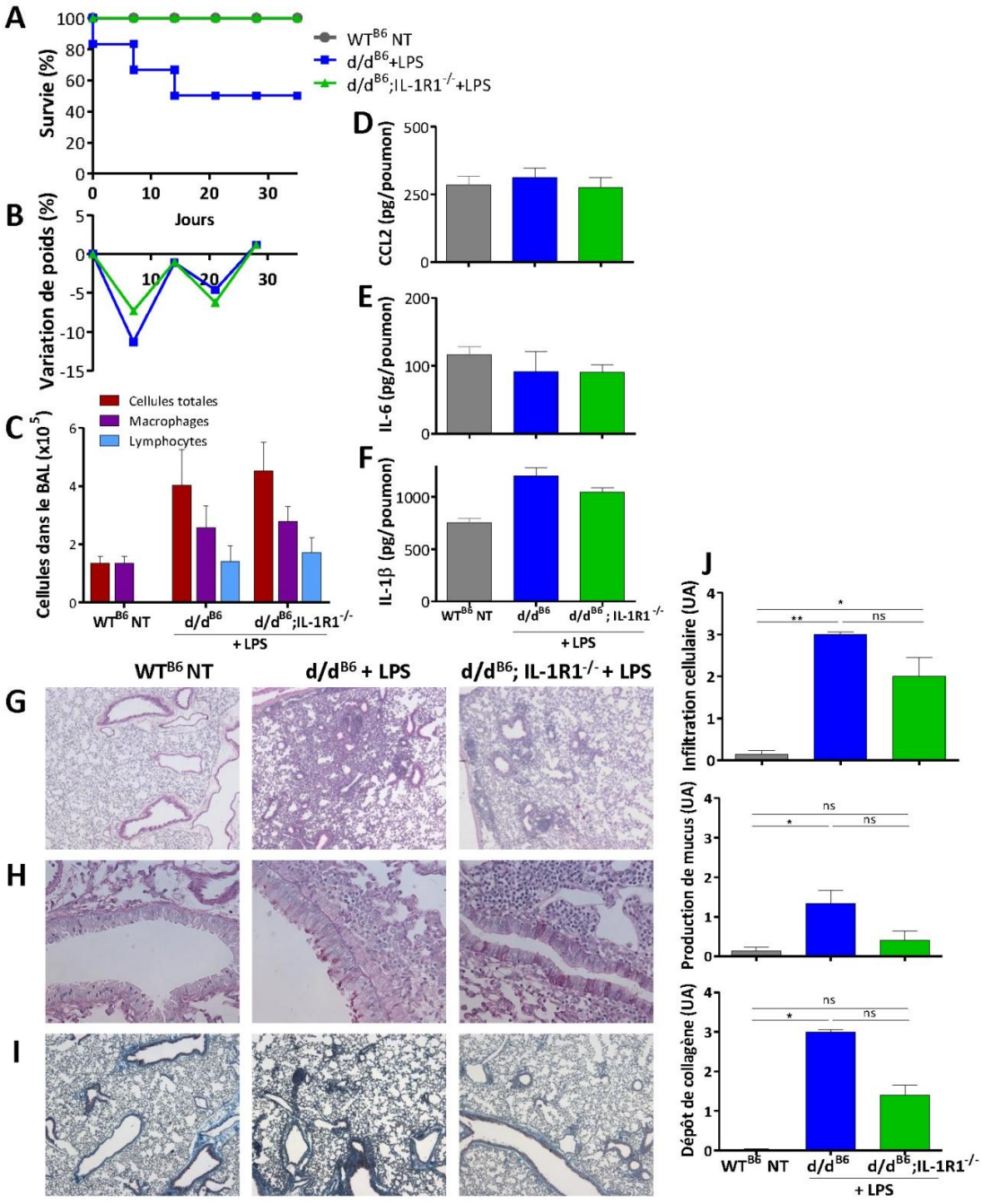


Figure 8 : L'IL-1β participe à l'inflammation pathologique chez les mutants ΔF508, en réponse au LPS

Des souris d/d^{B6} et double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ ont reçu 80µg de LPS par voie intra-nasale, 1 fois par semaine pendant 5 semaines. Des souris de type sauvage WT^{B6} non traitées (NT) ont été utilisées comme contrôles. La survie est représentée en (A) et la variation de poids des souris 24H après injection de LPS présentée en (B). Les souris ont été euthanasiées 24H après la dernière instillation. Les cellules recrutées dans les poumons ont été prélevées par lavage broncho-alvéolaire (BAL), comptées et différenciées (C). Les quantités de CCL2 (D), d'IL-6 (E) et d'IL-1β (F) ont été mesurées dans l'homogénat de poumon. L'infiltration cellulaire (coloration H&E) a été observée (G), tout comme la production de mucus (coloration PAS) (H) et le dépôt de collagène (coloration CAB) (I). Les scores histopathologiques réalisés à partir de ces observations sont présentés en (J). n=6-7 au début de l'expérience, puis n=3 pour les d/d^{B6}+LPS 24H après la dernière instillation. Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM ; * pour p<0,05 et ns pour non significatif.

3. Difficultés d'élevage des souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$.

La plus grande difficulté rencontrée lors de la poursuite du projet a concerné l'élevage des souris simple- (d/d^{B6}) et double-déficientes (d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$) de fond génétique C57BL/6. Douze souris ont été reçues du centre Erasmus MC de Rotterdam en Mai 2011, et après la période de quarantaine, elles ont été placées en accouplement (couple/trio A à E) (**Figure 9**). A l'image des symptômes observés chez l'homme, les souris homozygotes pour la mutation ΔF508 sont stériles. Les couples ou trios doivent alors être hétérozygotes pour la mutation ΔF508, et chaque petit doit être génotypé. En théorie, seulement 25% des petits sont homozygotes. En ce qui concerne l'élevage réalisé sur 24 mois à Orléans, seuls 13,3% (soit 40 sur 299) des petits portaient un génotype d/d (**Figure 9**).

De plus, il a été très difficile d'obtenir des souris d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$, étant donnée la petite taille des portées (6 petits par portée en moyenne), et la mortalité importante (25% sur l'ensemble des portées). En particulier, obtenir des souris homozygotes en nombre suffisant, d'âge et de sexe identique a été compliqué et long pour les souris d/d^{B6}. Malgré l'augmentation du nombre de couples/trios, il a été impossible d'obtenir un nombre suffisant de souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$ (6/299). C'est pourquoi, d'une part, des anticorps neutralisants ont par la suite été utilisés sur des souris homozygotes pour la mutation ΔF508, et d'autre part, des expériences ont été réalisées sur des souris ΔF508 de fond génétique FVB (hébergées au CDTA d'Orléans).

Après 24 mois d'élevage, n'ayant pas réussi à obtenir une production satisfaisante de souris simple- et double- déficientes, nous avons décidé d'arrêter l'hébergement des souris en Juin 2013. Les dernières souris obtenues ont été transférées à l'Université Catholique de Louvain à Brussel, au Dr Teresinha LEAL.

| Génotype des animaux IL-1R1 ; CFTR déficients en élevage | | |

4. Modèle d'infection aiguë à *P. aeruginosa*.

Le fait que l'IL-1β participe à l'inflammation pathologique chez les mutants ΔF508 en réponse aux endotoxines a été encourageant. Cependant, ce modèle de stimulation répétée au LPS a été considéré comme n'étant pas suffisamment adapté, de par la forte mortalité observée chez les souris d/d^{B6} et de par l'éventuelle tolérance induite par les 5 challenges au LPS. Par conséquent, les expériences suivantes ont eu pour but de se rapprocher des phénomènes infectieux observés chez les patients mucoviscidosiques. Nous avons utilisé l'infection par *P. aeruginosa*, décrit précédemment au laboratoire comme modèle d'étude [56:Secher 2011].

Dans un premier temps, une faible dose de *P. aeruginosa* (PA011) a été utilisée : 2x10^5 CFU administrées par voie intra-nasale à des souris WT^{B6}, d/d^{B6} ou simple déficientes pour le récepteur de l'IL-1β (IL-1R1$^{-/-}$), avec des souris WT^{B6} instillées avec du NaCl 0,9% servant de contrôle. Après l'infection par *P. aeruginosa*, l'ensemble des souris développe une pathologie, comme l'indique la perte de poids 20H post-infection (**Figure 10.A**). L'inflammation des poumons, testée par la mesure de l'activité de la Myéloperoxydase, des neutrophiles et le nombre de cellules recrutées dénombrées dans le BALF, est augmentée de façon significative dans tous les groupes, comparé aux souris non infectées (**Figure 10.B et C**). La charge bactérienne retrouvée dans les poumons à 20H est faible (<4% de la quantité inoculée) et ne diffère pas entre les groupes (**Figure 10.D**).

La quantité de bactéries détectée dans le BALF des souris IL-1R1$^{-/-}$ et des d/d^{B6} est plus élevée que celle des souris WT^{B6}, indiquant une différence dans la clairance bactérienne (**Figure 10.D**). De plus, la quantité de protéines totales dans le BALF est augmentée chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les souris d/d^{B6} en comparaison des souris WT^{B6} après infection par *P. aeruginosa* (**Figure 10.E**). Ces résultats semblent indiquer un endommagement de l'épithélium pulmonaire et une libération de protéines augmentée chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les souris d/d^{B6}. La chimiokine KC (CXCL1) attractant les neutrophiles, est augmentée chez toutes les souris après infection par *P. aeruginosa*, par rapport aux souris contrôles non infectées (**Figure 10.F**). Chez les souris IL-1R1$^{-/-}$, la production d'IL-1β et de TNF-α est sensiblement augmentée par rapport aux souris WT^{B6}, indiquant un défaut de contrôle de

l'infection à *P. aeruginosa*. Chez les souris d/d^{B6}, la production d'IL-1β dans les poumons est également plus élevée par rapport aux souris WT^{B6}. De plus, l'infection par *P. aeruginosa* induit chez les souris d/d^{B6} une libération de TNF-α supérieure à celle observée chez les souris IL-1R1$^{-/-}$, et à plus forte raison à celle des souris WT^{B6} (**Figure 10.G et H**). Chez les souris déficientes en IL-1R1, le nombre de cellules totales, et plus particulièrement les neutrophiles et les macrophages, est augmenté par rapport aux souris WT^{B6} après infection par *P. aeruginosa.* La même tendance est retrouvée, bien que non significative, chez les souris d/d^{B6} (**Figure 10.C**). Ces résultats semblent associés avec le nombre plus élevé de CFU retrouvé dans le BALF, et avec l'augmentation des protéines dans le BALF, indicatrices de l'endommagement tissulaire, des souris IL-1R1$^{-/-}$ et des d/d^{B6} (**Figure 10.D et E**). L'analyse histologique montre une infiltration cellulaire plus forte chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les d/d^{B6} que chez les souris WT^{B6} après infection par *P. aeruginosa* (**Figure 10.I et J**).

Ces résultats semblent indiquer que les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les souris d/d^{B6} développent une inflammation accrue 20H après infection par une faible dose de *P. aeruginosa*, en comparaison à des souris WT^{B6}, avec une charge bactérienne augmentée dans le BALF et un endommagement de l'épithélium supérieur. Afin de valider ces différences observées, en particulier entre les compartiments tissulaire et alvéolaire, et de comprendre l'implication des voies IL-1R1 et du CFTR, une infection avec 10^6CFU de *P. aeruginosa* a été réalisée et analysée à 6 heures post-infection.

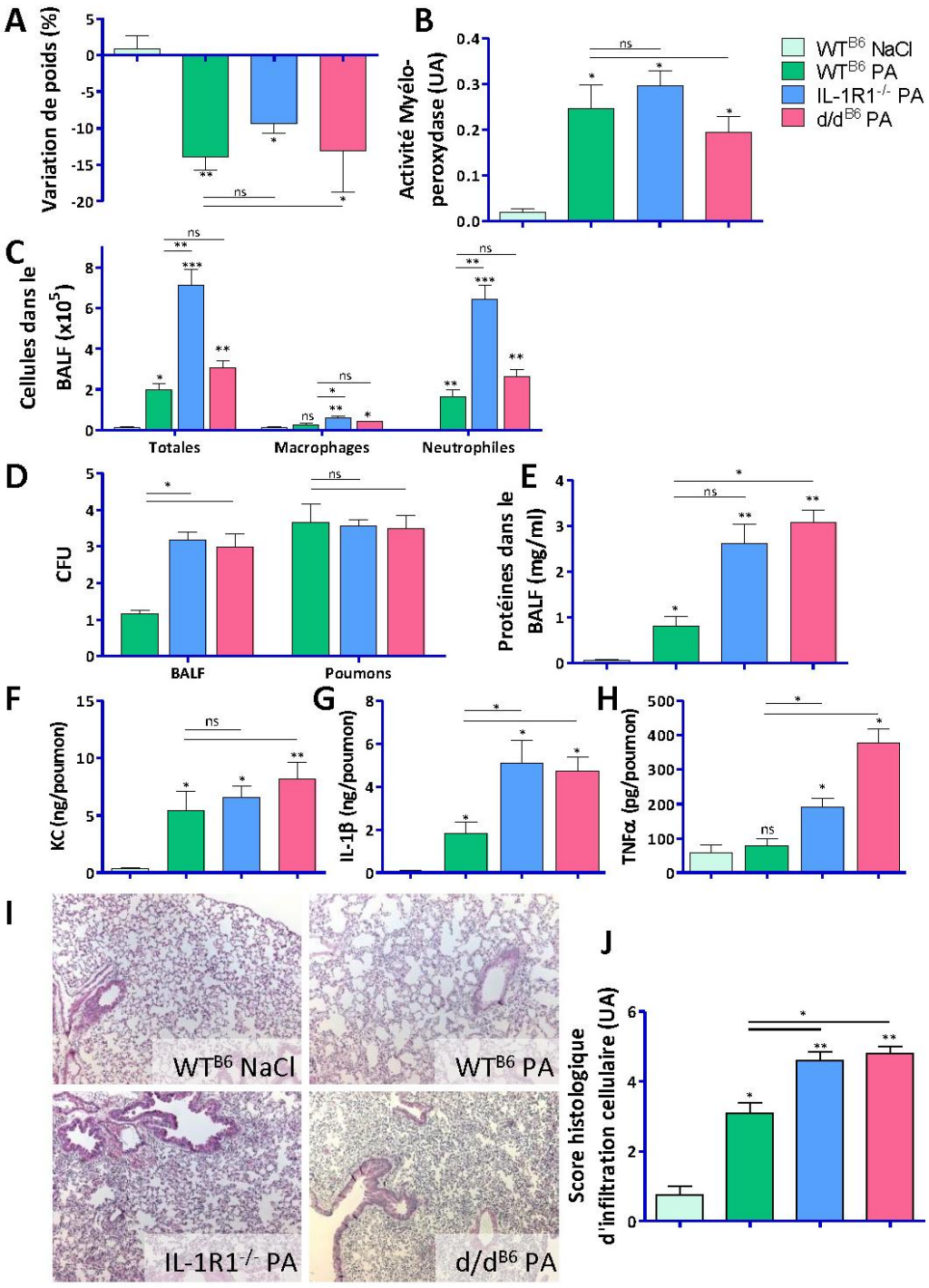


Figure 10 : Une faible dose de *P. aeruginosa* induit une inflammation accrue à 20H chez les souris IL-1R1$^{-/-}$ et les d/d^{B6}.

Des souris WT^{B6}, d/d^{B6} ou IL-1R1$^{-/-}$ ont reçu par voie intra-nasale 2x10^5 CFU de PA011, et des souris WT^{B6} ayant reçu du NaCl 0,9% ont été utilisées comme contrôles. La variation de poids 20H après infection est représentée en (A). L'activité de la Myéloperoxydase contenue dans les neutrophiles a été quantifiée dans les poumons (B), les cellules présentes dans le BALF, comptées et différenciées (C). Les bactéries ont été dénombrées dans le BALF et dans l'homogénat de poumon (D). La quantité totale de protéines a été évaluée dans le BALF (E) et les quantités de KC (F), d'IL-1β (G) et de TNF-α (H) ont été mesurées dans l'homogénat de poumon. L'infiltration cellulaire (coloration H&E) a été observée (I). Les scores histopathologiques (unités arbitraires) réalisés à partir de ces observations sont présentés en (J). (n=5-6) Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM ; * pour p<0,05 ; ** pour p<0,01 et *** pour p<0,001. ns pour non significatif.

Dans un second temps, une dose plus forte de *P. aeruginosa* (PA011) a été utilisée : 10^6 CFU administrés par voie intra-nasale à des souris WT^{B6}, d/d^{B6} ou IL-$1R1^{-/-}$, et des souris WT^{B6} instillées avec du NaCl 0,9% servant de contrôles. Six heures après l'infection par *P. aeruginosa*, la perte de poids des souris n'est pas encore corrélée avec le développement d'une pathologie, mais semble plutôt inhérente à l'anesthésie, comme l'indique la perte de poids identique chez toutes les souris, y compris les souris WT^{B6} ayant reçu du NaCl 0,9% (**Figure 11.A**). L'inflammation des poumons, testée par la mesure de l'activité de la Myéloperoxydase et le nombre de cellules recrutées dénombrées dans le BALF (en particulier les neutrophiles et les macrophages) est augmentée de façon significative dans tous les groupes, comparés aux souris non infectées (**Figure 11.B et C**). La charge bactérienne retrouvée dans les poumons à 6H post-infection est semblable à la dose administrée et ne semble pas différer entre les groupes, à l'exception d'une charge bactérienne réduite dans le BALF des souris IL-$1R1^{-/-}$ (**Figure 11.D**). Mais la différence entre les 2 compartiments ne semblent pas être retrouvée. De la même façon, la quantité de protéines totales dans le BALF est augmentée chez toutes les souris après infection par *P. aeruginosa* (**Figure 11.E**). La chimiokine KC (CXCL1) attractive des neutrophiles, est augmentées chez toutes les souris après infection par *P. aeruginosa*, par rapport aux souris contrôles non infectées. Cependant, l'augmentation d'IL-1β et de TNF-α observée dans les poumons est plus faible chez les souris d/d^{B6} par rapport aux souris WT^{B6} et aux IL-$1R1^{-/-}$ (**Figure 11.F-H**). L'analyse des résultats histologiques indique une infiltration cellulaire similaire chez toutes les souris 6H après l'infection par une dose de 10^6 CFU de *P. aeruginosa* (**Figure 11.I et J**).

Ces résultats suggèrent que 6H après infection à plus forte dose, les souris IL-$1R1^{-/-}$ et les souris d/d^{B6} développent une inflammation similaire à celle observée chez les souris WT^{B6}, avec une charge bactérienne identique dans le BALF et dans les poumons, ainsi qu'une infiltration neutrophilique semblable. Mais l'inflammation primaire identique, à 6H après infection par une forte charge bactérienne, n'exclue pas la possibilité de différences potentielles dans la réponse immune, susceptibles de se mettre en place ultérieurement, qu'il s'agisse d'une boucle indirecte impliquant la voie IL-1β/IL-1R1, ou bien d'un microenvironnement plus favorable à l'infection chez les mutants *Cftr*.

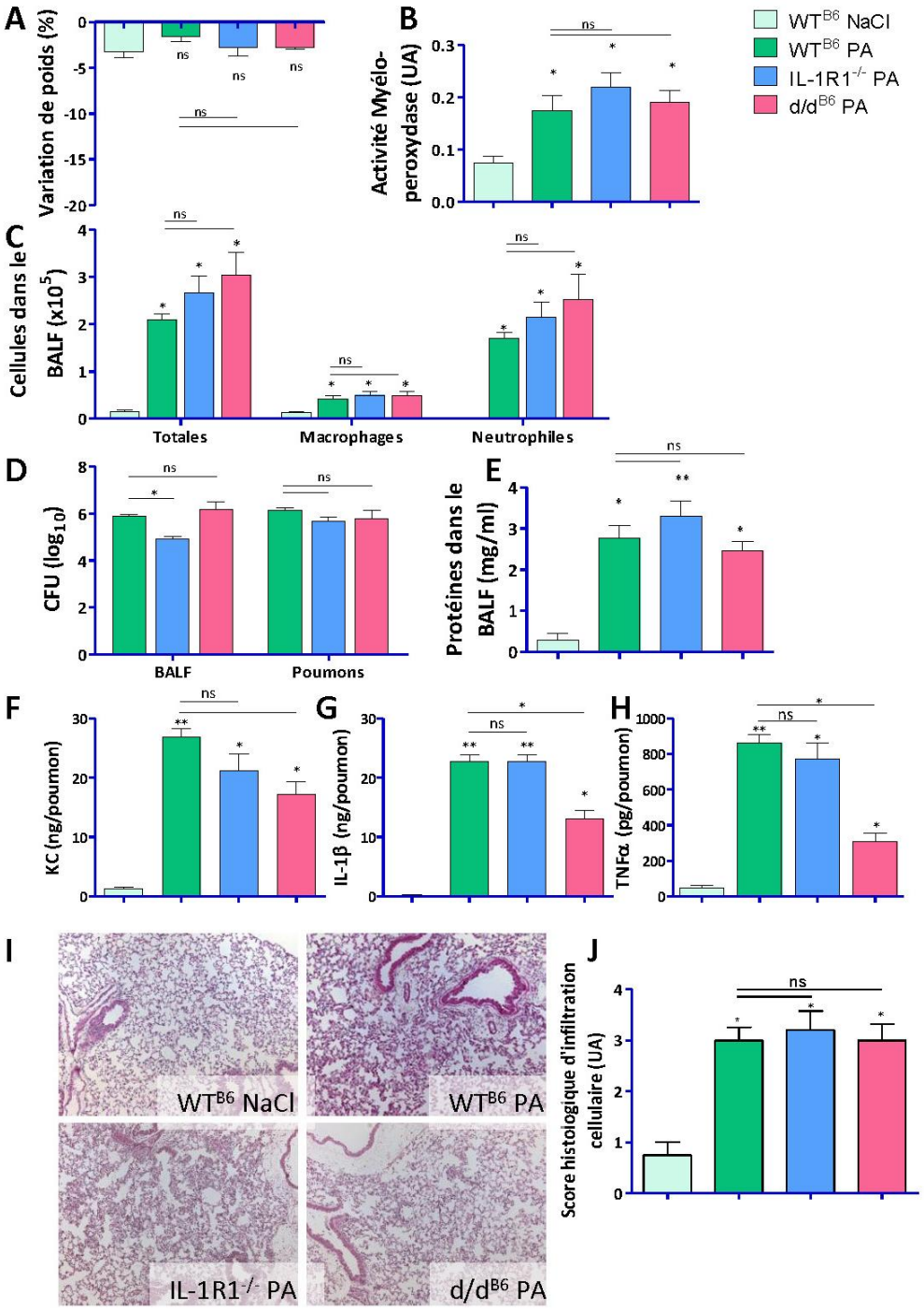


Figure 11 : L'inflammation induite par *P. aeruginosa* est identique à 6H chez les souris WT^{B6}, $IL\text{-}1R1^{-/-}$ et d/d^{B6}.

Des souris WT^{B6}, d/d^{B6} et $IL\text{-}1R1^{-/-}$ ont reçu par voie intra-nasale 10^6 CFU de PA011, et des souris WT^{B6} ayant reçu du NaCl 0,9% ont été utilisées comme contrôle. La variation de poids 6H après infection est représentée en (A). L'activité de la Myéloperoxydase contenue dans les neutrophiles a été quantifiée dans les poumons (B), les cellules présentes dans le BALF, ont été comptées et différenciées (C). Les bactéries ont été dénombrées dans le BALF et dans l'homogénat de poumon (D). La quantité totale de protéines a été évaluée dans le BALF (E) et les quantités de KC (F), d'IL-1β (G) et de TNF-α (H) ont été mesurées dans l'homogénat de poumon. L'infiltration cellulaire (coloration H&E) a été observée (I). Les scores histopathologiques (unités arbitraires) réalisés à partir de ces observations sont présentés en (J). (n=5-6) Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM ; * pour p<0,05 ; ** pour p<0,01 et *** pour p<0,001. ns pour non significatif.

5. Etude du rôle de l'IL-17 et de l'IL-1β après une infection aiguë à *P. aeruginosa* chez les souris C57BL/6.

En raison des difficultés d'élevage de la lignée de souris ΔF508-IL-1R1$^{-/-}$, évoquées dans la sous-partie 3, le rôle de l'IL-17 et de l'IL-1β après infection par *P. aeruginosa* a été approfondi par l'utilisation d'anticorps neutralisants chez des souris C57BL/6. Les souris ont été infectées par instillation intra-nasale, avec 10^6 CFU de *P. aeruginosa* (souche PA011) afin d'induire une inflammation aiguë analysée à 20H. Dans le but de tester le rôle de l'IL-1β et de l'IL-17A, les souris ont été traitées par 2 injections intra-péritonéales de 200µg d'anticorps neutralisants 15H puis 1H avant l'infection.

Comme précédemment, chez les souris C57BL/6, l'infection par *P. aeruginosa* provoque une perte de poids rapide, avec une augmentation du poids du poumon et de la charge bactérienne à 10^6 CFU par poumon (**Figure 12.A-C**). L'infection induit également un recrutement de neutrophiles (mis en évidence par le dosage de l'activité myéloperoxydase/MPO), une augmentation de la quantité de protéines totales dans l'homogénat de poumons (suggérant une inflammation accrue), et une forte production de la chimiokine KC et des cytokines IL-6, IL-1β et TNF-α (**Figure 12.D-I**).

La neutralisation de l'IL-17A ou l'IL-1β semble moduler l'infection et l'inflammation pulmonaire. En effet, avec l'administration d'anticorps anti-IL17A, la charge bactérienne est réduite de 2 logs et l'inflammation est plus faible, comme le montre la baisse de l'activité MPO mesurée ainsi que de la production d'IL-6, d'IL-1β, de TNF-α et de KC (**Figure 12**). De plus, le blocage de l'IL-1β induit une diminution de la charge bactérienne, avec une réduction du recrutement de neutrophiles (activité MPO), et des médiateurs de l'inflammation dans les poumons (IL-6, TNF-α et KC) (**Figure 12**).

Ces résultats suggèrent donc que l'IL-1β et l'IL-17A soient impliquées dans l'inflammation induite par *P. aeruginosa* à 20H chez les souris WT^{B6}.

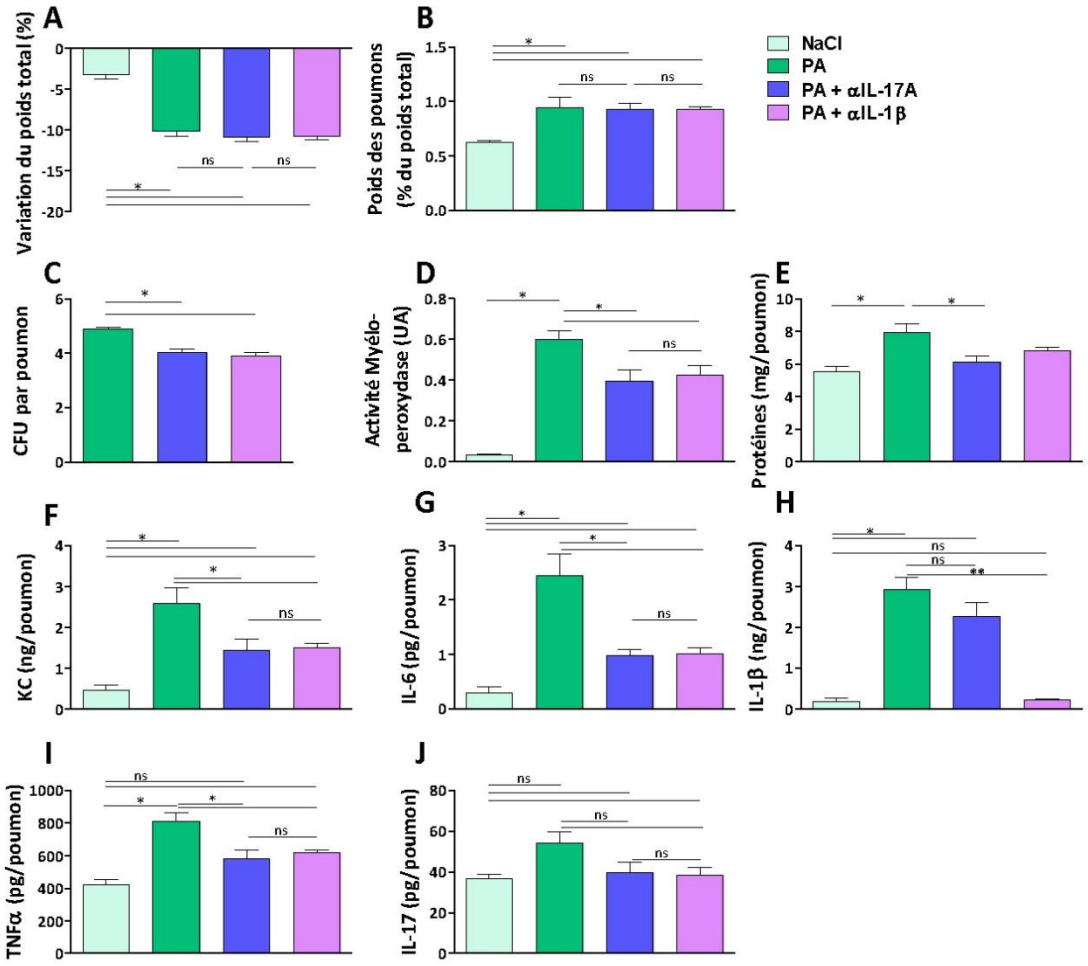


Figure 12 : L'IL-1β et l'IL-17A sont impliquées dans l'inflammation induite par *P. aeruginosa* à 20H chez les souris WT^{B6}.

Des souris WT^{B6} ont reçu par voie intra-nasale 10^6 CFU de PA011 (PA), et des souris WT^{B6} ayant reçu du NaCl 0,9% ont été utilisées comme contrôles. Deux groupes de souris WT^{B6} ont aussi reçu par voie intra-péritonéale, une dose d'anticorps anti-IL-1β ou d'anti-IL-17A, à raison de 200µg/souris, 15H puis 1H avant l'infection. La variation du poids des souris 20H après infection est représentée en (A) et le poids relatif des poumons en (B). La détermination de la charge bactérienne (C), la quantification de l'activité de la Myéloperoxydase contenue dans les neutrophiles (D), la mesure de la quantité totale de protéines dans l'homogénat de poumons (E) et le dosage des quantités de KC (F), d'IL-6 (G), d'IL-1β (H), de TNF-α (I) et l'IL-17A (J) ont été réalisés dans l'homogénat de poumon. (n=5-6) Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM ; * pour $p<0,05$; ** pour $p<0,01$ et *** pour $p<0,001$. ns pour non significatif.

6. Etude du rôle de l'IL-17 après une infection aiguë à *P. aeruginosa* chez les souris FVB, WT et mutantes ΔF508.

Après avoir validé la participation de l'IL-17A dans l'inflammation induite par *P. aeruginosa*, nous avons voulu approfondir le rôle de cette cytokine, et plus particulièrement dans un contexte mucoviscidosique. Nous avons par la suite utilisé des souris mutantes ΔF508 de fond génétique FVB (d/d^{FVB}), ainsi que les souris contrôles FVB de type sauvage (WT^{FVB}). Les souris ont été infectées par instillation intra-nasale avec 10^6 CFU de *P. aeruginosa* (PA011) afin d'induire une inflammation aiguë analysée à 16H. Dans le but de tester le rôle de l'IL-17A, les souris ont été traitées par 2 injections intra-péritonéales de 200µg d'anticorps neutralisants 15h puis 1H avant l'infection.

De la même façon que chez les souris C57BL/6, chez les souris FVB de type sauvage l'infection par *P. aeruginosa* provoque une chute de poids rapide, avec une augmentation du poids du poumon et de la charge bactérienne à 10^7 CFU par poumon (**Figure 13.A-C**). L'infection induit un fort recrutement de neutrophiles, une augmentation de la quantité de protéines totales dans l'homogénat de poumons, et une forte production de la chimiokine KC et des cytokines IL-6, IL-1β, TNF-α et IL-17A (**Figure 13.D-J**).

L'infection et l'inflammation pulmonaires sont réduites de façon significative chez les souris d/d^{FVB} comparées aux WT^{FVB} comme l'indiquent la charge bactérienne plus faible et ainsi que la réduction des médiateurs de l'inflammation KC, IL-6, IL-1β, TNF-α et IL-17A (**Figure 13.C, F-J**). De plus, l'administration d'un anticorps anti-IL-17A, à une dose neutralisant efficacement l'IL-17A présente dans les poumons (**Figure 13.D-J**), permet chez les souris WT^{FVB} et les d/d^{FVB} de réduire la charge bactérienne dans les poumons, de diminuer le recrutement de neutrophiles ainsi que la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires : KC, IL-6, IL-1β et TNF-α (**Figure 13**)

Ainsi, nos résultats semblent indiquer que les souris mutantes ΔF508 sont plus résistantes à l'infection par *P. aeruginosa*. Néanmoins, la neutralisation de l'IL-17A a un effet significatif sur l'infection à et l'inflammation pulmonaire, indépendamment de la présence d'un canal CFTR fonctionnel.

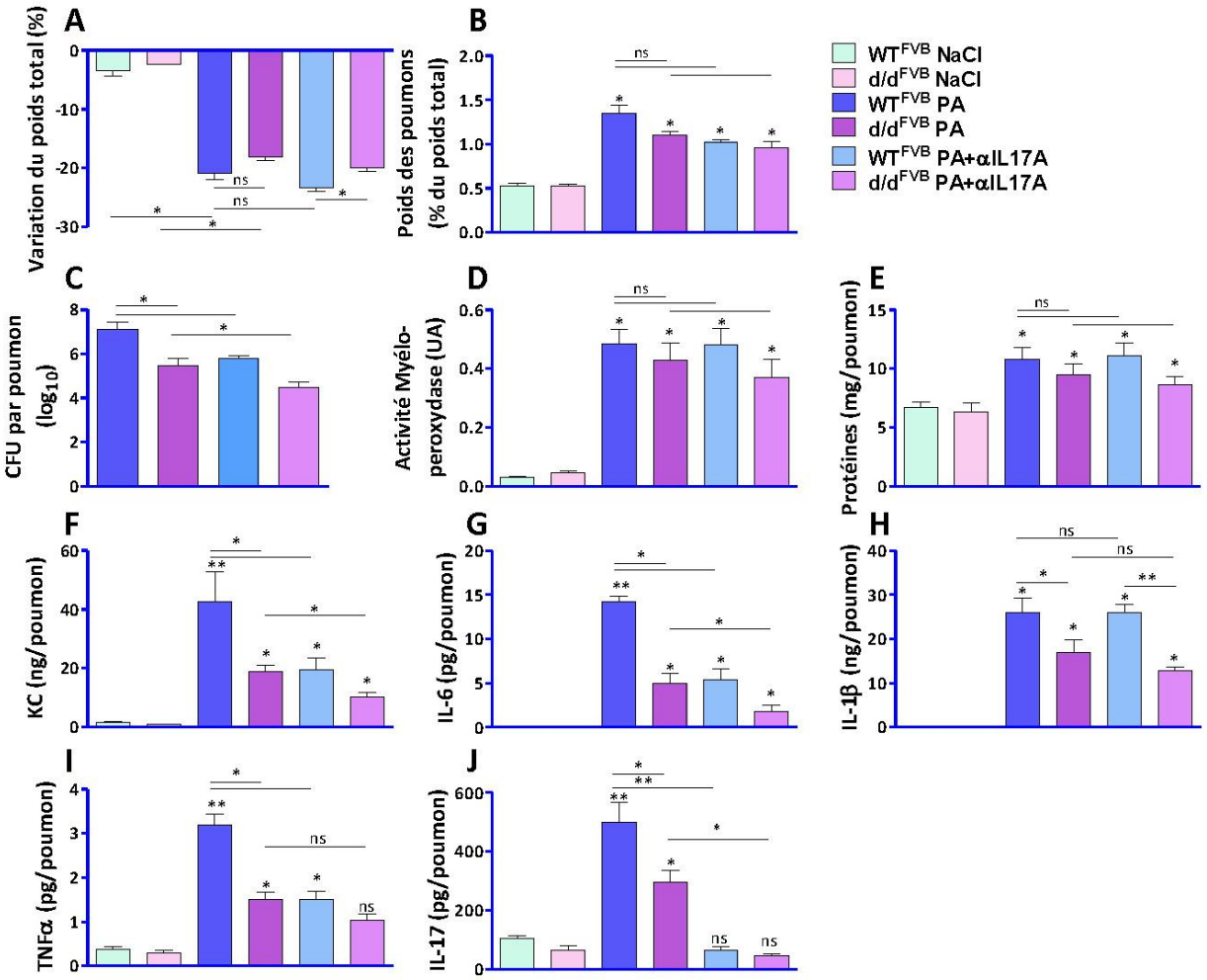


Figure 13 : La neutralisation de l'IL-17A réduit l'inflammation induite par *P. aeruginosa* chez les souris WT^{FVB} et chez les souris d/d^{FVB}.

Des souris WT^{FVB} et d/d^{FVB} ont reçu par voie intra-nasale 10^6 CFU de PA011 (PA). Des souris WT^{FVB} ayant reçu du NaCl 0,9% ont été utilisées comme contrôle. Des souris infectées ont aussi reçu par voie intra-péritonéale, une dose d'anticorps anti-IL-17A, à raison de 200µg/souris, 15H puis 1H avant l'infection. La variation du poids des souris 16H après infection est représentée en (A) et le poids relatif des poumons en (B). Différentes analyses ont été réalisées sur les poumons : détermination de la charge bactérienne (C), quantification de l'activité de la Myéloperoxydase contenue dans les neutrophiles (D), mesure de la quantité totale de protéines dans l'homogénat de poumons (E) et dosage des quantités de KC (F), d'IL-6 (G), d'IL-1β (H), de TNF-α (I) et l'IL-17A (J) dans l'homogénat de poumon. (n=5-6) Les valeurs sont représentées en moyenne + SEM ; * pour $p<0,05$; ** pour $p<0,01$ et *** pour $p<0,001$. ns pour non significatif.

– Discussion –

La mucoviscidose est une pathologie qui concerne les épithéliums de différents organes, mais dont la caractéristique la plus délétère est l'atteinte des voies respiratoires. Elle est causée par un dysfonctionnement du canal chlorique CFTR [4:Quinton 1983], qui a pour origine des mutations au sein du gène *CFTR*. Parmi les mutations qui peuvent entraîner la mucoviscidose, la mutation ΔF508 (qui mène à la délétion de la phénylalanine 508) est présente sur 70% des allèles *CFTR* mutées [22:O'Sullivan 2009]. Cette mutation a été introduite chez la souris afin de créer un modèle murin cliniquement proche de l'homme [54:van Doorninck 1995].

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la pathologie pulmonaire se définit par un mucus visqueux qui obstrue les voies respiratoires, une susceptibilité accrue aux infections chroniques (et plus particulièrement à *P. aeruginosa*) et une inflammation excessive [3:Lubamba 2012]. Même en l'absence d'infection virale ou bactérienne, les patients atteints de mucoviscidose présentent dès l'enfance des signes d'inflammation des voies respiratoires [28:Verhaeghe 2007 - 29:Muhlebach 2002 - 32:Parker 2012]. De plus, le

défaut de clairance mucociliaire causé par l'hyperviscosité du mucus est aussi à l'origine d'une réponse immunitaire excessive, et en particulier d'un recrutement accru de neutrophiles. Ainsi, nous avons cherché à approfondir les mécanismes de l'inflammation pouvant être impliqués dans le développement de la pathologie. En effet, nous nous sommes d'abord intéressés à la voie de l'IL-1β, connue pour activer le recrutement des neutrophiles, mais dont le rôle dans la réponse à l'infection par *P. aeruginosa* est encore controversé [39:Levy 2009 - 40:Schultz 2002 - 42:Veliz Rodriguez 2012]. Puis, nous avons également étudié la fonction de l'IL-17, elle aussi connue pour favoriser le recrutement de neutrophiles [57:Kolls 2008].

℘ Rôle de la voie de l'IL-1β :

Une première étude *in vivo* réalisée au centre Erasmus MC de Rotterdam a eu pour but d'étudier le rôle de l'IL-1β à l'état basal dans les poumons. Nous avons pu voir, chez les souris d/d^{B6} comme chez les souris WT^{B6}, que l'IL-1β n'a pas de rôle majeur dans l'homéostasie des poumons. En effet, les 2 types de souris ne présentaient pas différence dans l'expression de l'ARNm *Il1b*, et l'administration répétée d'un anticorps neutralisant l'IL-1β n'a eu aucun effet sur les paramètres de l'inflammation étudiés. Ainsi, le défaut de fonction CFTR n'induit pas de modification visible de la voie de l'IL-1β à l'état basal.

Puis nous avons cherché à étudier le rôle de l'IL-1β dans des conditions pathologiques, tout d'abord via l'induction d'un endommagement de l'épithélium avec des instillations répétées de LPS. Nous avons pu observer une mortalité induite par le LPS chez les souris d/d^{B6} mais absente chez les souris double-déficientes d/d^{B6} et IL-1R1$^{-/-}$, ainsi qu'une inflammation plus forte chez les souris simples d/d^{B6}, indiquant un rôle délétère de la voie IL-1R1. L'absence de la voie de l'IL-1R1 protège donc contre la mortalité induite par le LPS, probablement causée par une inflammation excessive, chez les mutants d/d. Cependant, alors que nous cherchions à créer une inflammation de type chronique, il semble que les stimulations consécutives ont induit une tolérance au LPS. De plus, l'administration répétée de LPS n'a pas été suffisante pour induire le développement d'une pathologie fibrotique. En effet, bien que l'infiltration cellulaire dans les poumons des souris d/d soit importante, le dépôt de collagène et la production de mucus sont peu augmentés après les stimulations au LPS seul. En revanche, il a été montré qu'une part importante de l'activation

de la production de mucus par *P. aeruginosa* est aussi dépendante de la flagelline, via les voies TLR5 et NAIP [36:Ben Mohamed 2012]. Des stimulations répétées au LPS seul ne sont donc pas adaptées pour induire un endommagement de l'épithélium et une inflammation de type chronique, et engendrent à long terme une tolérance [58:del Campo 2011].

Par conséquent, nous avons décidé de nous rapprocher plus encore des conditions d'infection pulmonaire des patients mucoviscidosiques, et d'utiliser un modèle d'infection aiguë à *P. aeruginosa*. Après l'administration d'une faible dose de *P. aeruginosa*, chez les souris IL-1R1$^{-/-}$, comme chez les souris d/d^{B6}, l'inflammation et la charge bactérienne dans les poumons sont accrues, comparées avec les souris WT^{B6} contrôles. Ces résultats indiquent un rôle protecteur de l'IL-1β après une faible dose de *P. aeruginosa*. Ils sont en accord avec l'étude de Karmarka *et al.* qui rapporte, dans un modèle murin de kératite induite par *P. aeruginosa*, une charge bactérienne chez les souris IL-1β$^{-/-}$ supérieure à celle des souris contrôles WT^{B6} [59:Karmakar 2012]. Cependant, aucune différence n'a pu être mise en évidence 6H après administration d'une forte dose de *P. aeruginosa*, l'inflammation et la charge bactérienne étaient identiques chez toutes les souris. De plus, 20H après infection par une forte dose de *P. aeruginosa*, l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-1β induit une réduction des différents paramètres de l'inflammation mesurés et de la charge bactérienne, par rapport aux souris contrôles WT^{B6}. De la même façon, Schultz *et al*. ont montré que l'inhibition de la voie de l'IL-1R1 améliorait la défense antibactérienne de l'hôte et limitait la production de cytokines pro-inflammatoires [40:Schultz 2002].

Il est donc envisageable que l'IL-1β ait un rôle à double tranchant pour l'hôte après infection par *P. aeruginosa*. En effet, après une infection avec une faible dose de *P. aeruginosa*, nous avons vu que l'IL-1β est produite en petite quantité et participe à la clairance bactérienne et à une inflammation efficace et un remodelage rapide. A l'inverse, après infection avec une forte dose de *P. aeruginosa*, la quantité d'IL-1β produite est multipliée par 10. Cette dernière est à l'origine d'une inflammation excessive et pathologique. Ainsi, l'inhibition de l'IL-1β par un anticorps neutralisant permet une meilleure clairance bactérienne et une réduction de l'inflammation pathologique des poumons. Et en effet, il a été montré *in vitro* qu'en présence d'une quantité importante de cytokines telles que l'IL-1β, l'IL-6 ou le TNF-α, la croissance bactérienne de *P. aeruginosa*, ou de *S. aureus*, est augmentée [60:Kanangat 1999 - 61:Meduri 2002]. Et plus récemment, dans un modèle murin d'infection par *P. aeruginosa* après brûlure, il a été vu que la mortalité induite par

l'inhibition du TNF était dépendante de l'induction de l'IL-1β [62:Tsay 2013]. Ainsi, alors qu'une inflammation modérée permet l'élimination des bactéries, une inflammation excessive (non régulée) peut favoriser la croissance bactérienne et retarder la résolution du tissu.

℘ Rôle de la voie de l'IL-17 :

En complément de notre étude sur la voie de l'IL-1β, nous nous sommes aussi intéressés au rôle de la voie de l'IL-17. Après l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-17A, 16 et 20H après infection par une forte dose de *P. aeruginosa*, les différents paramètres de l'inflammation mesurés et la charge bactérienne étaient réduits, qu'il s'agisse de souris WT^{B6} (16H), WT^{FVB} ou d/d^{FVB} (20H). Ces résultats ne sont pas en accord avec des études récentes, rapportant que l'inhibition de l'IL-17 induit une réduction du nombre de neutrophiles recrutés, ainsi qu'une augmentation de la charge bactérienne et du score histopathologique, après une infection aiguë par *P. aeruginosa* [63:Liu 2011 - 64:Liu 2013]. Néanmoins, il a aussi été montré que l'IL-17A recombinante humaine activait la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires par des cellules épithéliales bronchiales humaines *in vitro* [65:McAllister 2005]. L'inhibition de l'IL-17A pourrait alors mener à une réduction de l'inflammation. Il est donc probable, qu'à l'instar de l'IL-1β, en réponse à une infection bactérienne, une forte production d'IL-17 favorise une inflammation excessive et la croissance bactérienne [61:Meduri 2002].

L'IL-17 a un rôle non seulement dans un contexte d'infection à *P. aeruginosa*, mais aussi dans un contexte mucoviscidosique. En effet, d'une part l'IL-17 est augmentée dans les expectorations des patients mucoviscidosiques et, d'autre part, Roussell *et al*. ont montré *in vitro* que l'IL-17 induisait un priming des cellules épithéliales alvéolaires ΔF508. Cette étude, présentant une augmentation de la réponse PRR (NOD1) chez des cellules ΔF508 stimulées à l'IL-17, indique que l'inhibition de l'IL-17 chez les patients atteints de mucoviscidose permettrait de réduire l'inflammation pulmonaire [66:Roussel 2010]. Ce que semblent confirmer nos résultats, qui révèlent une réduction significative de l'inflammation, comme de la charge bactérienne, chez les souris d/d^{B6} ou d/d^{FVB}, après administration d'un anticorps neutralisant l'IL-17.

℘ Modèle murin ΔF508 :

Par ailleurs, nous avons cherché à définir la participation de ces voies immunitaires dans un modèle murin ΔF508. Notre première étude réalisée au centre Erasmus MC de Rotterdam a mis en évidence l'absence d'inflammation spontanée chez les souris mutantes ΔF508 de fond génétique C57BL/6. Néanmoins, alors que chez l'homme les signes d'inflammation sont présents précocement, les études faites chez les modèles murins sont parfois controversées. A l'instar de nos observations, la majorité des équipes ont rapporté l'absence de caractéristiques de la pathologie pulmonaire telles que l'obstruction muqueuse, l'accumulation de neutrophiles ou la bronchectasie, chez des souris naïves déficientes ou mutées pour le gène *Cftr* [67:van Heeckeren 2004 - 68:van Heeckeren 2006 - 69:Fisher 2011 - 70:Bragonzi 2010]. Cependant, une inflammation a également été observée chez ces souris sans aucune infection [71:Durie 2004 - 72:Tirkos 2006], rapportant entre autres un recrutement de neutrophiles. Il semble que l'apparition d'une pathologie pulmonaire spontanée soit dépendante de différents facteurs comme l'âge des souris (une inflammation des voies respiratoires étant plus fréquente chez les souris âgées [72:Tirkos 2006]), le fond génétique et le statut sanitaire de la zone d'hébergement [49:Wilke 2011]. De plus, tandis que la plupart des souris déficientes ou mutées pour le gène *Cftr* présentent une nette pathologie intestinale, l'absence de pathologie respiratoire peut être expliquée par la présence de canaux chloriques, calcium dépendants, de substitution présents dans les poumons et compensant, en partie, l'absence du CFTR [73:Grubb 1994 - 74:Grubb 1994].

Nous avons par la suite réalisé sur les souris ΔF508 une infection aiguë par *P. aeruginosa*, le pathogène ayant la plus forte prévalence chez les patients mucoviscidosiques [27:CFF 2012]. Après infection avec une faible dose de *P. aeruginosa*, les souris d/d de fond génétique C57BL/6 présentent un recrutement cellulaire et une charge bactérienne dans les poumons identiques aux souris WT^{B6} infectées. Pourtant, elles montrent aussi une augmentation du nombre de CFU et de cytokines telles que l'IL-1β et le TNF-α, dans le BALF. Ces résultats semblent indiquer une susceptibilité accrue des souris d/d après infection par *P. aeruginosa*.

Mais étonnamment, 6H après une infection avec une forte dose de *P. aeruginosa*, la charge bactérienne et le recrutement cellulaire entre les souris d/d^{B6} et WT^{B6} ne présentent pas de différence significative, tandis que la quantité d'IL-1β et de TNF-α est réduite dans le

BALF des souris d/d^{B6}. De la même façon, les souris d/d de fond génétique FVB, après infection par cette même forte dose, montrent à 16H une réduction de la charge bactérienne et de la production des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. Cette réduction de l'inflammation et des CFU chez les souris d/d^{FVB} après une infection par *P. aeruginosa* est surprenante et différente de ce qui est indiqué dans la littérature. En effet, plusieurs études rapportent une augmentation de la charge bactérienne et de la production de cytokines pro-inflammatoires après une infection par *P. aeruginosa* chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles [68:van Heeckeren 2006 - 75:Schroeder 2001 - 76:Mall 2004 - 77:Saadane 2006]. Et similairement, après une stimulation au LPS, les souris d/d^{FVB} montrent un recrutement supérieur de neutrophiles dans le BALF et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires [78:Lubamba 2012]. Cependant, la corrélation entre la perte de fonction CFTR et l'hyper-inflammation en cas d'infection n'est pas toujours aussi nette. En effet, l'absence de corrélation directe entre le niveau d'expression de CFTR et la clairance bactérienne a été montrée *in vivo* [79:Chroneos 2000]. De plus, d'autres études ont mis en évidence une charge bactérienne chez les souris d/d semblable à celle des souris contrôles après une infection aiguë par *P. aeruginosa* [80:Cressman 1998 - 81:McCray 1999], ou bien après une infection chronique [67:van Heeckeren 2004 - 82:Heeckeren 1997].

– Conclusions et Perspectives –

Les différents travaux réalisés dans le cadre du projet mucoviscidose ont eu pour objectif d'approfondir les mécanismes immunitaires impliqués dans la pathogenèse pulmonaire induite par une perte de fonction CFTR. Et l'ensemble des expériences réalisées au cours de ma thèse, sur un modèle murin complexe et difficile à produire, a conduit à plusieurs pistes intéressantes, mais qui restent à confirmer.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au rôle de l'IL-1β. Un de nos objectifs initiaux était d'établir une colonie de souris C57BL/6 mutantes ΔF508 déficientes (ou non) pour le récepteur IL-1R1. Cependant, force est de constater que l'élevage des souris (simple-) et double-déficientes s'est avéré difficile et insuffisant, en particulier en ce qui concerne les souris d/d et IL-1R1$^{-/-}$. Les raisons du taux de mortalité élevé et de la faible proportion de souris homozygotes d/d au sein des portées sont mal définies, bien que des

observations similaires aient déjà été faites pour des mutants CFTR [70:Bragonzi 2010]. Malgré l'augmentation du nombre de couples/trios, il a été impossible d'obtenir une production suffisante pour conduire la série d'expériences désirée. Ces difficultés d'élevage nous ont poussés par la suite, d'une part à utiliser des anticorps neutralisants afin d'étudier la voie de l'IL-1β, et d'autre part à réaliser des expériences sur des souris de fond génétique FVB, hébergées par le CDTA.

Les expériences réalisées dans le but de décortiquer le rôle de l'IL-1β ont d'abord révélé que cette cytokine n'avait pas de rôle à l'état basal dans les poumons, chez les souris WT^{B6}, comme chez les souris d/d^{B6}. A l'inverse, dans un contexte d'endommagement de l'endothélium (par stimulation au LPS) ou d'infection aiguë par *P. aeruginosa*, une activation excessive de la voie de l'IL-1β participe à l'induction d'une inflammation exacerbée et pathologique, et favorise probablement la persistance des bactéries. Et il est ainsi possible que dans un cadre mucoviscidosique, où l'hyper-inflammation est une des causes de la pathologie, la voie de l'IL-1β joue un rôle important et puisse être une cible thérapeutique potentielle. Néanmoins, il reste encore de nombreux aspects à détailler.

En effet, nous avons utilisé des souris déficientes pour le récepteur IL-1R1 afin d'observer les conséquences de l'inhibition de la voie de l'IL-1β. Cependant, le récepteur IL-1R1 est aussi nécessaire pour la signalisation de l'IL-1α, et l'axe IL-1R1/IL-1α a, par exemple, été montré comme étant essentiel au recrutement des neutrophiles dans un modèle d'exposition à la fumée de cigarette [83:Botelho 2012]. De plus, l'IL-1α et l'IL-1β possèdent des fonctions analogues et non redondantes dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* [84:Bourigault 2013]. Ainsi, le rôle exact de l'IL-1α dans cette pathologie devrait aussi être analysé, par exemple avec l'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-1α.

De plus, nous avons pu observer des effets opposés de l'IL-1β en fonction de la dose de *P. aeruginosa* inoculée. Ainsi, après une infection par une faible dose de *P. aeruginosa*, l'IL-1β participe à une inflammation modérée et aide à la clairance bactérienne. Alors qu'après une infection par une forte charge de *P. aeruginosa*, la voie de l'IL-1β semble contribuer à une hyper-inflammation et favoriser la survie bactérienne.

De la même façon, l'utilisation d'anticorps neutralisants nous a permis de suggérer un rôle similaire de l'IL-17, dont la production a déjà été corrélée avec l'auto-immunité [44:Baeten 2013] et l'inflammation pulmonaire [85:Besnard 2012]. Ainsi, après une infection légère par *P. aeruginosa*, l'IL-17 contribue à la mise en place d'une inflammation modérée

qui permet l'élimination des bactéries. Mais après une forte dose de *P. aeruginosa*, l'IL-17 contribue à la mise en place d'une inflammation excessive et peut favoriser la croissance bactérienne. Mais tout comme l'IL-1β, le rôle amphibologique de l'IL-17 mérite d'être défini de façon plus détaillée. De plus, il sera nécessaire de confirmer ces résultats préliminaires en incluant l'administration d'anticorps isotypique contrôle.

Par ailleurs, nous avons étudié la réponse à l'infection aiguë à *P. aeruginosa* chez des souris d/d^{FVB}. De façon surprenante, les souris d/d^{FVB} ont présenté une inflammation et une charge bactérienne identiques à 6H, et réduite à 20H post-infection, en comparaison avec les souris contrôles. Ce phénotype est plutôt inédit et inattendu, et nécessite d'être confirmé.

Enfin, bien que nous ayons cherché à nous rapprocher des cas cliniques par l'utilisation d'un modèle d'infection aiguë par *P. aeruginosa*, ce modèle est encore assez différent. En effet, chez les patients souffrant de mucoviscidose, c'est la chronicité des infections et la persistance des pathogènes dans les poumons qui sont à l'origine de la pathologie. Pour cette raison, nous avons également cherché à implémenter un modèle d'infection chronique [86:van Heeckeren 2002], mais sa mise au point est encore en cours. Il s'agit d'une part d'utiliser une souche de *P. aeruginosa* produisant des biofilms, RP73 [87:Moalli 2011]. Et il s'agit d'autre part d'adsorber les bacilles de *P. aeruginosa* sur des microbilles d'agarose et de procéder à l'infection par voie intra-trachéale. Nous essayons donc d'établir une infection qui subsiste 1 à 2 semaine(s), en collaboration avec le Pr C. Garlanda (Humanitas Clinical Research Center – Milan) et le Pr U. Jenal (Biozentrum, Université de Bâle). L'établissement de ce modèle plus pertinent permettrait de mieux détailler les différents mécanismes inflammatoires impliqués dans la réponse à une infection chronique par *P. aeruginosa*, et en particulier chez des souris ΔF508.

L'étude de l'importance de la fonction CFTR et de son impact sur la réponse immune à l'infection, et notamment le rôle des voies IL-1β et IL-17, mais aussi sur la clairance bactérienne et la résolution de l'inflammation devront être approfondis dans ce modèle d'infection chronique.

- Deuxième partie -

– Introduction –

La malaria, aussi appelée paludisme, est une maladie infectieuse causée par un parasite du genre *Plasmodium*. Ce pathogène est transmis par la piqure d'un moustique du type *Anopheles*. La malaria est la parasitose la plus répandue dans le monde, prédominante plus particulièrement dans les zones tropicales et subtropicales. *Plasmodium* est parmi les agents infectieux à l'origine du plus grand nombre de décès dans le monde. Son endiguement constitue d'ailleurs l'un des huit 'Objectifs du Millénaire pour le Développement' de l'Organisation des Nations Unies à atteindre d'ici 2015.

1. GENERALITES SUR LA MALARIA.

1. Historique.

Les traces les plus anciennes de *Plasmodium* ont été trouvées sur des momies datant de 1400 ans avant J.-C. En effet, au début du XXI^{e} siècle, l'archéologue égyptien Zahi Hawass et son équipe examinèrent les restes de plusieurs momies. L'analyse de l'ADN retrouvé sur certains échantillons a révélé la présence de gènes spécifiques de *Plasmodium*, notamment les gènes *Stevor, Ama1* et *Msp1*. Bien que la cause de la mort de ces momies, et plus particulièrement de celle de Toutankhamon, fasse débat, il est incontestable que la malaria existe au moins depuis l'époque de l'Egypte Antique [88:Hawass 2010 - 89:Butler 2010 - 90:Timmann 2010].

En ce qui concerne la description de la pathologie, le médecin et philosophe grec Hippocrate décrivait déjà au IV^{e} siècle avant J.-C. une maladie caractérisée par des périodes de fièvre cycliques [91:Bogdonoff 1985]. En 1880, le docteur français Alphonse Laveran, basé à l'hôpital militaire de Constantine, soignait des patients atteints de malaria, appelée à l'époque 'Fièvre des marais'. Il identifia et décrit le parasite *Plasmodium* retrouvé spécifiquement dans le sang de ses patients. Il reçut le prix Nobel pour ces recherches en 1907 [92:Laveran 1982]. Le médecin britannique Ronald Ross identifia le moustique *Anopheles* comme vecteur de la maladie en 1889. Il fit ensuite une description détaillée du cycle de *Plasmodium* chez l'Anophèle [93:Ross 1898], et reçu le prix Nobel en 1902.

2. Incidence.

La malaria est la parasitose la plus répandue aujourd'hui. Il est estimé que la moitié de la population mondiale est à risque. La majorité des cas et des décès ont lieu en Afrique sub-saharienne, mais *Plasmodium* est également présent en Asie, en Amérique latine, et plus faiblement au Moyen-Orient et dans certaines régions d'Europe (**Figure 14**). En 2011, 104 pays ont été recensés comme endémiques pour la malaria.

Selon le « Rapport 2013 sur le paludisme dans le monde » de l'OMS, environ 207 millions de cas de malaria ont été dénombrés en 2012. Ces cas ont conduit à environ 627 000 décès (le nombre étant compris entre 473 000 et 789 000). La République Démocratique du Congo et le Nigéria totalisent à eux seuls 40% des décès dus à la malaria. La grande majorité (85%) des décès concerne des enfants de moins de 5 ans en Afrique. Les autres groupes de population à risque sont essentiellement les personnes porteuses du VIH, ainsi que les femmes enceintes, dont l'infection peut être pernicieuse pour la mère et pour l'enfant, provoquant entre autres une fausse couche.

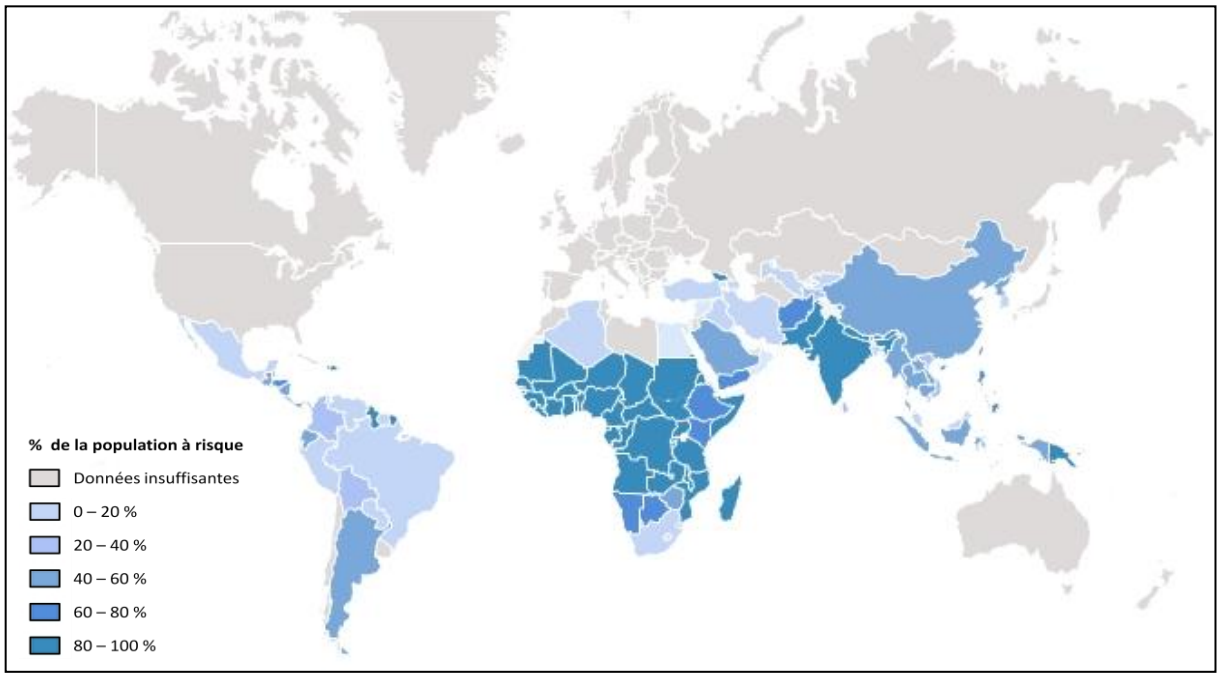


Figure 14 : Population ayant un risque de contracter la Malaria – OMS 2013.

Le vecteur de la malaria est l'Anophèle, mais quelques cas de contamination interhumaine ont été rapportés. En effet, même si le taux de transmission congénitale est plutôt faible, il peut arriver au cours de la grossesse, ou lors de l'accouchement, qu'une mère transmette l'infection au fœtus/nouveau-né [94:Ouedraogo 2012]. Enfin, de rares cas de transmission via la transfusion de sang contaminé, ou via une greffe d'organe (comme celle du foie d'un donneur infecté) ont aussi été signalés [95:Fischer 1999]. Néanmoins, le parasite reste classiquement transmis à l'homme par la piqure d'un moustique infecté.

3. Spécificités de *Plasmodium*.

3.1. Cycle de développement du parasite.

Plasmodium est un parasite protozoaire hématophage qui appartient au phylum des *Apicomplexa*. Afin de réaliser son cycle de développement, *Plasmodium* requiert 2 hôtes : un vecteur (hôte définitif) et un hôte intermédiaire. La multiplication sexuée du parasite s'effectue au sein de l'hôte définitif, le moustique Anophèle femelle. Et une multiplication asexuée s'accomplit chez l'hôte intermédiaire qui est un mammifère.

3.1.a. Etapes de développement chez le moustique.

Le premier hôte de *Plasmodium* est donc un moustique du genre *Anopheles*, sachant que le complexe d'espèces cryptiques *Anopheles gambiae* (composé de 7 espèces au sens strict) constitue le vecteur le plus important. Lors d'une piqure sur un mammifère infecté par *Plasmodium*, la femelle Anophèle ingère des hématies, dont certaines contiennent les gamétocytes du parasite. Dans l'intestin du moustique, alors que les formes asexuées (mérozoïtes), qui sont pathogéniques chez l'hôte intermédiaire, sont digérées, la baisse de température active la gamétogenèse à partir des gamétocytes. Le gamète femelle (macrogamétocyte) est alors fécondé par le gamète mâle (microgamétocyte flagellé). Cette fusion produit un zygote sphérique qui se transforme rapidement en ookinète, cellule allongée, mobile et invasive. L'ookinète se déplace jusqu'à l'épithélium de l'intestin puis le traverse afin d'accéder au côté basal de l'épithélium. Après la transmigration, l'ookinète reste fixé au niveau de la lamina basale intestinale et se transforme en oocyste. Cet oocyste entre alors dans une étape de différenciation et multiplication asexuée : la sporogonie. Au terme de cette étape de 10 à 12 jours, un oocyste libère dans l'hémolymphe environ 1 000 sporozoïtes allongés et mobiles. Lorsqu'ils atteignent les glandes salivaires, les sporozoïtes reconnaissent via des ligands spécifiques la lamina basale de ce tissu. Les protozoaires traversent ensuite la paroi des glandes salivaires et s'y accumulent jusqu'au prochain repas sanguin du moustique, qui restera infectant pendant un mois environ [96:Aly 2009]. (**Figure 15**)

3.1.b. Etapes de développement chez le mammifère.

Lors d'un repas sanguin, le moustique injecte de la salive afin d'inhiber la coagulation du sang et d'anesthésier le site de la piqûre. Ainsi, lorsqu'une femelle Anophèle infectée par *Plasmodium* se nourrit sur un mammifère, elle injecte un petit nombre de sporozoïtes au niveau du derme. Sur l'ensemble des parasites injectés, environ 50% restent dans la peau, 15% rejoignent les vaisseaux lymphatiques (et sont phagocytés par des cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques drainants) et 35% atteignent la circulation sanguine [97:Amino 2005]. L'organe cible des sporozoïtes est le foie. Lorsqu'ils parviennent au niveau des vaisseaux sinusoïdes hépatiques, quelques minutes après la piqûre, les parasites traversent la paroi endothéliale des sinusoïdes et entrent dans le tissu. Les sporozoïtes traversent alors plusieurs hépatocytes avant de s'arrêter dans l'un d'eux. Ils y accomplissent alors un cycle de différenciation et multiplication asexuée : la schizogonie hépatique (ou exo-érythrocytaire). Le parasite s'arrondie et prend une forme appelée trophozoïte. Il s'agrandit et multiplie son matériel génétique de façon à se différencier en schizonte multi -

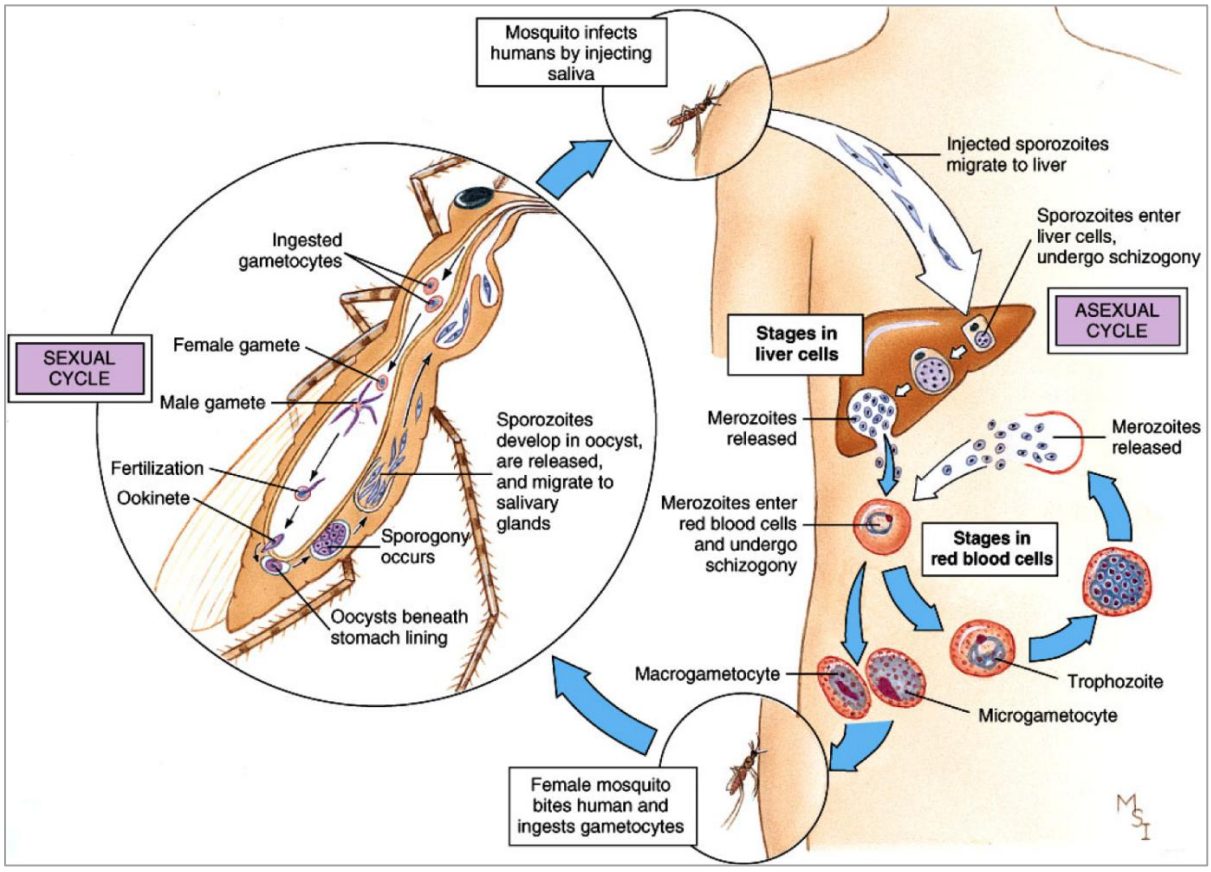


Figure 15 : Cycle de développement de *Plasmodium* (www.biocyclopédia.com).

nucléé. Après maturation, le schizonte contient plusieurs milliers de mérozoïtes encapsulés dans une membrane parasitophore, le mérozome. Puis, la membrane de l'hépatocyte se rompt, et libère le mérozome. Ce dernier rejoint la circulation sanguine avant de se déchirer au niveau des poumons (sous l'action d'enzymes digestives produites par le parasite, ou bien via des contraintes mécaniques) et de relâcher les mérozoïtes [98:Prudencio 2006]. Lors de cette phase transitoire, l'hôte ne présente aucun signe clinique indiquant son infection (**Figure 15**).

Cependant, pour certaines espèces, notamment *Plasmodium vivax*, quelques parasites peuvent ne pas entrer en schizogonie hépatique, certains trophozoïtes primaires pouvant rester quiescents. Cette forme latente est appelée hypnozoïte et peut se réactiver plusieurs mois, et jusqu'à plusieurs années, après la première infection [99:Galinski 2013] ; induisant des mécanismes d' « immortalisation » de l'hépatocyte-hôte.

La libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine constitue le début de la phase érythrocytique du développement de *Plasmodium*. Rapidement, le mérozoïte reconnait et adhère à la membrane d'un érythrocyte. Le parasite pénètre alors dans l'hématie et commence un deuxième cycle de différenciation : la schizogonie érythrocytaire qui dure 48H chez la plupart des espèces (**Figure 16**). Comme dans le foie, la schizogonie commence par la formation d'un trophozoïte qui prend d'abord la forme d'un anneau. Puis le trophozoïte se développe et accroît le nombre de ses organites et leur activité. *Plasmodium* se nourrit d'éléments érythrocytiques, utilisant la dégradation de l'hémoglobine comme source d'acides aminés. Il altère également le fonctionnement de la cellule hôte via l'exportation de protéines dans son cytoplasme ou au niveau membranaire. Puis, le noyau se divise environ 4 fois. Au stade schizonte, 16 à 20 mérozoïtes s'individualisent. Enfin, la membrane parasitophore puis la membrane de l'hématie sont rompues, vraisemblablement sous l'action d'enzymes digestives produites par le parasite et, les mérozoïtes sont libérés dans la circulation, pouvant réaliser un nouveau cycle de multiplication [100:Maier 2009 - 101:Bannister 2000].

Dès la sortie du foie (comme pour *P. vivax*) ou après quelques cycles de multiplication, certains mérozoïtes peuvent se différencier en gamétocytes sexués. Cette forme reste quiescente chez le mammifère, et peut être transmise à un Anophèle lors d'une

piqure. Le protozoaire pourra ainsi commencer un nouveau cycle de développement dans l'intestin du moustique (**Figure 15**).

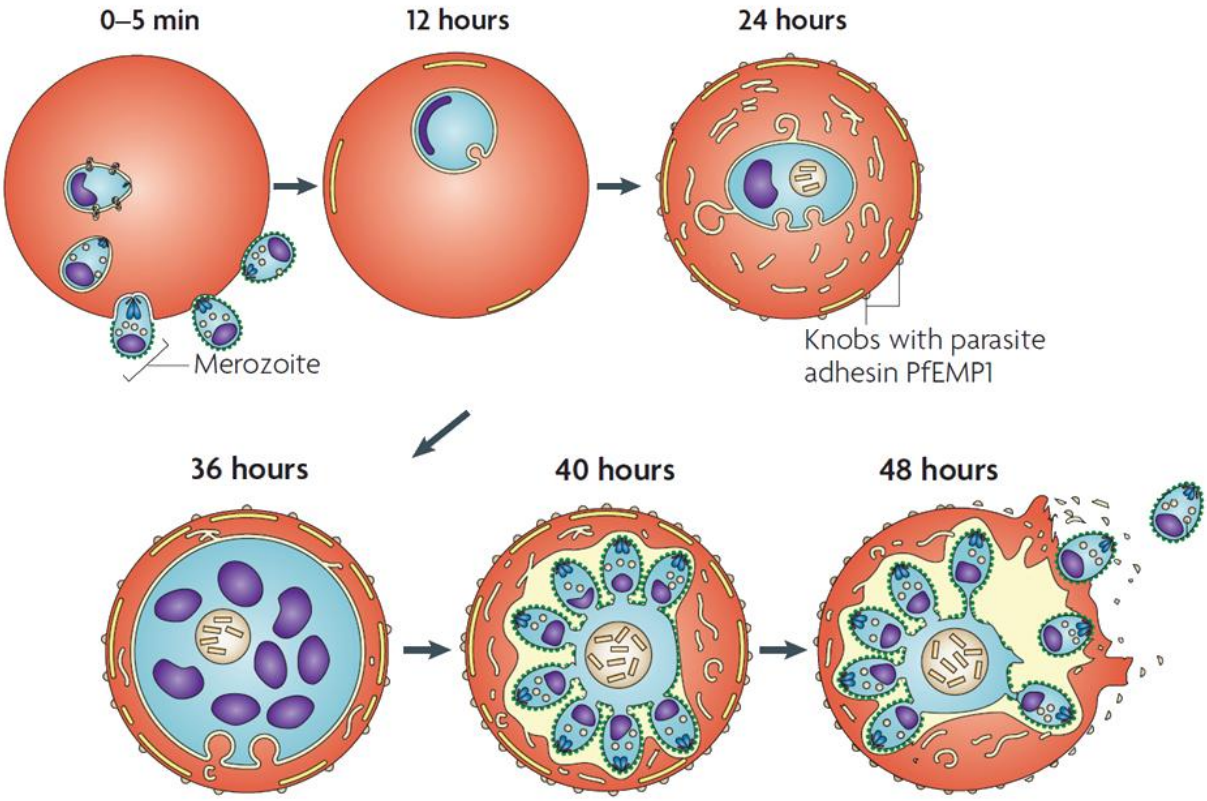


Figure 16 : Schizogonie érythrocytaire de *Plasmodium* (adapté de [100:Maier 2009])

3.2. Les espèces spécifiques de l'homme.

Plasmodium étant un parasite intracellulaire obligatoire, les interactions parasite – cellules hôte sont spécifiques et dépendantes des espèces concernées. Parmi les nombreuses espèces de *Plasmodium*, 5 sont connues pour infecter l'homme. Leurs caractéristiques de développement déterminent les symptômes et la gravité de la malaria [102:Antinori 2012].

- ***Plasmodium falciparum*** est l'espèce qui provoque les cas de malaria les plus sévères et le plus grand nombre de décès. *P. falciparum* est majoritairement en Afrique, mais est aussi présent en Amérique du Sud et en Asie. Il ne forme pas d'hypnozoïte, mais peut perdurer et mener à une infection chronique pouvant durer jusqu'à 2-3 ans.

℘ ***Plasmodium vivax*** est aussi très répandu, principalement en Amérique du Sud et en Asie. Il est rarement fatal, mais est connu pour sa capacité à produire des hypnozoïtes latents à l'origine de réactivations de l'infection. Les mérozoïtes de *P. vivax* adhérent préférentiellement aux réticulocytes, ce qui rend la charge parasitaire dans le sang assez faible [99:Galinski 2013].

℘ ***Plasmodium ovale*** est peu fréquent et entraîne une pathologie modérée. Les mérozoïtes de *P. ovale* adhèrent aussi principalement aux réticulocytes. A l'instar de *P. vivax*, *P. ovale* produit également des hypnozoïtes dans le foie [103:Richter 2010].

℘ ***Plasmodium malariae*** est présent en Afrique de façon plus sporadique. Il est peu fréquent mais peut persister et se réactiver plusieurs dizaines d'années après la primo-infection. Il a la caractéristique d'avoir une schizogonie érythrocytaire plus longue, durant 74H [104:Oakley 2011].

℘ ***Plasmodium knowlesi*** est présent essentiellement en Asie du Sud-est. Il est incapable de former des hypnozoïtes, mais a une schizogonie érythrocytaire rapide, de 24H. D'abord confondu avec *P. malariae*, il a ensuite été montré que *P. knowlesi* n'infectait pas seulement les macaques mais également l'homme. *P. knowlesi* peut d'ailleurs entraîner des cas de malaria sévère [105:Antinori 2013].

3.3. Traitements antipaludéens.

Pendant longtemps et jusqu'aux années 1930, les patients atteints de malaria ont été traités avec de la quinine, extraite d'un arbuste équatorien, le Quinquina. Puis, en 1934, la société pharmaceutique allemande Bayer a mis au point une molécule synthétique similaire, la chloroquine. Cette molécule inhibe la transformation de l'hème (produit de la dégradation de l'hémoglobine) en hémozoïne et provoque donc l'accumulation de ce composé qui est toxique pour les mérozoïtes. Cependant, la chloroquine ayant été utilisée à trop grande échelle, une résistance des parasites est rapidement apparue, à l'exception de *P. vivax* qui y demeure toujours sensible. Plus tard, l'association Pyriméthanine/Sulfadoxine a été utilisée. Elle permet chez *Plasmodium* de bloquer la synthèse d'acide folique, précurseur des acides

nucléiques. Mais dans ce cas également le parasite a développé une résistance au traitement. Puis, en 1972, l'artémisinine fut extraite d'une plante (*Artemisinia annua*) utilisée depuis plus de 2 000 ans en Chine pour traiter différentes maladies, dont la malaria. Son mécanisme d'action est encore mal défini, mais elle permet d'éliminer différents stades du parasite, dont les gamétocytes [106:Mita 2012]. Afin d'éviter l'apparition de résistance, l'OMS recommande aujourd'hui l'administration de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et de ses dérivés.

Enfin, il existe certains traitements prophylaxiques prescrits pour les voyageurs venant dans les pays endémiques tels que le Malarone® ou le Paludrine®. Néanmoins, le moyen de protection le plus sûr demeure la prévention de la piqûre par un moustique potentiellement infecté, par la pulvérisation d'insecticide dans les habitations et les moustiquaires imprégnées de répulsifs.

L'apparition de la résistance des parasites aux traitements antipaludéens, et de la résistance du vecteur aux insecticides, confirme la nécessité de développer un vaccin contre la malaria. Parmi les 5 espèces infectant l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus répandus et par conséquent la cible de la majorité des études [107:malERA 2011]. Plusieurs stratégies sont appliquées dans la recherche vaccinale. Une première approche consiste à produire un vaccin qui permettrait de bloquer la transmission du parasite, en ciblant par exemple les gamétocytes. Cette approche permettrait de réduire considérablement la propagation des parasites. Cependant, une autre approche légitime est aussi appliquée. Elle a pour but de réduire la morbidité et la mortalité des jeunes enfants, en ciblant directement la multiplication du parasite chez l'homme. Une combinaison des 2 permettrait d'obtenir un vaccin optimal. Parmi les différentes recherches en cours, un seul candidat est en phase III d'essai clinique, et attendu pour 2015. Le RTS,S/AS01 contient une portion de la protéine PfCS (Circum sporozoite de *P. falciparum*) qui est une protéine majeure de la surface des sporozoïtes. Elle est associée à un antigène de surface du virus de l'Hépatite B (S) et administrée dans un adjuvant liposomique (AS01). Pour le moment, son efficacité est comprise entre 30 et 50% de protection contre la malaria dite 'clinique' et la malaria sévère [108:Thera 2012 - 109:Riley 2013].

4. Pathophysiologies associées à la malaria.

4.1. La malaria clinique.

Alors que l'inoculation du parasite et l'étape de multiplication hépatique sont asymptomatiques, 1 à 2 semaines après la piqûre, le stade sanguin de *Plasmodium* est à l'origine des différents symptômes de l'infection. Les signes de la malaria dite 'clinique', sans complication, sont la fièvre accompagnée de frissons, de maux de tête, de fatigue, ainsi que de troubles digestifs [110:Good 2005]. Néanmoins, il peut arriver dans les zones d'endémie, que l'infection soit quasi-silencieuse chez des personnes régulièrement infectées et ainsi partiellement immunisées. Historiquement, la malaria était identifiée par une fièvre cyclique, tierce ou quarte en fonction des espèces de *Plasmodium*. En effet, la schizogonie érythrocytaire est synchronisée. Par conséquent, la lyse des hématies se fait de façon coordonnée. Et la libération synchronisée des mérozoïtes est associée avec le relarguage de différentes toxines parasitaires, notamment des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) et l'hémozoïne. Ces molécules activent alors des récepteurs de type PRR (*Pattern Recognition Receptor*) présents entre autres à la surface de phagocytes. Ces derniers produisent ensuite des médiateurs pyrogéniques et pro-inflammatoires qui induisent l'augmentation de la température du corps, à chaque lyse des hématies [104:Oakley 2011].

4.2. La malaria sévère.

Mais dans certains cas, l'infection évolue en malaria dite 'sévère', par le développement de sérieuses complications. En effet, vraisemblablement dans le but d'éviter l'élimination des hématies infectées au niveau de la rate, *Plasmodium* induit l'expression de molécules d'adhésion à la surface des érythrocytes. Le parasite provoque de cette façon l'adhésion et la séquestration des hématies parasitées au niveau de l'endothélium de différents organes. Les complications de la malaria peuvent alors concerner un ou plusieurs organes, ou encore être systémiques (**Figure 17**).

4.2.a. Anémie sévère.

Par exemple, et plus particulièrement chez les enfants et les femmes enceintes, une anémie sévère peut se développer. L'augmentation de la destruction des hématies est un des différents facteurs impliqués dans la pathologie. Elle est causée par la lyse des cellules induite par le parasite, ainsi que par la séquestration et l'élimination splénique des hématies infectées ou non infectées. L'infection par *Plasmodium* peut également entrainer une dysérythropoïèse. Il a par exemple été montré que l'hémozoïne de *Plasmodium* pouvait inhiber l'érythropoïèse, notamment via l'inhibition du développement de progéniteurs érythroïdes [111:Perkins 2011 - 112:White 2013 - 113:Thawani 2014]. De plus, l'anémie sévère semble aussi corrélée à un déséquilibre de la production de médiateurs pro-inflammatoires. La production d'IFN-γ, ou bien de TNF-α, par les cellules T $CD8^+$, lorsqu'elle est excessive peut activer la dysérythropoïèse et la phagocytose des hématies [111:Perkins 2011].

4.2.b. Malaria placentaire.

Chez la femme enceinte, l'infection par *Plasmodium*, et de façon plus sévère dans le cas de *P. falciparum*, peut être pernicieuse et peut causer une insuffisance placentaire, un accouchement prématuré, un faible poids à la naissance ou encore une perte du fœtus [114:Schofield 2005]. Par ailleurs, en cas de grossesse, le risque pour la mère de développer une anémie sévère, une hypoglycémie ou de l'œdème pulmonaire après infection par *Plasmodium* est augmenté. Bien que les informations soient limitées, il a été montré que la pathologie est associée à une forte adhésion des hématies infectées aux syncytiotrophoblastes. Il semble également qu'au niveau du placenta, la réponse T_H1 antiparasitaire, soit délétère pour le développement fœtal [112:White 2013 - 115:Rogerson 2007]. La complication placentaire est en effet caractérisée par la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires ainsi que par le recrutement de monocytes [116:Hviid 2010].

4.2.c. Malaria pulmonaire.

D'autre part, 5 % des patients souffrant de malaria clinique et 20 à 30 % des patients atteints de malaria sévère développent une pathologie pulmonaire [117:Mohan 2008]. En particulier après infection par *P. falciparum*, certains patients développent des troubles respiratoires allant de la simple toux au Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA). Il

a été montré qu'elle est souvent associée à une acidose métabolique, mais les mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie respiratoire sont peu connus. Chez l'homme, elle est corrélée avec de l'œdème et des hémorragies pulmonaires ponctuelles, la séquestration d'hématies (parasitées on non), la congestion des capillaires sanguins et le recrutement de monocytes/macrophages et de neutrophiles [118:Taylor 2012 - 119:Milner 2013].

Dans les études récentes effectuées sur des modèles murins, la pathologie pulmonaire est également caractérisée par de l'œdème, avec une augmentation de la perméabilité vasculaire et des hémorragies [120:Van den Steen 2010]. Les mécanismes de la pathogenèse sont peu définis, mais la complication semble fortement liée à la séquestration CD36-dépendante du parasite dans les poumons [121:Lovegrove 2008 - 122:Anidi 2013] et à la présence du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dans le sang [123:Epiphanio 2010]. La pathologie est aussi associée à une inflammation pulmonaire, caractérisée par la production de chimiokines (comme CCL2, CXCL2, CXCL10 ou CCL5) et de cytokines pro-inflammatoires (telles IFN-γ, TNF-α, IL-6 ou IL-1β) [124:Deroost 2013]. L'inflammation conduit à l'accumulation de leucocytes [120:Van den Steen 2010], et plus particulièrement à un recrutement précoce de neutrophiles dans les poumons [125:Souza 2013].

Table 1 | **Severe and fatal disease syndromes in malaria**

Syndrome	Clinical features	Possible sequence or mechanism of disease
Cerebral malaria	Sustained impaired consciousness, coma, long-term neurological sequelae	Cerebral parasite sequestration; bioactive GPI; pro-inflammatory cytokine cascade; endothelial-cell activation; natural killer T-cell activation; T_H1/T_H2-cell balance; chemokine production; monocyte, macrophage and neutrophil recruitment; platelet and fibrinogen deposition; $CD4^+$, $CD8^+$ and γδ T-cell involvement; IFN-γ production; neurological metabolic derangements; possibly hypoxia
Placental malaria	Placental insufficiency, low birth weight, premature delivery, loss of fetus	*Plasmodium falciparum* EMP1-mediated binding to placental endothelium and syncytiotrophoblast through chondroitin sulphate A and hyaluronic acid; cytokine production; chemokine-mediated recruitment and infiltration of monocytes; intravascular macrophage differentiation
Severe malarial anaemia	Pallor, lethargy, haemoglobin level of 4–6 g per 10 ml	Erythropoietic suppression by toxins and cytokines; increased RBC destruction, owing to parasitization, RBC alterations, complement and immune complex or antigen deposition, erythrophagocytosis, splenic hyperphagism, $CD4^+$ T cells, T_H1/T_H2 cytokine balance (TNF and IFN-γ versus IL-10)
Metabolic acidosis	Respiratory distress, deep breathing (Kussmaul breathing), hypovolaemia	Molecular mechanisms unknown. Possibly widespread parasite sequestration; bioactive toxins; increased vascular permeability; reduced tissue perfusion; anaemia; pulmonary airway obstruction; hypoxia; increased host glycolysis; repressed gluconeogenesis. Some overlap with shock-like syndrome
Shock-like syndrome (systemic inflammatory-response-like syndrome)	Shock, haemodynamic changes, impaired organ perfusion, disseminated intravascular coagulation	Bioactive toxins; T_H1 cytokines; acute-phase reactants

EMP1, erythrocyte membrane protein 1; GPI, glycosylphosphatidylinositol; IFN-γ, interferon-γ; IL-10, interleukin-10; RBC, red blood cell; T_H, T helper; TNF, tumour-necrosis factor.

Figure 17 : Complications de la malaria [114:Schofield 2005]

Enfin, la complication responsable de la grande majorité des décès associés au paludisme est la malaria cérébrale. C'est à cette pathologie que nous nous sommes intéressés et qui sera détaillée dans les parties ***II*** et ***III*** suivantes.

II. LA MALARIA CEREBRALE.

1. Définitions.

La malaria cérébrale, aussi appelée neuropaludisme, est définie par l'OMS comme un coma profond, qui ne peut être attribué à une hypoglycémie, ni à des convulsions (sauf si le coma persiste plus d'une heure après la crise), ou à toute autre encéphalopathie. De plus, ce coma doit être associé à la présence de mérozoïtes de *Plasmodium* dans le sang [126:WHO. 2000].

La malaria cérébrale se développe dans environ 1% des cas d'infection par *P. falciparum*. Cette complication cérébrale est létale chez 15 à 20% des patients. Elle est responsable de 75% des décès attribués à la malaria, dont 90% sont des jeunes enfants en Afrique sub-saharienne [127:Dorovini-Zis 2011]. Les patients présentent des signes d'atteinte neurologique graduelle : avec tout d'abord une prostration, des troubles de la conscience, accompagnés parfois de convulsions ; puis ils développent une paralysie progressive et un coma profond [128:Idro 2005]. 10 à 20% des patients qui survivent à la malaria cérébrale présentent ensuite des séquelles neurologiques, telles que la spasticité (exagération du réflexe myotatique), l'ataxie, l'hémiplégie, des troubles de la parole ou encore la cécité [129:Murphy 2001]. Et à long terme, ils peuvent être atteints d'épilepsie ou de troubles cognitifs [130:Boivin 2007].

Les patients atteints de malaria cérébrale sont traités avec une combinaison d'antipaludiques à forte dose, le plus souvent quinine et artémisinine. Néanmoins, d'autres molécules sont étudiées. Par exemple, des études ont montré que le curcumin possédait non seulement des propriétés antipaludéennes, mais qu'il pouvait aussi être neuroprotecteur. Il semble que le curcumin active la phagocytose des hématies parasitées (CD36 dépendante), puisse diminuer l'expression des molécules d'adhésion, telles ICAM1(*Intercellular Adhesion Molecule* 1) et VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) ou soit capable de réduire la production de cytokines pro-inflammatoires [131:Jain 2013].

2. Séquestration des hématies et neuropathologie.

Aujourd'hui encore les mécanismes précis du développement de la neuropathologie restent parfois incertains et soumis à controverse. En effet, les études sur l'homme sont difficiles à exécuter, et sont confrontées aux disparités observées entre les jeunes enfants (en Afrique) et les adultes (plus étudiés en Asie). Cependant, certains éléments ont été montrés comme étant associés et nécessaires au développement de la malaria cérébrale ; à savoir l'adhésion des hématies infectées et l'hyper-inflammation, qui induisent une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et une atteinte des fonctions neurologiques [127:Dorovini-Zis 2011 - 132:Rowe 2009].

2.1. Cytoadhérence des hématies infectées.

En plus de modifier le métabolisme et la plasticité des hématies qu'il parasite [133:Dondorp 2002], *Plasmodium* induit l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. La molécule d'adhésion la plus connue et la plus étudiée est PfEMP1 (*P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*). Cette protéine parasitaire est impliquée dans la quasi-totalité des cas de cytoadhérence des hématies infectées. Elle a beaucoup été étudiée dans le but initial de développer un vaccin antipaludique. Cependant, il s'est avéré que *P. falciparum* possédait environ 60 variants de PfEMP1, dont l'expression est alternée à chaque cycle/schizogonie. PfEMP1 est impliquée dans l'interaction avec différents récepteurs de l'hôte, notamment ICAM, CD36 ou E-selectine. Il existe 3 types principaux de cytoadhérence (**Figure 18**):

- La **cytoadhérence avec les hématies non infectées** (*Rosetting*) permettrait de rendre les protéines du parasite présentes à la surface des hématies inaccessibles pour les cellules immunes. D'autre part, il s'agit d'un phénomène qui participe à l'obstruction des microvaisseaux sanguins [134:Kaul 1991 - 135:Vogt 2003].

- L'**adhésion avec des plaquettes activées** (*Clumping*) est aussi impliquée dans l'obstruction des vaisseaux [136:Pain 2001]. Ces agrégats de plaquettes et hématies infectées peuvent eux aussi adhérer à l'endothélium et l'activer [137:Cox 2010]. L'activation des plaquettes et leur adhésion aux hématies infectées peut expliquer la thrombocytopénie

observée chez l'homme, comme chez la souris, après infection par *Plasmodium*. Cependant, le rôle des plaquettes est assez discuté. Certaines études ont montré que les plaquettes sont capables d'inhiber le développement intra-érythrocytique de *P. falciparum* et favorisent la survie de souris après infection par *Plasmodium chabaudi* [138:McMorran 2009]. Alors qu'il a aussi été montré que le récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR) serait nécessaire au développement de la malaria cérébrale expérimentale murine [139:Lacerda-Queiroz 2012].

℘ La **cytoadhérence aux cellules endothéliales** est un élément essentiel au développement de la malaria cérébrale. Elle conduit à la séquestration des hématies parasitées dans différents organes dont le cerveau. Les conséquences de cette adhérence sont un dysfonctionnement des cellules endothéliales pouvant conduire à l'apoptose de celles-ci [140:Craig 2012 - 141:Wilson 2008 - 142:Weinberg 2008]. Une cytoadhérence similaire des hématies infectées aux syncytiotrophoblastes est impliquée dans la genèse de la malaria placentaire.

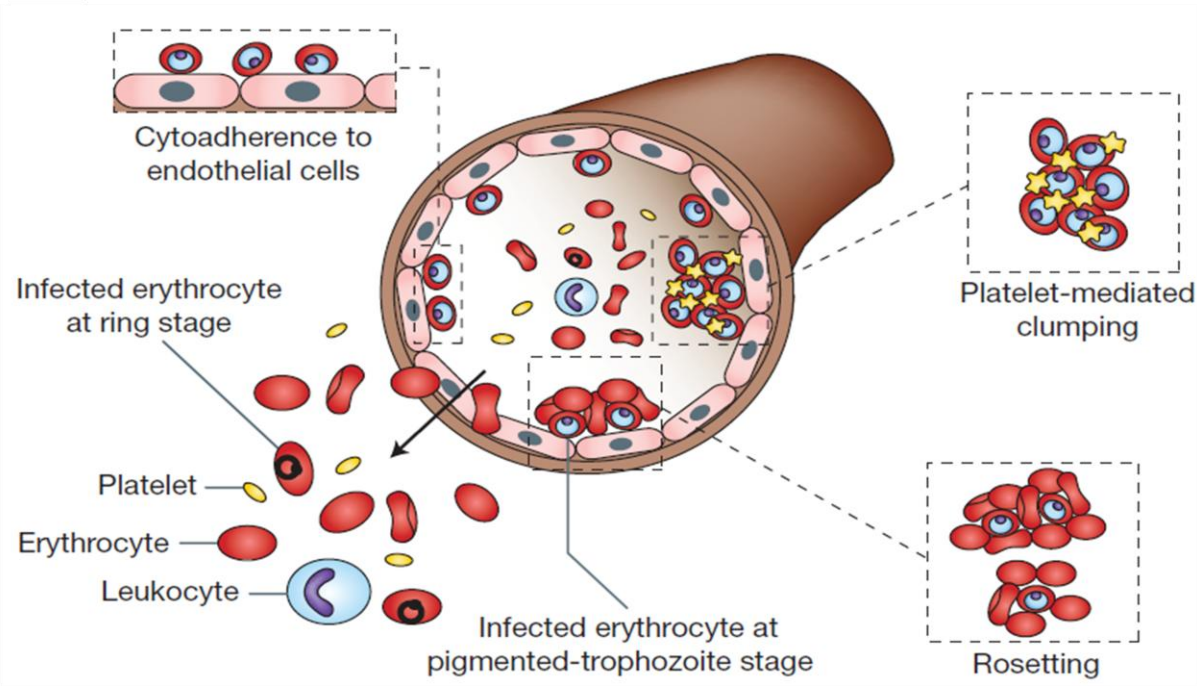


Figure 18 : Adhérence des hématies infectées [132:Rowe 2009].

2.2. Activation de l'endothélium et inflammation.

La séquestration des hématies infectées et des plaquettes au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux est à l'origine de l'activation des cellules endothéliales, qui vont augmenter l'expression de molécules d'adhésion (dont ICAM, CD36 et E-Selectine) à leur surface. A l'inverse, l'expression des protéines des jonctions serrées est réduite, de sorte que la perméabilité vasculaire est augmentée [127:Dorovini-Zis 2011 - 132:Rowe 2009]. Il a aussi récemment été montré que les cellules endothéliales activées sont capables de présenter des antigènes parasitaires à leur surface, probablement après un phénomène semblable à la trogocytose, qui conduit au transfert de matériel parasitaire de l'hématie infectée à la cellule endothéliale [143:Razakandrainibe 2012]. Enfin, les cellules endothéliales, sous l'effet de la cytoadhérence sont susceptibles de produire des médiateurs pro-inflammatoires [132:Rowe 2009].

De plus, la séquestration des hématies infectées conduit à une inflammation locale. L'activation de l'endothélium participe au recrutement des cellules immunes et à leur activation. Mais de la même façon, la réponse immunitaire est elle-même responsable de l'activation de l'endothélium, via la présence de cytokines pro-inflammatoires et l'activité cytotoxique de certaines cellules [144:Combes 2010]. Ces différents points seront détaillés dans la partie ***III.***

2.3. Neuropathologie.

La séquestration des hématies infectées, l'activation de l'endothélium et la réponse immune excessive engendrent une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dégradation de la BHE est à l'origine d'altérations du fonctionnement du tissu cérébral [128:Idro 2005].

En effet, la stimulation de l'endothélium conduit à l'activation et à l'endommagement des différents composants de l'unité neurovasculaire : les astrocytes, les cellules microgliales, les neurones et les cellules endothéliales de la BHE. Ainsi, la perméabilité de l'endothélium vasculaire cérébral, induite par l'adhérence des hématies parasitées, permet le passage de substances plasmatiques neurotoxiques dans le cerveau : notamment l'albumine sérique, des médiateurs pro-inflammatoires ou des toxines libérées

par le parasite. De plus, les cellules endothéliales libèrent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines des deux côtés de l'endothélium [145:Grab 2011 - 146:Renia 2012]. Au sein du SNC, les chimiokines sont susceptibles d'altérer les interactions entre les astrocytes et les neurones. Effectivement, chez l'homme, au cours de la malaria cérébrale, les macrophages périvasculaires sont activés [147:Deininger 2002]. Une analyse du liquide céphalo-rachidien chez des enfants kényans atteints de malaria cérébrale a mis en évidence la présence de marqueurs de lésions axonales et astrocytaires [148:Medana 2007]. Et, l'altération des la fonction neuronale est parfois associée à des zones de démyélinisation [127:Dorovini-Zis 2011].

Aux derniers stades de la pathologie d'importantes hémorragies sont observées au niveau des hémisphères cérébraux, du tronc cérébral et du cervelet. L'obstruction des vaisseaux et la perméabilisation de la BHE conduisent à l'apparition de zones ischémiques et d'œdème cérébral, qui peuvent être visualisés via l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (**Figure 19**). [149:Rasalkar 2011 - 150:Potchen 2012]

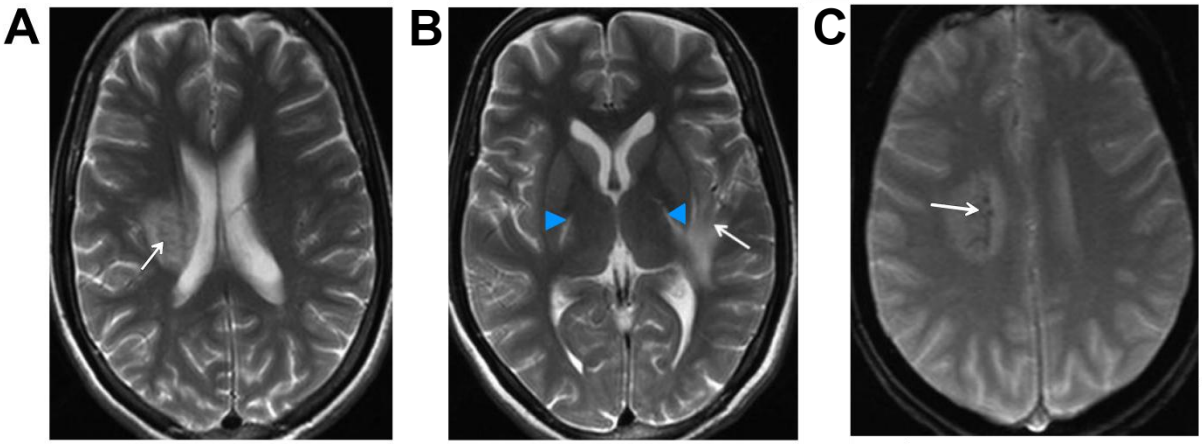


Figure 19 : Images IRM d'une femme de 32 ans atteinte de malaria cérébrale (adapté de [149:Rasalkar 2011])

Coupes axiales (T2) révélant plusieurs zones avec un signal hyperintense (œdème) au niveau de la *corona radiata* (flèche) en **A**, du bras postérieur de la capsule interne (pointes bleues) et du lobe temporal gauche/hippocampe (flèche) en **B**. Une coupe axiale en écho-gradient montre une hémorragie au niveau de la *corona radiata* (flèche) en **C**.

3. Modèles animaux.

Aujourd'hui encore, il reste de nombreux processus impliqués dans la Malaria cérébrale peu connus, notamment les mécanismes précis de la physiopathologie, ou bien les phénomènes de résistance observés chez certains habitants des zones endémiques. En effet, il est assez difficile d'étudier la pathologie chez l'homme. D'une part, la malaria cérébrale est une complication sévère dont la progression est très rapide ; la grande majorité des décès se produisent 24 à 48H après l'admission à l'hôpital. Et d'autre part, les techniques d'analyses précises du cerveau sont compliquées à mettre en place dans les zones endémiques. La plupart des conclusions sur la pathologie cérébrale humaine ont été réalisées *post-mortem*, essentiellement en histologie [151:Craig 2012]. L'utilisation de modèles animaux est essentielle afin de détailler les mécanismes impliqués dans la pathogenèse, dans le but de développer des traitements efficaces, curatifs et préventifs.

3.1 Modèle primate non-humain.

Les primates non-humains ont pour avantage d'avoir une physiologie très proche de l'homme et on suppose qu'ils permettent de reproduire au mieux ce qui se passe chez les patients. La malaria cérébrale peut être induite chez les macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) via l'infection par *P. knowlesi*, *P. coatneyi* et *P. fragile*. La complication cérébrale peut aussi être étudiée chez le macaque japonais (*Macaca fuscata*), infecté par *P. coatneyi*, et chez le babouin olive (*Papio anubis*) infecté par *P. knowlesi*. Néanmoins, les études chez les primates non-humains sont confrontées aux difficultés inhérentes à l'utilisation de ces espèces dans le cadre d'expérimentation animale, mais aussi à une variabilité dans la fréquence et le degré clinique du développement de la malaria cérébrale [151:Craig 2012].

3.2 Modèle murin.

Le modèle murin est, quant à lui, techniquement plus simple à utiliser, et la disponibilité de nombreuses souches de souris et de parasites permet l'étude de différents aspects de la malaria. Chez la souris, la malaria cérébrale est généralement étudiée après infection par *Plasmodium berghei* (K173 ou ANKA) de souris C57BL/6 ou CBA, bien que l'espèce *Plasmodium yoelii* soit aussi connue pour induire une pathologie cérébrale chez les souris Swiss et BALB/c. La malaria cérébrale expérimentale (ECM) est caractérisée par

l'apparition de symptômes neurologiques qui reproduisent une grande partie des signes présents chez les patients (**Figure 20**) et qui conduisent à la mort des souris 7 à 10 jours après infection. Les souris atteintes d'ECM présentent une obstruction des micro-vaisseaux cérébraux, par l'adhésion de nombreuses hématies (parasitées ou non), des zones hémorragiques et la séquestration de leucocytes dans les vaisseaux. Les études chez la souris ont par exemple permis de mettre en évidence le rôle spécifique de lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques, de certaines cytokines et de l'activation endothéliale, dans le développement de l'ECM [151:Craig 2012 - 152:de Souza 2002]. Le modèle murin est parfois déprécié en raison des variations observées au niveau de la cytoadhérence dans les vaisseaux cérébraux. En effet, chez l'homme, après infection par *P. falciparum*, une grande quantité d'hématies infectées sont séquestrées dans les vaisseaux [153:Pongponratn 2003 - 154:Toure 2007], alors que chez la souris, la présence des hématies infectées semble faible par rapport à la parasitémie périphérique [155:White 2010]. Les études précliniques sont également parfois discréditées, en particulier lorsque le traitement est administré aux animaux avant ou au moment de l'infection [151:Craig 2012].

Feature	Presence or frequency		
	Human CM		Murine CM[d]
	Children[b]	Adults[c]	
Behavioural changes			
Convulsions	Yes	Yes	Yes
Paralysis, seizures	Yes	Yes	Yes
Histopathological features: brain			
Astrocyte morphological changes	DG	DG	Yes
Microglial morphological changes or activation	Yes	Yes	Yes
pRBC accumulation in vessels or vascular obstruction	Yes	Yes	Yes
Mononuclear leukocyte accumulation in vessels or adhesion to endothelium	Yes	Yes	Yes
Presence of platelets in microvessels	Yes	NR	Yes
Parenchymal haemorrhage	Yes	Yes	Yes
Neuronal damage	NR	Yes	Yes
Oedema at terminal stage	Yes	Yes	Yes
Focal demyelination	NR	Yes	Yes
Histopathological features: retina[e]			
Haemorrhage	Yes	Yes	Yes
Immunological parameters			
Ig, C3, malarial antigen brain deposits	NR	Yes	Yes
High serum TNF	Often	Often	Yes
High serum soluble TNFR1 and soluble TNFR2	Yes	Yes	Yes
Blood–brain barrier function			
Increased vascular permeability to macromolecules	Yes	Controversial	Yes
Expression of molecules in brain or retina			
TNF mRNA and protein expression	Yes	Sometimes	Yes
IL-1β mRNA	Yes	NR	Yes
ICAM-1 and VCAM-1 on endothelium	Yes	Yes	Yes
TNFR2	Yes	NR	Yes
Haem oxygenase-1	NR	Yes	Yes
Biochemical changes in brain			
Increased lactate	Yes	Yes	Yes
Increased kynurenine pathway metabolites	Yes	Yes	Yes

Figure 20 : Comparaison des signes de malaria cérébrale chez l'homme et chez la souris [156:Hunt 2003]

Dans notre étude, nous avons employé le clone 15cy1 d'une souche de *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) transfectée à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) [157:Franke-Fayard 2004]. Le parasite exprime constitutivement cette protéine fluorescente tout au long de son cycle. Nous avons étudié l'infection au stade sanguin, les hématies infectées par *Pb*A pouvant être congelées puis utilisées afin d'infecter d'autre souris directement avec des mérozoïtes. Nous avons également réalisé des infections à partir du stade pré-érythrocytique. Pour cela, les sporozoïtes doivent être fraichement extraits de glandes salivaires de moustiques (*Anopheles stephensi*) infectés par *Pb*A, puis injectés par voie sanguine.

III. REPONSE IMMUNE ET MALARIA CEREBRALE.

L'origine précise de la complication cérébrale après infection par *Plasmodium* fait depuis longtemps débat. Est-ce la séquestration des hématies dans les micro-vaisseaux du cerveau qui est la source de la neuro-inflammation, et donc de la malaria cérébrale ? Ou bien est-ce la réponse du système immunitaire qui favorise la cytoadhérence et provoque une inflammation excessive dans le cerveau ? La réponse à ces questions reste complexe et est encore débattue. Cependant il est sûr que ces deux mécanismes, séquestration des hématies et inflammation excessive, sont interdépendants et nécessaires au développement de la malaria cérébrale. La compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la réponse immunitaire est essentielle, non seulement pour la recherche de vaccin, mais aussi afin de développer des thérapies contre l'évolution sévère de l'infection.

1. Reconnaissance du parasite et activation du système immunitaire de l'hôte.

1.1 Détection de *Plasmodium*.

La séquestration des hématies parasitées au sein des micro-vaisseaux des organes profonds permet au protozoaire d'éviter l'élimination de ses cellules hôtes au niveau de la rate. Ainsi, pour sa survie, le parasite induit l'expression de molécules d'adhésion de type EMP1 (*Erythrocyte Membrane Protein 1*), à la surface des hématies. Les variants d'EMP1 permettent l'adhérence des hématies, par l'intermédiaire de récepteurs de l'hôte (ICAM, VCAM, CD31, CD36 ou encore E-Selectine). Cependant, les hématies infectées sont aussi une source de produits parasitaires bioactifs, notamment lors de la lyse des hématies pour la libération des mérozoïtes [114:Schofield 2005]. Ces éléments parasitaires possèdent des motifs spécifiques – *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP) – reconnus comme pathogéniques par des récepteurs de l'hôte – *Pattern Recognition Receptors* (PRR) – et sont capables d'activer les cellules effectrices du système immunitaire de l'hôte, tout comme les cellules endothéliales (**Figure 21**).

Parasite product	Receptor and cell type	Pathological and cellular effects
Plasmodium falciparum EMP1-family members	ICAM1, VCAM1, CD36, thrombospondin, E-selectin, chondroitin sulphate A, hyaluronic acid and CD31 on endothelial cells and trophoblast cells; CD36 on DCs	Binding directs parasite to the brain, placenta and possibly other target organs; CD36 engagement proposed to suppress DC and macrophage activation
GPI	TLR2, TLR4 and/or possibly C-type lectins on several cell types, including DCs, macrophages, endothelial cells and adipocytes; CD1d and Vα14–Vβ8 TCR on NKT cells	Induces widespread expression of genes encoding pro-inflammatory proteins (including TNF, IL-1, IL-6, IL-12, iNOS, ICAM1, VCAM1); activates NKT cells; induces T_H1- or T_H2-cytokine production
Haemozoin	TLR9 on DCs	Contradictory reports: both T_H1- and T_H2-cell activities; induces and inhibits DCs; suppresses macrophages; induces IL-10 production; broadly immunosuppressive
Unknown ligands	NKC-encoded receptors on NK and NKT cells	Activates NK cells; induces IFN-γ production; regulates balance of T_H1 and T_H2 cytokines produced by NKT cells
Isopentenyl pyrophosphate	γδ TCRs	Activates γδ T cells; induces IFN-γ production
Protein antigens	Diverse TCRs on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells	Activates αβ T cells; induces T_H1- or T_H2-cytokine production
Unknown sugar(s)	MBL in plasma	Possible binding provides protection; low levels of MBL are associated with disease

DC, dendritic cell; EMP1, erythrocyte membrane protein 1; E-selectin, endothelial-cell selectin; GPI, glycosylphosphatidylinositol; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; IFN-γ, interferon-γ; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; MBL, mannose-binding lectin; NK, natural killer; NKC, natural killer complex; NKT, natural killer T; TCR, T-cell receptor; T_H, T helper; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumour-necrosis factor; VCAM1, vascular cell-adhesion molecule 1.

Figure 21 : Composés de *Plasmodium* et leur bio-activité [114:Schofield 2005].

℘ Les **ancres glycosylphosphatidylinositol** (GPI) sont présentes en très faible quantité au niveau des membranes plasmiques chez les eucaryotes. A l'inverse, elles sont abondantes chez de nombreux parasites protozoaires comme *Plasmodium* [158:Arrighi 2010]. Il a été montré que les ancres GPI sont des ligand du TLR2 [159:Nebl 2005]. Et Schofield *et al*. ont mis en évidence que les ancres GPI ont des propriétés pro-inflammatoires. En effet, la stimulation par les ancres GPI induit la production de cytokines telles que le TNF-α, l'IL-1 ou l'IL-12, par les macrophages [160:Schofield 1993]. L'activation du TLR2 peut également promouvoir la production d'IFN-I. La signalisation TLR2 induit entre autres l'expression du facteur de transcription IRF3 (dont l'activation conduit à la synthèse d'IFN-I) [161:Perkins 2013]. De plus, les ancres GPI de *Plasmodium* entraînent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 et d'E-Selectine par les cellules de l'endothélium vasculaire, favorisant ainsi l'adhérence des hématies parasitées et des leucocytes [162:Schofield 1996].

℘ L'**hémozoïne** est issue de la dégradation de l'hémoglobine par *Plasmodium*. Ainsi, alors que la partie globine est utilisée comme source d'acides aminés, l'hème, toxique pour la cellule, est transformé en un cristal insoluble et coloré : l'hémozoïne. L'activité

biologique de l'hémozoïne est encore discutée. En effet, il a été montré qu'elle pouvait directement activer la voie TLR9/MyD88 des cellules dendritiques [163:Coban 2005]. Mais il a aussi été observé que l'hémozoïne permet uniquement de fixer l'ADN parasitaire et de promouvoir son internalisation, et sa signalisation par TLR9 [164:Parroche 2007]. Néanmoins, chez l'homme, les patients présentant des signes de malaria sévère présentent un nombre plus élevé de monocytes et de macrophages contenant de l'hémozoïne [114:Schofield 2005]. De plus, l'hémozoïne est également susceptible d'entraîner une dysfonction des monocytes/macrophages, notamment un défaut de phagocytose et une réduction de l'expression du CMH_{II}, de CD11c ou encore d'ICAM [165:Schwarzer 1992 - 166:Schwarzer 1996], et d'avoir des effets immunosuppresseurs [167:Scorza 1999].

℘ L'**ADN** de *Plasmodium* a aussi été montré comme pouvant activer TLR9 [164:Parroche 2007 - 168:Wu 2010]. Néanmoins, notre équipe a mis en évidence que l'ECM induit par *Pb*A peut de développer en l'absence des voies TLR1, -2, -3, -4, -6, -7, ou -9, indiquant que des voies différentes des TLR devaient également contribuer au développement de l'ECM [169:Togbe 2007]. Effectivement, il a aussi été rapporté que des motifs d'ADN de *Plasmodium* riches en AT peuvent être détectés par des senseurs cytosoliques, comme STING (*Stimulator of Interferon Genes* ou TMEM173), et activer ainsi la production d'interférons de type I [170:Sharma 2011].

1.2 Réponse immune à *Plasmodium* et malaria cérébrale.

Alors que chez l'homme le rôle des différents leucocytes dans le développement de la malaria cérébrale est peu défini, chez la souris, l'action des leucocytes a été clairement détaillée. Et plus particulièrement, l'importance de la séquestration de leucocytes et de plaquettes dans les micro-vaisseaux cérébraux, induisant localement une forte inflammation de type T_H1, a été spécifiée [114:Schofield 2005].

L'inflammation qui intervient lors de la malaria cérébrale est singulière car elle se produit au sein des vaisseaux sanguins (où est séquestré le parasite) et n'implique pas d'extravasation des leucocytes dans le tissu cérébral. Néanmoins l'activation des cellules endothéliales conduit à la libération de médiateurs pro-inflammatoires des deux côtés de l'endothélium et mène à la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique. Il a, par exemple, été montré que l'activation des cellules microgliales (macrophages résidents du

cerveau) précédait le recrutement de leucocytes, dont les cellules T $CD8^+$, dans les vaisseaux cérébraux [171:Pais 2005].

Les plaquettes ont également un rôle important dans l'activation de l'inflammation. Elles ont un effet direct (via l'adhésion) ou indirect (via le relarguage de médiateurs pro-inflammatoires) sur l'activation de l'endothélium, augmentant aussi la perméabilité et la susceptibilité à l'apoptose. De plus, elles favorisent le recrutement des leucocytes et des hématies infectées, d'une part en activant l'expression de molécules d'adhésion, telles que ICAM-1, par les cellules endothéliales, et d'autre part en servant d'intermédiaire entre l'endothélium et les cellules séquestrées (via l'expression de récepteurs comme ICAM-2, le fibrinogène, E-Selectine ou CD36) (**Figure 22**) [114:Schofield 2005 - 137:Cox 2010].

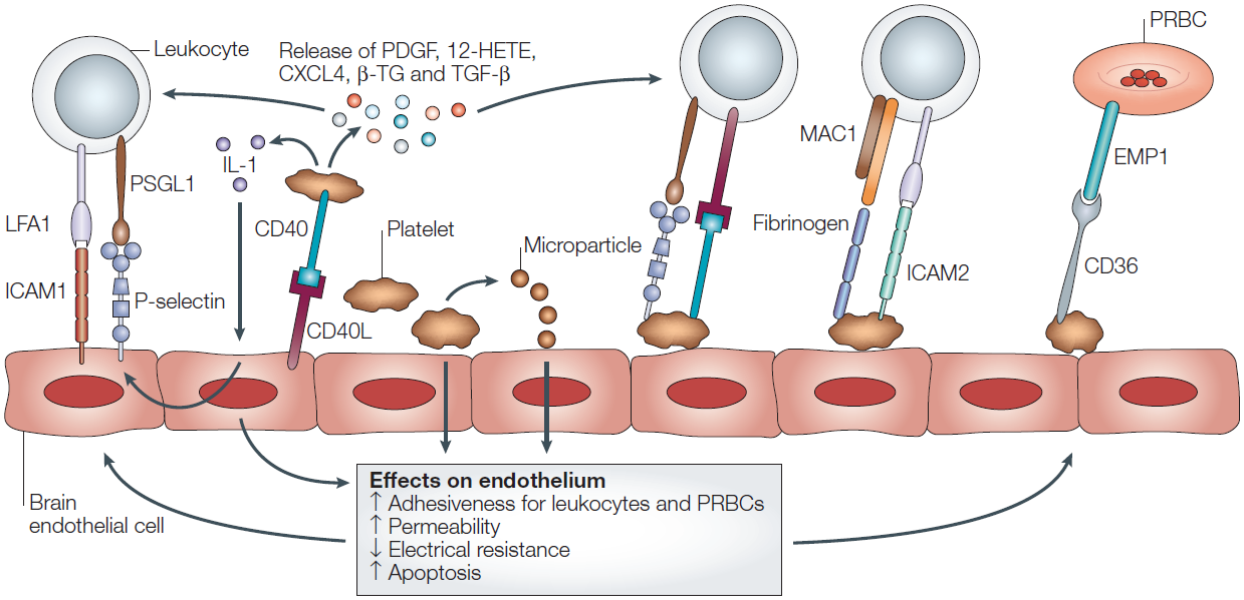


Figure 22 : Mécanismes d'interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales dans la malaria cérébrale [114:Schofield 2005]

Dans les microvaisseaux du cerveau, au niveau des sites de séquestration et d'inflammation, les monocytes acquièrent des caractéristiques de macrophages (pseudopodes, taille augmentée, vacuoles), bien qu'ils soient dans le compartiment vasculaire. Les monocytes/macrophages sont recrutés dans les micro-vaisseaux cérébraux et participent à l'inflammation excessive [172:Chua 2013]. Ils produisent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, notamment des espèces réactives d'oxygène (ROS) qui favorisent l'apoptose des cellules endothéliales [173:Woller 2008]. Enfin, après activation

par les hématies infectées ou par des antigènes parasitaires, les monocytes/macrophages sont susceptibles de produire de la thromboplastine, ou facteur tissulaire. Et ainsi, l'activation de la coagulation participerait à l'obstruction des vaisseaux dans le cerveau [174:Imamura 2002].

L'inflammation associée à la malaria cérébrale est communément définie comme de type T_H1, néanmoins des éléments de la réponse pro-T_H2 dite 'allergique' ont été impliqués dans le développement de la pathologie chez la souris. Dès la piqûre par l'Anophèle, les mastocytes sont recrutés au niveau du derme. Leur dégranulation, IgE-indépendante, initie une inflammation locale. Et la vasodilatation entrainée par l'histamine facilite la propagation des sporozoïtes. Il a été montré que *Pb*A induisait la production d'histamine, probablement par la voie IgE/FcεRI et par l'activation de TLR2, par les mastocytes et basophiles. De plus, l'histamine induit, au niveau de la barrière hémato-encéphalique, la production d'oxyde nitrique (NO), des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, et favorise la perméabilité vasculaire. La déficience en histidine décarboxylase (HDC, enzyme nécessaire à la synthèse de l'histamine) induit la résistance des souris à l'ECM induite par *Pb*A [175:Mecheri 2012]. Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence que les mastocytes pouvaient également libérer le facteur Flt3L, en réponse à l'acide urique, et ainsi induire l'expansion et l'activation de DC spécifiques de *Plasmodium* [176:Guermonprez 2013]. Aussi, la déplétion des neutrophiles permet de protéger les souris contre le développement de l'ECM. Après infection par *Pb*A, des neutrophiles $FcεRI^+$ (Récepteur I au IgE, de haute affinité) sont recrutés dans le cerveau et produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-12p40, l'IL-18, le TNF-α et l'interféron γ (IFN-γ), et des chimiokines comme CCL3 (chimiokine à motif C-C 3) et CXCL9 (chimiokine à motif C-X-C 9) [114:Schofield 2005 - 175:Mecheri 2012 - 177:Porcherie 2011].

Enfin, les cellules *Natural Killer* (NK) ont un rôle d'intermédiaires essentiels entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, Hansen *et al.* ont montré qu'ils sont recrutés précocement dans le cerveau, dès le jour 4 après infection par *Pb*A. Les cellules NK sont une source importante d'IFN-γ, activées par le contact avec les hématies parasitées, et permettent le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$, par la voie du récepteur CXCR3 (récepteur de chimiokine à motif C-X-C 3) [178:Hansen 2007 - 179:Artavanis-Tsakonas 2003].

Par ailleurs, les cellules NK ont aussi été présentées comme activatrices de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (DC). Ces DC sont ensuite capables d'activer de façon antigène-spécifique les cellules T $CD8^+$ après infection par *Pb*A chez la souris [180:Ryg-Cornejo 2013]. En effet, les DC semblent également être importantes pour le développement de la neuropathologie. Une étude a d'abord mis en évidence que la déplétion des DC $CD11c^{high}$ $Clec9A^+$ $CD8^+$ induisait une protection contre l'ECM induite par *Pb*A, par l'intermédiaire d'une réduction de cellules T cytotoxiques, et d'hématies infectées dans le cerveau [181:Piva 2012]. De façon similaire, il a été montré que des souris déficientes pour le récepteur DCIR – *CLR(C-type Lectin) DC Immuno-Receptor* – un PRR spécifique des DC présentaient une diminution de l'activation et du recrutement des cellules T cytotoxiques et étaient résistantes à l'ECM induit par *Pb*A [182:Maglinao 2013].

Néanmoins, il semble que *Plasmodium* ait développé des stratégies afin d'échapper à la réponse immune. Il a en effet été montré que l'infection par *P. yoelii* peut induire une réduction du pourcentage de DC exprimant le facteur BAFF (*B Cell Survival Factor*), entrainant une inhibition de l'induction des cellules B mémoires [183:Liu 2012]. De plus, *P. Chabaudi* AS est capable d'altérer la lymphopoïèse des cellules B au niveau de la moelle osseuse, ces dernières ayant un rôle important pour la clairance de *P. Chabaudi* [184:Bockstal 2011].

2. Rôle des cellules T dans la malaria cérébrale.

Chez l'homme, le rôle des lymphocytes T dans le développement de la malaria cérébrale est difficile à évaluer, et reste mal défini. Cependant, les premières études réalisées chez la souris ont montré que le développement de la malaria cérébrale expérimentale est dépendant des lymphocytes T [185:Grau 1986 - 186:Yanez 1996]. Depuis, différentes études ont confirmé cette hypothèse et ont permis de détailler la participation des cellules T dans la neuropathologie.

2.1 Contribution des lymphocytes au développement de la malaria cérébrale.

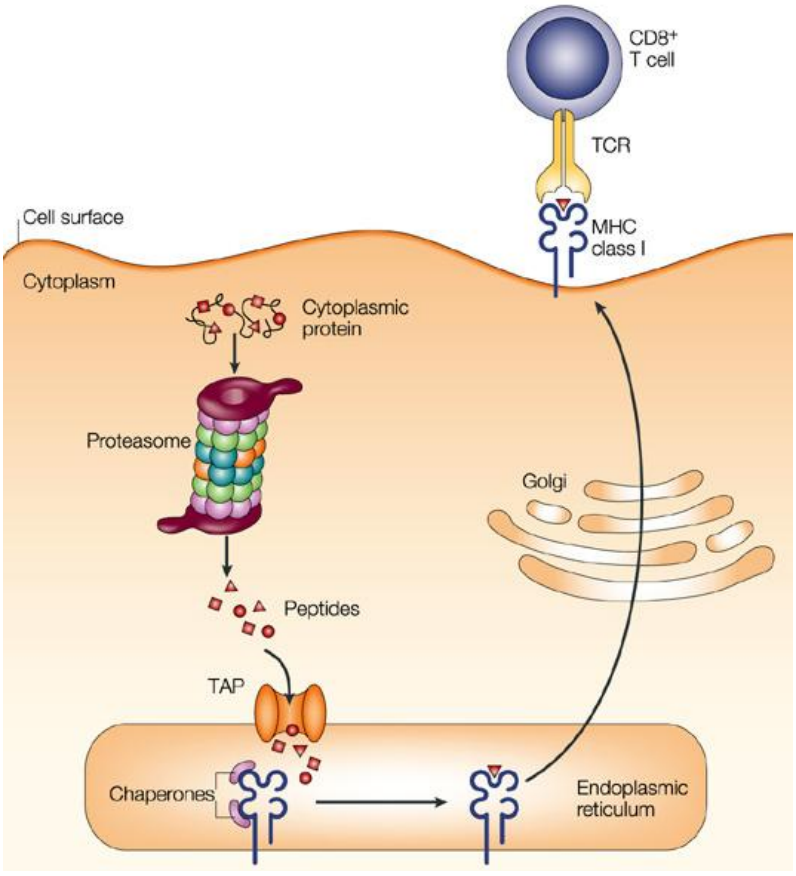
2.1.a. Rôle des cellules T $CD8^+$.

Le développement de la malaria cérébrale expérimentale (ECM) est dépendant de l'activation et du recrutement de lymphocytes T αβ $CD8^+$ dans le cerveau. En effet, Belnoue *et al*. ont démontré qu'un recrutement de lymphocytes T dans les vaisseaux cérébraux était corrélé avec l'apparition des symptômes neurologiques associés à l'ECM. Et ils ont décrit que la déplétion des cellules T $CD8^+$ permettait la protection contre l'apparition d'ECM chez les souris infectées par *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) [187:Belnoue 2002].

Le développement de l'ECM implique une activation des lymphocytes T $CD8^+$, spécifiques du stade sanguin de *Plasmodium*. En effet, Bagot *et al*. ont montré qu'une infection par le stade sporozoïte comme par le stade mérozoïte de *Pb*A induisait le recrutement dans le cerveau de cellules T $CD8^+$ provoquant l'ECM. Ces lymphocytes $CD8^+$ sont activés, comme l'indique l'expression des marqueurs d'activation CD69 et de CD44, ils présentent également une sous-expression de CD62L, et produisent de l'IFN-γ ou du TNF-α [188:Bagot 2004]. Plus tard, la spécificité de la réponse lymphocytaire a été confirmée. Ainsi, des splénocytes de souris infectées par *Pb*A, restimulés *ex vivo* en co-culture avec des DC ayant été pré-incubées avec un lysat du parasite, montrent une plus forte production d'IFN-γ et de TNF-α, par rapport à des splénocytes de souris naïves [189:Lau 2011]. Il semblerait donc qu'il y ait une activation antigène-spécifique de la réponse T $CD8^+$, au niveau de la rate, site principal de l'élimination des hématies infectées. Néanmoins, il n'est pas encore clair si les cellules T impliquées dans la neuropathologie sont activées dans les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate, ou bien dans le cerveau [135:Razakandrainibe 2012]. En revanche, Miyakoda *et al.* ont réalisé une étude montrant que l'infection par *Pb*A induit l'activation de cellules T $CD8^+$ spécifiques et non-spécifiques d'antigènes. L'utilisation d'une souche de parasite exprimant de l'ovalbumine dans son cytosol (OVA-*Pb*A) leur a permis de mettre en évidence des cellules T $CD8^+$ activées de façon non spécifique par les cellules NK, ainsi que des cellules T $CD8^+$ spécifiques de l'antigène. De plus, des lymphocytes T $CD8^+$ antigène-spécifiques qui sont recrutés dans le cerveau présentent une activité cytotoxique capable d'induire l'ECM. Il semble que ces lymphocytes soient activés par des cellules

présentatrices d'antigènes, qui exposent les épitopes de *Pb*A après une cross-présentation canonique sur le CMH_I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I). Des souris déficientes pour le transporteur TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) ne présentent pas de cellules T $CD8^+$ activées de façon antigène-spécifique [190:Miyakoda 2008]. En effet, TAP a pour fonction de transporter les peptides, issus de la dégradation des protéines du pathogène par le protéasome, dans le réticulum endoplasmique, où ils sont associés au CMH_I [191:Gromme 2002]. Le complexe est alors transporté au niveau de la membrane plasmique et les épitopes peuvent être reconnus par un TCR spécifique (**Figure 23**).

Les cellules T $CD8^+$ recrutées dans le cerveau libèrent des cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α, et participent ainsi à l'exagération de l'inflammation. Elles ont aussi une forte



activité cytotoxique. Par ailleurs, il semble que les cellules endothéliales vasculaires puissent aussi présenter des antigènes de *Plasmodium*, pouvant alors être reconnus par les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques. Puis, les lymphocytes $CD8^+$, par l'intermédiaire de la voie Perforine et Granzyme B, provoquent la lyse des cellules endothéliales. Il apparait donc que les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques sont nécessaires au développement de l'ECM, entre autres par leur

implication dans la dégradation de la barrière hémato-encéphalique [143:Razakandrainibe 2012 - 178:Hansen 2007 - 189:Lau 2011 - 192:Suidan 2008].

Figure 23 : Voie canonique de la cross-présentation sur le CMH_I [193:Yewdell 2003].

2.1.b. Rôle des cellules T $CD4^+$.

L'infection par *Pb*A implique non seulement le recrutement de lymphocytes T $CD8^+$ dans les micro-vaisseaux cérébraux, mais aussi celui de lymphocytes T_H1 $CD4^+$, qui participent au développement de la neuropathologie [194:Amante 2010]. En effet, les cellules T $CD4^+$ sont une source importante d'IFN-γ, essentiel pour le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$. Ainsi, le transfert de cellules T $CD4^+$ compétentes permet de retrouver un phénotype de sensibilité à l'ECM, chez des souris résistantes, déficientes en IFN-γ, [195:Villegas-Mendez 2012]. Les cellules T $CD4^+$ séquestrées dans le cerveau sont activées, comme le révèle l'expression des marqueurs CD69 et CD44, mais n'expriment pas le CD62L [196:Nitcheu 2003]. Cependant, le recrutement seul des lymphocytes T $CD4^+$ n'est pas suffisant pour induire l'ECM. Effectivement, alors que les souris déficientes pour le récepteur à l'interféron γ ($IFN\text{-}\gamma R^{-/-}$) ne développent pas de pathologie cérébrale, elles présentent néanmoins un recrutement de cellules T $CD4^+$ restant insuffisant pour déclencher l'ECM [197:Belnoue 2008]. De plus, outre les cellules T_H1 $CD4^+$, d'autres types cellulaires sont capables de produire de l'IFN-γ, notamment les monocytes, les cellules NK et les cellules NKT [198:Hansen 2003].

Par ailleurs, peu d'études ont adressé le rôle des cellules T_H17 $CD4^+$ dans le développement de la pathologie cérébrale. Chez l'homme il a été montré que, dans la circulation, le nombre de cellules T $CD4^+$ produisant de l'IL-17 est augmenté après infection par *P. vivax* [199:Bueno 2012]. A l'inverse, chez la souris, l'infection par *Pb*A induit la production d'IL-17, mais par des cellules différentes des T $CD4^+$, et les souris déficientes en IL-17 sont aussi sensibles à l'ECM que les souris de type sauvage [200:Ishida 2010]. Cependant, chez l'homme, la voie T_H17 a été montrée comme étant importante dans la dégradation de la BHE et la neuro-inflammation impliquée dans la sclérose en plaque [201:Kebir 2007]. Ces observations pourraient laisser penser qu'il y a une participation de la réponse T_H17 lors de la malaria cérébrale, mais dont l'importance reste à définir.

Enfin, les études réalisées chez la souris sur le rôle des cellules T régulatrices (T_{reg}) sont assez contradictoires. Dans certains cas, la déplétion des lymphocytes T_{reg} $CD4^+$ $CD25^+$ induit une réduction de la parasitémie, une diminution des signes cliniques et de la mortalité due à l'ECM [202:Hisaeda 2004 - 203:Amante 2007 - 204:Haque 2010]. D'autres études affirment que l'inhibition des cellules T_{reg} n'a pas d'effet sur la parasitémie, ni sur la sévérité de la pathologie cérébrale [205:Vigario 2007 - 206:Couper 2008]. Et enfin, des équipes ont montré que la déplétion de T_{reg} induit, à l'inverse, une aggravation de la pathologie, par l'intermédiaire de l'augmentation du nombre de cellules T $CD4^+$ productrices d'IFN-γ [207:Nie 2007 - 208:Cambos 2008 - 209:Wu 2010]. Les études chez l'homme sont aussi discordantes. Cependant, au vu de l'augmentation précoce du nombre de cellules T_{reg} après infection par *P. falciparum*, Finney, Riley et Walther suggèrent que les lymphocytes T_{reg} pourraient, en régulant la voie T_H1, faciliter la persistance du parasite, et promouvoir une réponse immune mémoire [210:Finney 2010].

2.2 La voie de signalisation PKC-ϑ.

Les cellules T étant essentielles au développement de la malaria cérébrale expérimentale, l'étude des voies impliquées dans la régulation de leurs fonctions est importante. Parmi les différentes voies de signalisation des cellules T, les protéines kinases ont un rôle clé dans l'induction de la prolifération et de la cytotoxicité des lymphocytes [211:Isakov 2012]. La protéine kinase C – θ (PKC-θ) est une protéine de 707 acides aminés, à l'activité sérine/thréonine kinase, dépendante du diacylglycérol (DAG). Elle est fortement exprimée par les cellules T [212:Meller 1999], les plaquettes [213:Cohen 2011] et au sein du muscle strié squelettique [214:Chang 1993].

Lors de l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) et du corécepteur CD28, la kinase est transloquée au niveau de la synapse immunologique. Puis, l'activation de PKC-θ provoque la phosphorylation de différentes protéines, et conduit à l'activation de plusieurs facteurs de transcription : NF-κB (*Nuclear Factor-κB*), CREB (*C-AMP Response Element-Binding protein*), AP-1 (*Activator Protein 1*) et NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) (**Figure 24**)

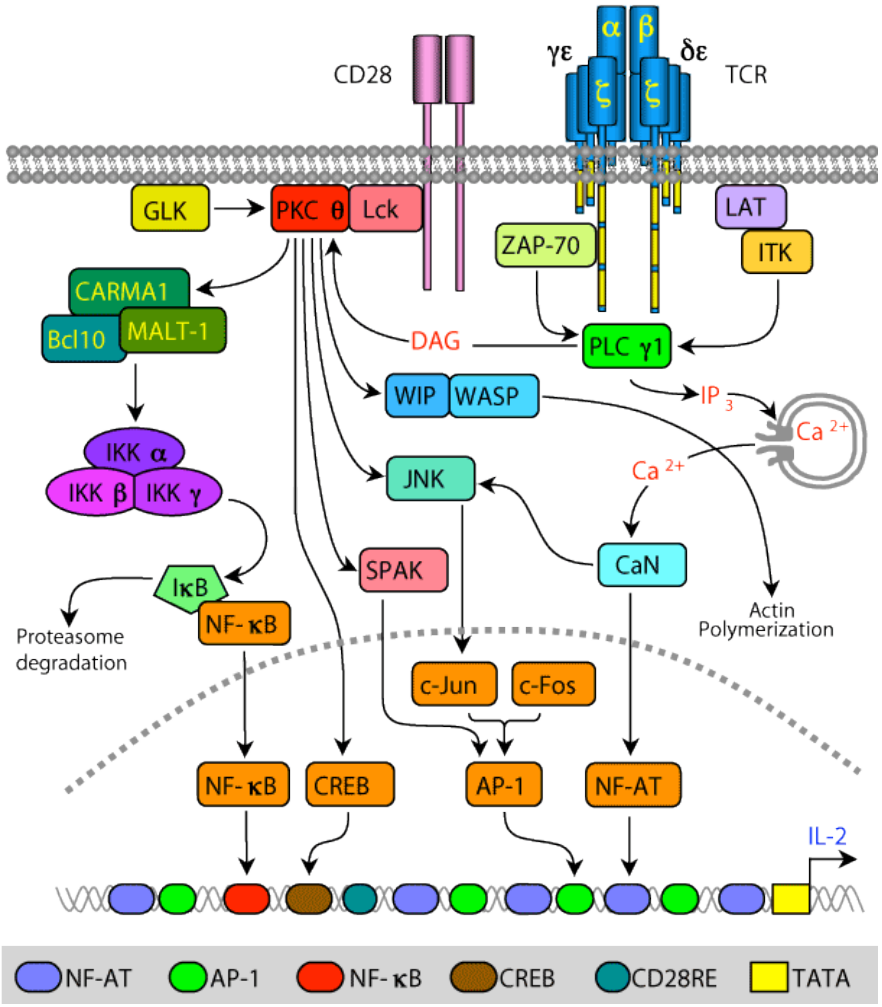


Figure 24 : Régulation du signal de transduction des récepteurs TCR/CD28 activés par PKC-θ [211:Isakov 2012].

La protéine PKC-θ a un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules T. Mais, alors que le développement des lymphocytes naïfs conventionnels $CD4^+$ et $CD8^+$ semble intact en absence de PKC-θ [215:Pfeifhofer 2003], la réponse T est altérée en conditions pathologiques. Effectivement, chez la souris, la voie PKC-θ a été montrée comme nécessaire à la réponse T_H2 aux allergènes [216:Marsland 2004], ou aux helminthes [217:Salek-Ardakani 2005]. L'implication de PKC-θ dans la réponse immune de type T_H1 est variable en fonction de la pathologie concernée. Ainsi, la kinase n'est pas importante pour la réponse T_H1 à l'infection par *Leishmania major* [218:Ohayon 2007]. Mais la déficience en PKC-θ entraîne une réduction de la réponse des cellules T dans des modèles murins de rejet de greffe ou d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale [219:Anderson 2006]. Chez ces souris, les cellules T déficientes en PKC-θ présentent un défaut de production de cytokines pro-T_H1, notamment d'IFN-γ et de TNF-α, ainsi qu'une réduction de la cytotoxicité. De plus, il a été montré que PKC-θ pouvait induire l'expression par les lymphocytes T de

LFA-1 (*Leukocyte Function-Associated Molecule 1*), une molécule d'adhésion ayant une forte affinité pour ICAM-1 [220:Baier 2009].

La réponse T_H1 étant capitale dans le développement de l'ECM, l'ensemble de ces données nous ont conduits à nous interroger sur le rôle de PKC-θ dans la complication cérébrale due à l'infection par *Plasmodium* (*cf.* **Article 1**)

3. Médiateurs de l'inflammation.

La malaria cérébrale est une pathologie causée par une inflammation excessive, caractérisée par une réponse cellulaire cytotoxique exagérée, mais aussi par la libération d'une très grande quantité des médiateurs pro-inflammatoires [156:Hunt 2003]. Ces molécules, relarguées afin de lutter contre *Plasmodium*, sont impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules effectrices immunes, comme dans l'activation de l'endothélium. Ainsi, il s'agit d'éléments essentiels dans le développement de la malaria cérébrale, et dont les fonctions méritent d'être étudiées.

3.1 La voie de l'IL-12.

3.1.a. La famille de l'IL-12.

La famille de l'IL-12 est constituée de 4 membres : l'IL-23, l'IL-12, l'IL-27 et l'IL-35. Chacune est un dimère composé d'une chaine α (p19, p28 ou p35) et d'une chaine β (p40 ou l'*Epstein Barr virus inducible gene 3* Ebi3). Les cytokines de la famille de l'IL-12 se fixent sur des récepteurs dimériques, dont la structure et la conformation sont mal connues. Comme les chaines α et β des interleukines, les sous-unités des récepteurs (IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IL-23R, IL-27R et gp130) sont communes à plusieurs interleukines de la famille de l'IL-12 (**Figure 25**). L'IL-12 et l'IL-23 sont définies comme pro-inflammatoires et induisent la stimulation des voies T_H1 et T_H17, respectivement [221:Vignali 2012]. A l'inverse, l'IL-27 et l'IL-35 (dont le récepteur n'a été caractérisé que très récemment) sont plutôt anti-inflammatoires, par l'intermédiaire de la stimulation des cellules T_{reg}. L'activité pro-T_H1 de l'IL-12, nous a conduits à nous intéresser plus en détails à cette cytokine.

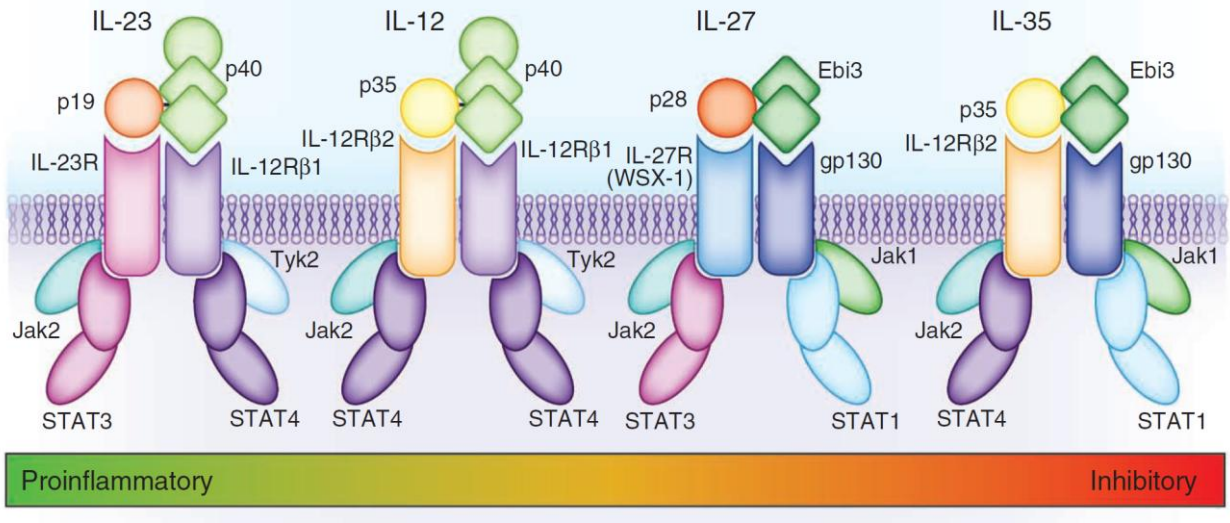


Figure 25 : Les membres de la famille de l'IL-12 et leurs récepteurs [221:Vignali 2012].

3.1.b. L'interleukine 12.

L'interleukine 12 (ou IL-12p70) est une cytokine dimérique formée par une chaine α : p35 (commune à l'IL-35), et par une chaine β : p40 (commune à l'IL-23). Elle signale sur son récepteur formé par les 2 sous-unités : l'IL-12Rβ1 (commune récepteur de l'IL-23) et IL-12Rβ2 (commune au récepteur de l'IL-35), dont l'activation induit essentiellement la phosphorylation et la dimérisation du facteur de transcription STAT4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 4*) (**Figure 25**). L'IL-12 peut être produite par les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les DC et les cellules B, en réponse à l'infection par des pathogènes. Cette cytokine facilite la prolifération des cellules T et induit une polarisation T_H1 en activant la production d'IFN-γ par les cellules NK, NKT et T $CD8^+$ cytotoxiques. De plus, l'IL-12 exerce un fort rétrocontrôle positif en augmentant l'expression de l'IL-12Rβ2 par les cellules T, mais aussi en induisant la libération d'IFN-γ qui stimule la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène [221:Vignali 2012 - 222:Trinchieri 2003 - 223:Korzenik 2006].

3.1.c. IL-12 et malaria cérébrale.

L'IL-12 a été montré comme étant nécessaire à une réponse T_H1 après infection par des pathogènes intracellulaires. Elle est plus particulièrement requise pour maintenir la

production d'IFN-γ par les cellules T en réponse au protozoaire *Toxoplasma gondii*, ou au trypanosome *Leishmania major* [224:Yap 2000 - 225:Park 2000]. De plus, après infection par *T. gondii*, la production initiale d'IL-12 serait indépendante de la production d'IFN-γ, et aurait donc un rôle dans l'initiation de la réponse T_H1 [226:Scharton-Kersten 1996].

Par ailleurs, différentes études réalisées chez l'homme semblent indiquer une implication de la voie de l'IL-12 dans le développement de la malaria cérébrale. D'une part, après infection par *P. falciparum*, des patients maliens ayant développé une malaria sévère, ont montré une concentration sérique en IL-12p70 supérieure aux patients ne présentant pas de complication après infection [227:Lyke 2012]. D'autre part, un polymorphisme du gène *Il12b* (codant pour l'IL-12p40) a été associé à la malaria cérébrale chez des patients thaïlandais [228:Naka 2009].

Chez la souris, Sedegah *et al.* ont montré que l'administration d'IL-12 permettait d'activer la réponse contre les sporozoïtes de *P. yoelii* [229:Sedegah 1994]. Mais le rôle de l'IL-12 peut-être double. Car malgré son implication dans la clairance du parasite, elle est susceptible de participer à la réponse excessive. En effet, des souris BALB/c résistantes à l'ECM ont été rendues sensibles par l'administration de CpG (oligonucléotide formé par des CTP et GTP). Les auteurs suggèrent que le CpG induit une augmentation d'IL-12, qui provoque la production d'IFN-γ et entraîne l'ECM [230:Schmidt 2011]. Enfin, il a aussi été montré que l'IL-12 intervient dans la perméabilisation de l'endothélium cérébral vasculaire, induite par les cellules T $CD8^+$ et $Perforine^+$, après infection par *Pb*A [196:Nitcheu 2003].

La fonction de stimulation de la réponse T_H1 en réponse aux pathogènes intracellulaires et l'implication dans la réponse immune à la malaria, chez l'homme comme chez la souris, nous ont conduits à analyser plus précisément la voie de l'IL-12. Nous nous sommes pour cela intéressés au récepteur IL-12Rβ2, spécifique, au moment de notre étude, de la voie de l'IL-12 (*cf.* **Article 2**)

3.2 Les interférons.

Les interférons (IFN) sont des cytokines qui ont été mises en évidence pour leurs propriétés antivirales. Puis, il s'est avéré qu'il s'agissait de cytokines produites en réponse à différents pathogènes intracellulaires : virus, bactéries et parasites, et dans les situations de

tumorigenèse. Il existe de nombreux interférons classés en 3 types, selon leur structure, leur récepteur et leur fonction.

Le groupe des interférons de type I est composé de l'IFN-α, l'IFN-β, l'IFN-ε, l'IFN-ω, l'IFN-κ et l'IFN-ζ, le dernier étant spécifique de la souris. L'interféron de type II correspond à l'IFN-γ [231:Takaoka 2006]. Et les interférons de type III, plus récemment découverts, sont les IFN-λ1, λ2 et λ3 (ou IL-29, IL-28A et IL-28B) [232:Lopusna 2013].

3.2.a L'interféron γ.

L'IFN-γ est le seul IFN de type II et il signale par l'intermédiaire de son récepteur, composé des sous-unités IFN-γR1 et IFN-γR2. Bien qu'il ait des propriétés antivirales, l'IFN-γ est principalement produit par les cellules NK et T activées (T αβ, T γδ et NKT), plutôt que par les cellules infectées [233:McCall 2010].

L'implication de l'IFN-γ dans la réponse à *Plasmodium* est connue depuis longtemps ; Grau *et al.* ont en effet montré que l'administration d'anticorps anti-IFN-γ protégeait les souris contre le développement d'ECM induite par *Pb*A [234:Grau 1989]. Cependant, chez l'homme comme chez la souris, les études qui ont suivi ont été controversées.

Dans une étude réalisée chez des enfants maliens infectés par *P. falciparum*, les patients ayant développé la complication cérébrale présentaient une concentration plasmatique d'IFN-γ plus faible, suggérant un rôle protecteur de l'IFN-γ [235:Cabantous 2005]. Néanmoins, des travaux effectués au Soudan, également sur des enfants infectés par *P. falciparum*, ont mis en évidence une concentration plus élevée en IFN-γ et en IL-10 dans le sérum des patients atteints de malaria sévère, comparée aux patients sans complication [236:Mirghani 2011].

Chez la souris, l'IFN-γ est impliqué dans le contrôle de la multiplication du parasite. En effet, dans un modèle murin de malaria clinique, alors que les souris de type sauvage contrôlent l'infection, les souris déficientes en IFN-γ sont incapables de bloquer la réplication de *P. chabaudi* AS, et meurent d'anémie sévère [237:Su 2002]. Cependant, il a ensuite été clairement démontré que l'IFN-γ est nécessaire au développement de l'ECM. L'IFN-γ est essentiel à la production de différentes chimiokines attractives pour les cellules T, notamment CCL3/MIP-1α, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG et CXCL10/IP-10, et est nécessaire au

recrutement et à l'accumulation de cellules T $CD8^+$ cytotoxiques dans le cerveau [194:Amante 2010 - 197:Belnoue 2008 - 238:Villegas-Mendez 2011].

Les sources cellulaires d'IFN-γ sont multiples et varient au cours de l'infection par *Pb*A (**Figure 26**), mais les cellules T αβ $CD4^+$ semblent être la source majoritaire pour le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ [195:Villegas-Mendez 2012].

Ces études soulignent le rôle double de l'IFN-γ. Car d'une part, l'IFN-γ est une cytokine importante pour l'activation d'une réponse antiparasitaire efficace, et un défaut d'IFN-γ peut favoriser la multiplication du parasite. Mais d'autre part, l'IFN-γ est un puissant activateur de la réponse cytotoxique et du recrutement de lymphocytes T effecteurs dans le cerveau. L'IFN-γ est donc essentiel pour le développement de la neuropathologie.

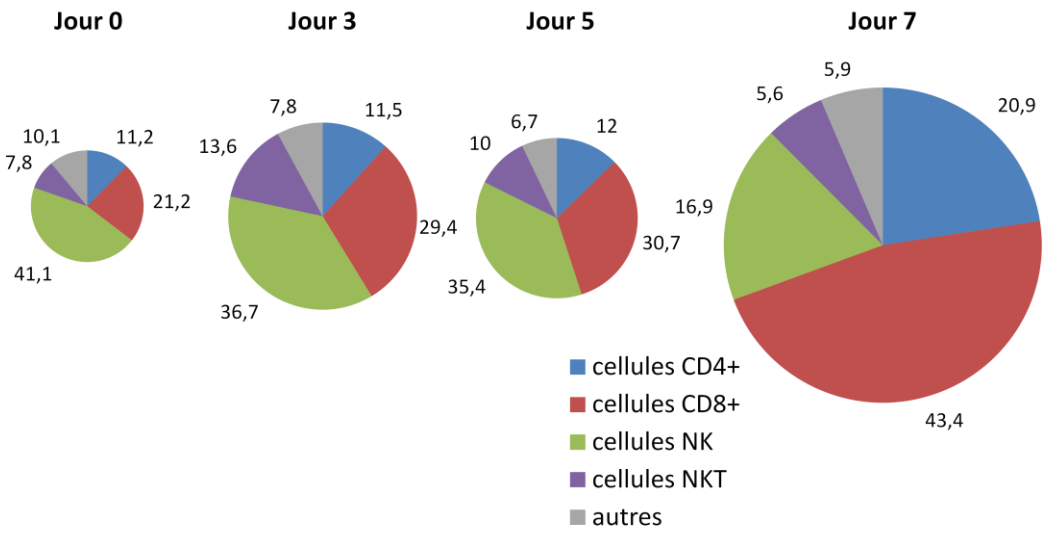


Figure 26 : Sources cellulaires d'IFN-γ, dans le cerveau, après infection par *Pb*A.

Des souris C56BL/6 YETI, exprimant l'eYFP (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*) sous le promoteur de l'IFN-γ, ont été infectées par 10^4 hématies parasitées par *Pb*A. Les sources cellulaires d'IFN-γ et d'eYFP ont été analysées par cytométrie en flux aux jours 0, 3, 5 et 7 post-infection. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules productrices d'IFN-γ. D'après la Figure 3 – [195:Villegas-Mendez 2012]

3.2.b Les interférons de type I.

La famille des interférons de type I (IFN-I) est constituée par l'IFN-β, plus de 10 IFN-α et 4 sous-types moins importants (l'IFN-ε, l'IFN-ω, l'IFN-κ et l'IFN-ζ). Mais tous signalent par le même récepteur constitué des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. Tous les types cellulaires sont potentiellement capables de produire de l'IFN de type I, en présence d'acide nucléique de pathogène intracellulaire [239:Trinchieri 2010 - 240:Kalinke 2012]. De plus, il existe différentes interactions entre les voies de l'IFN-γ et des IFN-I. Par exemple, des cellules T $CD4^+$ humaines, stimulées avec de l'IFN-α, surexpriment l'ARNm de l'IFN-γ [241:Filen 2010].

Les IFN-I sont non seulement impliqués dans la réponse aux infections, mais ont aussi un rôle dans certaines maladies auto-immunes du système nerveux central (SNC) [231:Takaoka 2006]. En effet, les IFN-I ont un rôle néfaste dans un modèle murin d'infection par *Listeria monocytogenes*, en favorisant l'apoptose des lymphocytes [242:Carrero 2004]. Cependant, ils ont un rôle protecteur, complémentaire mais non redondant avec celui de l'IFN-γ, après infection par *M. tuberculosis* chez la souris [243:Desvignes 2012]. En effet, lors de la réponse pré-adaptative à *M. tuberculosis*, les IFN-α/β participent, avec l'IFN-γ, au recrutement de cellules myéloïdes. Lors de la réponse adaptative plus tardive, les IFN-α/β limitent l'inflammation induite par l'IFN-γ et bloquent la propagation du bacille. Les IFN-I semblent aussi être protecteurs contre le développement de la sclérose en plaque. L'administration d'IFN-β est utilisée dans le traitement des formes rémittentes de la sclérose. Dans le modèle EAE, les souris déficientes pour le récepteur IFNAR développent une pathologie accrue [240:Kalinke 2012 - 244:Prinz 2008].

En revanche, peu d'études détaillent le rôle des IFN-I dans la malaria et présentent des résultats contradictoires. Il a été montré à plusieurs reprises que l'infection par *Plasmodium* provoque une production d'IFN-I. L'ADN de *Plasmodium* et/ou l'hémozoïne peuvent être reconnus par TLR9 et induire la production de cytokines pro-inflammatoires dont les IFN-I. Et, plus récemment, il a été démontré que des motifs riches en AT d'ADN de *Plasmodium* peuvent induire la production d'IFN-I par l'intermédiaire de l'activation du senseur cytosolique STING [170:Sharma 2011 - 245:Erdman 2011]. Néanmoins le rôle des IFN-I dans le développement de la malaria cérébrale était peu détaillé et assez discuté. Chez l'homme, une étude a rapporté des taux d'IFN-α réduits chez des enfants atteints d'anémie sévère [246:Luty 2000]. Par ailleurs, l'administration d'IFN-α à des souris infectées par *Pb*A

induit une réduction drastique de la parasitémie, et protège contre le développement de l'ECM [247:Vigario 2007]. De façon similaire l'administration d'IFN-β semble promouvoir la résistance à l'ECM, des souris infectées par *Pb*A, mais indépendamment d'un effet sur la parasitémie [248:Morrell 2011]. A l'inverse, des souris déficientes pour le récepteur IFNAR sont résistantes à l'ECM induite par le stade sanguin de *Pb*A. Ces souris ont une charge parasitaire nettement réduite, et la protection contre l'ECM observée en absence de l'IFNAR a été attribuée avec une augmentation de la réponse des cellules T $CD4^+$ [249:Haque 2011].

En somme, en raison de leur interaction avec la voie de l'IFN-γ, de leur implication dans la réponse aux pathogènes intracellulaires ou dans des pathologies auto-immunes, ainsi que du manque de caractérisation de leur rôle dans la malaria cérébrale, nous avons cherché à préciser l'importance de la voie des IFN-I et de leur place dans la réponse de l'hôte associée au développement de l'ECM en réponse à *Pb*A aux stades sanguins et hépatiques (*cf.* **Article 3**).

3.3 Autres médiateurs de l'inflammation.

L'infection par *Plasmodium* induit l'activation de différentes voies de la réponse immune et la production d'une très grande quantité de médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans le développement de la complication cérébrale [250:Langhorne 2008]. En plus de l'axe IL-12/IFN-γ et des IFN-I, d'autres molécules participent à la neuro-pathogenèse.

3.3.a Les chimiokines.

La malaria cérébrale est associée à une hyper-inflammation, impliquant le recrutement de différentes cellules immunes. Or, les chimiokines sont les éléments clés de la migration des leucocytes dans le SNC [251:Wilson 2010].

Le rôle des chimiokines dans la malaria cérébrale a été largement étudié chez la souris, la mesure de leur production dans le cerveau chez l'homme étant assez difficile. Dans le cerveau de souris infectées par *Pb*A, l'inflammation, et particulièrement l'IFN-γ, entraine la production d'une grande quantité de chimiokines, à savoir, CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1β), CCL5, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (I-TAC) [252:Van den Steen 2008].

Certaines études se sont intéressées au rôle des récepteurs de ces chimiokines. Le récepteur CCR2 des chimiokines CCL2, CCL7 (MCP-3) et CCL13 (MCP-4), connu pour son implication dans le recrutement des monocytes, n'est pas requis pour le développement de l'ECM [253:Belnoue 2003]. Alors que des souris déficientes pour CCR5, le récepteur de CCL3, CCL4, CCL5, et CCL8 (MCP-2), ayant entre autres un rôle dans la chimio-attraction des lymphocytes, sont partiellement protégées contre l'ECM [196:Nitcheu 2003 - 254:Belnoue 2003].

En outre, le recrutement des lymphocytes T par l'intermédiaire du récepteur CXCR3 est sans conteste nécessaire pour le développement de la malaria cérébrale chez la souris. CXCR3 est le récepteur des CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ; il est surexprimé lors de l'inflammation de type T_H1 par les cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$, les cellules NK et NKT [255:Billottet 2013]. Plusieurs études ont clairement mis en évidence que le recrutement des lymphocytes par la voie CXCR3, de façon dépendante de l'IFN-γ, était essentiel pour l'ECM. Ainsi, les souris déficientes pour CXCL9 ou pour CXCL10 sont partiellement protégées, et les souris déficientes pour le récepteur CXCR3 sont résistantes à la malaria cérébrale induite par *Pb*A [256:Campanella 2008 - 257:Miu 2008]. Les sources cellulaires des ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ne sont pas encore précisément définies, mais il semble que la libération des chimiokines dans le cerveau soit précoce et intervienne dans l'initiation de la pathologie. De plus, la stimulation par l'IFN-γ ou les IFN de type I est susceptibles d'induire la production de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 par les cellules endothéliales, les astrocytes et la microglie [197:Belnoue 2008 - 244:Prinz 2008 - 252:Van den Steen 2008 - 256:Campanella 2008 - 258:Hamby 2012]. En effet, nous avons mis en évidence un défaut de production des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 dans le cerveau, après infection par *Pb*A, en l'absence de la voie de l'IFN-γ ou des IFN-I (*cf.* **Article 3**).

3.3.b TNF-α et LT-α.

Le *Tumour Necrosis Factor* α (TNF-α) est une cytokine pro-inflammatoire produite en cas d'infection par un pathogène. Il peut être produit par les monocytes/macrophages, les lymphocytes et les cellules endothéliales [259:Zganiacz 2004].

Depuis longtemps, le TNF-α a été associé à l'infection par *Plasmodium*. Chez l'homme, plusieurs études ont relié le taux de TNF-α dans le sérum avec la sévérité de la

pathologie [260:Grau 1989 - 261:Kern 1989 - 262:Kwiatkowski 1990]. Et en effet, le TNF-α est à même d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion, telles qu'ICAM-1, P-Sélectine et VCAM, à la surface des cellules endothéliales et de favoriser ainsi la cytoadhérence des hématies infectées [263:Wassmer 2011]. Cependant, l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF-α ne permet pas d'inhiber la pathologie cérébrale chez la souris [264:Hermsen 1997]. Par ailleurs, des souris déficientes pour le TNF-α et pour la lymphotoxine α (LT-α) ne développent pas de complication cérébrale après infection par *Pb*A [265:Rudin 1997]. Et il s'est avéré que la LT-α, plutôt que le TNF-α, est nécessaire pour le développement de l'ECM [266:Engwerda 2002]. La superfamille du TNF est complexe et fait intervenir plusieurs récepteurs, comme montré sur la **Figure 27**. Notre équipe et une autre ont ensuite mis en évidence que les voies LT-α_3/TNFR2 [243:Stoelcker 2002] et LT-$\alpha_1\beta_2$/LT-βR [244:Togbe 2008] sont nécessaires pour le développement de l'ECM.

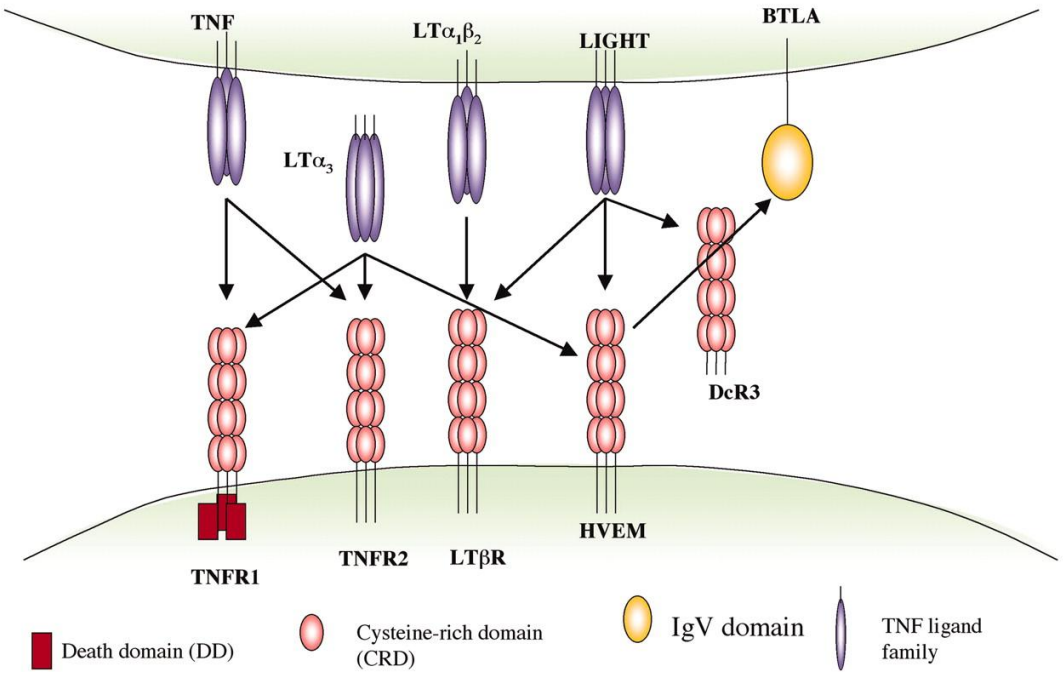


Figure 27 : Ligands et récepteurs de la superfamille du TNF [267:Watts 2005].

3.3.c Granzymes et Perforine.

Les cellules cytotoxiques possèdent plusieurs systèmes pour induire la mort des cellules cibles, notamment les voies des *Death Receptor* (Fas/FasLigand et TRAIL/TRAIL-Récepteur) ou la voie Granzymes/Perforine. C'est cette dernière voie qui est impliquée dans le développement de la complication cérébrale. Les protéines Perforine et Granzymes sont contenues dans les granules des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK [268:Adrain 2005].

Lorsque les cellules cytotoxiques activées reconnaissent leur cellule cible, elles libèrent le contenu des granules au niveau de l'espace extracellulaire de la synapse immunologique. La Perforine libérée est monomérique, puis, elle s'insère dans la membrane plasmique et se polymérise afin de former un pore [269:Anthony 2010]. Ensuite, soit directement, soit après endocytose, les protéines Granzymes pénètrent le cytosol par l'intermédiaire des pores de Perforine. Les Granzymes sont alors capables de déclencher l'apoptose des cellules cibles [270:Ewen 2012], en induisant la libération du Cytochrome C ou en activant les Caspase-3, 7, 8 ou 10 (Granzyme B), ou bien encore par l'intermédiaire d'une fragmentation de l'ADN (Granzyme A) (**Figure 28**).

La voie cytotoxique Granzymes/Perforine est un élément essentiel dans la réponse à différents pathogènes, dont *Plasmodium*. Chez l'homme, les patients atteints de malaria présentent des taux sériques de Granzymes A et B augmentés [272:Hermsen 2003]. Dans le modèle murin de malaria cérébrale, il a été montré que l'expression de la Perforine et de Granzyme B est requise pour le développement de l'ECM [196:Nitcheu 2003 - 273:Haque 2011]. En effet, la Perforine est nécessaire pour induire l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires du cerveau lors de l'ECM [274:Potter 2006], et les souris déficientes en Granzyme B montrent un recrutement de cellules T $CD8^+$ incapables d'induire une rupture de la BHE, et sont protégées contre l'ECM [273:Haque 2011].

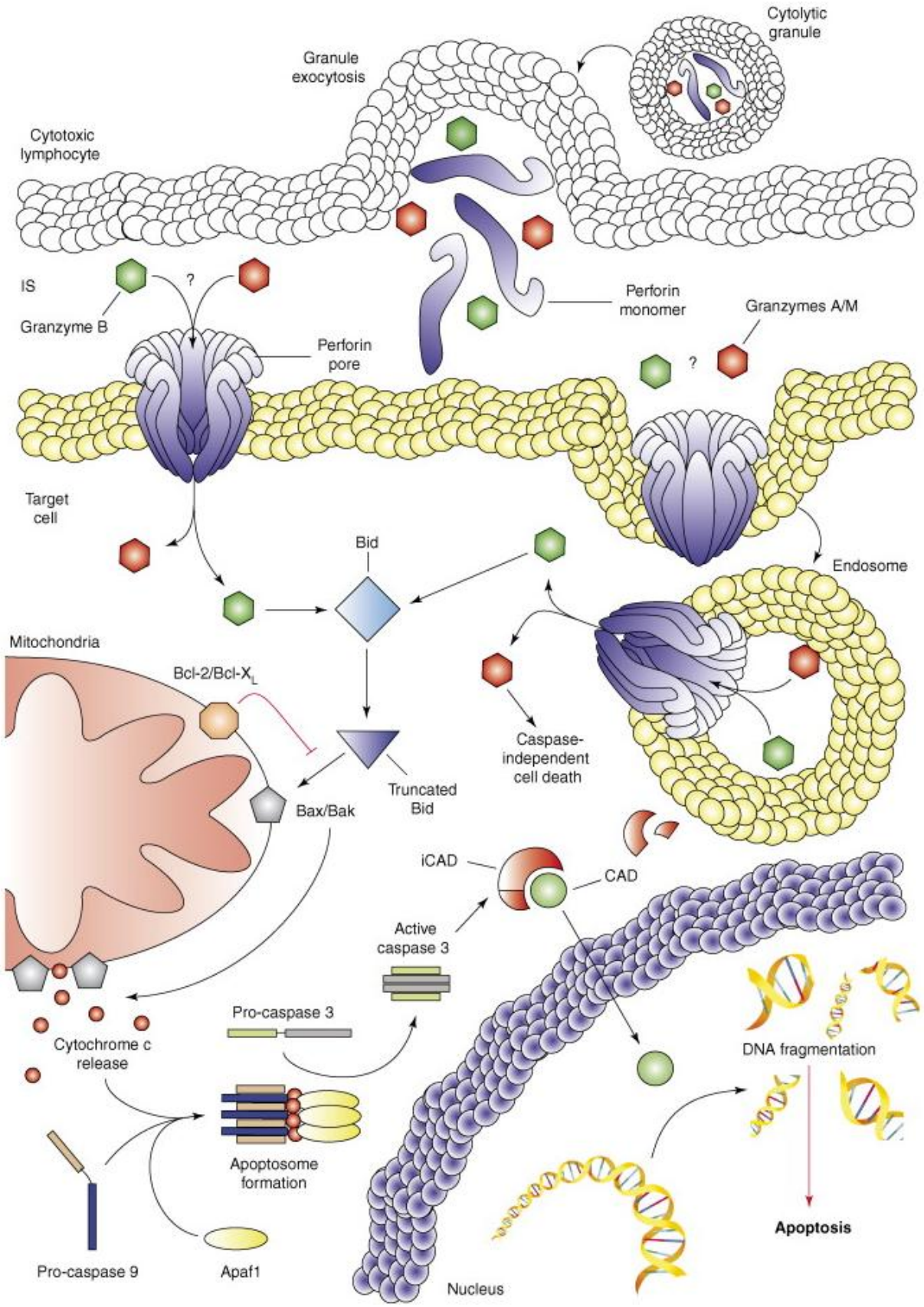


Figure 28 : Induction de l'apoptose par les Granzymes par la Perforine [271:Bolitho 2007].

Ces différents médiateurs de l'inflammation sont des éléments primordiaux pour le développement de la malaria cérébrale expérimentale chez les souris. Ils sont nécessaires tant pour l'initiation de la pathologie (chimiokines attractants les cellules immunitaires), que pour l'amplification de la réponse (cytokines pro-inflammatoires) ou encore pour l'activité effectrice des lymphocytes (molécules de cytotoxicité). L'expression et la quantité de ces médiateurs pro-inflammatoires sont des paramètres qui nous ont permis d'expliquer les mécanismes impliqués dans les phénotypes de résistance et de sensibilité à l'ECM observés dans nos études.

IV. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE

La malaria cérébrale est une complication cérébrale de l'infection par *P. falciparum.* L'évolution sévère et létale de l'infection ne se produit pas chez tous les patients infectés et les mécanismes impliqués dans le développement du neuropaludisme sont mal définis. Les études chez l'homme étant difficiles, le modèle murin d'ECM, induite par l'infection par *P. berghei* ANKA est un outil majeur pour la compréhension de la pathogenèse. La neuropathologie murine est caractérisée par la séquestration d'hématies parasitées ou non, le recrutement de cellules immunitaires, et plus particulièrement de lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques [187:Belnoue 2002].

Cela a conduit notre équipe à s'intéresser aux voies impliquées dans le recrutement et l'activation de lymphocytes T lors du développement de l'ECM. En parallèle, nous avons aussi analysé l'apparition de la pathologie pulmonaire après infection par *Pb*A. Afin de caractériser le rôle de molécules d'intérêt, nous avons utilisé des souris génétiquement déficientes pour ces molécules. Nous avons cherché à répondre à trois objectifs majeurs :

- Etudier la participation de PKC-θ dans la réponse à l'infection par le stade sanguin de *Pb*A. La kinase exprimée dans les lymphocytes T contribue à la transduction du signal du TCR et est importante pour l'activation des lymphocytes T en conditions pathologiques (*cf.* **Article 1**).
- Analyser la voie de l'IL-12 qui est impliquée dans la polarisation T_H1 de la réponse immune, grâce à l'étude de l'infection par le stade sanguin de *Pb*A, de souris déficientes pour l'IL-12p40, l'IL-12p35 ou l'IL-12Rβ2 (*cf.* **Article 2**).
- Etudier la participation des IFN de type I dans la neuropathologie. Comparer la réponse à l'infection par le stade sanguin, à l'infection par le stade pré-érythrocytique de *Pb*A et confronter la pathologie induite par *Pb*A, au stade mérozoïte ou sporozoïte, chez des souris déficientes pour le récepteur des IFN-I (IFNAR) ou pour le récepteur de l'IFN-γ (IFN-γR) (*cf.* **Article 3**).

– Résultats –

1. RÔLE DE LA PROTEINE PKC-Θ DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE.

Article 1. PKC-θ is required for the development of experimental cerebral malaria.

Mathilde Fauconnier, Marie-Laure Bourigault, Sandra Meme, Frederic Szeremeta, Jennifer Palomo, Adeline Danneels, Sabine Charron, Lizette Fick, Muazzam Jacobs, Jean-Claude Beloeil, Bernhard Ryffel, and Valerie F.J. Quesniaux.

American Journal of Pathology – January 2011 – 178(1):212-21

La malaria cérébrale est une neuropathologie causée par une inflammation excessive, et, chez la souris, l'ECM est dépendante de l'activation et du recrutement de lymphocytes T cytotoxiques dans les vaisseaux sanguins du cerveau [275:Renia 2006]. Les mécanismes intervenant dans cette pathologie ne sont pas encore tous connus. Notre équipe s'est donc intéressée aux voies susceptibles d'être impliquées dans l'activation des cellules T, et plus spécifiquement à la protéine kinase C – θ (PKC-θ). Cette kinase est exprimée par les cellules T, les plaquettes et les cellules du muscle strié squelettique [212:Meller 1999 - 213:Cohen 2011 - 214:Chang 1993]. Elle est recrutée au niveau de la synapse immunologique lors de l'engagement du TCR, et est essentielle pour l'activation des cellules T [276:Chaudhary 2006]. De plus, alors que PKC-θ est nécessaire à une réponse de type T_H2 aux allergènes ou aux helminthes [216:Marsland 2004 - 217:Salek-Ardakani 2005], son rôle dans la réponse de type T_H1 est variable. Ainsi, tandis que la kinase n'est pas requise pour la réponse à *L. major*, elle est obligatoire pour induire une réponse cytotoxique responsable du développement de l'EAE [218:Ohayon 2007 - 219:Anderson 2006 - 277:Ohayon 2010].

Nous avons donc cherché à détailler le rôle de PKC-θ dans le développement de l'ECM. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin d'infection par le stade sanguin de *Pb*A, et comparé la réponse de souris déficientes pour la protéine PKC-θ à celle de souris de type sauvage.

Dans cette étude, nous avons pu observer que l'absence de la signalisation par PKC-θ protégeait les souris contre le développement de l'ECM. En effet, 60% des souris déficientes pour PKC-θ ne développent pas de symptôme neurologique après infection par *Pb*A. Elles survivent au-delà de 2 à 3 semaines après infection et décèdent d'anémie sévère associée à une hyper-parasitémie. A l'inverse, 100% des souris de type sauvage décèdent de complications neurologiques 7 à 9 jours après infection. De plus, l'évolution de la parasitémie au cours de l'infection est similaire dans les 2 groupes, et continue d'augmenter, chez les souris résistantes, indiquant que la déficience en PKC-θ a un effet sur le développement de la complication cérébrale mais pas sur le contrôle du parasite.

Puis, afin de comprendre la résistance des souris déficientes en PKC-θ, nous avons cherché à quantifier la pathologie vasculaire par des techniques non invasives d'Imagerie et d'Angiographie par Résonance Magnétique (IRM et ARM) du cerveau. Après infection par

*Pb*A, alors que les images des souris de type sauvage témoignent de zones d'œdème et de compression (IRM), ainsi que d'altération de la circulation sanguine / ischémie (ARM), les souris déficientes en PKC-θ ne présentent aucun signe caractéristique de la pathologie cérébrale induite par *Pb*A.

L'endommagement de la BHE a été étudié dans le but d'expliquer l'absence d'œdème, d'ischémie ou encore de gonflement, caractéristiques de la malaria cérébrale. Le test de perméabilité au Bleu Evans et les analyses histologiques indiquent une absence de lésion microvasculaire chez les souris déficientes en PKC-θ, tandis que les souris de type sauvage infectées par *Pb*A montrent une augmentation de la perméabilité vasculaire, un endommagement de l'endothélium induisant des hémorragies cérébrales, ainsi qu'une séquestration d'hématies et de leucocytes dans les vaisseaux. Par la suite, afin de comprendre comment la déficience en PKC-θ permettait la protection contre les lésions micro-vasculaires, nous avons analysé les leucocytes séquestrés dans le cerveau par immuno-marquage et cytométrie en flux. Chez les souris déficientes en PKC-θ, le recrutement des cellules T est absent, alors que les souris de type sauvage montrent un recrutement de cellules T $CD4^+$, et $CD8^+$ activées dans les vaisseaux cérébraux nettement augmenté après infection par *Pb*A. Aussi, la déficience en PKC-θ semble réduire la surexpression de la molécule ICAM-1 dans le cerveau après infection par *Pb*A.

Par ailleurs, nous avons mesuré certains paramètres hématologiques, spécifiques de l'infection par *Plasmodium*. L'estimation des hématies circulantes n'indique pas d'anémie au moment du développement de la complication cérébrale. Mais les souris résistantes à l'ECM voient par la suite une réduction drastique de la quantité d'hématies dans le sang et décèdent de l'anémie sévère induite par l'infection. Chez les deux types de souris, une thrombocytopénie est observée après infection. Elle n'est pas corrélée à la sensibilité à l'ECM, mais témoigne de l'activation et de la séquestration des plaquettes dans les organes profonds [137:Cox 2010]. De plus, l'infection par *Pb*A induit chez toutes les souris une leucopénie, principalement due à une lymphopénie, mesurée au moment de l'ECM. Mais la lymphopénie n'est pas non plus corrélée à la sensibilité à l'ECM, elle serait plutôt provoquée par une réaffectation des cellules T aux sites d'inflammation [278:Hviid 2000]. Ensuite, à 2 et 3 semaines après infection par *Pb*A, les souris déficientes en PKC-θ et résistantes à l'ECM développent une forte lymphocytose.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la pathologie pulmonaire. Mais les lésions observées dans les poumons après infection par *Pb*A étaient indépendantes de la présence de PKC-θ. L'analyse histologique révèle une accumulation de cellules, leucocytes (dont des macrophages $CD11b^+$) et hématies, dans les alvéoles, et un épaississement de la paroi alvéolaire, chez les souris déficientes en PKC-θ comme chez les souris de type sauvage après infection par *Pb*A.

Cette étude indique donc que la protéine PKC-θ est nécessaire au recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ dans le cerveau. Elle est donc indispensable à l'endommagement de l'endothélium cérébral et au développement de l'ECM, mais elle n'est pas requise pour la pathologie pulmonaire induite par *Pb*A.

The American Journal of Pathology, Vol. 178, No. 1, January 2011
Copyright © 2011 American Society for Investigative Pathology.
Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.008

Immunopathology and Infectious Diseases

Protein Kinase C-Theta Is Required for Development of Experimental Cerebral Malaria

Mathilde Fauconnier,* Marie-Laure Bourigault,* Sandra Meme,† Frederic Szeremeta,† Jennifer Palomo,* Adeline Danneels,* Sabine Charron,* Lizette Fick,‡ Muazzam Jacobs,‡ Jean-Claude Beloeil,† Bernhard Ryffel,*‡ and Valerie F.J. Quesniaux*

From the University of Orléans and CNRS, Molecular Immunology and Embryology UMR6218, Orléans, France; CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire,† Orléans, France; and the Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine,‡ Cape Town, South Africa*

Cerebral malaria is the most severe neurologic complication in children and young adults infected with *Plasmodium falciparum*. T-cell activation is required for development of *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A)–induced experimental cerebral malaria (CM). To characterize the T-cell activation pathway involved, the role of protein kinase C-theta (PKC-θ) in experimental CM development was examined. PKC-θ–deficient mice are resistant to CM development. In the absence of PKC-θ, no neurologic sign of CM developed after blood stage *Pb*A infection. Resistance of PKC-θ–deficient mice correlated with unaltered cerebral microcirculation and absence of ischemia, as documented by magnetic resonance imaging and magnetic resonance angiography, whereas wild-type mice developed distinct microvascular pathology. Recruitment and activation of CD8$^+$ T cells, and ICAM-1 and CD69 expression were reduced in the brain of resistant mice; however, the pulmonary inflammation and edema associated with *Pb*A infection were still present in the absence of functional PKC-θ. Resistant PKC-θ–deficient mice developed high parasitemia, and died at 3 weeks with severe anemia. Therefore, PKC-θ signaling is crucial for recruitment of CD8$^+$ T cells and development of brain microvascular pathology resulting in fatal experimental CM, and may represent a novel therapeutic target of CM. *(Am J Pathol 2011, 178:212–221; DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.008)*

Malaria is 1 of the 5 most important infectious diseases worldwide, and cerebral malaria (CM) is a frequent cause of death in children and young adults infected with *Plasmodium falciparum*.[1] Many aspects of the pathophysiology of CM are still poorly understood. Investigations in human beings and mice characterized the sequestration of erythrocytes (parasitized or not), platelets, and leukocytes in cerebral blood vessels,[2,3] with increased expression of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor[4–6] and adhesion molecules.[7] The specific role of T cells in the pathogenesis of CM has been difficult to address in human beings. In mice, however, T-cell sequestration and activation are crucial steps in the development of experimental CM after *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) infection.[8–10] In particular, brain sequestrated αβ CD8$^+$ T cells have a pathogenic effector role in experimental CM development.[10] T-cell activation is a complex process involving a cascade of intracellular enzymes. The present study addressed the role of protein kinase C (PKC) in the pathogenesis of CM in *Pb*A infection.

PKC isozymes are important in cellular activation, differentiation, adhesion, motility, and survival. Among the PKC family, PKC-δ and PKC-θ are expressed in lymphocytes, and PKC-θ is also expressed in natural killer cells.[11] PKC-θ is a critical regulator of T-cell receptor signaling and T-cell activation,[12,13] and has been proposed as a therapeutic target for T-cell–mediated diseases.[12] However, the role of PKC-θ in T-cell activation is complex, and PKC-θ is not equally involved in all T-cell responses. PKC-θ regulates Th2 helper cells that mediate immune response against helminth infection.[12,13] It is involved in interferon I and II signaling in human T cells.[14] PKC-θ is also important for T-cell survival and differentiation intc functional cytotoxic T cells; however, it may be dispensable, compensated by other innate signals, for CD8$^+$ T-cell proliferation and development.[15] PKC-θ is not essential for mounting normal protective Th1 immune responses to clear some virus infections.[16] Further, TLR9 ligand CpG was recently shown to directly act on T-cell proliferation and survival, bypassing the PKC-θ pathway.[17] Therefore, the implication of PKC-θ in the T-cell

Supported by CNRS, the interdisciplinary program MIE from the French Research Minister, and European FP6 MPCM project.

Accepted for publication September 14, 2010.

Address reprint requests to Bernhard Ryffel, CNRS Transgenose Institute, Molecular Immunology and Embryology UMR6218, 3B rue de la Ferollerie, F-45071 Orleans, France. E-mail: bryffel@cnrs-orleans.fr.

pathway during development of experimental CM remains to be established.

In the present study, PKC-θ–deficient mice were used to identify PKC-θ as an obligatory pathway for development of CM in *Pb*A infection. PKC-θ–deficient mice were protected from CM development in blood stage infection with *Pb*A, and magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic resonance angiography (MRA) confirmed the lack of ischemia and microvascular pathology and brain morphologic changes in these mice. Further, it was demonstrated that experimental CM protection is associated with reduced T-cell recruitment and activation in the brain, whereas lung edema is unaffected in the absence of functional PKC-θ.

Materials and Methods

Mice

Mice deficient in PKC-θ[18] were obtained from Manfred Kopf (Molecular Biomedicine, ETH Zurich, Switzerland) and bred in our animal facility at the Transgenose Institute (CNRS, Orleans, France). Mice were of C57BL/6J genetic background (back-crossed at least 15 times), and wild-type C57BL/6J mice were used as controls. For experiments, adult (aged 8 to 10 weeks) mice were kept in filtered-cages in a P2 animal facility. All animal experiments complied with ethical and animal experiments regulations of the French government.

Experimental Malaria Infection

Recombinant *Pb*A that constitutively expresses green fluorescent protein at a high level throughout the complete life cycle, from a transgene controlled by the strong promoter from a *P berghei* elongation factor-1α gene, was obtained from Dr. Andrew P. Waters (Glasgow Biomedical Research Center, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom).[19] Mice were infected via intraperitoneal injection of 10^5 parasitized erythrocytes as described previously.[20] Mice were observed daily, grip strength was evaluated during daily body weight measurement, and clinical neurologic signs of CM culminating in ataxia, paralysis, and coma were assessed.

Parasitemia

Parasitemia was assessed in 2 μL of blood collected from the tail vein at various time points after infection with EGFP-*Pb*A. Blood was diluted in 3 ml of PBS containing 0.5% bovine serum albumin, and fluorescent cells were analyzed using a flow cytometer (FACScan LSR; Becton Dickinson, Grenoble, France)[21] using FlowJo software (TreeAge Software, Inc, Williamstown, Massachusetts).

Hematologic Analysis

Blood was drawn with the mice under anesthesia with isofluorane (CSP, Fontenay sous Bois, France) into tubes containing EDTA (Vacutainer; Becton Dickinson) as indicated, and hematologic parameters were determined using a 5-part-differential hematology analyzer (MS 9.5; Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France).

Assessment of Vascular Leak

Mice were injected intravenously with 0.2 ml of 325 mg/ml Evans blue solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) on day 7, shortly before the death of the wild-type mice. One hour later, mice were sacrificed, and the coloration of the brain was assessed. Brain extravasation was evaluated using Evans blue in formamide (Sigma-Aldrich) measured by absorbance at 610 nm of the tissue extracts as an indicator of increased capillary permeability.[20] Similar mean (SD)baseline levels were observed in noninfected wild-type and PKC-$\theta^{-/-}$ mice: 0.50 (0.21) μg/ml and 0.51 (0.26) μg/ml, respectively.

Histologic Analysis

Mice were euthanized and perfused with intracardiac sterile PBS/EDTA, 0.002 mmol/L, to remove circulating red blood cells and leukocytes from the brain and lung. The tissues were then fixed with a second perfusion of PBS/paraformaldehyde 4% (Sigma-Aldrich). The brains and lungs from *Pb*A-infected mice were fixed in 3.6% PBS/formaldehyde for 72 hours as described previously.[20] Longitudinal sections of 3 μm were stained with H&E. Brain microvascular disease with endothelial damage, accumulation of mononuclear cells, and extravasated erythrocytes in the Virchov-Robin space was assessed semiquantitatively from a whole brain section, typically between −5.64 and −6.84 from the bregma. Erythrocyte accumulation in alveoli and thickening of alveolar septae of the lung were quantified using a semiquantitative score with increasing severity of changes (0 to 5) by 2 independent observers including a trained pathologist (B.R.). Brain microvascular obstruction was evaluated by scoring the number of vessels containing sequestered blood cells on multiple fields corresponding to whole brain sections (0% microvascular obstruction = 0, 1% to 19% microvascular obstruction = 1, 20% to 39% microvascular obstruction = 2, 40% to 59% microvascular obstruction = 3, 60% to 79% microvascular obstruction = 4, and 80% microvascular obstruction = 5). Lung sections were scored on 10 fields per section for erythrocyte accumulation in alveoli (less than 1 cell per alveoli = 0, 1 cell per alveoli = 1, 2 to 5 cells per alveoli = 2, 5 to 10 cells per alveoli = 3, 10 to 30 cells per alveoli = 4, and 30 cells pre alveoli = 5); alveolar size (all normal alveoli = 0, mix of normal and medium-sized alveoli = 1, medium-sized alveoli only = 2, mix of medium-sized and small alveoli = 3, all small alveoli = 4, and full obstruction = 5 (not observed); and thickening of alveolar septae due to inflammatory cells and edema was scored with increasing severity from 0 to 5 as an estimate of interstitial inflammation.

Immunohistologic Staining

Macrophages and T-cell populations were analyzed *in situ* using immunohistologic staining. Euthanized mice were perfused as described above, and brains and lungs were

harvested, imbedded in OCT media (Tissue-Tek; Sakura Finetek Japan Co, Ltd, Tokyo, Japan), and frozen rapidly. Longitudinal cryosections of 10 μm were fixed in acetone, washed in PBS/Tween 0.05% and PBS, and incubated for 30 minutes with wild-type mouse serum at 2% in PBS. All incubations were carried out in a wet chamber. Brain and lung sections were then incubated overnight at 4°C with biotinylated rat antibodies to CD3e (clone 145-2C11), CD8α (clone 53-6.7), CD4 (clone RM4-5), CD54 (clone 3E2,), CD11b (clone M1/70), or IA/IE (clone 2G9) (all from BD Pharmingen, Inc, San Diego, CA) as indicated. After washing, sections were incubated for 30 minutes with an avidin-biotin peroxydase complex (ABC; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA), followed by the peroxydase substrate (diaminobenzidine; Vector Laboratories, Inc). Finally, sections were washed in PBS, mounted using Eukitt medium (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Germany), and examined microscopically.

Brain Imaging Using MRI

MRI experiments were performed as described previously[21] using a horizontal 9.4 T/20 Bruker Biospec MR system (Bruker BioSpin SA, Wissembourg, France). A 12-element linear birdcage coil (Bruker BioSpin SA) with inner diameter of 35 mm and length of 60 mm was used to achieve uniform excitation and reception. A custom-built stereotaxic head holder was used to fix the animals in the birdcage coil. The mice were anesthetized using 1.5% isoflurane in a 1:1 oxygen/nitrous oxide mixture administered using a face mask, allowing free breathing. Respiration was monitored using a balloon taped to the abdomen and connected to a pressure transducer (SA Instruments, Inc, Stony Brook, NY). Mean (SD) mouse body temperature was maintained at 37°C (0.5°C) throughout the experiment, using warm water circulation.

Preparatory anatomical sagittal MRI was performed using a multisection multiecho sequence with the following parameters: rapid acquisition with relaxation enhancement factor = 8, repetition time/effective echo time = 4000/46 ms, field of view = 20 × 20 mm^2, matrix = 128 × 128, 1 section 1-mm thick, number of averages = 1, and experimental time = 1 minute. Brain lesions and global changes in tissue structure were accessed via T2-weighted MRI using a multisection multiecho sequence with the following parameters: rapid acquisition with relaxation enhancement factor = 8, repetition time/effective echo time = 5000/46 ms, field of view = 17 × 17 mm^2, matrix = 256 × 192 (zero-filled to 256 × 256), 37 axial sections 0.5-mm thick, number of averages = 8, and experimental time = 16 minutes. Three measures were used to estimate morphologic changes of the brain: line 1 from the pituitary gland to the aqueduct of Sylvius, the median line crossing the medial cerebellar nucleus, and the medium line stemming from the cerebellar obex. For each group, a region of interest was drawn manually in the corpus callosum, and gray-level mean was measured using Mazda software (Mazda version 3.20, copyright 1998–2002 by Piotr Szczypinski).

Vascular cerebral blood flow was measured at MRA using a fast low-angle shot sequence with the following parameters: field of view = 14 × 14 mm^2, matrix = 128 × 128, repetition time/echo time = 30/5 ms, 51 axial sections 0.3-mm thick, number of averages = 4, and experimental time = 13 minutes. Angiograms were produced by generating maximum intensity projections after interpolating raw data to obtain an isotropic resolution (109 μm^3). Image analysis and processing were performed using the public domain software Image J.

Isolation of Brain-Sequestered Leukocytes

Mice were euthanized and perfused as described,[10] on day 7, when all wild-type mice exhibited neurologic symptoms of CM. Brains were removed and homogenized gently (30 seconds at 4000 rpm) using a sterile disposable homogenization system (Dispomix; Medic Tools AG, Zug, Switzerland) in RPMI 1640 medium containing 2% fetal calf serum. Homogenates were passed through a 100-μm nylon cell strainer (Becton Dickinson France SAS, Grenoble, France), and cells were centrifuged at 400*g* for 10 minutes.[21] The mononuclear cells

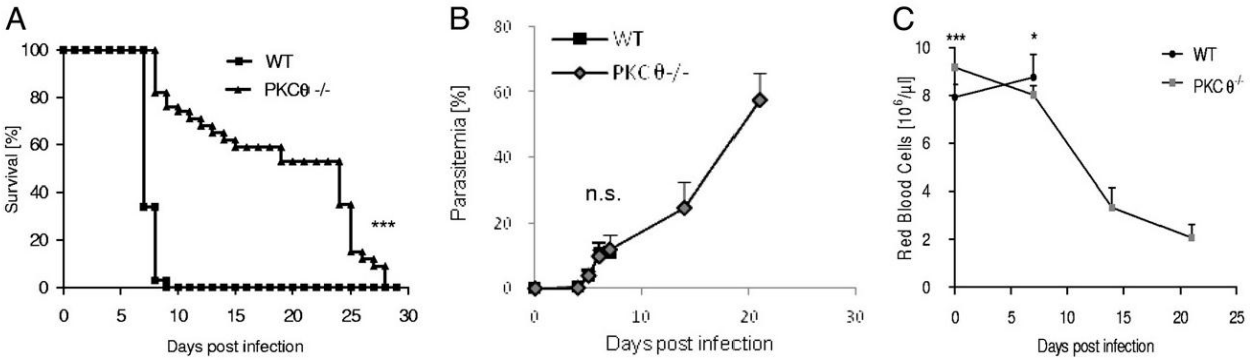


Figure 1. PKC-θ–deficient mice do not develop *Pb*A-induced CM. **A**: Wild-type mice (WT) and PKC-θ–deficient mice were infected with 10^5 *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) parasitized red blood cells, and their survival was monitored daily. Values are given as mean (SD) of 25 PKC-θ–deficient and 29 WT mice, and are pooled from 5 independent experiments. **B**: Kinetics of parasitemia is shown up to day 7 for WT mice and day 21 after infection for CM-resistant PKC-θ–deficient mice. Values are given as mean (SD) from 5 independent experiments: 11 PKC-$\theta^{-/-}$ and 14 WT mice on day 4; 7 PKC-$\theta^{-/-}$ and 9 WT mice on day 5; 7 PKC-$\theta^{-/-}$ and 9 WT mice on day 6; 38 PKC-$\theta^{-/-}$ and 22 WT mice on day 7; and 19 WT and 16 PKC-$\theta^{-/-}$ mice on days 14 and 21. **C**: Kinetics of peripheral red blood cell counts is shown up to day 7 for WT mice and day 21 after infection for CM-resistant PKC-θ–deficient mice. Values are given as mean (SD) from 4 independent experiments: 15 PKC-$\theta^{-/-}$ and 21 WT mice on day 0; 21 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 7; and 4 WT and 3 PKC-$\theta^{-/-}$ mice on days 14 and 21. NS, not significant. $^*P < 0.05$. $^\dagger P < 0.01$. $^\ddagger P < 0.001$.

were separated over a 35% Percoll gradient (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

Flow Cytometry Analysis

Brain-sequestered cells were collected, washed, and saturated with mouse serum before staining with fluorescence-labeled antibodies for 30 minutes. The cells were then phenotyped at flow cytometry using the following rat antibodies: anti-mouse CD3 conjugated to fluorescein isothiocyanate (clone 145-2C11), CD4 conjugated to peridinin-chlorophyll-protein complex (clone L3T4 RM4-5), CD8α conjugated to allophycocyanin cyanin7 (clone 53-6.7), CD69 (clone H1.2F3) conjugated to phycoerythrin, and isotype-matched control antibodies (all from BD Pharmingen Inc). For each sample, 10,000 cells from the mononuclear population were scored. Data were analyzed using a flow cytometer and FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, Oregon).

Statistical Analysis

Unless otherwise indicated, data are given as mean (SD), indicated by error bars. Statistical significance was determined using commercially available software (Prism version

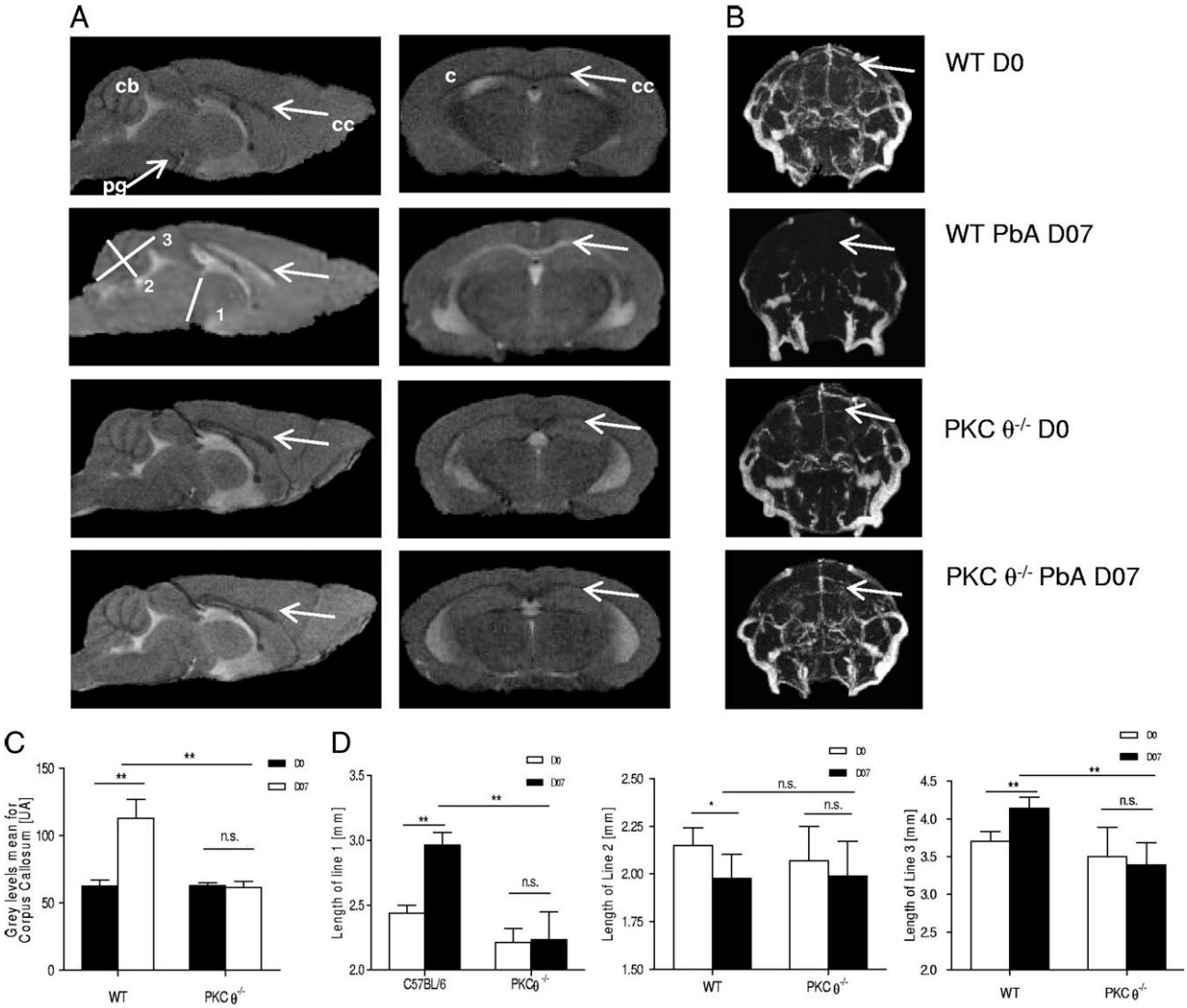


Figure 2. MRI analysis of brains of *Pb*A-infected mice. Wild-type (WT) and PKC-θ–deficient mice were infected with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells as in Figure 1. **A**: MRI of uninfected and infected mice 7 days after infection. **Left column**: Mid-sagittal MRI. **Right column**: Typical axial MRI. Distinct anomalies are visible in WT infected mice; namely, edema formation is apparent as a bilateral hyperintense signal (**arrows**) at the corpus callosum, whereas WT uninfected mice and PKC-θ–deficient uninfected or infected mice do not show such alterations. MRIs are representative of 3 independent experiments: 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 0; and 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7. **B**: At MRA, vascular blood flow perturbations are evident in WT mice 7 days after infection with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells, whereas WT uninfected mice and PKC-θ–deficient uninfected or infected mice seem unaffected. **Arrows**: Area demonstrating reduced brain vascularization in WT mice undergoing CM. Vascularization was not impaired in *Pb*A-infected PKC-θ knockout mice. MRA images are representative of 3 independent experiments: 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 0; and 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7. **C**: Corpus callosum mean gray level intensity for WT and PKC-θ–deficient uninfected mice (day 0, **open bars**) and infected mice (day 7, **closed bars**). Values are given as mean (SD) of 3 independent experiments: 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 0; and 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7. **D**: Assessment of brain swelling in uninfected (day 0, **open bars**) and infected (day 7, **closed bars**) WT or PKC-θ–deficient mice in terms of measurement of distances 1 to 3 from the mid-sagittal MRIs: line 1 from the pituitary gland to the aqueduct of Sylvius; line 2, median line crossing the medial cerebellar nucleus; and line 3, medium line stemming from the cerebellar obex. Values are given as mean (SD) of 3 independent experiments: 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 0; and 6 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7. c, cortex; cb, cerebellum; n.s., not significant; ml, corpus callosum; pg, pituary gland. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

4.0; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Differences between multiple groups were analyzed for statistical significance via 1-way parametric analysis of variance followed by the Bonferroni posttest for analyzing large sample groups or by a nonparametric Mann-Whitney test for analysis of small groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

PKC-θ Deficiency Confers Protection Against CM Development

The role of PKC-θ was assessed by investigating the development of neurologic signs of CM, survival, and parasitemia in mice deficient in PKC-θ. After injection of *Pb*A-infected erythrocytes, wild-type control mice developed typical neurologic symptoms of CM such as ataxia, loss of grip strength, progressive paralysis, and coma, and all died within 1 week, whereas 75% of PKC-θ–deficient mice survived longer than 10 days, and 60% of PKC-θ–deficient mice survived longer than 14 days with no sign of CM (Figure 1A).

Parasitemia was analyzed at flow cytometry using parasites transfected with green fluorescent protein.[19] Although the onset of parasitemia was slightly lower in PKC-θ–deficient mice on day 4, parasitemia was similar in both groups on days 5 to 7, and PKC-θ–deficient mice failed to control parasite growth thereafter, with parasitemia increased to 25% at day 14 and reaching 58% at day 21 (Figure 1B). PKC-θ–deficient mice died after day 21 with a high parasite load (Figure 1, A and B) and severe anemia (Figure 1C) in the absence of neurologic signs. However, a retrospective analysis revealed that PKC-θ–deficient mice that died before day 15 without neurologic signs exhibited a slightly higher parasite load at day 7 compared with PKC-θ–deficient mice that survived beyond day 15 [mean (SD), 13.7 (3.8) and 9.6 (3.7%), respectively], indicating that early death in PKC-θ–deficient mice might be associated with a higher parasite load. Therefore, our data demonstrate a critical role of PKC-θ in CM development, but no drastic effect on parasite growth.

Reduced Cerebral Ischemia by Noninvasive Imaging in Absence of PKC-θ

Both MRI and MRA were used to explore neuropathologic disease in the brain of *Pb*A-infected mice. These noninvasive techniques enable investigation of neurologic disease and are used in human beings to study brain changes during CM.[21–25] In murine experimental CM, MRI and MRA enable semiquantitative analysis of swelling and edema, focal ischemia, morphologic changes, and vascular blood flow. This could be indicative of mi-

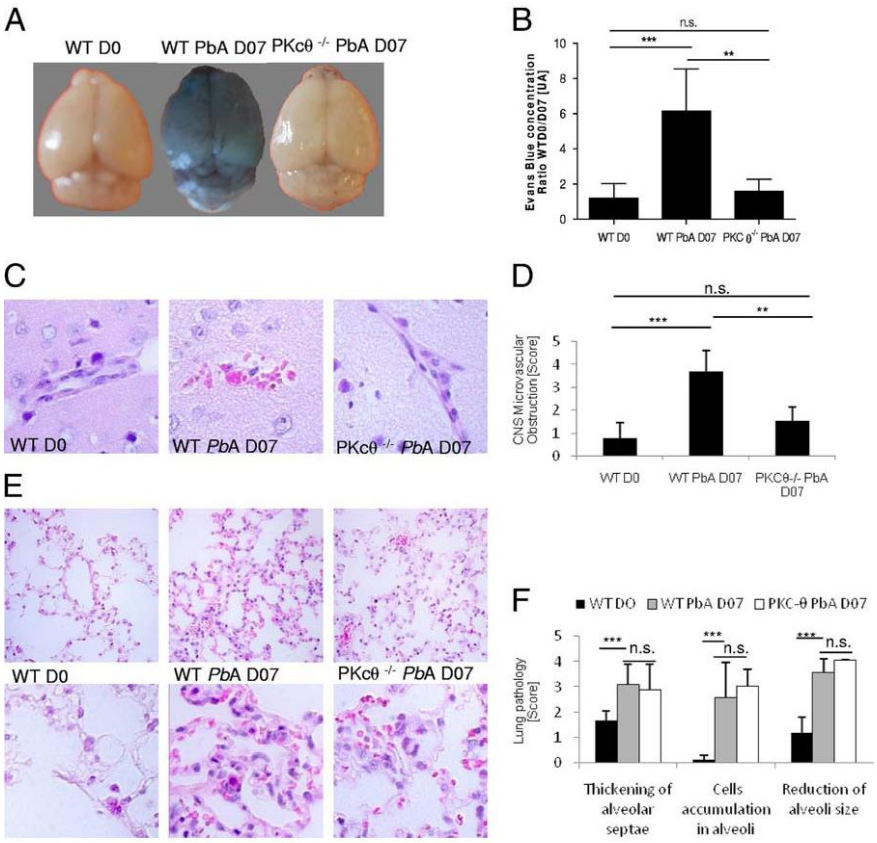


Figure 3. PKC-θ–deficient mice do not develop CM-associated brain vascular leakage. Mice were infected with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells as in Figure 1. **A**: Qualitative assessment of brain vascular leak using Evans blue extravasation. Wild-type (WT) mice with severe CM on day 7 after infection (WT *Pb*A D07) exhibited blue discoloration of the brain, whereas uninfected control mice (WT D0) infected PKC-θ–deficient mice demonstrated no discoloration. Images are representative of 3 independent experiments: 12 WT mice on day 0; 7 WT mice on day 7; and 7 PKC-θ–deficient mice. **B**: Quantitative assessment of brain capillary permeability using Evans blue extravasation in formamide was measured via absorbance at 610 nm in brain extract. Values are given as mean (SD) from 3 different experiments as in **A**. **C**: Microvascular damage with mononuclear cell adhesion and perivascular hemorrhage is visible in the brain cortex of WT mice 7 days after infection but not in uninfected WT mice or PKC-θ–deficient mice. Microscopy sections (original magnification ×80) demonstrate representative H&E staining from 2 independent experiments: 8 WT mice on day 0; and 4 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7 after infection. **D**: Severity of brain microvascular obstruction and local hemorrhage was assessed semiquantitatively from a whole-brain section between −5.64 and −6.84 from the bregma. Bar graphs show mean (SD) score from 2 independent experiments as in **C**. **E**: Lung alveolar damage of infected WT and PKC-θ–deficient mice on *Pb*A infection. Magnifications are ×40 (**upper panels**) and ×100 (**lower panels**) of representative H&E staining from 2 independent experiments: 7 WT mice on day 0, and 4 PKC-$\theta^{-/-}$ and 7 WT mice on day 7 after infection. **F**: Semiquantitative scores of thickening of alveolar septae, cell accumulation in alveoli, and reduction in size of alveoli. Bar graphs show mean (SD) scores from 2 independent experiments as in **E**. NS, not significant. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

crovascular disease of the brain due to obstruction of small vessels with parasitized erythrocyte and leukocyte sequestration and damaging of endothelial cells.[21,26–28] Wild-type and PKC-θ–deficient mice were examined at day 7, when sensitive mice start developing acute CM. Typical MRI and MRA images of uninfected and infected mice are shown in Figure 2,A and B, respectively.

While wild-type mice exhibited distinct signs of ischemic brain damage on blood stage *Pb*A infection, PKC-θ–deficient mice demonstrated normal MRI parameters without any signs of edema or infection, similar to findings in uninfected mice. *Pb*A-infected wild-type mice exhibited distinct changes at MRI, observable as a bilateral hyperintense signal at the corpus callosum (Figure 2A). The gray level intensity in the corpus callosum was significantly increased after *Pb*A infection in wild-type mice, whereas no significant variation was observed in PKC-θ–infected or PKC-θ–noninfected mice (Figure 2C). Brain edema or swelling was documented in infected wild-type mice during acute CM by measuring 3 distances in the brain (Figure 2D): (1) line 1 from the pituitary gland to the aqueduct of Sylvius, (2) median line 2 crossing the medial cerebellar nucleus, and (3) medium line 3 stemming from the cerebellar obex.[26] Distances 1 and 3 were significantly increased and distance 2 was significantly reduced in infected wild-type mice compared with noninfected mice (Figure 2D), in agreement with data from Penet et al.[26] In contrast, these metric parameters were not significantly altered in infected PKC-θ–deficient mice compared with noninfected PKC-θ–deficient or wild-type mice (Figure 2D).

MRA analysis showed that while wild-type mice demonstrated distinct vascular blood flow perturbations on blood stage *Pb*A infection, with a dramatic reduction of blood flow (Figure 2B), PKC-θ–deficient mice exhibited normal MRA parameters after infection, without any signs of microvascular obstruction, similar to findings in uninfected mice (Figure 2B). Therefore, PKC-θ signaling is critically involved in development of microvascular obstruction and ischemic brain damage consequent to *Pb*A infection.

Microvascular Cerebral But Not Pulmonary Lesions Are Absent in PKC-θ–Deficient Mice on Pb*A Infection*

To validate functionally the data obtained at MRI, microvascular lesions in the brain were investigated. Microvessel obstruction and disruption, which leads to increased protein extravasation from the capillary bed, was quantified via Evans blue leakage into tissue. *Pb*A-infected wild-type mice demonstrated strong vascular leakage of Evans blue, whereas PKC-θ–deficient mice exhibited no discoloration of the brain parenchyma (Figure 3A), with nonsignificant blue extravasation (Figure 3B), compared with noninfected wild-type mice and noninfected PKC-θ–

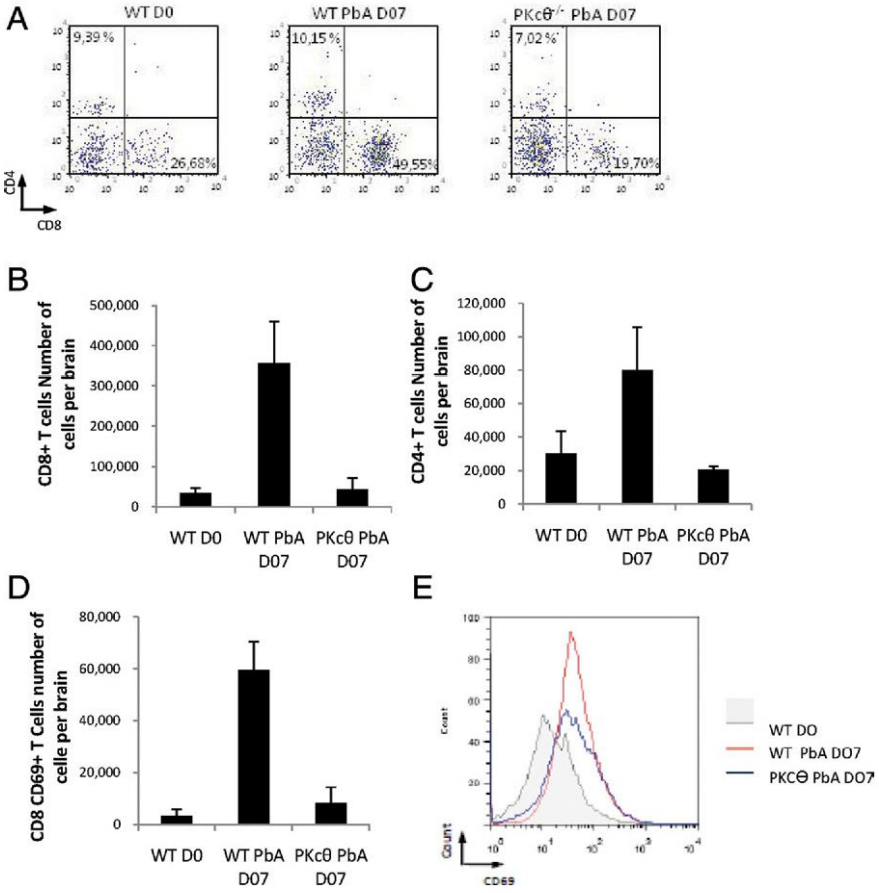


Figure 4. Reduced recruitment and activation of $CD8^+$ lymphocytes in the brains of *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells as in Figure 1. Flow cytometry analyses of brain-sequestered leukocytes from uninfected wild-type mice (WT NI), *Pb*A-infected wild-type mice (WT *Pb*A) with severe CM, and infected CM-resistant PKC-θ–deficient mice tested on the same day. **A**: Representative dot plots of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells within the $CD3^+$ cell populations, representative of 1 from 3 independent experiments. **B** and **C**: Bar graphs show absolute numbers of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, respectively. Values are given as mean (SD) of 3 or 4 pools of 3 or 4 mice per group, and are representative of 1 from 3 independent experiments. **D**: Bar graph shows absolute numbers of $CD8^+CD69^+$ T cells representing the mean (SD) of 2 independent experiments: 3 to 4 pools of 3 to 4 mice per group. **E**: Representative histograms of CD69 staining in $CD8^+$ T cells as in **D**, from 1 representative of 3 independent experiments. NS, not significant. $^*P < 0.01$.

deficient mice (data not shown), demonstrating the integrity of the blood-brain barrier.

Microscopically, the vascular blood flow perturbation was associated with microvascular lesions, with discrete damage to the small vessels and perivascular hemorrhage in the Virchov-Robin space and intravascular accumulation of mononuclear cells and infected and uninfected erythrocytes (Figure 3C), which was completely absent in PKC-θ–deficient mice. The severity of brain microvascular obstruction and local hemorrhage assessed semiquantitatively demonstrated a significant reduction in brain disease in PKC-θ–deficient mice (Figure 3D). Thus, data from the brain microscopic examination were in agreement with MRI results.

Pulmonary edema and acute respiratory distress are common complications in patients with CM.[2] In the *Pb*A CM model, mice exhibit signs of shock, most notably lung edema and inflammation, with vascular leakage.[29] The pulmonary microvascular beds were investigated in *Pb*A-infected wild-type and PKC-θ–deficient mice. The lungs of wild-type mice demonstrated congested capillaries of the alveolar septae, hemorrhage in alveoli, and interstitial edema after infection, similar to findings in *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice (Figure 3E). Lung disease was investigated semiquantitatively, and no significant difference was observed after infection in wild-type and PKC-θ–deficient mice (Figure 3F), which suggests that the lung disease is PKC-θ–independent. Therefore, the data suggest that disruption of T-cell signaling in the absence of PKC-θ prevents brain microvascular disease, but not lung inflammation, induced by *Pb*A blood stage infection.

Inactivation of PKC-θ Pathway Reduced Cerebral T-Cell Sequestration and Activation

Trafficking and recruitment of effector T lymphocytes into the brain are clearly necessary for development of disease associated with experimental CM.[10,30] Leukocytes sequestered in the brain in wild-type and PKC-θ–deficient mice were quantified at a time point when sensitive mice develop neurologic symptoms of CM on *Pb*A infection. Within $CD3^+$ T cells, both $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell populations were strongly increased in the brain of *Pb*A-infected wild-type mice compared with uninfected control mice (Figure 4, A–C). In contrast, T-cell recruitment was essentially absent in *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice. Expression of CD69, a marker of T-cell activation, was up-regulated in $CD8^+$ T cells on *Pb*A infection in both groups (Figure 4E); however, marked $CD69^+$ $CD8^+$ T-cell recruitment was observed only in wild-type mice (Figure 4D). Thus, brain sequestration of activated effector T lymphocytes on *Pb*A infection was drastically reduced in PKC-θ–deficient mice.

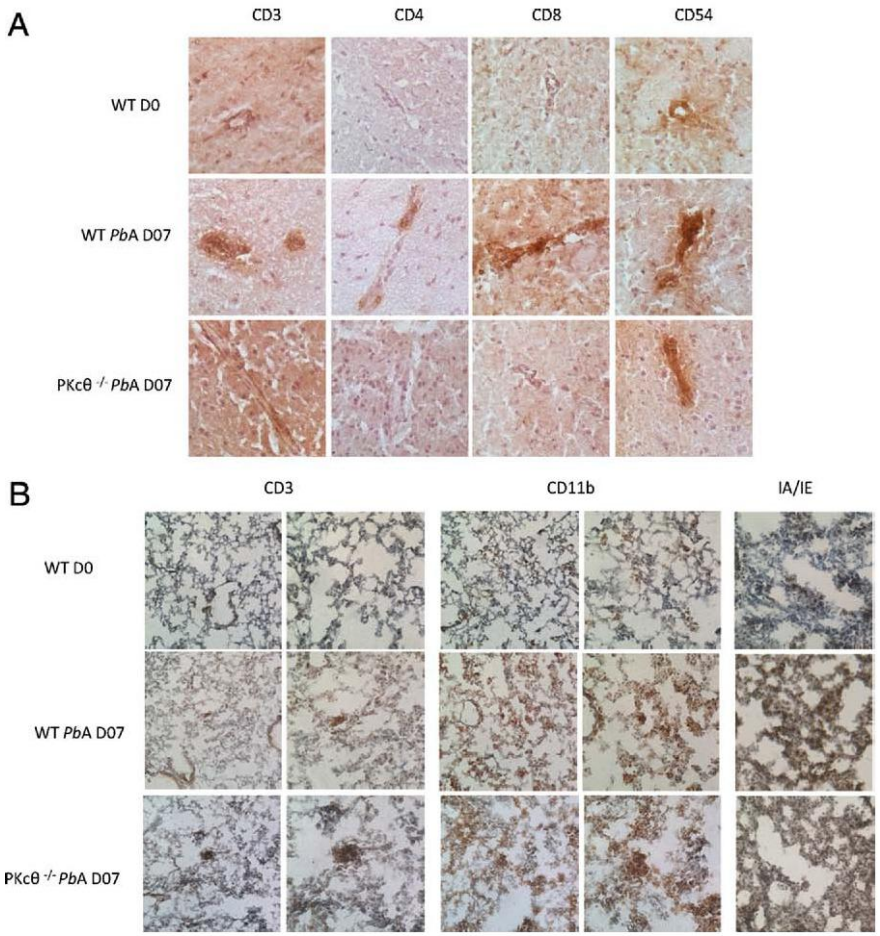


Figure 5. Immunohistologic staining shows reduced lymphocyte infiltration in the brains of *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells as in Figure 1. **A**: Staining of $CD3^+$, $CD8^+$, $CD4^+$, and $CD54^+$ cells in brain vessels of infected wild-type (WT) mice that developed CM and in CM-resistant PKC-θ–deficient mice. Noninfected WT mice (D0) served as controls (micrograph ×40). Results are representative of 3 to 4 mice per group and are from 1 representative of 2 independent experiments. **B**: Staining of $CD3^+$, $CD11b^+$, and IA/IE^+ cells in lung of infected WT mice and PKC-θ–deficient mice. Noninfected WT mice (D0) served as controls. Magnification ×20x (**left panels**) and ×40 (**right panels**) for CD3 and CD11b staining, and ×40 for IA/IE staining. Results are representative of 3 to 4 mice per group, and are from 1 representative of 2 independent experiments.

Topical distribution of the infiltrating T lymphocytes was determined via immunostaining brain sections (Figure 5A). $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells, present in brain of *Pb*A-infected wild-type mice were largely absent in *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice. The question then was whether adhesion molecule expression was influenced by the absence of PKC-θ signaling (Figure 5A). Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54), as a marker of T-cell activation, was increased in *Pb*A-infected wild-type mice, but less so in PKC-θ–deficient mice (Figure 5A). Intercellular adhesion molecule-1 expression was also up-regulated in the brain on *Pb*A infection; however, the increase was much less marked in PKC-θ–deficient mice. Thus, microscopic examination confirmed the absence of sequestered activated effector T lymphocytes in the brain of PKC-θ–deficient mice on *Pb*A infection.

To further understand the absence of protection from lung inflammation in PKC-θ–deficient mice, immunohistologic staining of lung sections was performed (Figure 5B). Lung infiltration of $CD3^+$ T cells was not increased 7 days after *Pb*A infection in either wild-type or PKC-θ–deficient mice. In contrast, pulmonary infiltration of macrophages, demonstrated at CD11b staining, was largely increased during *Pb*A infection, as was expression of major histocompatibility complex class II (IA and IE) (Figure 5B), indicating strong activation of lung tissue cells in both wild-type and PKC-θ–deficient mice. Therefore, *Pb*A-induced lung disease is due to strong, PKC-θ–independent recruitment and activation of a non–T-cell leukocyte subset such as macrophages.

Hematologic Alterations in PKC-θ–Deficient Mice

Thrombocytopenia and anemia are hallmarks of the course of *Pb*A infection in mice.[21,31] Therefore, hematologic parameters were investigated in naïve and *Pb*A-infected wild-type and PKC-θ–deficient mice. Hematologic analyses revealed similar reductions in platelet counts in wild-type and PKC-θ–deficient mice at 7 days after *Pb*A infection (Figure 6A), which suggests that thrombocytopenia in *Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice is not an indicator of CM sensitivity in this model.

After *Pb*A infection for 7 days, wild-type mice show a reduction of circulating white blood cells (Figure 6B), largely attributed to a decrease in lymphocytes (Figure 6D). Although the total white blood cell count was slightly lower in naïve PKC-θ–deficient mice compared with wild-type mice, there was a decrease in white blood cell and lymphocyte counts in PKC-θ–deficient mice at 7 days after *Pb*A infection (Figure 6, B and D). However, white blood cell and lymphocyte counts increased dramatically to greater than $100 \times 10^3/\mu L$ in CM-resistant PKC-θ–deficient mice on days 14 to 21 after infection (Figure 6, C and E). Although no significant anemia developed in wild-type mice at 7 days after infection (Figure 6F), PKC-θ–deficient mice developed dramatic anemia at 2 and 3 weeks after *Pb*A infection, reaching a mean (SD) of 2.07 (0.54) $\times 10^6$ red blood cells per microliter (Figure 6G).

Therefore, resistance of PKC-θ–deficient mice to CM development was not associated with thrombocytopenia. The

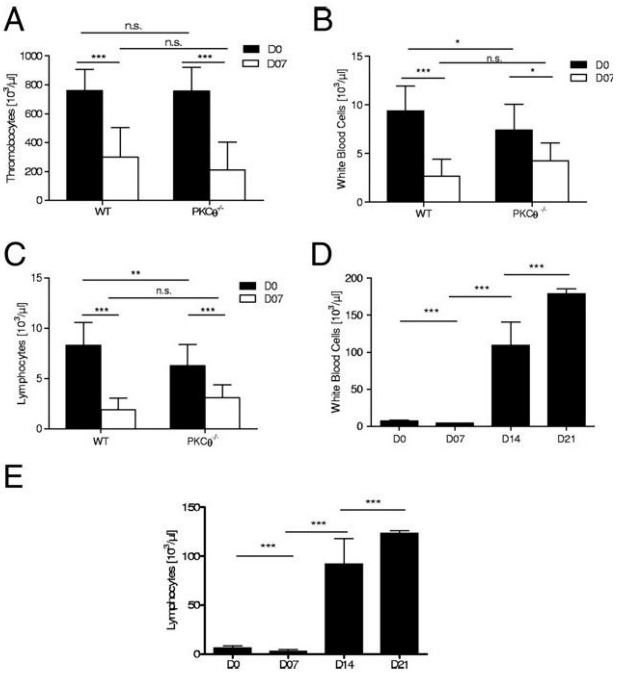


Figure 6. Hematologic alterations in PKC-θ–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A parasitized red blood cells as in Figure 1. Platelet (**A**), total white blood cell (**B**), and lymphocyte (**C**) counts were determined in peripheral blood of naïve and 7-day infected wilt-type (WT) and PKC-θ–deficient mice. Results are mean (SD) from 4 independent experiments: 15 PKC-$\theta^{-/-}$ and 21 WT mice on day 0; and 21 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 7. Kinetics of total white blood cell (**D**) and lymphocyte (**E**) counts are shown up to day 7 for WT mice and up to day 21 after infection for CM-resistant PKC-θ–deficient mice. Values are given as mean (SD) from 4 independent experiments: 15 PKC-$\theta^{-/-}$ and 21 WT mice on day 0; 21 PKC-$\theta^{-/-}$ and 6 WT mice on day 7; and 4 and 3 PKC-$\theta^{-/-}$ mice on days 14 and 21. NS, not significant. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

*Pb*A-infected PKC-θ–deficient mice that were resistant to CM and developed a high degree of parasitemia died at 3 weeks with severe anemia and drastic leukocytosis.

Discussion

PKC-θ signaling is critical for development of fatal experimental CM. Using PKC-θ–deficient mice, it was demonstrated that disruption of PKC-θ signaling abrogated both the T-cell recruitment into the brain and the cerebral microvascular disease that lead to fatal CM. However, PKC-θ signaling has little effect on the associated pulmonary inflammation and edema.

T-cell sequestration and activation are crucial steps in development of CM after *Pb*A infection.[8–10] Suidan et al[30] and Baier et al[32] demonstrated the role of Th1 response in initiation of central nervous system vascular permeability as a $CD8^+$ T cell perforin-dependent process. $CD8^+$ T cells may mediate circulatory shock, vascular permeability changes, and edema in the brain during *PbA*-infection.[29] $CD8^+$ T cells are the primary effector cells of CM in the *PbA* mouse model, although their precise mechanism of action is not known.[8] PKC-θ is expressed in T cells and is a key component of T-cell receptor signaling and activation.[12,13,33,34] However, PKC-θ–dependent pathways are differently required in T-cell activation and are especially critical for development of Th2 but not Th1

cells.[12,13] PKC-θ is not essential for T-cell activation leading to viral clearance.[16] PKC-θ–deficient mice develop less severe neurologic signs in T-cell–dependent experimental autoimmune encephalomyelitis models, with delayed $CD4^+$ T-cell recruitment and modulation of Th1 and Th17 cytokine profiles.[35,36] Moreover, they developed less severe Th1-dependent responses in antigen-induced arthritis.[37]

To address the role of PKC-θ in CM pathogenesis, PKC-θ–deficient mice were investigated for several aspects of the pathophysiology of CM development. The present study demonstrated protection of PKC-θ–deficient mice against CM after infection with *Pb*A, in agreement with the recent study of Ohayon et al,[38] who also demonstrated that PKC-θ has an effect on CM development; however, dissociated were the CM and the lung disease that are not affected by PKC-θ deficiency. Most PKC-θ–deficient mice survived beyond day 15 without signs of CM. The early death observed in 40% of PKC-θ–deficient mice was not associated with any of the classic visible CM symptoms observed in wild-type mice such as loss of gripping reflex, and might be related to a higher parasite load rather than to experimental CM development, although the explanation for the cause of early death remains speculative. However, the propagation of *Pb*A infection in erythrocytes was PKC-θ–independent. Indeed, CM-resistant PKC-θ–deficient mice developed a high parasite load together with severe anemia and leukocytosis, which were fatal after 3 weeks of infection, whereas wild-type mice developed fatal CM at 7 days after *Pb*A infection. This result was associated with unaffected cerebral perfusion as assessed at MRA. There was a correlation of MRA data and microscopic observations. *In vivo* imaging data correlated with absence of microvascular disease, accumulation of mononuclear cells, vascular leak, hemorrhage, and inflammation in the brain of *PbA*-infected PKC-θ–deficient mice.

However, PKC-θ expression is not restricted to T cells. It is also expressed in natural killer cells[39]; in platelets, where it may modulate activation and thrombus formation[40]; in skeletal muscle cells[41]; in the endothelium of muscle resistance arteries, where it modulates vascular tone through insulin-induced vasoconstriction[42]; and in hypothalamus tissue, where it contributes to insulin signaling.[43] PKC-θ could, therefore, exert multifold influence on development of CM, through platelet activation and vascular tone modulation, beyond a direct effect on T cells.

Specifically investigated was whether absence of PKC-θ affected T-cell recruitment during *Pb*A-induced CM. Flow cytometric analysis of thymus, spleen and lymph node cells revealed no abnormalities in PKC-θ–deficient mice.[18] However, after *Pb*A infection, analysis of brain-sequestered cells clearly showed a sharp reduction in brain-infiltrating $CD4^+$, and more drastically of $CD8^+$ and $CD8^+$ $CD69^+$ T cells in CM-resistant PKC-θ–deficient mice. These results are in agreement with those of Saibil et al,[44] who observed that the absence of PKC-θ strongly affected the primary activated $CD8^+$ T cells, whereas $CD4^+$ T cells exhibited only a moderate survival defect. Immunohistologic analysis confirmed reduced recruitment and activation of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the brains of PKC-θ–deficient mice. The reduced T-cell sequestration was associated with a slight reduction in expression of the activation marker CD54 in the brain vessels of PKC-θ–deficient mice. Defective T-cell activation and recruitment to the brain may, therefore, be responsible for protection of PKC-θ–deficient mice from CM development.

$CD8^+$ T cells were central not only to CM[8–10,21] but also to the CM-associated "shock" features including vascular leakage of lung, kidney, and brain; metabolic acidosis; and lowered mean arterial pressure.[29] $CD8^+$ T-cell depletion completely prevented neurologic signs of CM, significantly reduced the symptoms of circulating shock including lung vascular leakage, and restored cardiac output.[29] In the present study, however, there was little $CD3^+$ T-cell infiltration in the lungs from infected wild-type or PKC-θ–deficient mice, whereas there was a strong $CD11b^+$ macrophage infiltration with strong major histocompatibility complex class II expression in both wild-type and PKC-θ–deficient mice. Furthermore, the pulmonary microvascular damage with alveolitis, and plasma and erythrocyte leakage in the alveolar space was similar in wild-type and PKC-θ–deficient mice. Thus, *PbA*-induced brain microvascular damage and inflammation are primarily PKC-θ–dependent, whereas *PbA*-induced lung microvascular damage, edema, and alveolitis are largely PKC-θ–independent.

Therefore, PKC-θ seems to be a critical enzyme that regulates selective T-cell functions and may represent an attractive drug target for treatment of early CM. In conclusion, data from the present study suggest that accumulation of pathogenic $CD8^+$ T cells induced by *Pb*A infection is PKC-θ–dependent and that PKC-θ signaling is required and nonredundant for development of microvascular disease resulting in fatal CM. However, the lung disease can be dissociated from CM. PKC-θ deficiency does not protect against PbA-induced lung microvascular damage, edema, and alveolitis.

Acknowledgments

We thank Manfred Kopf (Molecular Biomedicine, ETH Zurich, Switzerland) for the kind gift of the PKC-θ–deficient mice, and Drs. Maitre and Kerdraon, pathologists at the Regional Hospital Center of Orléans (CHRO, Orléans, France), for expert evaluation of lung and brain histologic analyses.

References

1. Miller LH, Good MF, Milon G: Malaria pathogenesis. Science 1994, 264:1878–1883
2. Idro R, Jenkins NE, Newton CR: Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. Lancet Neurol 2005, 4:827–840
3. Hunt NH, Grau GE: Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. Trends Immunol 2003, 24:491–499
4. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH: Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. N Engl J Med 1989, 320:1586–1591
5. Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M: Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. Am J Med 1989, 87:139–143

6. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM: TNF concentration in fatal cerebral, nonfatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. Lancet 1990, 336:1201–1204
7. Fry AE, Auburn S, Diakite M, Green A, Richardson A, Wilson J, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Griffiths MJ, Peshu N, Williams TN, Marsh K, Molyneux ME, Taylor TE, Rockett KA, Kwiatkowski DP: Variation in the ICAM1 gene is not associated with severe malaria phenotypes. Genes Immun 2008, 9:462–469
8. Renia L, Potter SM, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, Deschemin JC, Snounou G, Gruner AC: Pathogenic T cells in cerebral malaria. Int J Parasitol 2006, 36:547–554
9. Schofield L, Grau GE: Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol 2005, 5:722–735
10. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, Viguier M, Snounou G, Renia L: On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. J Immunol 2002, 169:6369–6375
11. Vyas YM, Maniar H, Dupont B: Cutting edge: differential segregation of the SRC homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions. J Immunol 2002, 168:3150–3154
12. Chaudhary D, Kasaian M: PKC-theta: a potential therapeutic target for T-cell-mediated diseases. Curr Opin Invest Drugs 2006, 7:432–437
13. Marsland BJ, Soos TJ, Spath G, Littman DR, Kopf M: Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th) 2 cell but not Th1 cell responses. J Exp Med 2004, 200:181–189
14. Srivastava KK, Batra S, Sassano A, Li Y, Majchrzak B, Kiyokawa H, Altman A, Fish EN, Platanias LC: Engagement of protein kinase C-theta in interferon signaling in T-cells. J Biol Chem 2004, 279:29911–29920
15. Marsland BJ, Nembrini C, Schmitz N, Abel B, Krautwald S, Bachmann MF, Kopf M: Innate signals compensate for the absence of PKC-(theta) during in vivo CD8(+) T cell effector and memory responses. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102:14374–14379
16. Giannoni F, Lyon AB, Wareing MD, Dias PB, Sarawar SR: Protein kinase C theta is not essential for T-cell–mediated clearance of murine gammaherpesvirus 68. J Virol 2005, 79:6808–6813
17. Marsland BJ, Nembrini C, Grun K, Reissmann R, Kurrer M, Leipner C, Kopf M: TLR ligands act directly upon T cells to restore proliferation in the absence of protein kinase C-theta signaling and promote autoimmune myocarditis. J Immunol 2007, 178:3466–3473
18. Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR: PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature 2000, 404:402–407
19. Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ: A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. Mol Biochem Parasitol 2004, 137:23–33
20. Rudin W, Eugster HP, Bordmann G, Bonato J, Muller M, Yamage M, Ryffel B: Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta–deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. Am J Pathol 1997, 150:257–266
21. Togbe D, de Sousa PL, Fauconnier M, Boissay V, Fick L, Scheu S, Pfeffer K, Menard R, Grau GE, Doan BT, Beloeil JC, Renia L, Hansen AM, Ball HJ, Hunt NH, Ryffel B, Quesniaux VF: Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. PLoS ONE 2008, 3:e2608
22. Kampfl AW, Birbamer GG, Pfausler BE, Haring HP, Schmutzhard E: Isolated pontine lesion in algid cerebral malaria: clinical features, management, and magnetic resonance imaging findings. Am J Trop Med Hygiene 1993, 48:818–822
23. Looareesuwan S, Wilairatana P, Krishna S, Kendall B, Vannaphan S, Viravan C, White NJ: Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral malaria. Clin Infect Dis 1995, 21:300–309
24. Cordoliani YS, Sarrazin JL, Leveque C, Goasdoue P, Sabbah P: Imaging of encephalic parasitic diseases [in French]. J Neuroradiol 1998, 25:290–305
25. Patankar TF, Karnad DR, Shetty PG, Desai AP, Prasad SR: Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. Radiology 2002, 224:811–816
26. Penet MF, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Duhamel G, Kober F, Ibarrola D, Izquierdo M, Coltel N, Gharib B, Grau GE, Cozzone PJ: Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. J Neurosci 2005, 25:7352–7358
27. Stoelcker B, Hehlgans T, Weigl K, Bluethmann H, Grau GE, Manne DN: Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. Infect Immun 2002, 70:5857–5859
28. Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, De Souza JB, Bickle QD, Kaye PM: Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. J Exp Med 2002, 195:1371–1377
29. Chang WL, Jones SP, Lefer DJ, Welbourne T, Sun G, Yin L, Suzuki H, Huang J, Granger DN, van der Heyde HC: CD8(+)-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in Plasmodium berghei-infected mice. Infect Immun 2001, 69:7341–7348
30. Nitcheu JBO, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D, Combadiere B: Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. J Immunol 2003, 170:22221–22228
31. Grau GE PP, Gretener D, Vesin C, Lambert PH: Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. Immunology 1988, 65: 501–506
32. Suidan GL, McDole JR, Chen Y, Pirko I, Johnson AJ: Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. PLoS ONE 2008, 3:e3037
33. Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N, Altman A: Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. J Biol Chem 1993, 268:4997–5004
34. Isakov N, Altman A: Protein kinase C(theta) in T cell activation. Annu Rev Immunol 2002, 20:761–794
35. Salek-Ardakani S, So T, Halteman BS, Altman A, Croft M: Protein kinase Ctheta controls Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2005, 175:7635–7641
36. Tan SL, Zhao J, Bi C, Chen XC, Hepburn DL, Wang J, Sedgwick JD, Chintalacharuvu SR, Na S: Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired IL-17 production in protein kinase C theta–deficient mice. J Immunol 2006, 176:2872–2879
37. Healy AM, Izmailova E, Fitzgerald M, Walker R, Hattersley M, Silva M, Siebert E, Terkelsen J, Picarella D, Pickard MD, LeClair B, Chandra S, Jaffee B: PKC-theta–deficient mice are protected from Th1-dependent antigen-induced arthritis. J Immunol 2006, 177:1886–1893
38. Ohayon A, Golenser J, Sinay R, Tamir A, Altman A, Pollack Y, Isakov N: PKC(theta) deficiency increases resistance of C57BL/6J mice to Plasmodium berghei infection-induced cerebral malaria. Infect Immun 2010, 78:4195–420578
39. Vyas YM, Maniar H, Dupont B: Cutting edge: differential segregation of the SRC homology 2–containing protein tyrosine phosphatase–1 within the early NK cell immune synapse distinguishes noncytolytic from cytolytic interactions. J Immunol 2002, 168:3150–3154
40. Harper MT, Poole AW: Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. J Thromb Haemost 2010, 8:454–462
41. Hilgenberg L, Miles K: Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. J Cell Sci 1995, 108(pt 1):51–61
42. Bakker W, Sipkema P, Stehouwer CD, Serne EH, Smulders YM, van Hinsbergh VW, Eringa EC: Protein kinase C theta activation induces insulin-mediated constriction of muscle resistance arteries. Diabetes 2008, 57:706–713
43. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre AL, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, Niswender K, Irani BG, Holland WL, Clegg DJ: Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. J Clin Invest 2009, 119:2577–2589
44. Saibil SD, Jones RG, Deenick EK, Liadis N, Elford AR, Vainberg MG, Baerg H, Woodgett JR, Gerondakis S, Ohashi PS: CD4+ and CD8+ T cell survival is regulated differentially by protein kinase Ctheta, c-Rel, and protein kinase B. J Immunol 2007, 178:2932–2939

II. RÔLE DU RECEPTEUR IL-12Rβ2 DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE.

Article 2. IL-12Rβ2 is essential for the development of experimental cerebral malaria.

Mathilde Fauconnier*, Jennifer Palomo*, Marie-Laure Bourigault, Sandra Meme, Frederic Szeremeta, Jean-Claude Beloeil, Adeline Danneels, Sabine Charron, Pascal Rihet, Bernhard Ryffel, and Valerie F.J. Quesniaux.

**MF et JP ont contribué à parts égales à ce travail.*

The Journal of Immunology – February 2012 – 188(4):1905-14

Après avoir montré que la voie PKC-θ, impliquée dans la transcription du signal d'activation du TCR, était nécessaire au développement de l'ECM, nous nous sommes intéressés aux mécanismes en amont de l'activation des lymphocytes. Nous avons dans cette deuxième étude cherché à définir le rôle de la voie pro-T_H1 de l'IL-12 dans le développement de la neuropathologie associée à la malaria. En effet, l'IL-12 est essentielle pour l'induction d'une réponse T_H1 et entraîne la libération d'IFN-γ, un médiateur pro-inflammatoire requis pour le développement de l'ECM [238:Villegas-Mendez 2011].

L'IL-12 (ou IL-12p70) est une cytokine dimérique, formée par les sous-unités p40 et p35, sachant que la sous-unité p40 est commune à l'IL-23 (formée par l'IL-12p40 et l'IL-23p19), et la p35 commune à l'IL-35 (formée par l'IL-12p35 et Ebi3) [221:Vignali 2012]. Elle est produite par les cellules présentatrices d'antigène, et signale sur son récepteur dimérique (IL-12Rβ1 / IL-12Rβ2) présent entre autres, sur les cellules T et les cellules NK. La chaine IL-12Rβ1 est aussi commune au récepteur de l'IL-23. Lors de notre étude, l'IL-12Rβ2 était connue comme spécifique du récepteur de l'IL-12. Depuis, il a été vu que la sous-unité IL-12Rβ2 pouvait aussi s'associer à la gp130 et former le récepteur de l'IL-35 (**Figure 25**).

En revanche, le lien entre l'IL-12 et la malaria cérébrale était mal défini. Chez l'homme, il a été suggéré que l'IL-12 puisse avoir un rôle protecteur, au vu du faible taux sérique mesuré chez les patients ayant développé la complication cérébrale [279:Marquet 2008]. Cependant, un polymorphisme du gène *Il12b* puis une forte concentration sérique d'IL-12p70 ont été retrouvés chez des patients atteints de malaria sévère [227:Lyke 2012 - 228:Naka 2009]. Chez la souris, l'IL-12 a été associée au contrôle du parasite dans des modèles de malaria clinique [237:Su 2002 - 280:Stevenson 1995 - 281:Normaznah 1999]. Cependant, l'induction d'IL-12, par l'administration de CpG, semble induire une production d'IFN-γ nécessaire pour rendre des souris BALB/c sensibles à l'ECM induite par *Pb*A [230:Schmidt 2011]. Aussi, l'IL-12 semble participer à l'initiation de la perméabilisation vasculaire (par les cellules $CD8^+$ $Perf^+$) lors de l'ECM [196:Nitcheu 2003].

Nous avons donc étudié plus en détails le rôle de l'IL-12 dans le développement de la malaria cérébrale et pulmonaire. Pour cela nous avons utilisé des souris déficientes pour les chaînes IL-12Rβ2, l'IL-12p40, l'IL-12p35 ou l'IL-23p19. Et nous avons comparé leur réponse à celle de souris de type sauvage, après infection par *Pb*A au stade sanguin.

Tout d'abord, nous avons observé que l'infection par *Pb*A induisait une inflammation dans les poumons, avec la séquestration d'hématies chez les souris déficientes ou bien de type sauvage. La pathologie pulmonaire semble donc indépendante de la voie IL-12Rβ2, IL-12p40 et IL-12p35.

A l'inverse, bien que l'absence de l'IL-12Rβ2 ne protège pas contre la pathologie pulmonaire, nous avons pu observer que 90% des souris déficientes en IL-12Rβ2 ne développent pas les symptômes neurologiques caractéristiques de l'ECM et survivent au-delà de 3 semaines après infection. Ainsi, il apparait que le développement de l'ECM requiert

la présence du récepteur IL-12Rβ2. Nous avons également mesuré la charge parasitaire sanguine. Mais l'évolution de la parasitémie est identique chez toutes les souris après infection par *Pb*A et, continue d'augmenter chez les souris déficientes en IL-12Rβ2 et résistantes à l'ECM.

Nous avons utilisé les techniques non invasives d'IRM et d'ARM afin d'estimer le développement de la neuropathologie. Tandis que les souris de type sauvage susceptibles à l'ECM présentent des signes d'œdème, de gonflement et d'ischémie dans le cerveau après infection par *Pb*A, les souris déficientes en IL-12Rβ2 ne présentent aucune caractéristique d'ECM, et ont un profil identique aux souris naïves.

Dans le but de confirmer les observations effectuées par IRM et ARM, nous avons par la suite étudié l'intégrité de l'endothélium. Les analyses histologiques et le test de perméabilité au Bleu Evans indiquent un endommagement de l'endothélium cérébral, à l'origine d'hémorragies localisées, et une séquestration d'hématies et de leucocytes, chez les souris de type sauvage après infection par *Pb*A. Alors que les souris déficientes en IL-12Rβ2 ne présentent pas de lésion de l'endothélium vasculaire, ni de séquestration de cellules.

Ensuite, l'IL-12Rβ2 étant nécessaire à l'endommagement de la BHE, nous avons cherché à définir quels éléments de la réponse immune étaient modifiés par la déficience en IL-12Rβ2. Ainsi, tandis que l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (CD54) au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral, semble augmentée de la même façon chez les souris de type sauvage et déficientes en IL-12Rβ2, l'expression dans le cerveau des ARNm des médiateurs pro-inflammatoires IFN-γ, LT-α et TNF-α sont réduits chez les souris déficientes en IL-12Rβ2 après infection par *Pb*A. Puis, nous avons caractérisé par immuno-marquage et cytométrie en flux les leucocytes séquestrés dans le cerveau. Alors que l'infection par *Pb*A induit un fort recrutement de cellules T $CD8^+$ (et de façon moins importante de $CD4^+$) $CD69^+$ et $Perforine^+$, les souris déficientes en IL-12Rβ2, ne présentent que très peu de cellules séquestrées dans les vaisseaux cérébraux.

La déficience en IL-12Rβ2 protège contre le recrutement de cellules T cytotoxiques et contre l'endommagement de la BHE. A l'inverse, les souris déficientes pour les chaînes IL-12Rβ1, IL-12p40, en IL-12p35 ou en IL-23p19 présentent une sensibilité à l'ECM comparable aux souris de type sauvage et décèdent 7 à 10 jours après infection par *Pb*A d'atteinte cérébrale. Les souris déficientes en IL-12p40 ou en IL-12p35 susceptibles à l'ECM présentent un profil IRM/ARM semblable aux souris de type sauvage, avec des signes

d'œdème, de gonflement et d'ischémie dans le cerveau après infection par *Pb*A. Les analyses histologiques indiquent un endommagement de l'endothélium cérébral, à l'origine d'hémorragies localisées, et une séquestration d'hématies et de leucocytes, chez les souris déficientes en IL-12p40 ou en IL-12p35, sensibles à l'ECM induite par *Pb*A.

Ainsi, l'IL-12Rβ2 était essentiel à l'activation et au recrutement des cellules T $CD8^+$ pathogéniques dans le cerveau et nécessaires au développement de l'ECM, mais la déficience en IL-12p40 ou en IL-12p35 ne reproduit pas le phénotype de résistance à l'ECM. Il est possible d'envisager une redondance parmi les différents ligands connus de la famille de l'IL-12 : p40, p35, p19, p28 ou Ebi3. Il aussi envisageable que la sous-unité IL-12Rβ2 puisse s'associer avec une autre sous-unité et reconnaitre un ligand différent de l'IL-12p70.

IL-12Rβ2 Is Essential for the Development of Experimental Cerebral Malaria

Mathilde Fauconnier,[*,†,1] Jennifer Palomo,[*,†,1] Marie-Laure Bourigault,[*,†] Sandra Meme,[‡] Frédéric Szeremeta,[‡] Jean-Claude Beloeil,[‡] Adeline Danneels,[*,†] Sabine Charron,[*,†] Pascal Rihet,[§,¶] Bernhard Ryffel,[*,†,‖] and Valérie F. J. Quesniaux[*,†]

A Th1 response is required for the development of *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A)-induced experimental cerebral malaria (ECM). The role of pro-Th1 IL-12 in malaria is complex and controversial. In this study, we addressed the role of IL-12Rβ2 in ECM development. C57BL/6 mice deficient for IL-12Rβ2, IL-12p40, or IL-12p35 were analyzed for ECM development after blood-stage *Pb*A infection in terms of ischemia and blood flow by noninvasive magnetic resonance imaging and angiography, T cell recruitment, and gene expression. Without IL-12Rβ2, no neurologic sign of ECM developed upon *Pb*A infection. Although wild-type mice developed distinct brain microvascular pathology, ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice showed unaltered cerebral microcirculation and the absence of ischemia after *Pb*A infection. In contrast, mice deficient for IL-12p40 or IL-12p35 were sensitive to ECM development. The resistance of IL-12Rβ2–deficient mice to ECM correlated with reduced recruitment of activated T cells and impaired overexpression of lymphotoxin-α, TNF-α, and IFN-γ in the brain after *Pb*A infection. Therefore, IL-12Rβ2 signaling is essential for ECM development but independent from IL-12p40 and IL-12p35. We document a novel link between IL-12Rβ2 and lymphotoxin-α, TNF-α, and IFN-γ expression, key cytokines for ECM pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 000–000.

Cerebral malaria is the most severe neurologic complication in children and young adults infected with *Plasmodium falciparum*. The specific role of T cells in the pathogenesis of cerebral malaria has been difficult to address in humans. In mice, mononuclear cell sequestration and T cell activation are crucial steps for the development of experimental cerebral malaria (ECM) after *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) infection (1–3), a murine model reproducing several pathophysiological features of the human disease (4). Brain-sequestered αβ $CD8^+$ T cells were shown to play a pathogenic, effector role for ECM development (1).

The implication of Th1-promoting IL-12 in malaria and cerebral malaria, in both humans and mice, is still controversial. IL-12 was implicated in the control of early parasite development (5). Low serum levels of IL-12 and IFN-γ have been shown in children with cerebral malaria, supporting a protective role for the Th1 pathway (6). However, a role for Th1 response was reported in the initiation of CNS vascular permeability, a $CD8^+$ T cell perforin-dependent process (7, 8). $CD8^+$ T cells may mediate circulatory shock, vascular permeability changes, and edema in the brain during *Pb*A infection (9). Indeed, $CD8^+$ T cells are the primary effector cells of ECM in the *Pb*A mouse model, although their precise mechanism of action remains unresolved (3). We reported recently that the absence of protein kinase C-θ expression, a critical regulator of TCR signaling and T cell activation, prevents ECM pathogenesis upon *Pb*A infection (10).

IL-12 is a heterodimeric cytokine composed of two subunits, p40 and p35. IL-12 is produced primarily by APCs and acts as an immunoregulatory molecule on T and NK cells. IL-12R, formed by the association of IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 chains, is expressed primarily on activated T and NK cells. IL-12 induces IFN-γ, which is involved in protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection (11). Furthermore, treatment of susceptible mice with rIL-12 decreases parasite burden and increases survival after *P. chabaudi* infection (11). A crucial role for IL-12 in the early phase of blood-stage *P. chabaudi* infection was shown in terms of IFN-γ induction but also of Ab response involved in suppressing and resolving the chronic phase of infection (12). *P. berghei* NK65 infection induces the activation of TLR-MyD88 signaling, leading to IL-12 expression and liver injury, without a decrease in parasite proliferation (13). A protective immunity against *P. berghei* malaria was seen after treatment with exogenous IL-12 (14), and downregulation of IL-12p70 expression was seen in peritoneal exudate cells from *Pb*A-infected mice, mediated through IL-10 inhibition of IL-12p40 message (15).

In this study, we investigated a novel aspect of the IL-12 pathway, namely, an IL-12Rβ2 response, which seems to be involved in the development of ECM but different from the known

*Immunologie et Embryologie Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, 45071 Orléans, France; †Unité Mixte de Recherche 6218, Université d'Orléans, 45071 Orléans, France; ‡Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 45071 Orléans, France; §Technologies Avancées pour le Génome et la Clinique, Unité Mixte de Recherche 928, INSERM, 13288 Marseille, France; ¶Aix-Marseille Université, 13288 Marseille, France; and ‖Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, 7925 Cape Town, South Africa

[1]M.F. and J.P. contributed equally to this work.

Received for publication July 6, 2011. Accepted for publication December 8, 2011.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the European FP6 EUMODIC project and was performed in the context of the International Associated Laboratory TB IMMUNITY.

Portions of this work were presented at the Gordon Conference on Malaria, September 8, 2009, Oxford, United Kingdom.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Valérie Quesniaux, Transgenose Institute, Immunologie et Neurogénétique Expérimentale et Moléculaire, Unité Mixte de Recherche 7355 (ex-UMR6218), Centre National de la Recherche Scientifique, 3B Rue de la Ferollerie, F-45071 Orléans, France. E-mail address: quesniaux@cnrs-orleans.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ECM, experimental cerebral malaria; LT-α, lymphotoxin-α; MRA, magnetic resonance angiography; MRI, magnetic resonance imaging; *Pb*A, *Plasmodium berghei* ANKA; RT, reverse transcription; WT, wild-type.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1101978

IL-12 responses. We report the prevention of ECM in mice deficient for IL-12Rβ2. Magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic resonance angiography (MRA) were used as noninvasive tools to document the absence of pathological changes in these mice. Furthermore, mice deficient for IL-12p40 or IL-12p35 were sensitive to ECM, suggesting that IL-12Rβ2 is involved in the development of ECM, whereas IL-12p40 and IL-12p35 were dispensable.

Materials and Methods

Mice

Mice deficient for IL-12Rβ2 (16), IL-12p40 (17), or IL-12p35 (18) were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (Unité Propre de Service 44, Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, France). All of the mice were on a C57BL/6J genetic background, back-crossed 7 times for IL-12Rβ2–deficient mice and at least 10 times for IL-12p40– and IL-12p35–deficient mice. The C57BL/6 genetic background in IL-12Rβ2–deficient mice was verified using a set of 20 microsatellites (D1Nds9, D2mit148, D3mit22, D4mit2, D5mit188, D6mit74, D7mit222, D8mit4, D9mit10, D10mit10, D11mit5, D12mit46, D13mit159, D14mit30, D15mit121, D16mit5, D17mit16, D18mit188, D19mit1, and DXmit140). For the experiments, adult (7- to 10-wk-old) mice were kept in filtered-cages at the Biosafety Level 2 animal facility. All of the animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations (CLE CCO 2009-007).

Experimental malaria infection

A recombinant *Pb*A that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle, from a transgene controlled by the strong promoter from a *P. berghei* elongation factor-1α gene, was obtained from Dr. A. Waters (University of Glasgow, Glasgow, Scotland) (19). The parasite was frozen and amplified by passage in C57BL/6J mice. Mice were infected by i.p. injection of 10^5 parasitized erythrocytes as described (20). Mice were followed daily for neurologic signs of ECM, and blood–brain barrier integrity was assessed by Evans blue extravasation as described (10).

Parasitemia

Parasitemia was assessed with enhanced GFP-*Pb*A as described (21), and fluorescent cells were analyzed with a BD Canto II flow cytometer. Data were acquired by using DIVA software (BD Biosciences, Rungis, France) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Hematology

Blood was drawn into EDTA-containing tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Grenoble, France), and hematological parameters were determined using a five-part differential hematology analyzer (MS9-5; Melet Schloesing Laboratories, Osny, France).

Histology and immunohistological staining

Histological analysis and immunohistological staining were performed as described (10). Mice were euthanized and perfused with intracardiac sterile PBS/0.002 M EDTA to remove circulating RBCs and leukocytes from the brain and lungs. The brain and lungs from *Pb*A-infected mice were fixed in 3.6% PBS/formaldehyde for 72 h. Longitudinal sections (3 μm) were stained with H&E. Brain microvascular pathology with endothelial damage, accumulation of mononuclear cells, and extravasated erythrocytes in the Virchow-Robin space were assessed semiquantitatively from a whole-brain section typically between −5.64 and −6.84 from the bregma. Erythrocyte accumulation in the alveoli and thickening of alveolar septae of the lung were quantified using a semiquantitative score with increasing severity of changes (0–5) by two independent observers, including a trained pathologist (B.R.). Brain microvascular obstruction was evaluated by scoring the number of vessels containing sequestered RBCs in multiple fields corresponding to whole-brain sections (0% microvascular obstruction = 0; 1–19% microvascular obstruction = 1; 20–39% microvascular obstruction = 2; 40–59% microvascular obstruction = 3; 60–79% microvascular obstruction = 4; >80% microvascular obstruction = 5). Lung sections were scored on 10 fields per section for erythrocyte accumulation in the alveoli (<1 cell/alveoli = 0, 1 cell/alveoli = 1; 2–5 cells/alveoli = 2; 5–10 cells/alveoli = 3; 10–30 cells/alveoli = 4; >30 cells/alveoli = 5), alveolar size (all normal alveoli = 0, mix of normal and medium-sized alveoli = 1; medium-sized alveoli only = 2; mix of medium and small alveoli = 3; all small alveoli = 4; full obstruction would be 5 but was not observed), and thickening of alveolar septae due to inflammatory cells, and edema was scored with increasing severity from 0 to 5 as an estimate of interstitial inflammation.

For immunohistochemistry staining, euthanized mice were perfused as above, and brains were harvested, embedded in OCT media (Tissue Tek; Sakura), and frozen rapidly. Cryosections (10 μm) were fixed in acetone, washed in PBS/0.05% Tween and PBS, and incubated for 30 min with 2% wild-type (WT) mouse serum in PBS. All of the incubations were carried out in a wet chamber. Brain sections then were incubated overnight at 4°C with biotinylated rat Abs to CD54 (clone 3E2; BD Pharmingen). After being washed, sections were incubated for 30 min with an avidin–biotin peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA), followed by the peroxidase substrate (diaminobenzidine; Vector Laboratories). The staining was fixed with copper sulfate 1% (Sigma-Aldrich); sections were washed in PBS and colored with hematoxylin. Finally, sections were mounted using Eukitt (O. Kindler, Freiburg, Germany) and examined microscopically.

Brain imaging using MRI

MRI and MRA measurements of vascular cerebral blood flow were performed as described previously (21) using a horizontal 9.4 T/20 Bruker BioSpec magnetic resonance system (Bruker BioSpin, Wissembourg, France).

Immunophenotyping of brain-sequestered leukocytes

Mice were euthanized on day 7, a time point when all of the WT mice showed neurologic symptoms of ECM, and perfused with 10 ml PBS/0.02% EDTA intracardiac to remove circulating RBCs and leukocytes as described (21). Brains were removed and homogenized gently (30 s at 4000 rpm) using the sterile disposable homogenization system Dispomix (Medic Tools, Zug, Switzerland) in RPMI 1640 medium containing 2% FCS. Homogenates were passed through a nylon cell strainer (100 μm; Becton Dickinson), and cells were centrifuged at 400 × *g* for 10 min. The mononuclear cells then were separated over a 35% Percoll gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Brain-sequestered leukocytes were collected, washed, and saturated with mouse serum before being stained with fluorescently labeled Abs for 30 min. The cells then were phenotyped by flow cytometry using the following rat Abs specific for mouse CD3ε conjugated to FITC (clone 145-2C11), CD4 conjugated to PerCP (clone L3T4 RM4-5), CD8α conjugated to allophycocyanin-cyanin7 (clone 53-6.7), CD69 (clone H1.2F3) or perforin (clone eBioOMAK-D) conjugated to PE, and isotype-matched control Abs (all from BD Pharmingen, San Diego, CA). For the analysis of perforin expression, the cells were permeabilized for 20 min with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) before Ab staining. For each sample, 5000 cells from the mononuclear population (gated on the $CD3^+$ cell population) were scored. Data were analyzed using a BD Canto II flow cytometer and FlowJo software (10).

mRNA expression of brain tissue by semiquantitative and real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from homogenized mouse brain and lung using TRI reagent (Sigma-Aldrich) and purified by RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), and quality was determined by NanoDrop (ND-1000). Reverse transcription (RT) was performed in a mix containing RT buffer, $MgCl_2$, dNTPs, random hexamers, RNase inhibitor, and MultiScribe SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Incubations were performed in a thermocycler (Eppendorf, Westbury, NY) for 10 min at room temperature, 30 min at 50°C, and 5 min at 85°C. After this amplification, RNase H was incubated for 20 min at 37°C. These cDNAs were subjected to semiquantitative PCR or real-time quantitative PCR.

The brain transcript level of IL-12Rβ2 also was assessed by semiquantitative PCR, because IL-12Rβ2–deficient mice have a deletion in exons 2 and 3 (16) and commercially available primers for quantitative PCR targeting exon 6 were inappropriate. We thus designed specific primers in exon 3 (5′-TCTTGCCATGGAGATTTTCAACAAGGACATC-3′ and 5′-CAGACTGTTAGAGAATGCTCATTGGCACTTC-3′; Sigma-Aldrich) with hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 as a housekeeping gene (5′-CTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3′ and 5′-TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT-3′; Sigma-Aldrich), and used Taqman polymerase mix for amplification. An initial denaturation (10 min at 95°C) was followed by 30 cycles of amplification (30 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 60°C, and 30 s of amplification at 72°C). PCR products were resolved by electrophoresis on an agarose gel and analyzed by densitometry (ImageJ).

Quantitative real-time PCR and RNA identification were performed using primers from Qiagen for IL-12Rβ2, IFN-γ, lymphotoxin-α (LT-α), LT-β, LT-βR, and TNF-α message expression and Fast SYBR Green Master Mix for amplification and detection. Expression of actin B, GAPDH, and 18S housekeeping genes was used for normalization. Reactions were performed in triplicate using an Mx4000 Stratagene thermocycler (Agilent) and the following program: 95°C for 15 min and 40 cycles of 95°C for 10 s and 56°C for 30 s. Raw data were analyzed using the Relative Expression Software Tool (http://www.rest.de.com/).

Statistical analysis

Statistical significance was determined with GraphPad Prism software (version 4.0; San Diego, CA). Differences between multiple groups were analyzed for statistical significance by means of one-way parametric ANOVA test followed by Bonferroni posttest for the analysis of large groups of samples or by a nonparametric Mann–Whitney *U* test for the analysis of small groups of samples. The p values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

IL-12Rβ2 is essential for ECM development

The functional role of IL-12Rβ2 in the development of ECM was assessed by investigating neurologic signs and survival in mice deficient for IL-12Rβ2 expression (Fig. 1*A*). After *Pb*A infection, WT mice developed neurologic symptoms of ECM, such as ataxia, loss of grip strength, progressive paralysis, and coma, and most succumbed within 1 wk, whereas 90% of IL-12Rβ2–deficient mice survived >21 d with no sign of ECM (Fig. 1*A*). Mice deficient for IL-12p35 or IL-12p40 were sensitive to ECM (Fig. 1*A*); they died between days 6 and 11 with the same phenotype as WT mice. Similarly, mice deficient for IL-23p19 were also sensitive to ECM (Supplemental Fig. 1). We verified the expression of IL-12Rβ2 during ECM, which was overexpressed in the brains of *Pb*A-infected WT mice undergoing ECM (Fig. 1*B*) and absent in IL-12Rβ2–deficient mice (Supplemental Fig. 2). Parasitemia was analyzed by flow cytometry using GFP-transfected parasites (19). Although the onset of parasitemia was similar in all of the groups on day 7, IL-12Rβ2–deficient mice failed to control parasite growth thereafter, with parasitemia increasing up to 30% at day 14 and reaching 55% at day 21 (Fig. 1*C*). IL-12Rβ2–deficient mice succumbed after day 21 with severe anemia (Fig. 1*D*) in the absence of neurologic signs. Therefore, our data point to a critical role for IL-12Rβ2 in ECM development, which cannot be attributed to the known ligands IL-12p40 and IL-12p35 or to a direct effect on parasitemia.

Reduced cerebral ischemia and blood flow perturbation in the absence of IL-12Rβ2

Noninvasive MRI and MRA were used to follow the neuropathology caused by *Pb*A infection, as in human patients to study brain changes during ECM (21–25). In ECM, MRI and MRA allow a semiquantitative analysis of edema/swelling, focal ischemia, morphological changes, and vascular blood flow (21, 26). This could be indicative of microvascular pathology of the brain due to the obstruction of small vessels with parasitized erythrocytes and leukocyte sequestration and endothelial cell damage (21, 26–28). WT and IL-12 pathway-deficient mice were examined at day 7, when sensitive WT mice started developing acute ECM. Typical MRI and MRA images of uninfected and infected mice are shown in Fig. 2*A* and 2*B*, respectively.

WT mice presented distinct signs of ischemic brain damage upon *Pb*A infection, with a clearly increased MRI bilateral hyperintense signal at the corpus callosum, whereas IL-12Rβ2–deficient mice displayed normal MRI parameters without any signs of edema upon infection, similar to those of WT uninfected mice (Fig. 2*A*, 2*C*). IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice exhibited increased

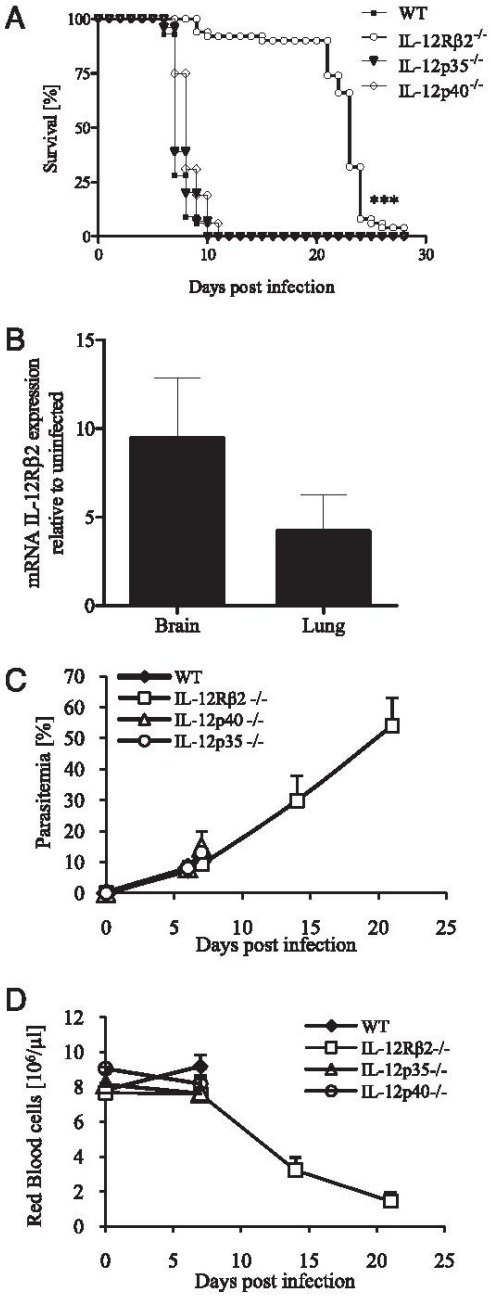


FIGURE 1. IL-12Rβ2–deficient mice do not develop *Pb*A-induced ECM. *A*. WT mice and mice deficient for IL-12Rβ2, IL-12p35, or IL-12p40 were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs, and their survival was monitored daily. Results are pooled from nine independent experiments, n = 16–88 mice per group. *B*, Transcription of IL-12Rβ2 7 d after *Pb*A infection of WT mice was evaluated by real-time RT-PCR in the brain and in the lung. mRNA gene expression was normalized relative to that of uninfected WT mice. Results are mean ± SD of $n = 4$ mice per group and are from one experiment representative of two independent experiments. *C*, The kinetics of parasitemia are shown up to day 7 after *Pb*A infection for WT mice and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice and day 21 postinfection for ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice. Results expressed as the percentage of parasitized RBCs are mean values ± SD from nine independent experiments, n = 26–50 mice per group. *D*, Peripheral RBC count kinetics are shown up to day 7 for WT mice and day 21 after *Pb*A infection for ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice. Results are mean ± SD from five independent experiments, n = 5–33 mice per group. $^{***}p < 0.001$.

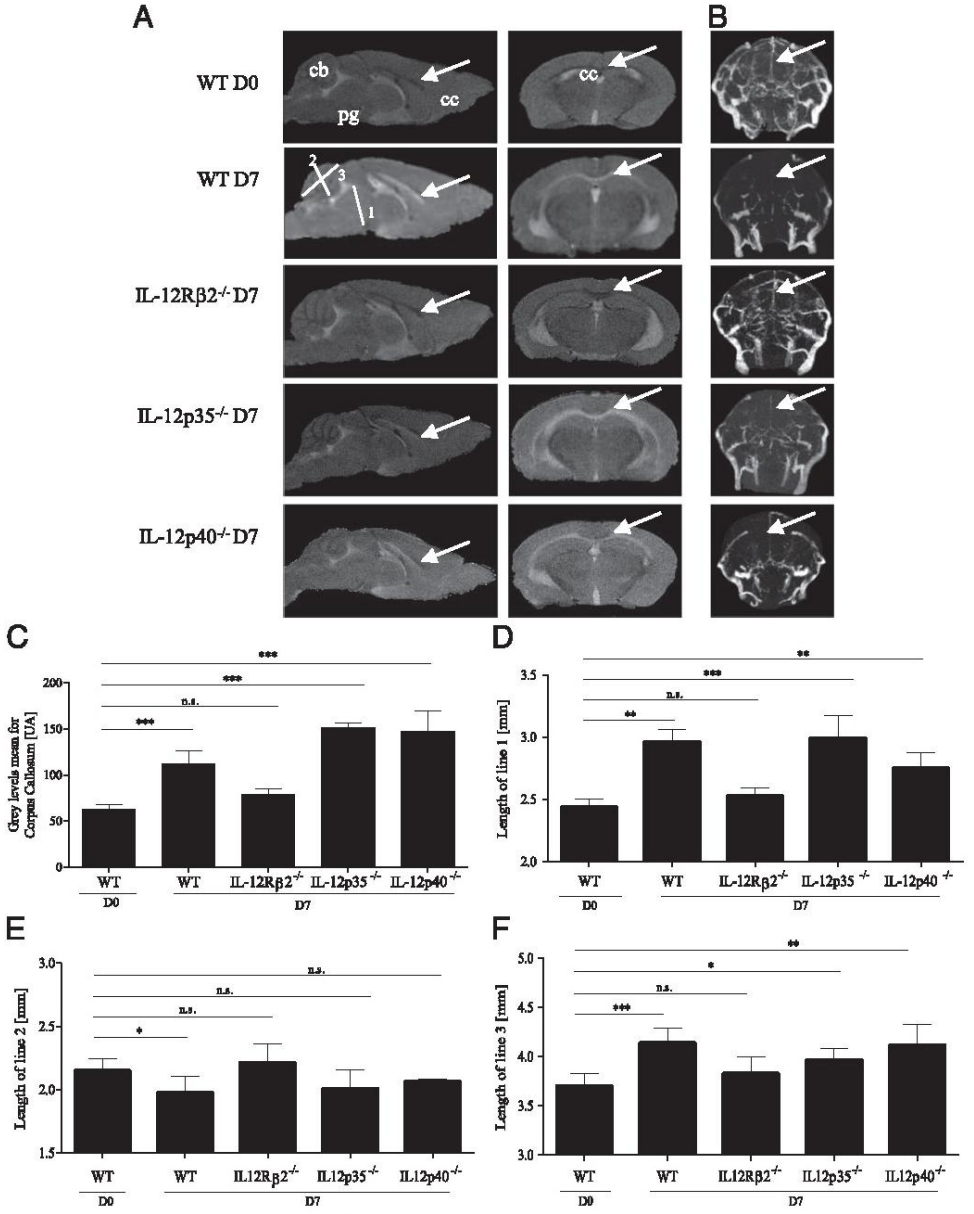


FIGURE 2. MRI/MRA analyses showing the absence of ECM-associated brain edema and reduced blood flow in *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice. WT and IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs as in Fig. 1. *A*, MRI of uninfected and infected mice 7 d postinfection. *Left* column, midsagittal MRI image [cc, corpus callosum (indicated by arrows); cb, cerebellum; pg, pituitary gland]; *right* column, typical axial MRI image. Distinct anomalies were visible in *Pb*A-infected WT and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice; namely, edema formation was apparent as a bilateral hyperintense signal at the corpus callosum, whereas WT uninfected mice and IL-12Rβ2–deficient infected mice did not show such alterations. MRI images are representative of three independent experiments, $n = 4$–7 mice per group. *B*, MRA vascular blood flow perturbations are evident in WT and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice, 7 d after *Pb*A infection, whereas infected IL-12Rβ2–deficient mice seemed unaffected, similar to naive WT mice. The arrows point to an area showing reduced brain vascularization in WT mice undergoing ECM, vascularization that was not impaired in *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice. MRA images are representative of three independent experiments (as in *A*). *C*, Corpus callosum mean gray levels of intensity from MRI (data from *A*) of uninfected and infected mice 7 d postinfection. The data represent the mean ± SD from three independent experiments as in *A*. $^{***}p < 0.001$. *D–F*, Assessment of brain swelling in uninfected and 7 d *Pb*A-infected mice in terms of the measurement of distances 1–3 from the midsagittal MRI images in *A*. *D*, Line 1 going from the pituitary gland to the Sylvius aqueduct. *E*, Line 2 median line crossing the medial cerebellar nucleus. *F*, Line 3 medium line stemming from the cerebellar obex. The data represent the mean ± SD from three independent experiments as in *A*. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

ischemic parameters, similar to those of WT mice, after *Pb*A infection (Fig. 2*A*, 2*C*). Brain edema/swelling was documented in infected WT mice during acute ECM by measuring three distances in the brain (Fig. 2*D–F*), namely, line 1 from the pituitary gland to the Sylvius aqueduct, median line 2 crossing the medial cerebellar nucleus, and medium line 3 stemming from the cerebellar obex (26). Distances 1 and 3 were increased significantly, whereas distance 2 was reduced significantly, in infected WT mice and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice, as compared with those in noninfected WT mice (Fig. 2*D–F*), in agreement with Penet et al. (26). In contrast, these metric parameters were not altered significantly in infected IL-12Rβ2–deficient mice as compared with those in noninfected mice (Fig. 2*D–F*).

Distinct vascular blood flow perturbations were analyzed by MRA, and a dramatic reduction in blood flow was documented in WT and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice upon *Pb*A infec-

tion (Fig. 2*B*). In contrast, IL-12Rβ2–deficient mice displayed normal MRA parameters without signs of microvascular obstruction after *Pb*A infection, similar to those in uninfected WT mice (Fig. 2*B*). Therefore, IL-12Rβ2 signaling is involved critically in the development of ischemic brain damage and microvascular obstruction after *Pb*A infection.

IL-12Rβ2 is critical to cerebral but not pulmonary microvascular lesions after PbA infection

Microvessel obstruction and disruption led to increased protein extravasation from the capillary bed, which can be quantified functionally by Evans blue leakage into the tissue. Although *Pb*A-infected WT mice showed strong vascular leakage, infected IL-12Rβ2–deficient mice had no discoloration of the brain parenchyma (Fig. 3*A*). The integrity of the blood–brain barrier in IL-12Rβ2–deficient mice was confirmed further by measuring Evans blue extravasation, significantly increased in WT mice but not in IL-12Rβ2–deficient mice upon *Pb*A infection (Fig. 3*B*).

Microscopically, vascular blood flow perturbation in *Pb*A-infected mice was associated with microvascular lesions. Perivascular hemorrhage and intravascular accumulation of mononuclear cells and infected and uninfected erythrocytes were documented in *Pb*A-infected WT mice and in infected IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice but were completely absent in IL-12Rβ2–deficient mice (Fig. 3*C*). The severity of brain microvascular obstruction and local hemorrhage was assessed semiquantitatively, and a significant reduction of brain pathology in IL-12Rβ2–deficient mice was documented (Fig. 3*D*). Thus, the microscopic brain examination confirmed the MRI/MRA results.

During *Pb*A infection, mice exhibit signs of shock, most notably lung edema and inflammation with vascular leakage (9). $CD8^+$ T cells were reported to be central not only to ECM but also to the ECM-associated "shock" features, including vascular leakage of the lung, kidney, and brain, metabolic acidosis, and lowered mean arterial blood pressure (9). IL-12Rβ2 mRNA was overexpressed in the lungs of WT mice after *Pb*A infection (Fig.

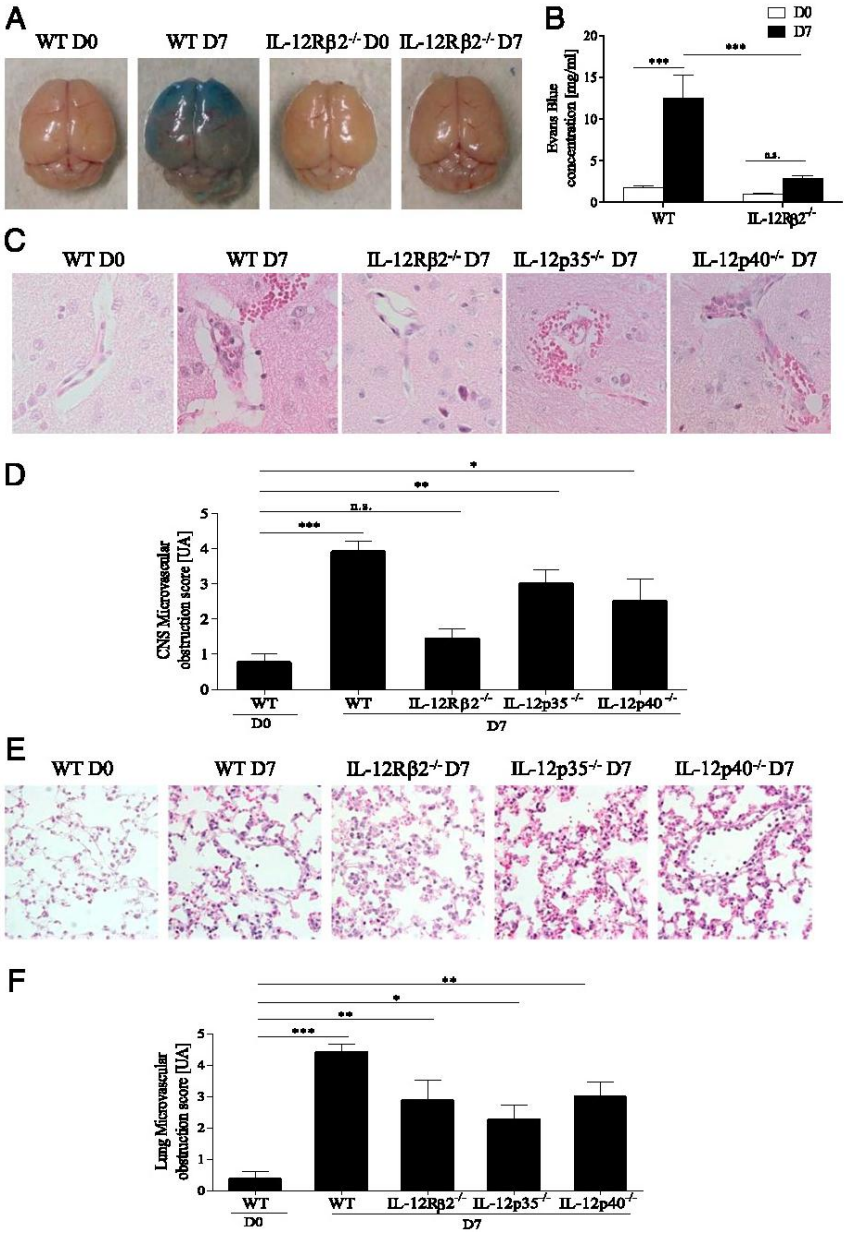


FIGURE 3. IL-12Rβ2 deficiency prevents ECM-associated brain vascular leakage, not lung inflammation, after *Pb*A infection. Mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs as in Fig. 1. *A*, Qualitative assessment of brain vascular leakage by Evans blue extravasation. WT mice with severe ECM on day 7 postinfection (WT D7) showed blue discoloration of the brain, whereas uninfected control (WT D0) and uninfected or day 7 infected IL-12Rβ2–deficient mice showed no discoloration. Images are representative of three independent experiments, $n = 4$–16 mice per group. *B*, Quantitative assessment of brain capillary permeability using Evans blue extravasation in formamide was measured by absorbance at 610 nm in brain extracts of naive or *Pb*A-infected WT or IL-12Rβ2–deficient mice as in *A*. Results are mean ± SEM from three different experiments as in *A*. *C*, Microvascular damage with mononuclear cell adhesion and perivascular hemorrhage was visible 7 d after *Pb*A infection in the brains of WT and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice but not in infected IL-12Rβ2–deficient mice. Microscopy sections (magnification ×40) showing H&E staining representative of three independent experiments, $n = 4$–8 mice per group. *D*, Semiquantitative scores of brain infiltration, obstruction, and hemorrhages. The bar graphs show the score mean ± SEM from three independent experiments as in *C*. *E*, Lung inflammation with alveolar septae thickening, hemorrhage in alveoli, and interstitial edema of *Pb*A-infected WT and IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice. Magnifications shown are ×40 of H&E staining representative of three independent experiments as in *C*. *F*, Semiquantitative scores of thickening of alveolar septae, cell accumulation in the alveoli, and reduction in size of the alveoli. The bar graphs show the mean ± SEM from three independent experiments as in *E*. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

1*B*), and we thus investigated the effects of the IL-12Rβ2 pathway on lung pathology by analyzing pulmonary microvascular beds in *Pb*A-infected mice. The lungs of *Pb*A-infected WT mice displayed congested capillaries of the alveolar septae, hemorrhage in the alveoli, and interstitial edema postinfection, similar to those of *Pb*A-infected IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice (Fig. 3*E*). The lung pathology was investigated semiquantitatively, and a significant difference was found between WT uninfected mice and *Pb*A-infected mice, either WT or deficient for IL-12Rβ2, IL-12p40, or IL-12p35 (Fig. 3*F*), suggesting that the lung pathology is largely independent of IL-12Rβ2, IL-12p35, and IL-12p40. Therefore, disruption of IL-12Rβ2 prevents brain microvascular pathology, but not lung inflammation, induced by *Pb*A infection.

Reduced LT expression and T cell recruitment and activation upon PbA infection in the absence of IL-12Rβ2

We next focused on the different immunological pathways likely triggered by *Pb*A infection in the absence of IL-12Rβ2. The adhesion molecule ICAM (CD54) expression was correlated with macrophage and parasitized erythrocyte brain sequestration during *Pb*A-induced ECM (29), and we investigated ICAM expression in the brains of *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice by immunostaining (Fig. 4). ICAM expression increased significantly in both WT and IL-12Rβ2–deficient mice after *Pb*A infection, indicating that ICAM expression is independent of IL-12Rβ2. ICAM expression was also similar in the brains of *Pb*A-infected IL-12p40– or IL-12p35–deficient mice (Supplemental Fig. 3). This was confirmed at the level of CD54 expression on brain-infiltrating $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells from either IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice 7 d after *Pb*A infection (data not shown). Thus, ICAM expression seems to be independent of the IL-12Rβ2 and IL-12 pathways.

Because IL-12 is a main switch for IFN-γ expression, we next investigated the regulation of IFN-γ expression after *Pb*A infection in the absence of IL-12Rβ2. The increase in IFN-γ expression observed in WT mice after *Pb*A infection was reduced in IL-12Rβ2–deficient mice (Fig. 5*A*). Similarly, both TNF-α and LT-α messages were increased less upon *Pb*A infection in IL-12Rβ2–deficient mice than in WT mice (Fig. 5*B*, 5*C*).

We then characterized brain T cell sequestration in response to *Pb*A (Fig. 6), a parameter necessary for the development of ECM pathology (1, 7). WT mice recruited and sequestered a high number of $CD8^+$ or $CD4^+$ T cells into the brain after *Pb*A infection. However, in the absence of IL-12Rβ2, brain T cell recruitment was reduced strongly (Fig. 6). Furthermore, activated T cells expressing CD69 and perforin after *Pb*A infection also were diminished strongly as compared with those in WT infected mice (Fig. 6*C*, 6*D*, 6*F*, 6*G*). No such drastic reduction in $CD8^+$ or $CD4^+$ T cell sequestration was seen in mice deficient for IL-12 expression (Supplemental Fig. 4). Thus, the absence of IL-12Rβ2 prevents T cell sequestration in the brain and impairs the expression of IFN-γ and TNF-α/LT-α family cytokines in response to *Pb*A.

Hematological alterations in IL-12Rβ2–deficient mice

Thrombocytopenia and anemia are hallmarks of the course of *Pb*A infection in mice (21, 30). We therefore investigated the hematological parameters in naive and *Pb*A-infected WT and

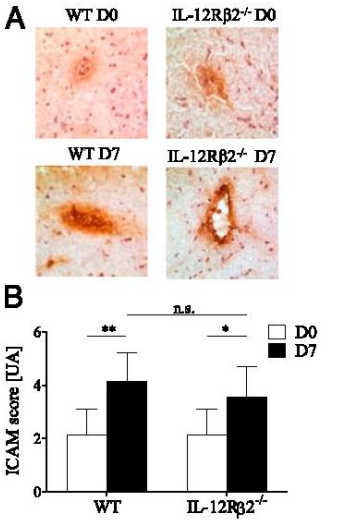


FIGURE 4. ICAM expression in the brains of *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs as in Fig. 1. *A*, Immunohistological staining of $CD54^+$ cells in brain vessels of naive and *Pb*A-infected WT mice developing ECM or ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice 7 d postinfection (magnification ×100). Results are representative of three to four mice per group and are from one representative of three independent experiments. *B*, Bar graphs of the score of ICAM staining. Results represent the mean ± SD of n = 3–4 mice per group and are from one representative of three independent experiments. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

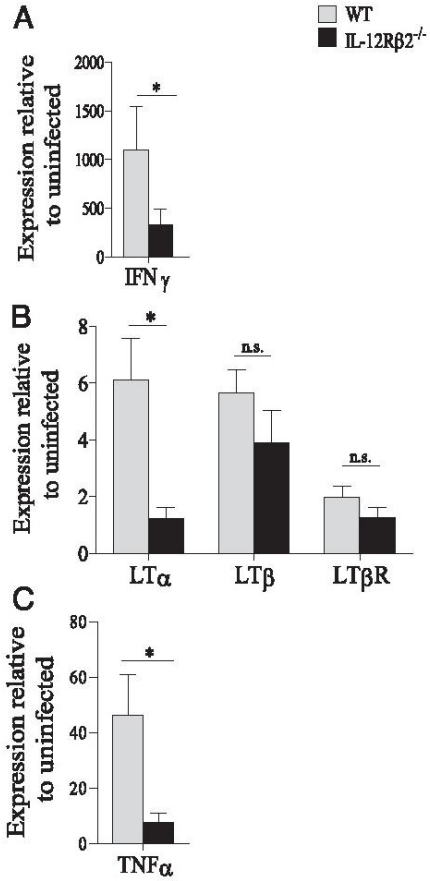


FIGURE 5. Differential cytokine gene expression in the brains of *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice. Transcription of IFN-γ (*A*), LT-α, LT-β, and LT-βR (*B*), and TNF-α (*C*) 7 d after *Pb*A infection of WT or IL-12Rβ2–deficient mice was evaluated by real-time RT-PCR. mRNA gene expression was normalized relative to that of uninfected controls for each mouse strain, and control baseline mRNA levels did not differ significantly between naive strains. Results are mean ± SEM of n = 3–4 mice per group and are from one experiment representative of two independent experiments. $*p < 0.05$.

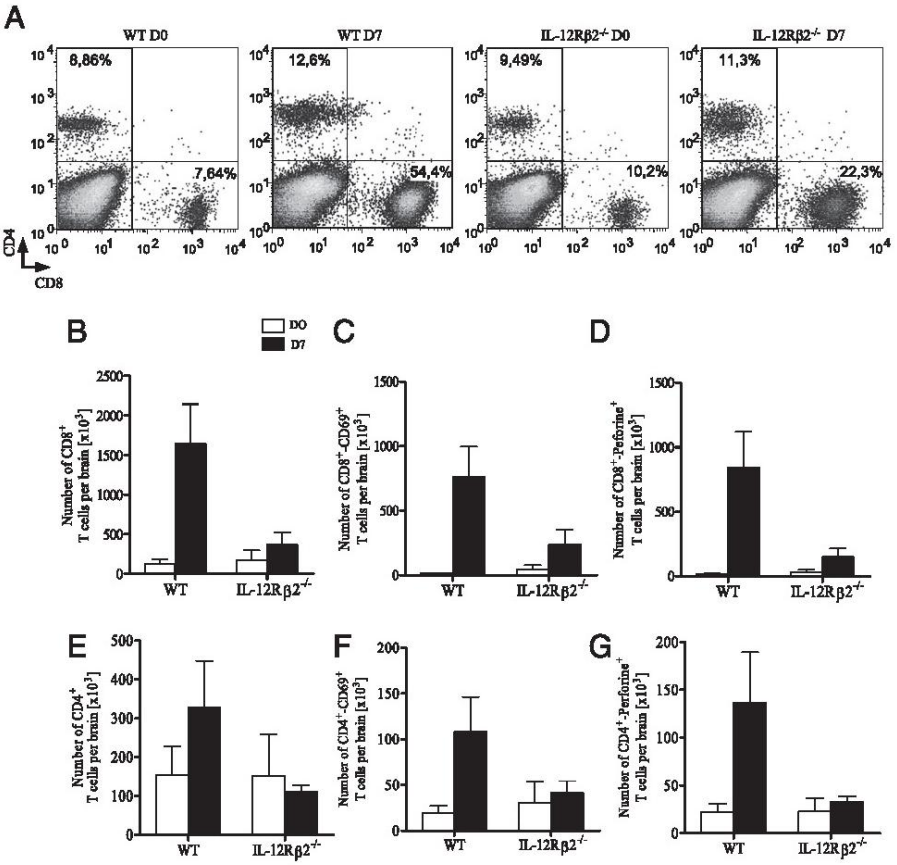


FIGURE 6. Reduced recruitment and activation of $CD8^+$ lymphocytes in the brains of *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs as in Fig. 1. Flow cytometry analyses of brain-sequestered leukocytes from uninfected (D0) or 7 d *Pb*A-infected (D7) WT and IL-12Rβ2–deficient mice. *A*, Representative dot plots of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells within the gated $CD3^+$ cell populations, from one pool of three mouse brains per group, representative of three independent experiments. *B–D*, Bar graphs of the absolute numbers of $CD8^+$, $CD8^+CD69^+$, and $CD8^+Perf^+$ T cells respectively. *E–G*, Bar graphs of the absolute numbers of $CD4^+$, $CD4^+CD69^+$, and $CD4^+Perf^+$ T cells, respectively. Results represent the mean ± SEM of $n = 3–4$ pools of three mice per group, from one representative of three independent experiments.

IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice. The hematological analyses revealed similar reductions of platelet counts in WT and IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice 7 d after *Pb*A infection (Fig. 7*A*). Thrombocytopenia was accentuated further on day 14 postinfection in ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice (Fig. 7*B*).

After 7 d of *Pb*A infection, WT mice show a reduction in circulating WBCs (Fig. 7*C*), largely attributed to a decrease in lymphocyte counts (Fig. 7*E*). The decrease in leukocyte and lymphocyte counts was seen in all of the groups of mice after 7 d of *Pb*A infection but was however less prominent in IL-12Rβ2–deficient mice than those in WT and IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice (Fig. 7*C*, 7*E*). Furthermore, leukocytes and lymphocytes increased dramatically on days 14–21 postinfection in IL-12Rβ2–deficient mice (Fig. 7*D*, 7*F*). Finally, although no significant anemia developed after 7 d of infection, IL-12Rβ2–deficient mice developed dramatic anemia after 2 and 3 wk of *Pb*A infection (Fig. 1*D*). Therefore, *Pb*A-infected IL-12Rβ2–deficient mice that were resistant to ECM and developed high parasitemia died at 3 wk with thrombocytopenia, severe anemia, and drastic leukocytosis.

Discussion

The effect of IL-12, required for Th1 cell differentiation, in severe malaria is unclear. In humans, depending on the populations studied, polymorphisms in promoters or genes coding for IL-12p35 and IL-12p40 have been associated with *P. falciparum* parasitemia (31), linked with mortality from severe malaria in children (32), associated with protection from severe malaria anemia (33), or associated with susceptibility to cerebral malaria (6).

In this study, we show that the disruption of the IL-12Rβ2 pathway prevents microvascular disease leading to fatal ECM in *Pb*A infection. Signaling through IL-12Rβ2 activates the expression of IFN-γ, a critical cytokine for innate and adaptive immune responses (34). Studies in malaria patients or in the *P. chabaudi* model showed a protective role for IFN-γ in parasite clearance and disease severity (35, 36). In *Pb*A infection, IFN-γ and its receptor are crucial in the development of ECM, genetically deficient mice being protected against ECM (37). The disruption of IL-12Rβ2 prevented cerebral pathology, and we revisited the roles of the different molecules involved in the IL-12 pathway.

We investigated several pathophysiological aspects of ECM in IL-12Rβ2–deficient mice and show that the absence of neurologic signs of ECM is associated with normal cerebral perfusion as assessed by MRI and MRA. In vivo analyses showed no brain sequestration of mononuclear cells, no vascular leak, no hemorrhage, and no inflammation in the absence of IL-12Rβ2, which were evident in *Pb*A-infected WT mice. In contrast, the absence of IL-12Rβ2 did not affect *Pb*A-induced pulmonary microvascular damage, thus confirming the different pathophysiology of *Pb*A-induced ECM and lung pathology (10, 38, 39). Thus, we demonstrated that *Pb*A-induced brain microvascular damage and inflammation are mainly IL-12Rβ2 dependent, whereas *Pb*A-induced lung microvascular damage, edema, and alveolitis are IL-12Rβ2 independent.

Although exogenous IL-12 may have adjuvant, protective effects against experimental malaria (5, 11, 36), IL-12 also may be involved in severe malaria complications, because it contributes to the induction of inflammatory mediators, including IFN-γ (40). We next investigated whether ECM resistance in the absence of IL-12Rβ2 might be attributed to one of the known IL-12 ligands. We document here that IL-12p35– or IL-12p40–deficient mice were susceptible to *Pb*A-induced ECM development. Comparable to WT mice, they presented characteristic signs of ECM, such as

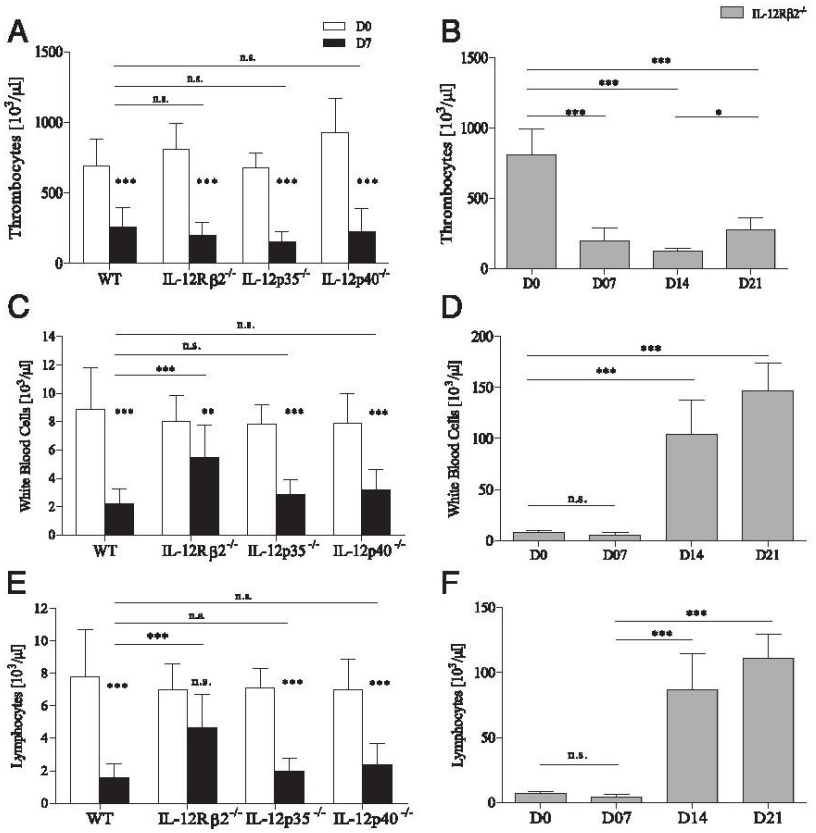


FIGURE 7. Hematological alterations in IL-12Rβ2–deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized RBCs as in Fig. 1. Platelet (*A*, *B*), total WBC (*C*, *D*), and lymphocyte (*E*, *F*) counts were determined in peripheral blood of naive and 7 d infected WT and IL-12Rβ2–, IL-12p35–, or IL-12p40–deficient mice. Results are mean ± SD from five independent experiments, n = 8–33 mice per group. The kinetics of platelet (*B*), total WBC (*D*), and lymphocyte (*F*) counts are shown for uninfected (D0) and at different time points after *Pb*A infection of ECM-resistant, IL-12Rβ2–deficient mice. Results are mean ± SD from four independent experiments (n = 9 mice on day 0, n = 22 mice on day 7, and n = 8 and n = 5 mice on days 14 and 21). Statistics shown are for each genotype on day 7 compared with day 0 or compared with the infected WT group. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

ischemic brain damage, vascular blood flow perturbation, and cerebral sequestration of blood cells. Our results show that *Pb*A-induced ECM development is independent of IL-12p35 and IL-12p40. IL-12p40–deficient mice were shown to develop ECM after *Pb*NK65 sporozoite infection (41). Furthermore, mice deficient for IL-23p19 or for IL-12Rβ1 were also sensitive to ECM (Supplemental Fig. 1 and data not shown). These data suggest that IL-12Rβ2 might be involved in another pathway that is unknown currently.

IL-12Rβ2–deficient mice, similar to WT mice, showed thrombocytopenia at day 7, a time when WT mice developed ECM, together with a slight anemia that further increased thereafter. Therefore, disruption of IL-12Rβ2, while protecting from ECM development, had no strong effect on the typical hematological responses to *Pb*A infection in mice, with the notable exception of the lymphocyte counts, which were decreased less than those in WT mice on day 7 postinfection. Furthermore, strong lymphocytosis was evident 2–3 wk postinfection in IL-12Rβ2–deficient mice, as observed previously in ECM-resistant, protein kinase C-θ–deficient mice (10). The propagation of *Pb*A infection in erythrocytes was totally IL-12Rβ2 independent, because the mice succumbed within 3 wk of severe parasitemia and anemia. In agreement with previous studies, there is dissociation among cerebral pathology, modification of the hematological parameters, and parasite growth (21, 28, 37).

Different studies showed that resistance to ECM seems to be linked to reduced parasite sequestration. Whole-body parasite sequestration was reduced in LT-α– or IFN-γ–deficient mice after *Pb*A infection. However, the brain represented only a small proportion of parasite tissue accumulation in ECM-susceptible, WT mice, and sequestration in the brain was not reported for ECM-resistant, LT-α– or IFN-γ–deficient mice (42). Claser et al. (43) reported similar or slightly higher parasitemia in IFN-γ–deficient mice, with a lower total or head parasite biomass than that in WT mice during ECM development, whereas *Pb*A-infected TNF-α– or IL-12p40–deficient mice developed ECM and showed the same level of parasitemia as WT mice.

We next assessed the downstream effects of IL-12Rβ2 disruption on cytokine expression in the brain after *Pb*A infection. In WT mice, IFN-γ expression was increased strongly after *Pb*A infection, whereas this overexpression was attenuated in IL-12Rβ2–deficient mice. A strong reduction of IFN-γ expression also was noted in IL-12p40–deficient mice infected with *P. chabaudi* (12). Indeed, the LT-α and TNF-α overexpression seen in the brains of WT mice after *Pb*A infection was reduced strongly in infected IL-12Rβ2–deficient mice. Increased expression of LT-α in the CNS was reported in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalitis (44–46). TNF-α was implicated originally in ECM pathogenesis (47). Administration of TNF-α–neutralizing Abs prevented ECM (47), and mice with a combined deletion of TNF-α and LT-α were resistant to ECM development (20). However, LT-α rather than TNF-α was shown to be essential for the development of ECM (28) with the implication of both LT-α homotrimer/TNFR2 and LT-αLT-β heterotrimer/LT-βR (21, 27). The cross talk between IL-12 and TNF-α/LT-α pathways seems to be multifold. Reduced TNF-α and LT-α levels were reported in the absence of IL-12p35 in experimental autoimmune encephalitis (48). $CD8^+$ T cells deficient for LT-α have diminished IL-12Rβ2 expression, and they fail to differentiate into normal effectors (49). LT-αβ expression was independent of IL-12 and IFN-γ (50). However, IL-12p40 homodimers, which were thought to be inactive or inhibitory, were shown recently to strongly induce LT-α expression in microglial cells (51). This effect of 12p40 homodimers was attributed to IL-12Rβ1 rather than IL-12Rβ2 (51),

a novel activity mediated by IL-12Rβ1, although the precise molecular interactions remain to be defined. The question of how IL-12Rβ2 may be triggered to affect LT-α transcription in response to *Pb*A infection remains and deserves further biochemical investigations.

In conclusion, IL-12Rβ2 clearly has an important role in the development of ECM. The absence of this receptor subunit abrogates the microvascular disease leading to fatal ECM. Notably, ECM pathology mediated by IL-12Rβ2 appears to be independent of the IL-12 ligands, because they are not essential for the pathogenic response. The ECM protection of IL-12Rβ2–deficient mice is likely linked to the diminution of the IFN-γ and TNF-α/LT-α family responses; however, a transcriptomic approach has been initiated to identify further gene expression downstream of IL-12Rβ2 critical for the response to *Pb*A infection.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Belnoue, E., M. Kayibanda, A. M. Vigario, J. C. Deschemin, N. van Rooijen, M. Viguier, G. Snounou, and L. Rénia. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 169: 6369–6375.
2. Schofield, L., and G. E. Grau. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 722–735.
3. Rénia, L., S. M. Potter, M. Mauduit, D. S. Rosa, M. Kayibanda, J. C. Deschemin, G. Snounou, and A. C. Grüner. 2006. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36: 547–554.
4. Hunt, N. H., and G. E. Grau. 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 24: 491–499.
5. Sedegah, M., F. Finkelman, and S. L. Hoffman. 1994. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10700–10702.
6. Marquet, S., O. Doumbo, S. Cabantous, B. Poudiougou, L. Argiro, I. Safeukui, S. Konate, S. Sissoko, E. Chevereau, A. Traore, et al. 2008. A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria. *Hum. Mol. Genet.* 17: 2190–2195.
7. Nitcheu, J., O. Bonduelle, C. Combadiere, M. Tefit, D. Seilhean, D. Mazier, and B. Combadiere. 2003. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J. Immunol.* 170: 2221–2228.
8. Suidan, G. L., J. R. Mcdole, Y. Chen, I. Pirko, and A. J. Johnson. 2008. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS One* 3: e3037.
9. Chang, W. L., S. P. Jones, D. J. Lefer, T. Welbourne, G. Sun, L. Yin, H. Suzuki, J. Huang, D. N. Granger, and H. C. van der Heyde. 2001. CD8(+)-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in Plasmodium berghei-infected mice. *Infect. Immun.* 69: 7341–7348.
10. Fauconnier, M., M. L. Bourigault, S. Meme, F. Szeremeta, J. Palomo, A. Danneels, S. Charron, L. Fick, M. Jacobs, J. C. Beloeil, et al. 2011. Protein kinase C-theta is required for development of experimental cerebral malaria. *Am. J. Pathol.* 178: 212–221.
11. Stevenson, M. M., M. F. Tam, S. F. Wolf, and A. Sher. 1995. IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 155: 2545–2556.
12. Su, Z., and M. M. Stevenson. 2002. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice. *J. Immunol.* 168: 1348–1355.
13. Adachi, K., H. Tsutsui, S. Kashiwamura, E. Seki, H. Nakano, O. Takeuchi, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, H. Okamura, et al. 2001. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol.* 167: 5928–5934.
14. Normaznah, Y., A. A. Halim, M. Outhayphone, and M. R. Zamri. 1999. Protective immunity against Plasmodium berghei malaria after administration of interleukin-12. *Malays. J. Pathol.* 21: 123–125.
15. Xu, X., K. Sumita, C. Feng, X. Xiong, H. Shen, S. Maruyama, M. Kanoh, and Y. Asano. 2001. Down-regulation of IL-12 p40 gene in Plasmodium berghei-infected mice. *J. Immunol.* 167: 235–241.
16. Wu, C., X. Wang, M. Gadina, J. J. O'Shea, D. H. Presky, and J. Magram. 2000. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J. Immunol.* 165: 6221–6228.
17. Magram, J., S. E. Connaughton, R. R. Warrier, D. M. Carvajal, C. Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. A. Faherty, and M. K. Gately. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471–481.
18. Chen, Z., R. S. Duan, H. C. Q, Q. Wu, E. Mix, B. Winblad, H. G. Ljunggren, and J. Zhu. 2004. IL-12p35 deficiency alleviates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Neurobiol. Dis.* 17: 171–178.
19. Franke-Fayard, B., H. Trueman, J. Ramesar, J. Mendoza, M. van der Keur, R. van der Linden, R. E. Sinden, A. P. Waters, and C. J. Janse. 2004. A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137: 23–33.
20. Rudin, W., H. P. Eugster, G. Bordmann, J. Bonato, M. Müller, M. Yamage, and B. Ryffel. 1997. Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am. J. Pathol.* 150: 257–266.
21. Togbe, D., P. L. de Sousa, M. Fauconnier, V. Boissay, L. Fick, S. Scheu, K. Pfeffer, R. Menard, G. E. Grau, B. T. Doan, et al. 2008. Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One* 3: e2608.
22. Patankar, T. F., D. R. Karnad, P. G. Shetty, A. P. Desai, and S. R. Prasad. 2002. Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology* 224: 811–816.
23. Kampfl, A. W., G. G. Birbamer, B. E. Pfausler, H. P. Haring, and E. Schmutzhard. 1993. Isolated pontine lesion in algid cerebral malaria: clinical features, management, and magnetic resonance imaging findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 818–822.
24. Looareesuwan, S., P. Wilairatana, S. Krishna, B. Kendall, S. Vannaphan, C. Viravan, and N. J. White. 1995. Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral malaria. *Clin. Infect. Dis.* 21: 300–309.
25. Cordoliani, Y. S., J. L. Sarrazin, D. Felten, E. Caumes, C. Lévêque, and A. Fisch. 1998. MR of cerebral malaria. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 19: 871–874.
26. Penet, M. F., A. Viola, S. Confort-Gouny, Y. Le Fur, G. Duhamel, F. Kober, D. Ibarrola, M. Izquierdo, N. Coltel, B. Gharib, et al. 2005. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J. Neurosci.* 25: 7352–7358.
27. Stoelcker, B., T. Hehlgans, K. Weigl, H. Bluethmann, G. E. Grau, and D. N. Männel. 2002. Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* 70: 5857–5859.
28. Engwerda, C. R., T. L. Mynott, S. Sawhney, J. B. De Souza, Q. D. Bickle, and P. M. Kaye. 2002. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 195: 1371–1377.
29. Favre, N., C. Da Laperousaz, B. Ryffel, N. A. Weiss, B. A. Imhof, W. Rudin, R. Lucas, and P. F. Piguet. 1999. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* 1: 961–968.
30. Grau, G. E., P. F. Piguet, D. Gretener, C. Vesin, and P. H. Lambert. 1988. Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. *Immunology* 65: 501–506.
31. Barbier, M., A. Atkinson, F. Fumoux, and P. Rihet. 2008. IL12B polymorphisms are linked but not associated with Plasmodium falciparum parasitemia: a familial study in Burkina Faso. *Genes Immun.* 9: 405–411.
32. Morahan, G., C. S. Boutlis, D. Huang, A. Pain, J. R. Saunders, M. R. Hobbs, D. L. Granger, J. B. Weinberg, N. Peshu, E. D. Mwaikambo, et al. 2002. A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes Immun.* 3: 414–418.
33. Zhang, L., D. Prather, J. Vanden Eng, S. Crawford, S. Kariuki, F. ter Kuile, D. Terlouw, B. Nahlen, A. A. Lal, L. Slutsker, et al. 2010. Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. *Malar. J.* 9: 87.
34. Goriely, S., M. F. Neurath, and M. Goldman. 2008. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 81–86.
35. Cabantous, S., B. Poudiougou, A. Traore, M. Keita, M. B. Cisse, O. Doumbo, A. J. Dessein, and S. Marquet. 2005. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 192: 854–860.
36. Stevenson, M. M., Z. Su, H. Sam, and K. Mohan. 2001. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect.* 3: 49–59.
37. Amani, V., A. M. Vigário, E. Belnoue, M. Marussig, L. Fonseca, D. Mazier, and L. Rénia. 2000. Involvement of IFN-gamma receptor-medicated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection. *Eur. J. Immunol.* 30: 1646–1655.
38. Lovegrove, F. E., S. A. Gharib, L. Peña-Castillo, S. N. Patel, J. T. Ruzinski, T. R. Hughes, W. C. Liles, and K. C. Kain. 2008. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog.* 4: e1000068.
39. Epiphanio, S., M. G. Campos, A. Pamplona, D. Carapau, A. C. Pena, R. Ataíde, C. A. Monteiro, N. Félix, A. Costa-Silva, C. R. Marinho, et al. 2010. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog.* 6: e1000916.
40. Yoshimoto, T., Y. Takahama, C. R. Wang, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi. 1998. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection. *J. Immunol.* 160: 5500–5505.
41. Romero, J. F., G. H. Ibrahim, J. Renggli, H. Himmelrich, P. Graber, and G. Corradin. 2007. IL-12p40-independent induction of protective immunity upon multiple Plasmodium berghei irradiated sporozoite immunizations. *Parasite Immunol.* 29: 541–548.
42. Amante, F. H., A. Haque, A. C. Stanley, Fde. L. Rivera, L. M. Randall, Y. A. Wilson, G. Yeo, C. Pieper, B. S. Crabb, T. F. de Koning-Ward, et al. 2010.

Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 185: 3632–3642.
43. Claser, C., B. Malleret, S. Y. Gun, A. Y. Wong, Z. W. Chang, P. Teo, P. C. See, S. W. Howland, F. Ginhoux, and L. Rénia. 2011. CD8+ T cells and IFN-γ mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. *PLoS One* 6: e18720.
44. Matusevicius, D., V. Navikas, M. Söderström, B. G. Xiao, M. Haglund, S. Fredrikson, and H. Link. 1996. Multiple sclerosis: the proinflammatory cytokines lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha are upregulated in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.* 66: 115–123.
45. Suen, W. E., C. M. Bergman, P. Hjelmström, and N. H. Ruddle. 1997. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 186: 1233–1240.
46. Gommerman, J. L., K. Giza, S. Perper, I. Sizing, A. Ngam-Ek, C. Nickerson-Nutter, and J. L. Browning. 2003. A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. *J. Clin. Invest.* 112: 755–767.
47. Grau, G. E., L. F. Fajardo, P. F. Piguet, B. Allet, P. H. Lambert, and P. Vassalli. 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237: 1210–1212.
48. Becher, B., B. G. Durell, and R. J. Noelle. 2002. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* 110: 493–497.
49. Kumaraguru, U., I. A. Davis, S. Deshpande, S. S. Tevethia, and B. T. Rouse. 2001. Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J. Immunol.* 166: 1066–1074.
50. Gramaglia, I., D. N. Mauri, K. T. Miner, C. F. Ware, and M. Croft. 1999. Lymphotoxin alphabeta is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol.* 162: 1333–1338.
51. Jana, M., and K. Pahan. 2009. Induction of lymphotoxin-alpha by interleukin-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, but not IL-12 p70. *Immunology* 127: 312–325.

III. ROLE DU RECEPTEUR AUX INTERFERONS DE TYPE I DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MALARIA CEREBRALE EXPERIMENTALE.

Article 3. Type I interferons contribute to experimental cerebral malaria development in response to sporozoite or blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA.

Jennifer Palomo, Mathilde Fauconnier, Laurie Coquard, Maïlys Gilles, Sandra Meme, Frederic Szeremeta, Lizette Fick, Jean-François Franetich, Muazzam Jacobs, Dieudonnée Togbe, Jean-Claude Beloeil, Dominique Mazier, Bernhard Ryffel, and Valerie F.J. Quesniaux.

European Journal of Immunology – June 2013 – 43(10):2683-95

Les voies de régulation des cellules T sont essentielles dans le développement de l'ECM. Nous avons d'abord montré l'importance de la protéine PKC-θ puis celle de l'IL-12Rβ2 pro-T_H1. L'IFN-γ est une cytokine essentielle dans la pathogenèse de l'ECM, requise plus particulièrement pour le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques dans le cerveau [238:Villegas-Mendez 2011]. Par ailleurs, PKC-θ est non seulement nécessaire lors de l'activation du TCR, mais la kinase est aussi impliquée dans la signalisation engagée par les IFN-I et IFN-γ, qui active l'expression des gènes induits par les IFN dans les cellules T

humaines [282:Srivastava 2004]. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des IFN-I dans le développement de l'ECM induite par *Pb*A.

La stimulation de cellules humaines T $CD4^+$ *in vitro* par l'IFN-α entraîne l'activation de la transcription des gènes *TBX* (codant pour le facteur de transcription T_H1 spécifique Tbet), *IL12RB2*, *GZMB* et *IFNG* [241:Filen 2010]. De plus, l'IFN-I est produit en réponse à *Plasmodium*, par l'intermédiaire de la reconnaissance de l'ADN et/ou de l'hémozoïne par TLR9, ou bien des régions riches en AT de l'ADN parasitaire par STING [163:Coban 2005 - 164:Parroche 2007 - 170:Sharma 2011]. Mais les études sur le rôle des IFN-I dans la malaria sont récentes et contradictoires. Il a été montré que l'administration d'IFN-α permettait une protection contre la malaria cérébrale induite par le stade sanguin de *Pb*A, grâce à une réduction nette de la parasitémie [247:Vigario 2007]. Alors que la protection contre l'ECM résultant de l'administration d'IFN-β semble être indépendante d'un effet sur la parasitémie [248:Morrell 2011]. A l'inverse, des études utilisant des souris déficientes en IFNAR semblent indiquer un rôle délétère de l'IFN-I dans l'ECM induite par le stade sanguin de *Pb*A. L'absence de la voie IFNAR a été associée à une réduction drastique de la charge parasitaire et une augmentation de la réponse T $CD4^+$, qui seraient responsables de la résistance à l'ECM [249:Haque 2011]. En revanche, l'étude de Sharma *et al.* révèle une résistance des souris déficientes en IFNAR après infection avec des hématies infectées par *Pb*A, mais sans variation de la parasitémie, et ne propose pas d'explication du phénotype [170:Sharma 2011].

Ces résultats discordants nous ont conduits à caractériser plus en détails la participation des IFN-I dans le développement de l'ECM, non seulement après infection par le stade sanguin de *Pb*A, mais aussi après une infection avec le stade pré-érythrocytique, qui n'avait pas encore été adressé. Nous avons comparé la réponse immune de souris déficientes pour le récepteur des IFN-I (IFNAR1) à celle des souris de type sauvage, sensibles à l'ECM, et à celle de souris déficientes pour le récepteur de l'IFN-γ (IFN-γR1), résistantes à l'ECM, après infection par *Pb*A.

Tout d'abord nous avons confronté l'infection par le stade pré-érythrocytique (sporozoïtes injectés par voie intraveineuse) à l'infection par le stade sanguin (hématies infectées administrées par voie intra-péritonéale). L'infection par des sporozoïtes implique un cycle de multiplication et différenciation intra-hépatique précédant le stade sanguin. Par conséquent, chez les souris de type sauvage sensibles à l'ECM, l'apparition des symptômes

est retardée de 24 à 48h, et l'atteinte neurologique est maximale 9 jours après infection. De plus, la proportion de souris développant l'ECM est plus faible après infection par le stade pré-érythrocytique. Néanmoins, dans les deux cas d'infection, les souris déficientes en IFN-γR ne développent aucun signe neurologique après infection par *Pb*A, survivent au-delà de 3 semaines et décèdent d'anémie et d'hyper-parasitémie. Les souris déficientes en IFNAR présentent une résistance partielle, impliquant un retard ou l'absence de l'apparition des symptômes neurologiques. Par ailleurs, la résistance observée chez les souris déficientes en IFNAR ou en IFN-γR n'est pas liée à un contrôle du parasite comme le confirment l'évolution de la parasitémie comparable chez toutes les souris, et l'apparition d'une hyper-parasitémie chez les souris résistantes. De plus, indépendamment du développement de l'ECM, les souris présentent une thrombocytopénie dès les jours 7-9 qui perdurent après infection par *Pb*A, et une lymphopénie (aux jours 7-9) qui est suivie d'une lymphocytose chez les souris résistantes à l'ECM.

Afin d'expliquer ces phénotypes, nous avons par la suite étudié la neuropathologie par IRM et ARM, 7 jours après infection par le stade sanguin de *Pb*A. Les souris déficientes en IFN-γR et résistantes à l'ECM ne montrent aucun des signes caractéristiques de l'ECM qui sont observés chez les souris de type sauvage. En outre, ces signes sont réduits chez les souris déficientes pour IFNAR. En effet, l'œdème cérébral et les indications d'altération structurale sont plus faibles, et l'ischémie mise en évidence par angiographie est sensiblement diminuée chez les souris déficientes en IFNAR après infection par *Pb*A, comparés aux souris de type sauvage. Puis, afin de confirmer ces observations d'IRM et ARM, nous avons étudié les lésions micro-vasculaires. Les analyses histologiques indiquent une protection contre la pathologie vasculaire chez les souris déficientes en IFN-γR, qui présentent un profil similaire aux souris avant infection, sans séquestration et sans hémorragie. Les souris déficientes en IFNAR montrent une pathologie vasculaire notablement réduite, en comparaison des souris de type sauvage, après infection par *Pb*A, avec une nette réduction de la séquestration d'hématies et de leucocytes dans les vaisseaux cérébraux et une absence d'hémorragie.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les altérations de la réponse immune, chez les souris déficientes, qui pourraient justifier la résistance à l'ECM. Nous avons commencé par une analyse de la transcription de certains marqueurs de l'inflammation dans le cerveau. Par rapport aux souris de type sauvage, après infection par le stade sanguin de *Pb*A,

l'expression de marqueurs de la réponse T_H1 cytotoxique (CD8, Granzyme B, IFN-γ et IL-12Rβ2) est réduite chez les souris déficientes pour IFNAR. La quantité d'ARNm des chimiokines attractant les lymphocytes T CXCL9, CXCL10 et CXCL11, et de leur récepteur CXCR3 est également diminuées dans le cerveau des souris déficientes en IFNAR. Similairement, l'ensemble de ces marqueurs sont également réduits chez les souris déficientes en IFN-γR après infection par *Pb*A, comparée aux souris de type sauvage, mais de façon plus importante.

Le rôle de la voie de l'IFN-γ dans le recrutement de cellules T impliqué dans l'ECM induite par *Pb*A étant déjà connu, nous avons par la suite analysé les leucocytes séquestrés dans le cerveau par immuno-marquage et cytométrie en flux chez les souris déficientes pour IFNAR. Le nombre de cellules T $CD4^+$, et d'autant plus pour les $CD8^+$, est limité chez les souris déficientes en IFNAR. Une diminution du nombre de cellules T activées $CD69^+$, et de l'expression sur les lymphocytes T du récepteur CXCR3 a aussi été mise en évidence en l'absence d'IFNAR.

Ainsi, cette étude révèle la participation des IFN-I dans la neuro-inflammation associée à l'ECM, et plus précisément dans le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques, par l'intermédiaire de la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10.

European Journal of Immunology

Type I interferons contribute to experimental cerebral malaria development in response to sporozoite or blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA

Jennifer Palomo[1,2], Mathilde Fauconnier[1,2], Laurie Coquard[1,2], Maïlys Gilles[1,2], Sandra Meme[3], Frederic Szeremeta[3], Lizette Fick[4], Jean-François Franetich[5,6,7], Muazzam Jacobs[4], Dieudonnée Togbe[8], Jean-Claude Beloeil[3], Dominique Mazier[5,6,7], Bernhard Ryffel[1,2,4] and Valerie F.J. Quesniaux[1,2]

[1] CNRS, UMR7355, Orléans, France
[2] Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orleans, Orléans, France
[3] CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France
[4] Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Cape Town, South Africa
[5] Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S945, Paris, France
[6] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U945, Paris, France
[7] Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Service Parasitologie-Mycologie, Paris, France
[8] Artimmune, Orléans, France

Cerebral malaria is a severe complication of *Plasmodium falciparum* infection. Although T-cell activation and type II IFN-γ are required for *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A)-induced murine experimental cerebral malaria (ECM), the role of type I IFN-α/β in ECM development remains unclear. Here, we address the role of the IFN-α/β pathway in ECM development in response to hepatic or blood-stage *Pb*A infection, using mice deficient for types I or II IFN receptors. While IFN-γR1$^{-/-}$ mice were fully resistant, IFNAR1$^{-/-}$ mice showed delayed and partial protection to ECM after *Pb*A infection. ECM resistance in IFN-γR1$^{-/-}$ mice correlated with unaltered cerebral microcirculation and absence of ischemia, while WT and IFNAR1$^{-/-}$ mice developed distinct microvascular pathologies. ECM resistance appeared to be independent of parasitemia. Instead, key mediators of ECM were attenuated in the absence of IFNAR1, including *Pb*A-induced brain sequestration of CXCR3^{+}-activated CD8^{+} T cells. This was associated with reduced expression of Granzyme B, IFN-γ, IL-12Rβ2, and T-cell-attracting chemokines CXCL9 and CXCL10 in IFNAR1$^{-/-}$ mice, more so in the absence of IFN-γR1. Therefore, the type I IFN-α/β receptor pathway contributes to brain T-cell responses and microvascular pathology, although it is not as essential as IFN-γ for the development of cerebral malaria upon hepatic or blood-stage *Pb*A infection.

Keywords: Chemokines · Experimental cerebral malaria · Merozoites · Sporozoites · Type I interferons (IFNs)

Introduction

Malaria remains one of the main global infectious diseases and cerebral malaria is a major complication, often fatal in

Correspondence: Dr. Valerie F.J. Quesniaux
e-mail: quesniaux@cnrs-orleans.fr

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Plasmodium falciparum-infected children and young adults [1]. Cerebral malaria pathophysiology is still poorly understood, combining cerebral vascular obstruction, and exacerbated immune responses. Indeed, investigations in humans and mice documented the sequestration of erythrocytes, parasitized or not, platelets and leucocytes in cerebral blood vessels with an increased proinflammatory cytokine expression [1–3]. The specific role of T cells in cerebral malaria pathogenesis has been difficult to address in humans. In mice however, T-cell sequestration and activation in the brain are crucial steps for experimental cerebral malaria (ECM) development after *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) infection [4–7]. In particular, αβ-CD8$^+$ T cells sequestrated in the brain play a pathogenic, effector role for ECM development [6], and we showed recently a role for protein kinase C-θ (PKC-θ) in *Pb*A-induced ECM pathogenesis [8]. Besides being a critical regulator of TCR signaling and T-cell activation, PKC-θ is involved in interferon type I/II signaling in human T cells [9]. Type II IFN-γ is essential for *Pb*A-induced ECM development [10–12], promoting CD8$^+$ T-cell accumulation in the brain [7, 12–14]. Type I IFNs are induced during viral infection but they also contribute to the antibacterial immune response. In *Mycobacterium tuberculosis* infection, types I and II IFNs play nonredundant protective roles [15], while type I IFNs inhibit IFN-γ hyper-responsiveness by repressing IFN-γ receptor expression in a *Listeria monocytogenes* infectious model [16]. Moreover, type I IFNs role in central nervous system (CNS) chronic inflammation is ambiguous [17]. IFN-β has proinflammatory properties and contributes to some autoimmune CNS diseases, while IFN-β administration is routinely used in relapsing-remitting multiple sclerosis treatment, characterized by inflammatory cell infiltration to the CNS, including Th1 and Th17 [17]. Crossregulations between type I and type II IFNs have been documented [18–21], they can have similar or antagonistic effects, and type I IFN-α/β precise role in ECM development after sporozoite or merozoite infection remains unclear.

Here, we addressed the role of IFN-α/β pathway in ECM development in response to hepatic or blood-stage *Pb*A infection, using mice deficient for types I or II IFN receptors. Unlike IFN–γR1$^{-/-}$ mice that were fully resistant to ECM, we show that IFNAR1$^{-/-}$ mice are partially protected after sporozoite or merozoite infection. Magnetic resonance imaging (MRI) and angiography (MRA) confirmed the reduced microvascular pathology and brain morphologic changes in the absence of type I IFNs signaling. Further, we demonstrate that ECM protection is associated with reduced T-cell responses in the brain in the absence of a functional type I IFN-α/β receptor pathway.

Results

The IFN-γ pathway is essential for ECM development upon sporozoite *Pb*A infection

The IFN-γ pathway is central for ECM development after blood-stage *Pb*A infection. We first assessed the role of this pathway in preerythrocytic/intrahepatic stage infection by investigating ECM neurological signs development in IFN-γR1$^{-/-}$ mice. Following the injection of 1000 sporozoites, 60% of the WT control mice developed typical ECM neurological symptoms, such as ataxia, loss of grip strength, progressive paralysis, and coma, and succumbed within 8–9 days, as previously described [22]. In contrast, IFN-γR1$^{-/-}$ mice were fully resistant to the same challenge, surviving 30 days with no ECM neurological signs (Fig. 1A). Therefore, type II IFN-γ pathway is essential for ECM development after *Pb*A sporozoite infection.

Hampered ECM development in the absence of IFN-α/β pathway upon hepatic or blood-stage *Pb*A infection

The role of type I IFN-α/β versus type II IFN-γ pathways in ECM development after infection with hepatic or blood-stage *Pb*A was then assessed in mice deficient for either IFNAR1 or IFN-γR1. IFNAR1$^{-/-}$ mice were partially protected against ECM following sporozoite-initiated infection, only 20% dying before day 10, and 40% eventually developing typical ECM neurological symptoms, which reflected a delayed ECM development after infection with sporozoites (Fig. 1A), as compared with WT control mice, 60% of which developed ECM and died before day 10, and IFN-γR1-deficient mice, which were fully resistant to *Pb*A challenge.

After injection of *Pb*A-parasited red blood cells (10^5 pRBC/mouse), WT mice succumbed within 7–9 days with typical ECM neurological signs, while IFN-γR1$^{-/-}$ mice were resistant, surviving over 20 days after infection with no ECM neurological signs. IFNAR1$^{-/-}$ mice were partially protected, 41% dying before day 9 postinfection and a further 36% developing delayed ECM from day 9 to 11 (Fig. 1B). Partial protection of IFNAR1$^{-/-}$ mice was also seen in response to higher dose *Pb*A-infected erythrocytes injection (10^6pRBC/mouse; data not shown).

Parasitemia was analyzed by flow cytometry using GFP transfected parasites [23]. There was no delay in parasitemia in IFN-γR1$^{-/-}$ and IFNAR1$^{-/-}$ mice following either sporozoite or blood-stage *Pb*A infection. At 9 days after *Pb*A sporozoite infection, parasitemia was about 2% in all groups with no significant differences between WT, IFN-γR1$^{-/-}$, and IFNAR1$^{-/-}$ mice (Fig. 1C), while after blood-stage *Pb*A infection parasitemia was 11–12% at 7 days in WT and IFN-γR1$^{-/-}$ mice, and was slightly increased in IFNAR1$^{-/-}$ mice (Fig. 1D). IFN-γR1$^{-/-}$ and IFNAR1$^{-/-}$ mice succumbed at later stages to either sporozoite or blood-stage infection with high parasitemia (Fig. 1E and F) and severe anemia (Fig. 2A and B) in the absence of neurological signs. Thus, our data confirm the essential role of type II IFN-γ pathway in ECM development after either *Pb*A merozoite or sporozoite infection and demonstrate a contribution of type I IFN-α/β pathways in ECM development that was not associated with any direct effect on parasite growth.

Hematological alterations in IFNAR1$^{-/-}$ mice

As thrombocytopenia and anemia are hallmarks of *Pb*A infection progression in mice [24], we next assessed hematological parameters in naive and *Pb*A-infected WT, IFNAR1$^{-/-}$, and

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

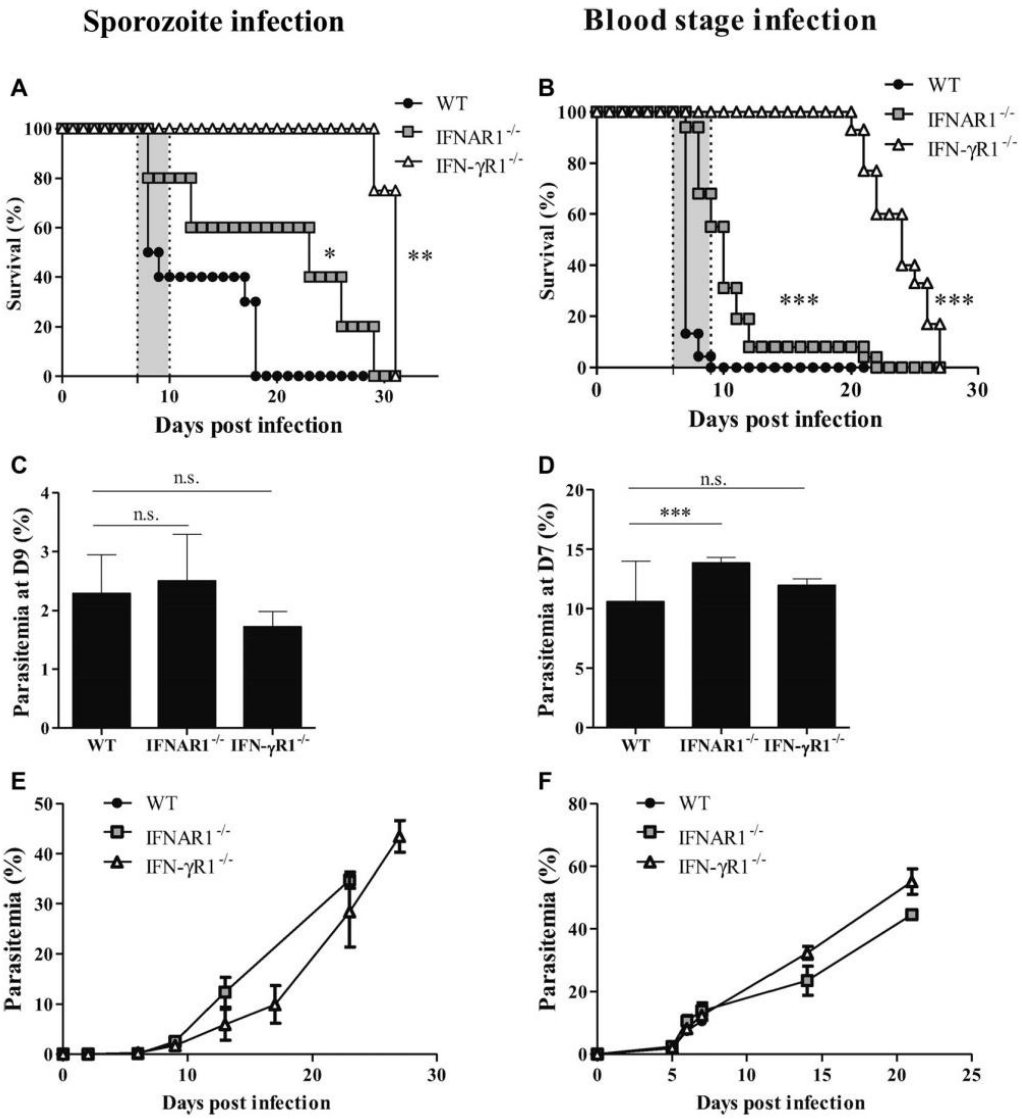


Figure 1. IFNAR1$^{-/-}$ mice are partially protected against *Pb*A-induced ECM. (A) WT mice and mice deficient for IFNAR1 or IFN-γR1 were infected intravenously with 1000 sporozoites from *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*A) and their survival was monitored daily. Results are from one experiment ($n = 10$ WT and IFNAR1$^{-/-}$ mice and four IFN-γR1$^{-/-}$ mice) representative of four independent experiments. (B) WT and IFNAR1 or IFN-γR1-deficient mice were infected intraperitoneally with 10^5 *Pb*A-parasited red blood cells and their survival was monitored daily. Results are pooled from five independent experiments ($n = 45$ WT, 24 IFNAR1$^{-/-}$, and 10 IFN-γR1$^{-/-}$ mice). (A, B) The shaded portion represents the time window of mortality from ECM in WT controls. (C) The percentage of parasitized erythrocytes in the peripheral blood was investigated by flow cytometric analysis of GFP fluorescent erythrocytes, on day 9 postinfection with *Pb*A sporozoites infected mice as in (A). Results are mean +SEM of $n = 9$–14 mice per genotype pooled from four independent experiments. (D) Parasitemia was determined on day 7 after *Pb*A blood-stage infection as in (B). Results are mean +SEM of 26–30 mice per genotype pooled from four independent experiments. (E) Evolution of the percentage of parasitized erythrocytes in the peripheral blood of ECM resistant mice up to 28 days in *Pb*A sporozoites-infected mice as in (A) and (C). Results are mean ± SEM of $n = 9$–14 mice per genotype pooled from four independent experiments. (F) Evolution of the percentage of parasitized erythrocytes in the peripheral blood of ECM resistant mice up to 21 days after *Pb*A blood-stage infection as in (B) and (D). Results are mean ± SEM of 26–30 mice per genotype pooled from four independent experiments. $^{***}p < 0.001$; $^{**}p < 0.01$; $^{*}p < 0.05$; n.s. not significant, statistical analysis was done with Log-Rank test for survival results (A and B), and with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's comparison for parasitemia (C and D).

IFN-γR1$^{-/-}$ mice. The platelet counts were drastically reduced in WT, IFNAR1$^{-/-}$, or IFN-γR1$^{-/-}$ mice on day 9 and 7 after either sporozoite or blood-stage *Pb*A infection, respectively (Fig. 2C and D). They remained low for the next 3–4 weeks in ECM-resistant mice, confirming that thrombocytopenia is not an indicator of platelet sequestration in brain microvessels in this model, but may rather reflect decreased production or increased activation of platelets [25]. WT mice showed a clear reduction in the number of circulating white blood cells (Fig. 2E and F), largely attributed to a decrease in the number of

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

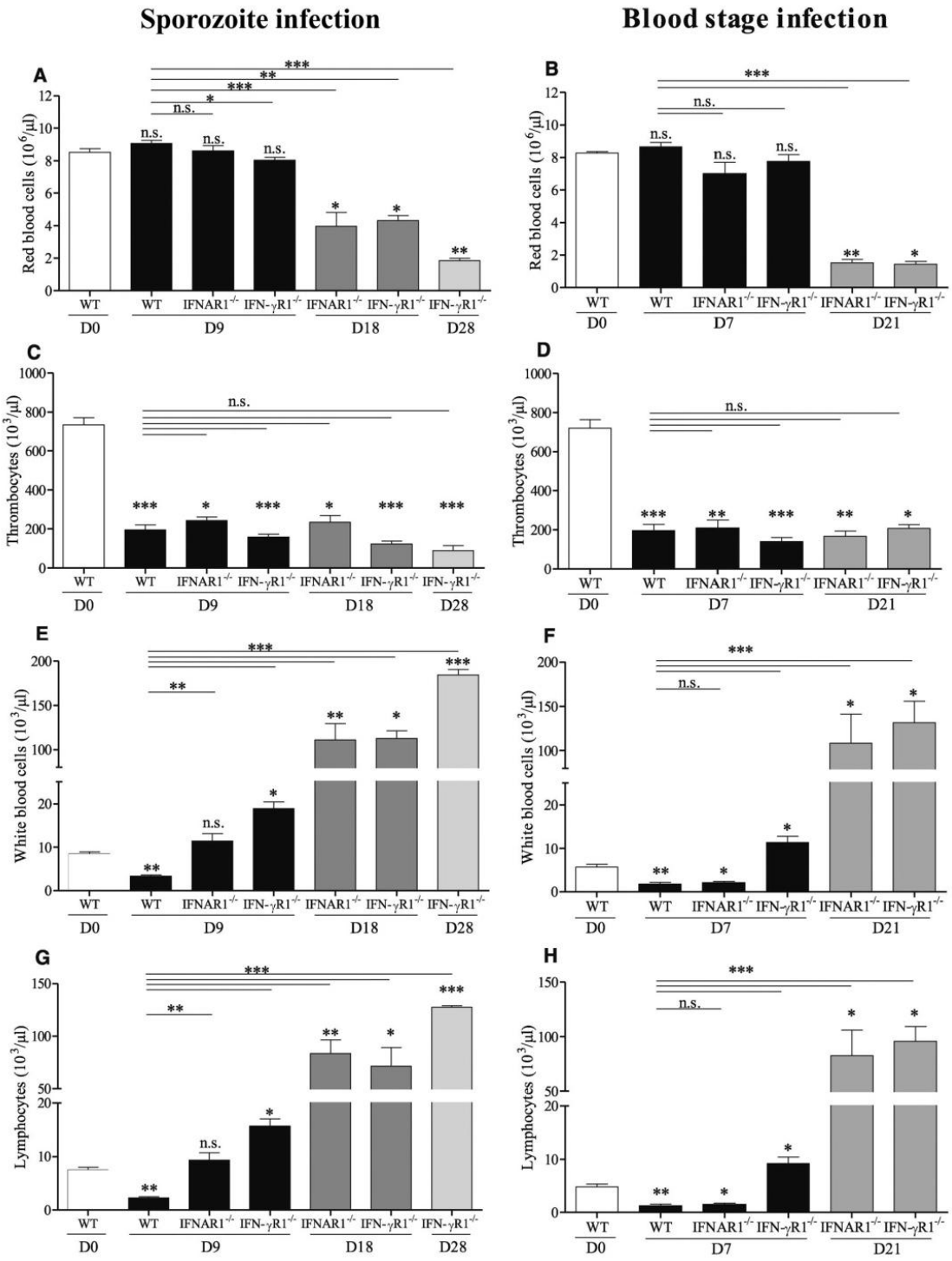


Figure 2. Hematological parameters after *Pb*A infection. (A, C, E, G) WT, IFNAR1, or IFN-γR1-deficient mice were infected with 1000 *Pb*A sporozoites and (A) red blood cell, (C) thrombocyte, (E) total white blood cell, and (G) lymphocyte counts were determined in peripheral blood at days 0, 9, 18, and 27 postinfection. Results are expressed as mean +SEM of $n = 11$–16 mice per genotype pooled from four independent experiments. (B, D, F, H) WT, IFNAR1, or IFN-γR1-deficient mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasited red blood cells and (B) peripheral red blood cell, (D) thrombocyte, (F) total white blood cell, and (H) lymphocyte counts were determined at day 0, 7, and 21 postinfection. Results are expressed as mean +SEM of $n = 8$–11 mice per group pooled from three independent experiments. No significant difference was found between the hematological parameters of noninfected gene deficient and WT mice (not shown). Two series of statistical analysis, done with a Kruskal–Wallis test followed by Dunn's comparison, are shown: (1) Asterisks on top of each histogram bar indicate a significant difference from uninfected WT controls; (2) Asterisks on top of a line indicate significance difference between mouse strains, compared with infected WT controls at day 9 (A) or day 7 (B) after infection. $^{***}p < 0.001$; $^{**}p<0.01$; $^{*}p<0.05$; n.s. not significant.

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

lymphocytes (Fig. 2G and H) on day 9 or 7 after either sporozoite or blood-stage *Pb*A infection, respectively. In contrast, in IFN-γR1$^{-/-}$ mice lymphocyte counts were increased on day 9 or 7 postinfection, and white blood cell and lymphocyte counts further augmented to reach circa 100 $\times$ 10^3 cells/μL 3 weeks postinfection (Fig. 2E–H). IFNAR1$^{-/-}$ mice had white blood cell and lymphocyte counts similar to naive mice on day 9 after sporozoite *Pb*A infection although they were as reduced as in infected WT mice on day 7 of blood-stage *Pb*A infection (Fig. 2E–H). Thereafter, white blood cell and lymphocyte counts increased dramatically in the surviving IFNAR1$^{-/-}$ mice, similar to what was seen in IFN-γR1$^{-/-}$ mice, further augmenting to reach ca 100 $\times$ 10^3 cells/μL two to three weeks postinfection (Fig. 2E–H).

Therefore, the partial or full resistance of IFNAR1$^{-/-}$ or IFN-γR1$^{-/-}$ mice to ECM development, respectively, was not associated with reduced thrombocytopenia, but with reduced lymphopenia and even leukocytosis.

Reduced cerebral ischemia by noninvasive imaging in absence of type I IFN-α/β pathway

Since ECM sensibility and hematological alterations appeared largely independent of the *Pb*A stage used for infection, the neuropathology of IFN pathway-deficient mice was further characterized by MRI and MRA in blood-stage *Pb*A-infected mice. These noninvasive tools are used in human patients for neurological disease investigation during CM [26–30]. In murine ECM, MRI/MRA allow a semiquantitative analysis of swelling/edema, focal ischemia, brain morphological changes, and microvascular pathology due to small vessel obstruction by erythrocytes and leukocytes and endothelial cell damage [30–33]. WT mice and mice deficient in type I and type II IFN pathways were examined at day 7 after blood-stage *Pb*A infection, when sensitive mice are developing acute ECM. Typical MRI and MRA brain images are shown in Figure 3A and B, respectively. While WT mice presented distinct signs of ischemic brain damage, with brain stem swelling and cerebellum compression, and vascular blood flow perturbations after *Pb*A infection, IFN-γR1$^{-/-}$ mice displayed normal MRI parameters without any sign of microvascular obstruction and IFNAR1$^{-/-}$ mice had an intermediate phenotype. *Pb*A-infected WT mice showed distinct changes of MRI and MRA, observable as a bilateral hyperintense signal at the corpus callosum (Fig. 3A), and a dramatic reduction of blood flow (Fig. 3B). Brain edema/swelling was documented in infected WT mice during acute ECM by measuring three distances (Fig. 3A), namely line 1 from the pituitary gland to Sylvius aqueduct, line 2 crossing the medial cerebellar nucleus and line 3 stemming from the cerebellar obex [30]. *Pb*A-infected WT mice showed increased distance 1, indicative of brain stem swelling, and cerebellum compression documented by distance 2 reduction and distance 3 increase, as compared with noninfected mice (Fig. 3D–F), in agreement with the data from Penet et al. [30]. We document here, for the first time, that IFN-γR1$^{-/-}$ mice present unaltered MRI/MRA signals upon *Pb*A infection, with no change in cerebral vasculature nor significant alteration of the metric parameters, as compared with noninfected WT mice (Fig. 3B–F), in line with their ECM-resistant phenotype. IFNAR1$^{-/-}$ mice presented a intermediate phenotype, with hyper-intense signal corresponding to some swelling at the corpus callosum, modest alterations of cerebellar structure, and lower brain stem swelling that were not significantly different from *Pb*A-infected WT mice, while the blood flow reduction was more heterogeneous, affecting only limited areas of the brain in these mice (Fig. 3B–F). Therefore, IFN-γR1$^{-/-}$ mice present no MRI/MRA detectable brain alteration, confirming that type II IFN-γ signaling is critically involved in microvascular obstruction development and ischemic brain damage consecutive to *Pb*A infection, while the contribution of the type I IFN–α/β pathway is of lesser importance.

Reduced microvascular cerebral, but not pulmonary lesions in IFNAR1$^{-/-}$ mice upon *Pb*A infection

In order to validate the functional data obtained by MRI/MRA, we further investigated the brain microvascular lesions on day 7 after blood-stage *Pb*A infection. Microscopically, the brain vascular blood flow perturbation in *Pb*A-infected WT mice was associated to microvascular lesions, with perivascular hemorrhage and intravascular accumulation of mononuclear cells and erythrocytes (Fig. 4A). These parameters were reduced in *Pb*A-infected IFNAR1$^{-/-}$ mice and absent in IFN-γR1$^{-/-}$ mice (Fig. 4A). The brain microvascular obstruction severity and local hemorrhage was assessed semiquantitatively and a significant reduction of brain pathology was documented in IFNAR1$^{-/-}$ mice, with an absence of pathology in IFN-γR1$^{-/-}$ mice (Fig. 4B). Thus, brain microscopic examination was in agreement with MRI results. Similarly, the perivascular hemorrhage and mononuclear cells and erythrocytes sequestration seen in WT mice after *Pb*A sporozoite-initiated infection were reduced in IFNAR1$^{-/-}$ mice and furthermore in IFN-γR1$^{-/-}$ mice (data not shown).

In mice, as in human, severe malaria can be associated with respiratory distress characterized by inflammatory-mediated increased capillary permeability or endothelial damage [34–37]. We thus investigated the pulmonary microvascular beds in WT, IFNAR1$^{-/-}$, and IFN-γR1$^{-/-}$ mice 7 days after blood-stage *Pb*A infection. Microscopically, lungs of *Pb*A-infected WT, IFNAR1$^{-/-}$, and IFN-γR1$^{-/-}$ mice displayed congested alveolar septae, with red blood cells and leukocytes infiltration and hemorrhage (Fig. 4C). Lung pathology was scored semiquantitatively and no significant difference found in *Pb*A infected WT, IFNAR1$^{-/-}$, and IFN-γR1$^{-/-}$ mice after blood stage (Fig. 4D) or sporozoite-induced infection (data not shown), indicating that *Pb*A-induced lung pathology is independent of IFNAR and IFN-γR pathways.

Therefore, the absence of functional type I, and furthermore type II interferon pathways prevents brain microvascular pathology, but not lung inflammation, induced by blood-stage *Pb*A infection.

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

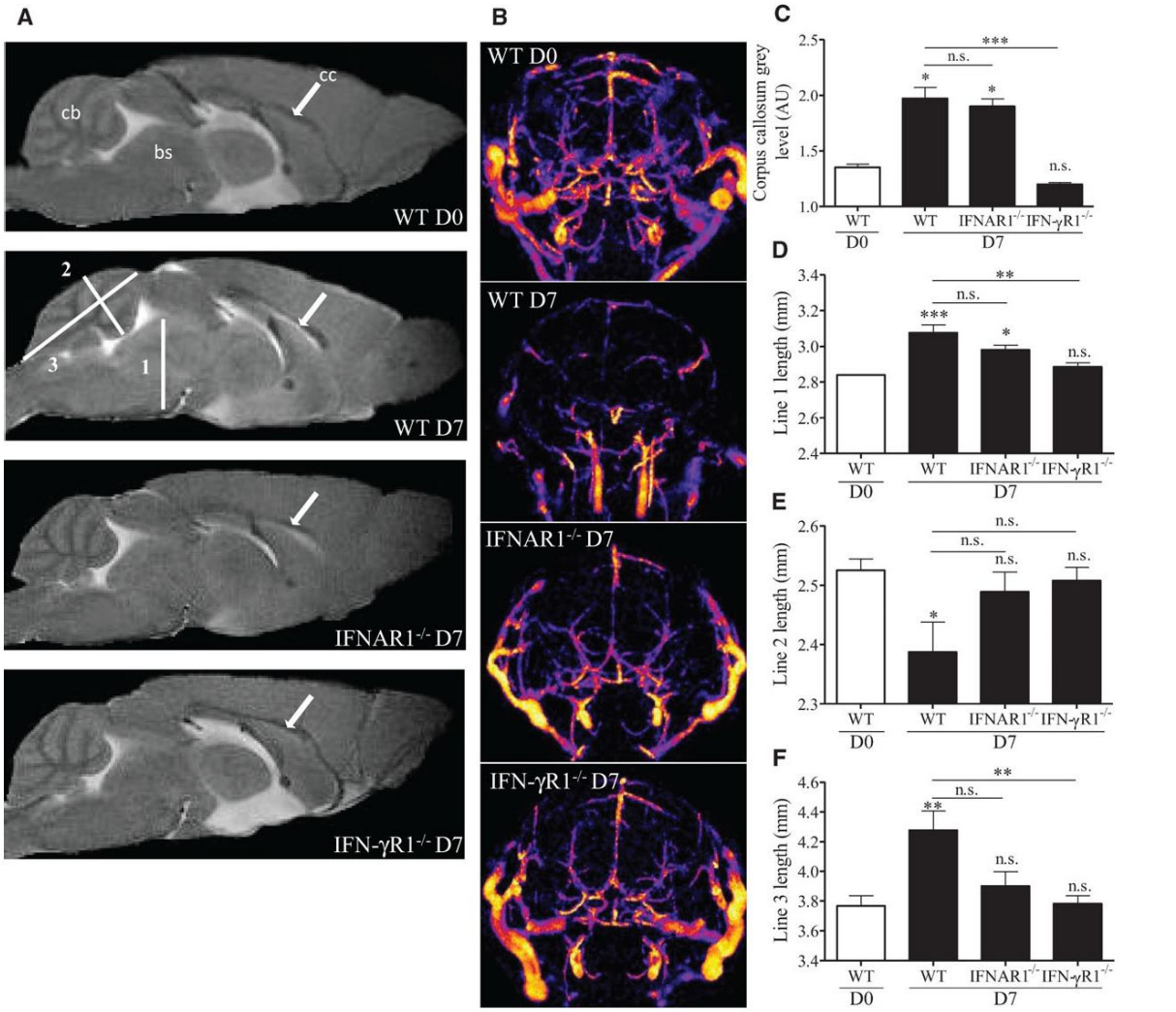


Figure 3. MRI/MRA analysis of the brain of *Pb*A-infected IFNAR1-deficient and IFN-γR1-deficient mice. WT, IFNAR1, or IFN-γR1-deficient mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized red blood cells and brain imaging performed by MRI and MRA. (A) MRI of uninfected (D0) and infected mice (D7) 7 days postinfection: Mid-sagittal MRI image (cc, corpus callosum (indicated by arrows); cb, cerebellum; bs, brain stem. Distinct anomalies were visible in *Pb*A-infected WT mice, namely brain swelling, and edema formation was apparent as a bilateral hyperintense (gray) signal at the corpus callosum. MRI images are representative of two independent experiments with $n = 4$ for WT uninfected controls and $n = 7$–8 for infected mice. (B) MRA: vascular blood flow perturbations are evident in WT and in a lesser extend in IFNAR1-deficient mice, 7 days post-*Pb*A-infection, while infected IFN-γR1-deficient mice seemed unaffected, similar to naive WT mice. MRA images are representative of two independent experiments (as in A). (C) Corpus callosum mean gray levels intensity, representative of edema formation, from mid-sagittal MRI image (from A) of uninfected and infected mice, 7 days postinfection: the data represent the mean +SEM of $n = 4$ for WT uninfected controls and $n = 7$–8 for infected mice, pooled from two independent experiments as in (A). (D–F) Assessment of brain swelling in uninfected and 7 day *Pb*A-infected mice in terms of measurement of distances 1–3 from the mid-sagittal MRI images in (A). (D) Line 1 from the pituitary gland to Sylvius aqueduct, standing for brain stem width; (E) Line 2, median line crossing the medial cerebellar nucleus; (F) Line 3, medium line stemming from the cerebellar obex. The data represent the mean +SD of $n = 4$ for WT uninfected controls and $n = 7$–8 for infected mice, pooled from two independent experiments as in (A). $^{***}p < 0.001$; $^{**}p<0.01$; $^{*}p<0.05$; n.s. not significant, statistical analysis was done with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's comparison.

Inactivation of type I IFN-α/β pathway impairs cerebral T-cell response

Effector T lymphocyte recruitment and activation in the brain, and especially $CD8^+$ effector T cells, are essential for ECM pathogenesis [6, 7, 12, 38]. We first quantified T-cell sequestration in the brain by determining CD3ε and CD8α message expression in WT, IFNAR1$^{-/-}$, and IFN-γR1$^{-/-}$ mice on day 7 postinfection, a time point when sensitive mice develop acute ECM. CD3ε and CD8α mRNA were clearly overexpressed, indicating that T-cell populations were increased in *Pb*A-infected WT mice brain, as compared with those of uninfected controls (Fig. 5A and B). By contrast, CD3ε and CD8α mRNA overexpression was reduced in IFNAR1$^{-/-}$ mice, and more so in IFN-γR1$^{-/-}$ mice, indicative of a limited T-cell recruitment in these mice. Granzyme B, a marker of cytotoxic T-cell effector function, essential for ECM

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

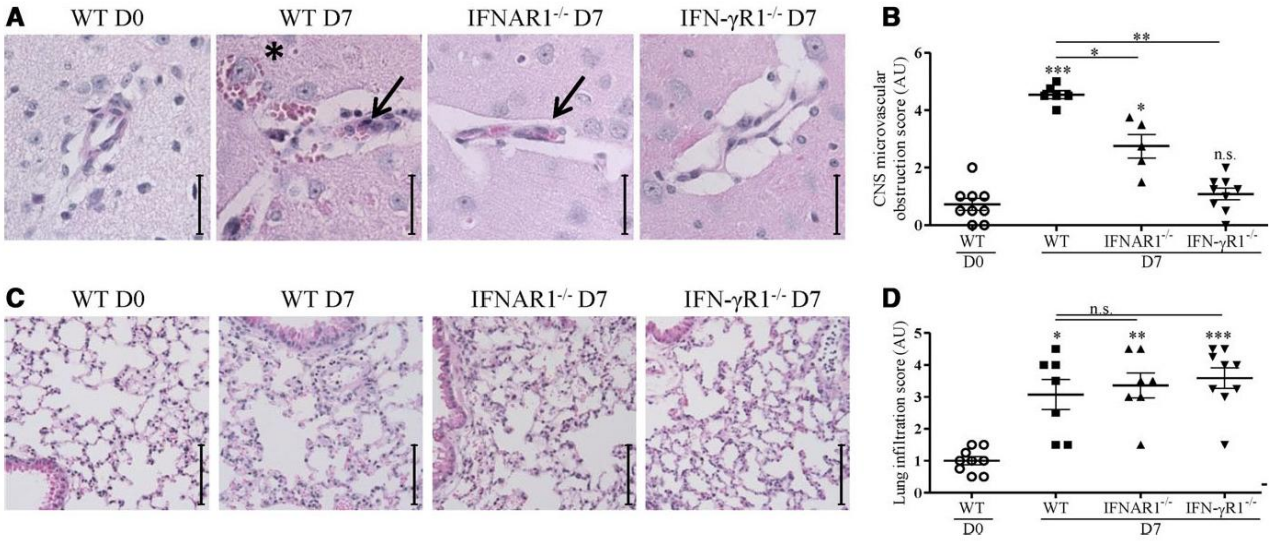


Figure 4. Reduced ECM-associated brain pathology, but not lung inflammation, in *Pb*A-infected IFNAR1-deficient mice. WT, IFNAR1, or IFN-γR1-deficient mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasited red blood cells. (A) Brain microvascular obstruction visible in the brain of WT mice 7 days postinfection. H&E staining (magnification 40×) representative of two independent experiments with $n = 4$–8 mice per group. Vessels with sequestered parasited red blood cells and leukocytes (black arrow) and hemorrhages (*) are shown. Scale bar = 50 μm. (B) Semiquantitative score of brain infiltration, obstruction, and hemorrhages. The microvascular obstruction score is shown as mean ± SEM of $n = 5$–9 mice per group pooled from two independent experiments as in (A). $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; n.s., not significant, statistical analysis with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's comparison, values at 7 days are compared with D0. (C) Lung microvascular obstruction on day 7 postinfection. H&E staining (magnification 20×) representative of two independent experiments as in (A). Hemorrhages, infiltration of red blood cells and immune cells were quantified (Scale bar = 100 μm). (D) Semiquantitative score of lung infiltration, obstruction, and hemorrhages. The lung infiltration is shown as mean ± SEM of $n = 5$–9 mice per group pooled from two independent experiments as in (A). $^{***}p < 0.001$; $^{**}p<0.01$; $^*p<0.05$; n.s. not significant; statistical analysis with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's comparison, values at 7 days are compared with D0.

development [38], was strongly upregulated in *Pb*A-infected WT mice brain, while it was more limited in IFNAR1$^{-/-}$ mice and essentially not upregulated in IFN-γR1$^{-/-}$ mice (Fig. 5C). The expression of CXCL9 and CXCL10 chemokines essential for T-cell recruitment and ECM development [39, 40] was strongly upregulated during ECM in WT mice (Fig. 5D and E). The expression of CXCL11 was also increased in the brain of *Pb*A-infected WT mice (Fig. 5F). Defective T-cell recruitment was associated with a significantly reduced CXCL9 and CXCL10 expression in IFNAR1$^{-/-}$ mice. Further, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 expression was almost absent in the brain of *Pb*A-infected IFN-γR1-deficient mice (Fig. 5D–F). The expression of CXCR3, the receptor for CXCL9, CXCL10, and CXCL11, necessary for CD8$^+$ T-cell recruitment into the brain during ECM development [39], was upregulated during ECM in WT mice (Fig. 5G). In contrast, CXCR3 message overexpression was significantly reduced in IFNAR1$^{-/-}$ and IFN-γR1$^{-/-}$ mice as compared with that of WT mice (Fig. 5G). IFN-γ and IL-12Rβ2, typical of Th1 responses central to ECM development [11, 12, 41] and strongly expressed in WT mice during ECM, were not upregulated in IFN-γR1$^{-/-}$ mice and their expression halved in the brain of *Pb*A-infected IFNAR1$^{-/-}$ mice (Fig. 5H and I). Thus, absence of type I IFN-α/β signaling led to a reduced local expression of type II IFN-γ during ECM. However, there was no reciprocal crossregulation since absence of type II IFN-γ pathway did not impinge on type I IFNs brain expression. Indeed, IFN-α and IFN-β expression was similar in the three types of mice after *Pb*A infection (data not shown). Thus, local brain chemokine expression and effector T-cell signature upon *Pb*A infection were reduced in IFNAR1$^{-/-}$ mice; however, the absence of IFN-γR1 signaling had a more profound effect.

Reduced cerebral T-cell sequestration and activation in the absence of IFNAR1 pathway

We next confirmed the effect of IFNAR1 deletion on the recruitment of effector T lymphocytes to the brain, a hallmark of ECM. Brain sequestered leukocytes were analyzed on day 7, a time point when sensitive mice develop neurological symptoms of ECM upon blood stage *Pb*A infection. As expected, populations of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells were significantly increased in the brain of *Pb*A-infected WT mice, as compared with those in uninfected controls, with a tenfold higher increase in CD8$^+$ than CD4$^+$ T cells (Fig. 6A–C). T-cell recruitment was strongly reduced in *Pb*A infected IFNAR1-deficient mice, as seen for both CD8$^+$ T cells and CD4$^+$ T cells. CD69 expression, a marker of T-cell activation, was upregulated on T cells upon *Pb*A infection in WT mice, but the levels of activated CD69$^+$CD8$^+$ and CD69$^+$CD4$^+$ T cells were limited in IFNAR1-deficient mice (Fig. 6D). CXCR3 expression was strongly increased on WT sequestered T cells (Fig. 6E and F). Interestingly, both the number of CXCR3$^+$CD8$^+$ and CXCR3$^+$CD4$^+$ T cells and the intensity of expression of CXCR3 per cell were reduced in IFNAR1-deficient mice, as compared with WT mice, after *Pb*A infection (Fig. 6E and F). Therefore, brain sequestration

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

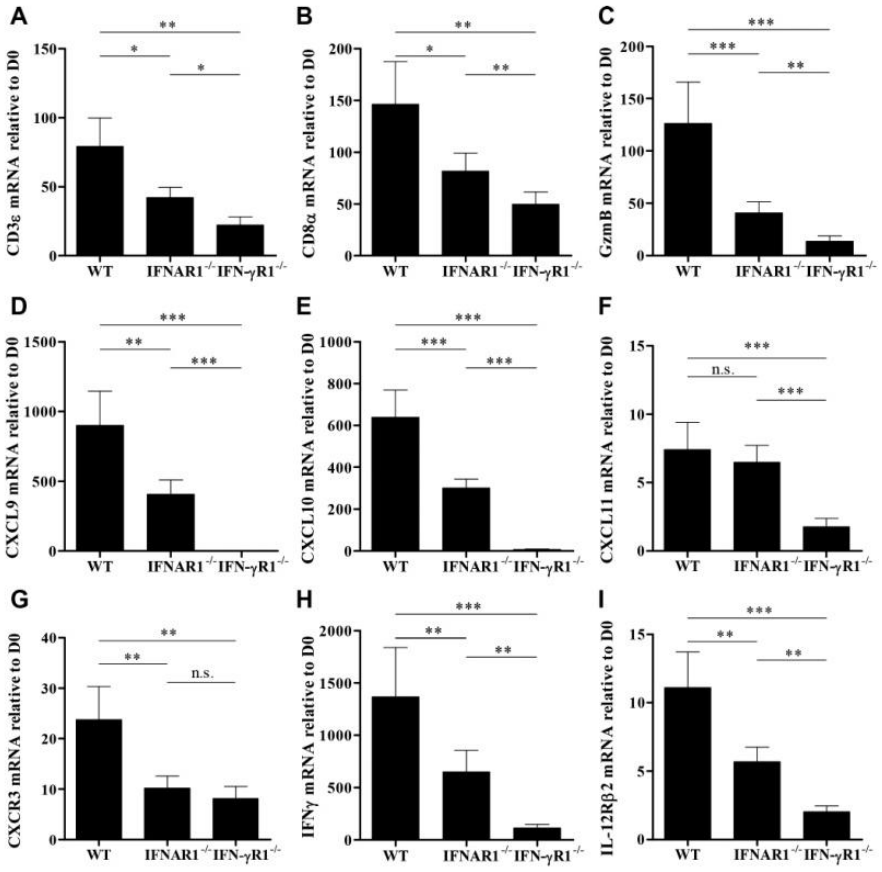


Figure 5. Differential T-cell signature in the brain of *Pb*A-infected IFNAR1-deficient mice. (A) CD3, (B) CD8α, (C) Granzyme B, (D) CXCL9, (E) CXCL10, (F) CXCL11, (G) CXCR3, (H) IFN-γ, and (I) IL-12Rβ2 expression was quantified by real-time quantitative RT-PCR 7 days after infection of WT, IFNAR1, or IFN-γR1-deficient mice with 10^5 *Pb*A-parasitized red blood cells. Expression of GAPDH and 18S housekeeping genes was used for normalization. Gene mRNA expression is shown as fold induction in *Pb*A-infected relative to uninfected controls, for each mouse strain. Results are expressed as mean +SEM of $n = 8$–10 mice per genotype pooled from three independent experiments. Statistical analysis was done using the Relative Expression Software Tool (REST-MCS, using Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test ©; $^{***}p<0.001$; $^{**}p<0.01$; $^{*}p<0.05$; n.s. not significant).

of activated effector T lymphocytes upon *Pb*A infection was drastically reduced in IFNAR1-deficient mice, and this was associated with a reduced membrane expression of the chemokine receptor CXCR3.

Discussion

*Pb*A-induced ECM development depends on T-cell sequestration and activation [4–6]. Brain sequestrated αβ-$CD8^+$ T cells play a pathogenic, effector role for ECM development [6], after either blood-stage or sporozoite infection [22], under the control of IFN-γ [12]. Although the role of type II IFN-γ has been well documented, the role of type I IFNs in ECM development remained controversial. Indeed, two recent studies in blood stage *Pb*A infection reported different results. Although IFNAR1$^{-/-}$ mice displayed transient, nonsevere ECM signs that were attributed to a reduced parasite burden in these mice [21], IFNAR1$^{-/-}$ mice survived *Pb*A infection with unaffected parasitemia in a second study [42]. This apparent discrepancy with our results may be due to the different genetic construct or background of the IFNAR1$^{-/-}$ mice used [21], which were undefined in [42]. Systemic administration of IFN-β during *Pb*A infection led to increased survival and improved blood-brain barrier function with no effect on parasitemia [20]. IFN-β treatment reduced TNF, IFN-γ, and CXCL9 plasma levels, while CXCL10 was strongly increased, and brain CXCL9 expression and T-cell infiltration were decreased in these mice [20]. Administration of recombinant human IFN-α delayed or prevented *Pb*A-induced ECM and decreased blood and brain parasite load, while systemic and splenic IFN-γ levels were strongly increased, blood TNF decreased, and brain leukocyte sequestration reduced [19]. These studies pointed to complex crossregulations between type I and type II IFNs.

Here, we investigated side-by-side the role of types I or II IFN pathways in ECM development in response to either hepatic or blood-stage *Pb*A infection. We confirmed that IFN-γR1$^{-/-}$ mice are fully resistant to ECM after *Pb*A merozoite infection [11, 12] and documented for the first time their absence of brain pathology and vascular flow perturbation by MRI/MRA. Further, we extended the study to show ECM resistance of IFN-γR1$^{-/-}$ mice after *Pb*A liver-stage/sporozoite infection. On the other hand, IFNAR1$^{-/-}$ mice showed partial protection or delay in ECM development after *Pb*A sporozoite or merozoite infection. Therefore, we show for the first time that the types I or II IFN pathways are central to ECM development following sporozoite-initiated infection.

Type I IFN pathway was reported to suppress T-cell dependent parasite control during blood-stage *Pb*A infection [21]. Here however, ECM protection was not associated with a decrease in parasitemia or thrombocytopenia in either type I or type II IFNR-deficient mice, after hepatic or blood-stage *Pb*A infection.

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

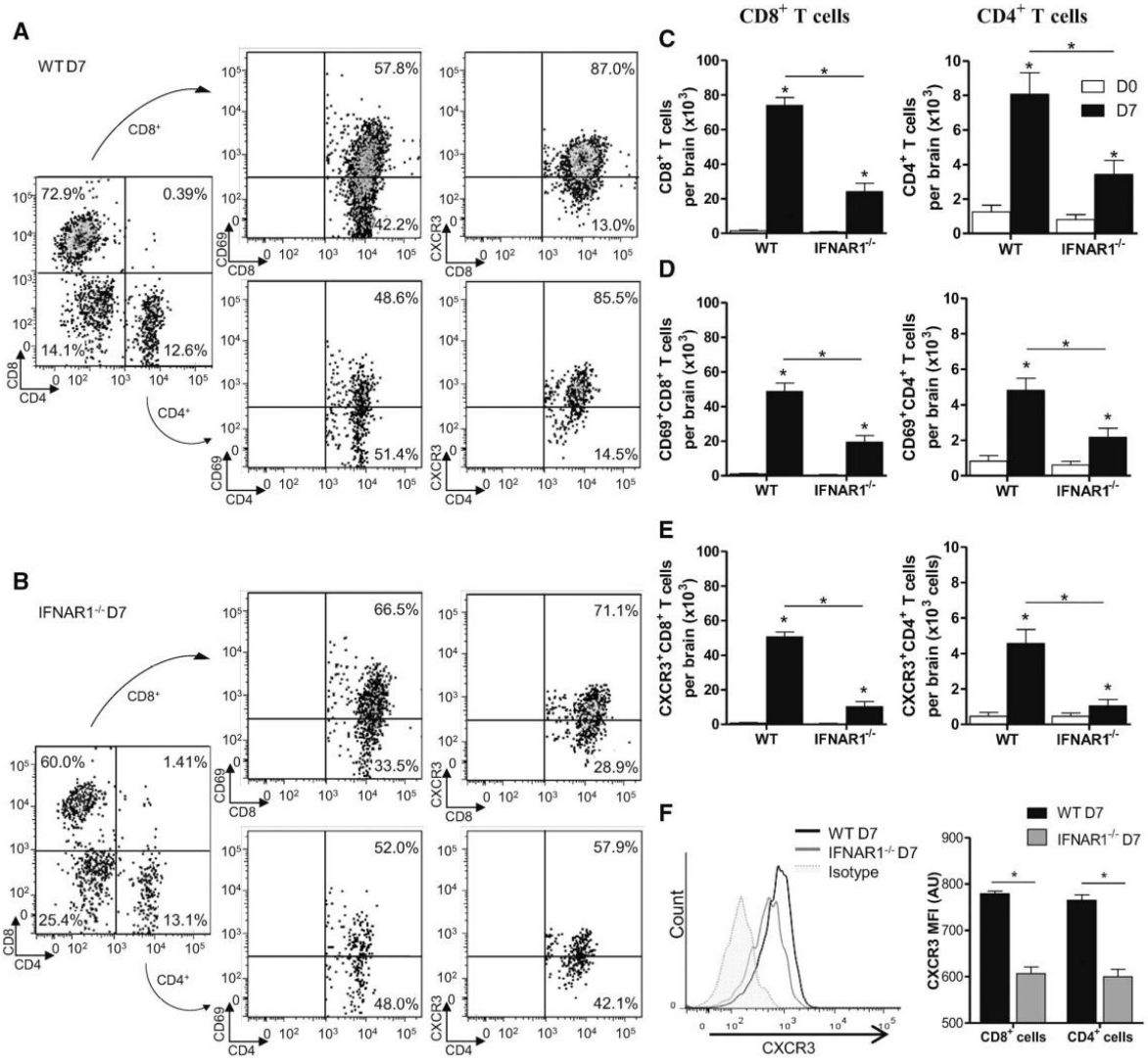


Figure 6. Reduced recruitment, activation, and CXCR3 expression of T lymphocytes in the brain of *Pb*A-infected IFNAR1-deficient mice. Mice were infected with 10^5 *Pb*A-parasitized red blood cells as in Figure 1. Flow cytometry analyses of brain-sequestered leukocytes from uninfected WT mice (WT D0), *Pb*A-infected WT mice (WT D7) with severe ECM, and naive and *Pb*A-infected IFNAR1-deficient mice tested on the same days. (A, B) Dot plots of $CD8^+$ and $CD4^+$ cell populations, gated on $CD3^+$ cells, in infected (A) WT and (B) IFNAR1-deficient mice, from one pool of three mice, representative of three individual pools per condition. Expression of $CD69^+$ and $CXCR3^+$ analyzed on $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells is shown. (C–E) The absolute numbers of (C) $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells, respectively, (D) $CD8^+CD69^+$ and $CD4^+CD69^+$ T cells, (E) $CD8^+CXCR3^+$ and $CD4^+CXCR3^+$ T cells in the brain are shown. (F) Representative histograms of CXCR3 expression in $CD8^+$ T cells from *Pb*A-infected WT and IFNAR1-deficient mice (left) and the mean fluorescence intensity of CXCR3 staining of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells (right) are shown. (C–F) Data are shown as mean +SEM of $n = 3$ individual pools of three mice per condition. $^*p<0.05$; n.s., not significant; statistical analysis with nonparametric Mann–Whitney test.

Therefore, our data are not in line with the previous study of Haque et al. [21], which concluded that IFNAR1$^{-/-}$ mice exhibited protection against cerebral malaria associated with reduced parasitemia and increased T-cell mediated parasite control, but are in agreement with that of Sharma et al. [42] that reported no difference in parasitemia in IFNAR1$^{-/-}$ mice after blood-stage *Pb*A infection. However, protection against cerebral malaria of IFNAR1$^{-/-}$ mice was shown in one survival curve in Sharma et al. [42], which is only partial in our hands. Differences in deletion, genetic background or experimental conditions might account for the difference in the extent of protection of the IFNAR$^{-/-}$ mice used. We used mice deficient for IFNAR1 subunit, deleted for exon 3–4, from Muller et al. [43] while Haque et al. [21] used IFNAR1$^{-/-}$ mice deleted for exon 5, from Hwang et al. [44]; Sharma et al. did not mention the origin of the IFNAR1$^{-/-}$ mice they used [42]. Furthermore, the role of type I IFNs in ECM development after sporozoite infection was not addressed in these studies, and we report for the first time the role of type I and type II IFNs in cerebral malaria pathogenesis after sporozoite infection. *Pb*A-associated lung inflammation was unaffected in IFNAR1$^{-/-}$

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

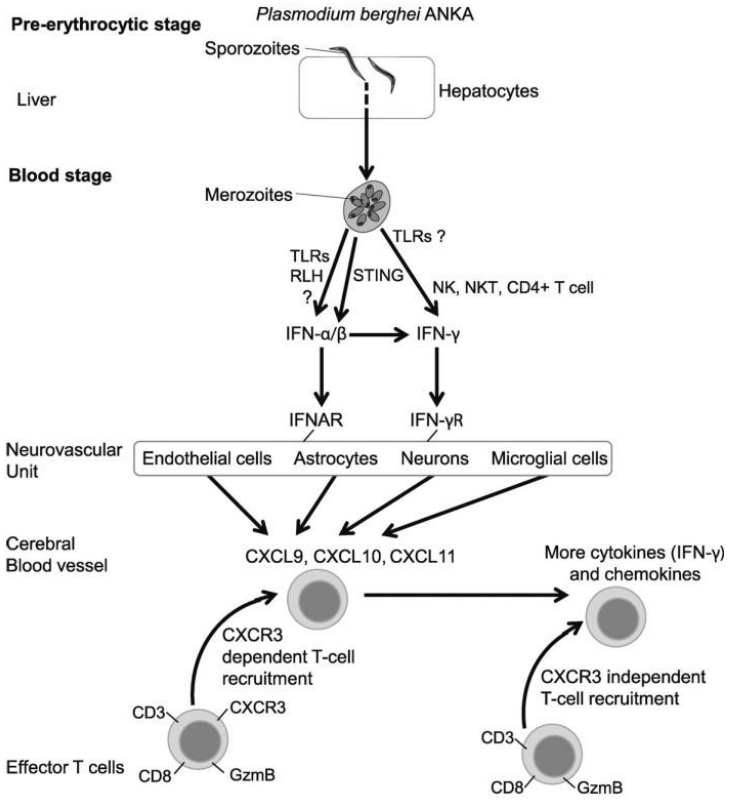


Figure 7. Scheme of the role of type I IFNs linking innate and pathogenic T-cell response in ECM development. In the liver, *Plasmodium berghei* ANKA sporozoites differentiate into merozoites that infect erythrocytes. PAMPs from *Plasmodium* induce IFN production: GPI anchors, hemozoin, and DNA activate type I IFN-α/β release through TLR2 [50], and TLR9 or STING [42, 51]. Parasited erythrocytes also induce type II IFN-γ production by NK, NKT, and CD4$^+$ T cells. Here, we show that type I IFN receptor contributes to brain expression of CXCL9 and CXCL10, either directly or indirectly through IFN-γ expression during ECM development. Indeed, IFNs stimulate members of the neurovascular unit, namely brain endothelial cells, astrocytes, neurons, and microglial cells, inducing the secretion of T-cell attracting chemokines, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 [12, 39, 45, 47, 48], necessary for CXCR3-dependent recruitment of CD8$^+$ T cells within cerebral vessels. This yields a second, robust release of chemokines and cytokines, recruiting to the brain more CD8$^+$ T cells, independently of CXCR3 [39].

and IFN-γR1$^{-/-}$ mice, pointing to an effect on ECM adaptive response rather than on systemic parasite control and inflammatory response. Therefore, the net beneficial effect of the absence of type I IFN pathway on ECM development did not seem merely related to an effect on parasite control, but may rather result from a complex, systemic and local regulation of the pathogenic T-cell response to either hepatic or blood-stage parasite infection.

Mechanistically, our data show that the type I IFN response to *Pb*A is essential for CXCL9 and CXCL10 expression that govern pathogenic T-cell recruitment to the brain, and ECM pathology (Fig. 7). Indeed, the increased survival, reduced neurological signs, ischemia and microvascular pathology, and brain morphologic changes seen by MRI/MRA in the absence of type I IFN signaling were associated with a lower T-cell response in the brain. We documented earlier the parallel between flow cytometry analysis of brain CD8$^+$ T-cell number and activation and the expression of T-cell response markers such as IFN-γ measured by qPCR [8]. Here, ECM protection was concurrent with decreased brain levels of CD3ε, CD8α, Granzyme B, IFN-γ, and IL-12Rβ2 expression, although these decreases were less prominent than in ECM resistant IFN-γR1$^{-/-}$ mice. The reduced Granzyme B expression in ECM-protected IFNR-deficient mice was in line with the reported essential role of CD8$^+$ T-cell Granzyme B expression for ECM development [38]. Reduced brain T-cell sequestration and decrease in IFN-γ expression, essential for ECM development [11, 12], might explain the ECM protection seen in IFNAR1$^{-/-}$ mice. The reduced brain sequestration of activated effector CD8$^+$ and CD4$^+$ T lymphocytes upon *Pb*A infection in IFNAR1-deficient mice was associated with a reduced membrane expression of CXCR3, a chemokine receptor associated with murine ECM [45]. T-cell chemoattractants, CXCR3 ligands CXCL9, CXCL10, and CXCL11 expression were strongly reduced in IFNAR1$^{-/-}$ mice and almost abrogated in IFN-γR1$^{-/-}$ mice. Both CXCL9 and CXCL10 were shown to be essential for CD8$^+$ T-cell trafficking to the brain and ECM development [39,40]. They are the initial chemokines induced in the brain during ECM onset, 6 days post *Pb*A infection, at a time when IFN-γ, CCL5, CCL3, or CCL2 are still low, thus likely induced by the innate immune response [39]. CXCL9 and CXCL10 induction was reported to be MyD88-dependent [46], attributed to TLR responses to *Pb*A [39]. But IFNs are also strong inducers of CXCL9 and CXCL10. AT-rich *Plasmodium* DNA induced IFN-β via a pathway involving STING, TBK1, and IRF3/IRF7 signaling [42]. Early splenic release of IFN-α was reported 1–2 days post-*Pb*A infection in mice [21]. Microglia respond to IFN-β by increasing chemokines and cytokines, and most prominently CXCR3 ligands CXCL9, CXCL10, and CXCL11 [47]. CXCL9 is further expressed by brain endothelial cells and astrocytes in response to IFN-γ, while CXCL10 is expressed by endothelial cells, neurons, astrocytes, and microglial cells in response to either type I IFNs or IFN-γ [39, 47, 48]. Thus, we propose that type I IFNs might be a missing link between innate and adaptive response to *Pb*A, central for chemokines expression and pathogenic T-cell recruitment to the brain and ECM development.

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Materials and methods

Mice

Mice deficient for IFNAR1-subunit of type I IFN receptor [43] (IFNAR1$^{-/-}$) and for IFN-γR1-subunit of IFN-γ receptor [49] (IFN-γR1$^{-/-}$) were bred in the Transgenose Institute animal facility (UPS44 CNRS, Orleans). Mice were on C57BL/6J genetic background (at least 10 back-crosses) and WT C57BL/6J mice were used as control. For experiments, 7/11-week-old mice were kept in filtered-cages in a P2 animal facility. All animal experimental protocols complied with the French ethical and animal experiments regulations and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans (N° CLE CCO 2011–028 to V.Q., UMR7355).

Experimental malaria infection

Plasmodium berghei ANKA (*PbA*) 15cy1 line constitutively expressing GFP under EF1α-promoter control, was obtained from Dr. A. Waters [23]. Mice were infected intraperitoneally with 10^5 parasitized erythrocytes as described [41]. Alternatively, mice were infected intravenously with 1000 motile sporozoites obtained from salivary gland homogenate of day-21-*Pb*A-infected females *Anopheles stephensi*. Mice were observed daily and scored for ECM neurological signs, namely ataxia, paralysis, and coma.

Parasitemia

Parasitaemia was assessed with EGFP-*Pb*A as described [41] and fluorescent cells analyzed by BD CANTO II flow cytometer. Data were acquired by using DIVA software (BD Bioscience, Rungis, France) and analyzed with FlowJO software (Treestar, Ashland, USA).

Hematology

Blood was drawn under Isofluorane anesthesia (CSP, Fontenay-sous-Bois, France) into tubes containing Ethylenediaminetetraacetic (EDTA), (Vacutainer; Becton, Grenoble, France) and hematological parameters determined using 5-part-differential-hematology analyzer MS9.5 (Melet Schloesing Laboratoires, France).

Histology

Histological analysis was performed as described [41]. Briefly, mice were euthanized and perfused with intracardiac PBS/2 mM-EDTA. Organs were fixed in PBS/3.6%-formaldehyde for 72 h. Brain and lung microvascular obstruction was quantified on H&E stained sections, using a semiquantitative score with increasing severity of changes (0–5) by two independent observers, including a trained pathologist (B.R.).

Brain imaging using MRI and MRA

MRI and MRA measurements of cerebral vascular blood flow were performed using a horizontal 7 T/16 Bruker Biospec MR system (Bruker Biospin, Wissembourg, France), as described [8]. A homogeneous coil with inner diameter of 23 mm and length 55 mm was used to achieve uniform excitation and reception. A custom-built stereotaxic head holder was used to fix the animal into the birdcage coil (see below). The mice were anaesthetized with isoflurane (1.5%) and O_2 (0.5 L/min) applied with a face mask allowing free breathing. Respiration was monitored using a balloon taped to the abdomen and connected to a pressure transducer (SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA). Body temperature was kept at 37 ± 0.5°C throughout the experiment, using warm water circulation. Brain lesions and global changes in tissue structure were accessed by T_2 weighted (T2w) MR images using a MSME sequence, in both axial and sagittal planes, with the following parameters: RARE factor = 8, $TR/TE_{eff.}$ = 5000/46 ms, FOV = 18 × 18 mm^2, matrix = 256 × 192 (zero-filled to 256 × 256), 37 axial slices 0.5 mm thickness, NA = 8, experimental time = 16 min. Three measures were used to estimate the morphological change of the brain, the first one Line 1 going from the Pituitary gland to Sylvius aqueduct, the second one Median line crossing the medial cerebellar nucleus and the third one Medium line stemming from the cerebellar obex. Measurements of vascular cerebral blood flow was performed by MRA using a Fast Low Angle Shot sequence, with the following parameters: FOV = 18 × 18 mm^2, matrix = 256 × 256, TR/TE = 16/5 ms, 55 axial slices 0.2 mm thickness, NA = 4, experimental time = 11 min. Angiograms were produced by generating maximum intensity projections after interpolating raw data to obtain an isotropic resolution (72 μm^3). Image analysis and processing were performed with the public domain software Image J (NIH, http://rsb.info.nih.gov/ij)

mRNA expression

Total RNA was isolated from homogenized mouse brain using TRI-Reagent (Sigma), purified by RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), and quantified by NanoDrop (Nd-1000). Reverse transcription was performed in with SuperScript® III Kit according to manufacturers' instructions (Invitrogen). cDNA was subjected to quantitative real-time PCR using primers for CD3, CD8α, Granzyme B, IFN-γ, IL-12Rβ2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, and CXCR3 (Qiagen) and GoTaq® qPCR-Master Mix (Promega). GAPDH and 18S expression was used for normalization. Raw data were analyzed using the Relative Expression Software Tool (REST, http://www.rest.de.com/).

Immunophenotyping of brain-sequestered leukocytes

Mice were euthanized and perfused with intracardiac PBS/2 mM-EDTA. Brain leukocytes were isolated as described [41]. Briefly, brains were gently homogenized in RPMI 1640 medium

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

containing 2% FCS. The mononuclear cells were then separated over a 35% Percoll gradient (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) and analyzed by flow cytometry with hamster antibodies anti-mouse CD3ε-PerCP (BD Pharmingen, clone 145-2C11), anti-mouse CD69-PE-Cy-7 (BD Pharmingen, clone H1.2F3), anti-mouse CXCR3/CD183-FITC (eBioscience, clone CXCR3-173), and with rat antibodies anti-mouse CD8α-allophycocyanin (BD Pharmingen, clone 53-6.7), and anti-mouse CD4-V450 (BD Pharmingen, clone RM4-5). Data were analyzed using a BD CANTO II flow cytometer and FlowJO software.

Statistical analysis

Statistical significance was determined with GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences were analyzed by mean of nonparametric tests (Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparison) or Logrank test for survival. p-values < 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments: The authors are grateful to Prof. U. Kalinke (Paul-Ehrlich Institut, Langen, Germany) for the kind gift of IFNAR1-deficient mice and to Prof. F. Erard for helpful discussions. The authors acknowledge the support from University of Orleans and CNRS through International Associated Laboratory TB IMMUNITY (LIA N°236) between CNRS INEM and UCT IIDMM.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

1 **Idro, R., Jenkins, N. E. and Newton, C. R.**, Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* 2005. **4**: 827–840.

2 **Hunt, N. H. and Grau, G. E.**, Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 2003. **24**: 491–499.

3 **Craig, A. G., Grau, G. E., Janse, C., Kazura, J. W., Milner, D., Barnwell, J. W., Turner, G. et al.**, The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog.* 2012. **8**: e1002401.

4 **Renia, L., Potter, S. M., Mauduit, M., Rosa, D. S., Kayibanda, M., Deschemin, J. C., Snounou, G. et al.**, Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 2006. **36**: 547–554.

5 **Schofield, L. and Grau, G. E.**, Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5**: 722–735.

6 **Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigario, A. M., Deschemin, J. C., van Rooijen, N., Viguier, M., Snounou, G. et al.**, On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 2002. **169**: 6369–6375.

7 **Nitcheu, J., Bonduelle, O., Combadiere, C., Tefit, M., Seilhean, D., Mazier, D. and Combadiere, B.**, Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J. Immunol.* 2003. **170**: 2221–2228.

8 **Fauconnier, M., Bourigault, M. L., Meme, S., Szeremeta, F., Palomo, J., Danneels, A., Charron, S. et al.**, Protein kinase C-theta is required for development of experimental cerebral malaria. *Am. J. Pathol.* 2011. **178**: 212–221.

9 **Srivastava, K. K., Batra, S., Sassano, A., Li, Y., Majchrzak, B., Kiyokawa, H., Altman, A. et al.**, Engagement of protein kinase C-theta in interferon signaling in T-cells. *J. Biol. Chem.* 2004. **279**: 29911–29920.

10 **Grau, G. E., Heremans, H., Piguet, P. F., Pointaire, P., Lambert, P. H., Billiau, A. and Vassalli, P.**, Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989. **86**: 5572–5574.

11 **Amani, V., Vigario, A. M., Belnoue, E., Marussig, M., Fonseca, L., Mazier, D. and Renia, L.**, Involvement of IFN-gamma receptor-medicated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 1646–1655.

12 **Belnoue, E., Potter, S. M., Rosa, D. S., Mauduit, M., Gruner, A. C., Kayibanda, M., Mitchell, A. J. et al.**, Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 2008. **30**: 544–553.

13 **Amante, F. H., Haque, A., Stanley, A. C., Rivera Fde, L., Randall, L. M., Wilson, Y. A., Yeo, G. et al.**, Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 2010. **185**: 3632–3642.

14 **Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T. N., de Souza, J. B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J. S., Hafalla, J. C. et al.**, IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J. Immunol.* 2012. **189**: 968–979.

15 **Desvignes, L., Wolf, A. J. and Ernst, J. D.**, Dynamic roles of type I and type II IFNs in early infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 2012. **188**: 6205–6215.

16 **Rayamajhi, M., Humann, J., Penheiter, K., Andreasen, K. and Lenz, L. L.**, Induction of IFN-alphabeta enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN-gamma. *J. Exp. Med.* 2010. **207**: 327–337.

17 **Prinz, M. and Knobeloch, K. P.**, Type I interferons as ambiguous modulators of chronic inflammation in the central nervous system. *Front Immunol.* 2012. **3**: 67.

18 **Gonzalez-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. and Raz, E.**, Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* 2012. **12**: 125–135.

19 **Vigario, A. M., Belnoue, E., Gruner, A. C., Mauduit, M., Kayibanda, M., Deschemin, J. C., Marussig, M. et al.**, Recombinant human IFN-alpha inhibits cerebral malaria and reduces parasite burden in mice. *J. Immunol.* 2007. **178**: 6416–6425.

20 **Morrell, C. N., Srivastava, K., Swaim, A., Lee, M. T., Chen, J., Nagineni, C., Hooks, J. J. et al.**, Beta interferon suppresses the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun.* 2011. **79**: 1750–1758.

21 **Haque, A., Best, S. E., Ammerdorffer, A., Desbarrieres, L., de Oca, M. M., Amante, F. H., de Labastida Rivera, F. et al.**, Type I interferons suppress CD4(+) T-cell-dependent parasite control during blood-stage *Plasmodium* infection. *Eur. J. Immunol.* 2011. **41**: 2688–2698.

22 **Bagot, S., Nogueira, F., Collette, A., do Rosario, V., Lemonier, F., Cazenave, P. A. and Pied, S.**, Comparative study of brain CD8+ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage *Plasmodium berghei* ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infect. Immun.* 2004. **72**: 2817–2826.

23 **Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R. E. et al.**, A *Plasmodium berghei* reference

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004. **137**: 23–33.

24 **Grau, G. E., Piguet, P. F., Gretener, D., Vesin, C. and Lambert, P. H.**, Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. *Immunology* 1988. **65**: 501–506.

25 **Cox, D. and McConkey, S.**, The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol. Life Sci.* 2010. **67**: 557–568.

26 **Kampfl, A. W., Birbamer, G. G., Pfausler, B. E., Haring, H. P. and Schmutzhard, E.**, Isolated pontine lesion in algid cerebral malaria: clinical features, management, and magnetic resonance imaging findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993. **48**: 818–822.

27 **Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Krishna, S., Kendall, B., Vannaphan, S., Viravan, C. and White, N. J.**, Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral malaria. *Clin. Infect. Dis.* 1995. **21**: 300–309.

28 **Cordoliani, Y. S., Sarrazin, J. L., Felten, D., Caumes, E., Leveque, C. and Fisch, A.**, MR of cerebral malaria. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1998. **19**: 871–874.

29 **Patankar, T. F., Karnad, D. R., Shetty, P. G., Desai, A. P. and Prasad, S. R.**, Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology* 2002. **224**: 811–816.

30 **Penet, M. F., Viola, A., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Duhamel, G., Kober, F., Ibarrola, D. et al.**, Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J. Neurosci.* 2005. **25**: 7352–7358.

31 **Stoelcker, B., Hehlgans, T., Weigl, K., Bluethmann, H., Grau, G. E. and Mannel, D. N.**, Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* 2002. **70**: 5857–5859.

32 **Engwerda, C. R., Mynott, T. L., Sawhney, S., De Souza, J. B., Bickle, Q. D. and Kaye, P. M.**, Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 1371–1377.

33 **Togbe, D., de Sousa, P. L., Fauconnier, M., Boissay, V., Fick, L., Scheu, S., Pfeffer, K. et al.**, Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One* 2008. **3**: e2608.

34 **Mohan, A., Sharma, S. K. and Bollineni, S.**, Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J. Vector Borne Dis.* 2008. **45**: 179–193.

35 **Taylor, W. R., Hanson, J., Turner, G. D., White, N. J. and Dondorp, A. M.**, Respiratory manifestations of malaria. *Chest* 2012. **142**: 492–505.

36 **Chang, W. L., Jones, S. P., Lefer, D. J., Welbourne, T., Sun, G., Yin, L., Suzuki, H. et al.**, CD8(+)-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Infect. Immun.* 2001. **69**: 7341–7348.

37 **Epiphanio, S., Campos, M. G., Pamplona, A., Carapau, D., Pena, A. C., Ataide, R., Monteiro, C. A. et al.**, VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog.* 2010. **6**: e1000916.

38 **Haque, A., Best, S. E., Unosson, K., Amante, F. H., de Labastida, F., Anstey, N. M., Karupiah, G. et al.**, Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 2011. **186**: 6148–6156.

39 **Campanella, G. S., Tager, A. M., El Khoury, J. K., Thomas, S. Y., Abrazinski, T. A., Manice, L. A., Colvin, R. A. et al.**, Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. **105**: 4814–4819.

40 **Nie, C. Q., Bernard, N. J., Norman, M. U., Amante, F. H., Lundie, R. J., Crabb, B. S., Heath, W. R. et al.**, IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog.* 2009. **5**: e1000369.

41 **Fauconnier, M., Palomo, J., Bourigault, M. L., Meme, S., Szeremeta, F., Beloeil, J. C., Danneels, A. et al.**, IL-12Rbeta2 is essential for the development of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* 2012. **188**: 1905–1914.

42 **Sharma, S., DeOliveira, R. B., Kalantari, P., Parroche, P., Goutagny, N., Jiang, Z., Chan, J. et al.**, Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* 2011. **35**: 194–207.

43 **Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. and Aguet, M.**, Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994. **264**: 1918–1921.

44 **Hwang, S. Y., Hertzog, P. J., Holland, K. A., Sumarsono, S. H., Tymms, M. J., Hamilton, J. A., Whitty, G. et al.**, A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. **92**: 11284–11288.

45 **Van den Steen, P. E., Deroost, K., Van Aelst, I., Geurts, N., Martens, E., Struyf, S., Nie, C. Q. et al.**, CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur. J. Immunol.* 2008. **38**: 1082–1095.

46 **Griffith, J. W., O'Connor, C., Bernard, K., Town, T., Goldstein, D. R. and Bucala, R.**, Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. *J. Infect. Dis.* 2007. **196**: 1553–1564.

47 **Prinz, M., Schmidt, H., Mildner, A., Knobeloch, K. P., Hanisch, U. K., Raasch, J., Merkler, D. et al.**, Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008. **28**: 675–686.

48 **Hamby, M. E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D. H., Khakh, B. S. and Sofroniew, M. V.**, Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple g-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 2012. **32**: 14489–14510.

49 **Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J. et al.**, Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993. **259**: 1742–1745.

50 **Schofield, L. and Hackett, F.**, Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* 1993. **177**: 145–153.

51 **Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K. et al.**, Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 2010. **7**: 50–61.

Abbreviations: **ECM**: experimental cerebral malaria · **MRI**: magnetic resonance imaging · **MRA**: magnetic resonance angiography · **PbA**: *Plasmodium berghei* ANKA

Full correspondence: Dr. Valerie F. J. Quesniaux, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, CNRS Campus, UMR7355, 3B rue de la Ferollerie, F-45071 Orleans, France
Fax: +33-238-25-79-79
e-mail: quesniaux@cnrs-orleans.fr

Received: 11/1/2013
Revised: 1/3/2013
Accepted: 25/4/2013
Accepted article online: 18/6/2013

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

– Discussion –

Les travaux présentés dans cette partie ont tenté de préciser les mécanismes impliqués dans la réaction excessive du système immunitaire, responsable du développement de la malaria cérébrale et pulmonaire murine. En effet, tandis que la réponse immunitaire est importante dans le contrôle du parasite, la réponse cellulaire après infection par *Pb*A est exacerbée, pathologique et à l'origine de complications sévères. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à plusieurs éléments impliqués dans l'initiation, l'activation et le maintien de la réponse T_H1 des lymphocytes T cytotoxiques. Nous avons d'abord porté notre attention sur la protéine PKC-θ, importante pour la signalisation intracellulaire des lymphocytes T. Puis, nous avons étudié le rôle de la voie de l'IL-12, et plus spécifiquement le rôle de l'IL-12Rβ2. Enfin, nous avons cherché à définir le rôle des IFN de type I dans le développement de l'ECM.

℘ La protéine PKC-ϑ est nécessaire au développement de la malaria cérébrale expérimentale.

La protéine kinase C – θ est une enzyme sérine/thréonine kinase qui est fortement exprimée par les cellules T. PKC-θ étant la seule isoforme transloquée au niveau de la synapse immunologique lors de l'activation du TCR [211:Isakov 2012], son rôle dans l'activation des cellules T a beaucoup été étudié. L'importance de PKC-θ dans la réponse de type T_H2, aux allergènes ou aux helminthes, est bien établie [216:Marsland 2004 - 217:Salek-Ardakani 2005], mais l'implication de la kinase dans la réponse immune de type T_H1 est plus variable. En effet, alors que la protéine PKC-θ n'est pas requise après infection par *L. major* [218:Ohayon 2007] ou par le virus murin γ de l'herpès 68 (MHV-68) [283:Giannoni 2005], elle est nécessaire pour la réponse T mise en jeu dans l'EAE [219:Anderson 2006]. Nous avons cherché à définir le rôle de PKC-θ dans la neuropathologie induite par *Pb*A.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une résistance au développement de l'ECM, chez les souris déficientes en PKC-θ après infection par le stade sanguin de *Pb*A. En effet, à l'inverse des souris de type sauvage sensibles à l'ECM, les souris déficientes en PKC-θ ne développent pas de symptôme caractéristique d'une atteinte neurologique. Néanmoins, comme elles ne contrôlent pas le parasite, elles décèdent tardivement d'hyper-parasitémie et d'anémie. En absence de la voie PKC-θ, l'intégrité de la BHE est protégée, et les souris ne montrent pas de signe d'œdème ou d'ischémie (documentés par IRM et ARM) dans le cerveau. De plus, la présence de la kinase est requise pour la séquestration des hématies et le recrutement de lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ activés dans les vaisseaux cérébraux. Nos résultats sont en accord avec les travaux d'Ohayon *et al.* réalisés en parallèle [277:Ohayon 2010]. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence chez des souris déficientes pour PKC-θ une résistance à l'ECM induite par *Pb*A, sans effet sur la parasitémie. Leurs analyses, centrées sur la caractérisation de la réponse splénique, indiquent une réduction de la prolifération et de l'activation des cellules T $CD8^+$ dans la rate après infection, en l'absence de la signalisation PKC-θ. En revanche, nous avons aussi montré que les souris déficientes en PKC-θ n'étaient pas protégées contre la pathologie pulmonaire. A l'instar des souris de type sauvage, elles présentaient une séquestration d'hématies, une congestion des capillaires et des septa alvéolaires, ainsi qu'une augmentation du nombre de macrophages dans les

poumons après infection par *Pb*A. Au jour 7, il semble que le développement de la pathologie pulmonaire soit indépendant de la présence de PKC-θ.

La déficience en PKC-θ est associée à un défaut dans le recrutement des cellules T dans les micro-vaisseaux du cerveau. D'une part, il a été vu que la signalisation PKC-θ était nécessaire pour induire l'expression de l'intégrine LFA-1 par les cellules T [220:Baier 2009]. Ainsi, après infection par *Pb*A, la déficience en PKC-θ inhibe la surexpression de LFA-1 par les lymphocytes T spléniques [277:Ohayon 2010]. D'autre part, nous avons mis en évidence qu'en l'absence de PKC-θ, l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral était réduite. Le TNF-α induit l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales [263:Wassmer 2011]. Or, il a aussi été montré que chez des souris déficientes en PKC-θ, après stimulation du TCR, la quantité de TNF-α circulant, ou exprimé dans la rate, était diminuée par rapport aux souris de type sauvage [219:Anderson 2006]. La réduction de l'expression d'ICAM-1 que nous avons observée pourrait donc en partie être due à une production de TNF-α plus faible chez les souris déficientes en PKC-θ.

Par ailleurs, le phénotype de résistance à l'ECM que nous avons mis en évidence peut également être relié à une altération de la prolifération et de l'activation des cellules T. A l'état basal, les souris déficientes en PKC-θ ne présentent pas de modification de production des cellules T naïves dans le thymus, la rate ou les ganglions lymphatiques [215:Pfeifhofer 2003]. Mais après stimulation du TCR *in vitro*, un défaut d'activation de NF-κB et AP-1 a été mis en évidence dans les cellules T déficientes en PKC-θ [284:Sun 2000]. De plus, il a été montré *ex vivo* qu'en absence de la signalisation PKC-θ, tandis que la prolifération induite par un antigène était intacte, la survie des cellules T $CD8^+$ activées et leur différenciation en cellules effectrices cytotoxiques étaient nettement diminuées [285:Barouch-Bentov 2005]. Ainsi, la résistance à l'ECM induite par *Pb*A observée dans notre étude chez les souris déficientes en PKC-θ peut aussi s'expliquer par un défaut de survie et de différenciation des cellules T $CD8^+$ cytotoxiques, spécifiques de *Plasmodium*, et nécessaires au développement de la neuropathologie.

Cependant, la protéine PKC-θ est présente dans d'autres types cellulaires qui peuvent intervenir dans le développement de l'ECM. En effet, alors que des taux très faibles de la protéine sont mesurés dans les neutrophiles et les monocytes/macrophages, les plaquettes

expriment fortement la kinase [197:Meller 1999]. La protéine PKC-θ est impliquée dans la modulation de l'homéostasie, de l'agrégation plaquettaires, et de la formation de thrombus. Néanmoins, les autres isoformes de PKC participent également à la régulation de ces voies [213:Cohen 2011]. Dans notre cas, la thrombopénie induite par l'infection est observée chez toutes les souris indépendamment de la présence de PKC-θ. Cela semble indiquer que l'activation et la séquestration des plaquettes dans les organes profonds ne requiert pas la présence de PKC-θ.

De plus, PKC-θ est exprimée par les cellules NK et est recrutée au niveau de la synapse immunologique lors de l'activation de ces cellules [286:Krzewski 2006]. La participation de PKC-θ à l'activation et au recrutement des cellules NK, a été mise en évidence dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée [287:Aguilo 2009]. Dans cette étude, les auteurs montrent que des souris déficientes en PKC-θ ne contrôlent pas la progression de tumeur RMA-S (un variant déficient en CMH_I du lymphome induit par le virus de Rauscher). Le développement tumoral observé en l'absence de la signalisation PKC-θ est corrélé avec un défaut de recrutement, d'activation et de cytotoxicité des cellules NK. Aussi, lors de l'infection par *Pb*A, les cellules NK sont une source importante d'IFN-γ et favorisent le recrutement dépendant de CXCR3 des lymphocytes T $CD8^+$ dans le cerveau [178:Hansen 2007]. Ainsi, la résistance à l'ECM induite par *Pb*A que nous avons observée en l'absence de PKC-θ peut aussi être liée à un défaut d'activation des cellules NK.

Enfin, il a récemment été montré que PKC-θ était exprimée par les cellules endothéliales. En effet, des cellules humaines de l'endothélium vasculaire cérébral, après stimulation *in vitro* par l'IL-1β, présentent une augmentation de la phosphorylation de PKC-θ. L'activation de la kinase entraîne, entre autres, la phosphorylation de la protéine Zona-Occludens 1 (ZO-1) des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité endothéliale [288:Rigor 2012]. Ainsi, bien que la voie de l'IL-1β ne soit pas essentielle dans le développement de l'ECM [289:Kordes 2011], il n'est pas exclu que la signalisation PKC-θ soit impliquée dans la perméabilisation de la BHE associée à la neuropathologie. Il a par exemple été mis en évidence qu'au niveau des cellules endothéliales cérébrales, l'engagement d'ICAM-1 peut conduire à l'activation de protéines kinases C [143:Razakandrainibe 2012 - 290:Turowski 2005].

Notre étude met en évidence la résistance à l'ECM induit par *Pb*A des souris déficientes en PKC-θ. Ce phénotype est clairement lié à un défaut de recrutement et d'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques. Mais il est également probable que la résistance à l'ECM implique une altération de l'activation des cellules NK, et éventuellement une susceptibilité à la perméabilisation des cellules endothéliales réduite.

℘ Le récepteur IL-12Rβ2 participe au développement de la malaria cérébrale expérimentale.

L'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les neutrophiles après infection. Elle est constituée de deux sous-unités : l'IL-12p40 et l'IL-12p35, et signale par son récepteur formé de l'IL-12Rβ1 et de l'IL-12Rβ2 (**Figure 25**) [221:Vignali 2012]. L'IL-12 est essentielle pour la différenciation de cellules T_H1, par l'induction de la production d'IFN-γ. De plus, l'IL-12 et les interférons peuvent agir en synergie pour favoriser l'activation de la réponse T_H1 (**Figure 29**).

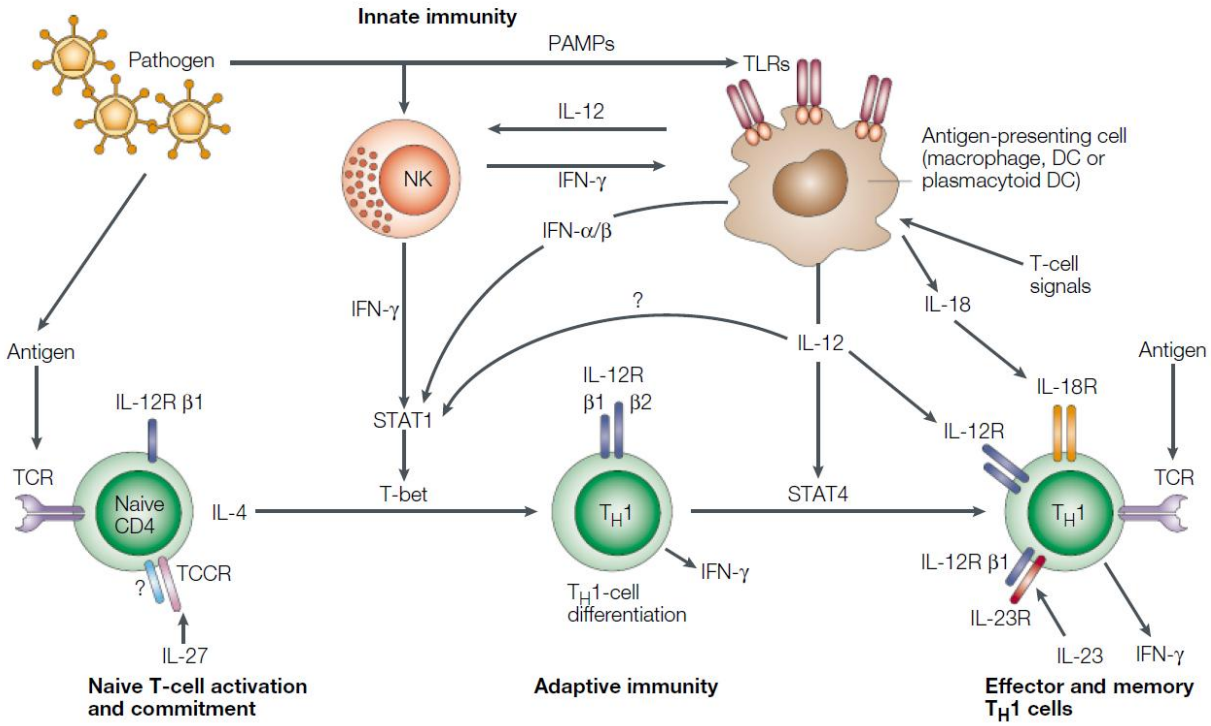


Figure 29 : Modèle de la différenciation TH1 en réponse à l'infection par un pathogène [222:Trinchieri 2003].

C'est sa position en amont de la réponse T_H1, connue pour être nécessaire au développement de l'ECM, qui nous a conduits à nous intéresser au rôle de la voie de l'IL-12. Tandis que les études chez l'homme étaient contradictoires et associaient l'IL-12 à la fois à une susceptibilité ainsi qu'à une résistance à la malaria cérébrale [279:Marquet 2008 - 291:Zhang 2010], la participation de l'IL-12 au développement de l'ECM était peu définie. Dans un modèle d'infection par *Pb*A de souris BALB/c, l'induction de la production d'IL-12, par administration de CpG, entraîne le développement d'ECM [230:Schmidt 2011]. Ainsi, afin de préciser le rôle de l'IL-12 dans la neuropathologie induite par *Pb*A, nous avons étudié la réponse immune après infection, chez des souris déficientes en IL-12Rβ2, le récepteur spécifique de l'IL-12 au moment de l'étude.

Après infection par le stade sanguin de *Pb*A, à l'inverse des souris de type sauvage, les souris déficientes en IL-12Rβ2 n'ont pas développé de symptôme neurologique caractéristique de l'ECM, malgré une parasitémie qui était proche de celle des souris contrôles. En l'absence de l'IL-12Rβ2, les souris ne montraient aucun signe d'œdème ou d'ischémie cérébrale, ou encore de séquestration d'hématie dans les micro-vaisseaux du cerveau. Et la perméabilité de la BHE des souris déficientes restait intacte. A l'inverse, la pathologie pulmonaire était observée après infection par *Pb*A indépendamment de la présence de l'IL-12Rβ2. Ici aussi, nous avons mis en évidence la dissociation entre le développement de l'ECM dépendant de l'activation de cellules T $CD8^+$ et de la présence de l'IL-12Rβ2, et l'apparition de la pathologie pulmonaire qui implique plutôt le recrutement de cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages et les neutrophiles [125:Souza 2013].

Afin d'expliquer le phénotype de résistance à la neuropathologie, nous avons d'abord réalisé une analyse de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires associés au développement de l'ECM. Après infection par *Pb*A la quantité des ARNm *Tnfa*, *Lta* et *Ifng* dans le cerveau était nettement diminuée chez les souris déficientes en IL-12Rβ2. En effet, lors d'une infection, une boucle de régulation positive est mise en route, par laquelle l'IL-12 active la production d'IFN-γ par les cellules T et NK. Et l'IFN-γ induit à son tour la libération d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène (**Figure 29**). Ainsi, un défaut de signalisation de la voie de l'IL-12 est naturellement associé à une réduction de la production d'IFN-γ. L'IL-12 est par exemple nécessaire pour maintenir la production d'IFN-γ par les cellules T

impliquées dans la résistance à l'infection chronique par l'apicomplexe *T. gondii* [224:Yap 2000]. Et similairement, après infection par *Franciscella tularensis* LVS, les souris déficientes en IL-12Rβ2 présentent un défaut de production d'IFN-γ dans la rate, associé dans ce modèle à une charge bactérienne accrue et une plus forte susceptibilité à l'infection [292:Melillo 2013]. De plus, l'absence de la signalisation de l'IL-12 et la réduction de la production d'IFN-γ étaient associées à une diminution des transcrits *Tnfa* et *Lta.* Or, il a été montré que la LT-α, plutôt que le TNF-α, était requise pour le développement de l'ECM [266:Engwerda 2002]. Le lien entre l'IL-12 et la LT-α a également été mis en évidence dans un modèle murin d'infection neuro-méningée à l'*Herpes simplex virus* de type 1 Kos (HSV-1 Kos). Dans cette étude, les cellules T des souris déficientes en LT-α présentent un défaut de cytotoxicité, ainsi qu'une expression en IL-12Rβ2 réduite [293:Kumaraguru 2001].

L'ensemble de ces données nous a conduits à nous intéresser à la réponse cellulaire cytotoxique induite après infection par *Pb*A. Nous avons mis en évidence que la déficience en IL-12Rβ2 était associée à un défaut de recrutement des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$, activées ($CD69^+$) et produisant de la Perforine. En effet, l'IL-12 a un rôle essentiel dans la différenciation T_H1 et plus particulièrement dans l'activation de la réponse cytotoxique. Dans un modèle murin de mélanome B16 sous-cutané, après induction de l'expression d'IL-12 (par électroporation d'ADNc *Il12*), la croissance tumorale était réduite grâce à une augmentation de la réponse cytotoxique spécifique d'antigènes du mélanome. Le recrutement de cellules T $CD8^+$ produisant de l'IFN-γ était accentué [294:Sin 2012]. Aussi, la stimulation *ex vivo* de cellules T humaines en présence d'IL-12 recombinante permet, en plus d'augmenter la production d'IFN-γ, d'accroître l'expression de l'IL-12Rβ2, du marqueur d'activation CD25 (récepteur α de l'IL-2), et du récepteur de chimiokines CXCR3 [295:Reddy 2005]. Ainsi, il semble vraisemblable que la résistance à l'ECM induite par *Pb*A, observée chez les souris déficientes en IL-12Rβ2, soit associée à une réduction de la production d'IFN-γ et de réponse T_H1, ainsi qu'à un défaut de l'activité cytotoxique.

Nous avons également étudié le rôle des ligands du récepteur à l'IL-12, IL-12p40 et IL-12p35, ainsi que de la seconde sous-unité l'IL-12Rβ1 (données non montrées), ou encore de l'IL-23p19. A l'inverse du phénotype observé en l'absence de l'IL-12Rβ2, les souris déficientes en IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19 ou IL-12Rβ1 présentaient une sensibilité à l'ECM comparable à celle des souris de type sauvage, caractérisée par une séquestration

d'hématies et de leucocytes dans les micro-vaisseaux, ainsi que par des lésions de l'endothélium associées à de l'œdème et de l'ischémie dans le cerveau. Ces résultats qui peuvent sembler contradictoires révèlent la complexité des cytokines de la famille de l'IL-12 et de leur récepteur, ainsi que la diversité des associations possibles entre les différentes sous-unités. En effet, il a récemment été mis en évidence que la sous-unité IL-12Rβ2 pouvait aussi s'associer avec la sous-unité gp130 (qui participe au récepteur de l'IL-6) pour former le récepteur de l'IL-35 [296:Collison 2012]. Cette cytokine anti-inflammatoire est formée par l'IL-12p35 et Ebi3 [221:Vignali 2012]. Il a été montré dans un modèle murin de mélanome B16, que l'IL-35 produite par des cellules T_{reg} est susceptible d'inhiber la réponse des cellules T cytotoxiques et ainsi favoriser la croissance tumorale [297:Wang 2013]. Cependant, si le phénotype de résistance à l'ECM observé chez les souris déficientes en IL-12Rβ2 était lié à l'IL-35, alors la déficience en p35 devrait reproduire ce phénotype. Or nous avons vu que les souris déficientes en p35 étaient sensibles à l'ECM, ce qui semble écarter l'hypothèse que l'IL-35 participerait au développement de l'ECM.

De plus, au vu de la diversité des associations possibles, il est parfois difficile de détailler le rôle des différentes cytokines à partir d'une déficience génétique pour une seule sous-unité. Ainsi, dans un modèle murin d'EAE, tandis que les souris déficientes en IL-12p40 sont protégées contre l'encéphalite, les souris déficientes en IL-12p35 développent une pathologie exacerbée en comparaison des contrôles [298:Becher 2002]. D'autre part, alors que les souris déficientes en IL-12p40 sont capables de contrôler l'infection aigüe à *F. tularensis* mais développent une infection chronique tardive, les souris déficientes en IL-12Rβ2 présentent une sensibilité plus sévère, ne contrôlent pas la phase aigüe et décèdent rapidement après infection [292:Melillo 2013 - 299:Elkins 2002]. Enfin, certains membres de la famille de l'IL-12 sont susceptibles d'agir en tant que monomère, ou encore de former des homodimères. Par exemple, la chaîne IL-27p28 (IL-30) seule est capable de se fixer, sans induire de signal, sur la sous-unité gp130. Elle peut ainsi inhiber la signalisation des récepteurs de l'IL-6 et de l'IL-27 [221:Vignali 2012]. Par ailleurs, l'homodimère $(IL\text{-}12p40)_2$, et non l'hétérodimère IL-12p70, induit la production de LT-α par les cellules microgliales primaires humaines, de façon dépendante de l'IL-12Rβ1, mais indépendamment de l'IL-12Rβ2 [300:Jana 2009]. Aussi, l'IL-35 peut signaler par l'intermédiaire de l'association IL-12Rβ2/gp130, mais également par les homodimères IL-12Rβ2/IL-12Rβ2 ou gp130/gp130 [296:Collison 2012]. Par conséquent, au vu de la complexité des associations

homo/hétérodimériques et des monomères possibles, des ligands comme des récepteurs de la famille de l'IL-12, il est encore difficile de préciser avec exactitude les différents éléments de signalisation et de régulation impliqués dans cette voie. Il a par exemple été montré que la signalisation par l'IL-27R (ou WSX-1), qui s'associe à la gp130 pour former le récepteur de la cytokine IL-27, peut inhiber la production d'IFN-γ après infection par *Leishmania donovani*, indiquant que l'IL-27, plutôt connue comme étant pro-inflammatoire, puisse avoir des propriétés anti-inflammatoires [301:Rosas 2006]. Et dans un modèle d'anémie sévère induite par l'infection par *P. berghei* NK65, la déficience en IL-27R favorise la production de cellules $CD4^+$ T_H1 totalement différenciées. Cette étude met en évidence une inhibition par l'IL-27 de l'induction dépendante de l'IL-12 de cellules T_H1 matures [302:Villegas-Mendez 2013].

Les souris déficientes en IL-12p40 ou en IL-12p35 ne reproduisant pas le phénotype de résistance à l'ECM observé en l'absence de l'IL-12Rβ2, il est possible d'envisager une redondance parmi les différents ligands connus de la famille de l'IL-12 : p40, p35, p19, p28 ou Ebi3. Mais il n'est pas non plus exclu que la sous-unité IL-12Rβ2 puisse signaler sous forme monomérique, homodimérique ou en association avec une autre sous-unité, après activation par un ligand qui n'aurait pas encore été décrit.

℘ Les interférons de type 1 sont impliqués dans le développement de la malaria cérébrale expérimentale.

La troisième étude de cette partie a porté sur le rôle des interférons de type I dans le développement de l'ECM. Le rôle essentiel de l'IFN-γ était connu depuis longtemps, et plus particulièrement dans le recrutement des cellules T $CD8^+$ effectrices et pathogéniques, dans les micro-vaisseaux du cerveau [197:Belnoue 2008]. L'existence de nombreuses voies de régulation croisées entre les interférons de type I et de type II nous a conduits à nous interroger sur le rôle des IFN-I dans la neuropathologie induite par *Pb*A [239:Trinchieri 2010 - 243:Desvignes 2012]. Les études chez la souris étaient peu nombreuses et controversées. D'une part, il a été montré que l'administration d'IFN-α humain recombinant permettait de prévenir le développement de l'ECM, par la réduction de la charge parasitaire, et le recrutement de leucocytes dans le cerveau [247:Vigario 2007]. A l'inverse, l'administration d'IFN-β permettrait de protéger contre l'ECM de façon indépendante d'un effet sur la

parasitémie [248:Morrell 2011]. D'autre part, la déficience pour le récepteur des IFN de type I, IFNAR, a été associée à la protection contre l'atteinte cérébrale induite par *Pb*A. Une étude a rapporté qu'en l'absence d'IFNAR, les souris étaient protégées contre la neuropathologie, phénotype qui a été attribué à une réduction drastique de la parasitémie. Les auteurs suggèrent que les IFN-I induiraient une réponse des DC qui inhiberait la production d'IFN-γ par les cellules T $CD4^+$, et bloquerait alors le contrôle du parasite [249:Haque 2011]. La même année, Sharma *et al.* ont remarquablement mis en évidence que les régions riches en AT de l'ADN de *Plasmodium* étaient capables d'induire la production des IFN-I, par l'intermédiaire du senseur cytosolique STING. Dans cette étude, les souris déficientes en IFNAR étaient résistantes à l'ECM, avec une parasitémie identique à celle des souris contrôles, mais aucun mécanisme n'a été détaillé [170:Sharma 2011]. Par ailleurs, en plus de l'activation du senseur STING par les séquences riches en AT de l'ADN, l'hémozoïne et/ou l'ADN, ainsi que les ancres GPI de *Plasmodium* peuvent être détectés par les cellules présentatrices d'antigène, par l'intermédiaire de TLR9 et TLR2 respectivement, et activer la libération des IFN-I [160:Schofield 1993 - 164:Parroche 2007 - 170:Sharma 2011 - 303:Coban 2010]. Dans le but de préciser la participation des IFN-I dans le développement de l'ECM, nous avons utilisé des souris déficientes pour le récepteur des IFN-I (IFNAR), ainsi que des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN-γ (IFN-γR).

L'étude en parallèle des infections par *Pb*A au stade pré-érythrocytique (sporozoïtes) et au stade sanguin (hématies infectées) nous a permis de montrer que le passage par la phase hépatique retarde le pic de l'atteinte neurologique de 24 à 48H, et que la sensibilité à l'ECM est plus prononcée lors de l'infection par le stade sanguin, chez les souris de type sauvage ou déficientes. Nos résultats confirment les travaux de Kordes *et al.* rapportant que la proportion de souris qui développent l'ECM est supérieure lors de l'infection par le stade sanguin en comparaison de l'infection avec des sporozoïtes [289:Kordes 2011]. Il est possible que la croissance plus rapide de la parasitémie soit à l'origine d'une réponse immune plus forte et donc d'une pathologie inflammatoire plus drastique lors d'une infection par le stade sanguin. Il a par exemple été mis en évidence que l'administration d'une faible dose de quinine permettrait de ralentir la croissance de *Pb*A et protégerait ainsi les souris contre le développement de l'ECM. L'inhibition de la multiplication du protozoaire était associée à une réduction dans le cerveau de la production d'IFN-γ, des chimiokines CXCL9 et CXCL10, ainsi qu'à une diminution du recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs [304:McQuillan

2011]. Néanmoins, nous avons observé dans les deux cas d'infection que les souris déficientes en IFNAR présentaient un phénotype intermédiaire, entre la forte susceptibilité à l'ECM des souris de type sauvage et la résistance des souris déficientes en IFN-γR, avec un retard ou une absence de complication neurologique. De façon similaire aux travaux de Sharma *et al*., la protection contre l'ECM des souris déficientes en IFNAR (tout comme celle des souris déficientes en IFN-γR) n'était pas associée à une diminution de la parasitémie [170:Sharma 2011].

Nous avons montré, pour la première fois, que les souris déficientes en IFN-γR étaient également résistantes à l'infection par le stade pré-érythrocytique de *Pb*A. Et la protection contre la neuropathologie était associée avec une absence de signe caractéristique de l'ECM documentée par IRM et ARM, notamment œdème et ischémie cérébrale. De la même façon, les souris déficientes en IFNAR présentaient une réduction des signes IRM/ARM caractéristiques de la pathologie cérébrale après infection par le stade sanguin de *Pb*A. De plus, en l'absence d'IFNAR, la séquestration d'hématies infectées et de leucocytes dans le cerveau était réduite, et l'analyse histologique n'a révélé aucune hémorragie chez ces souris. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée parallèlement par Ball *et al*. qui ont aussi mis en évidence la résistance à l'ECM de souris déficientes en IFNAR, sans diminution de la parasitémie. Dans cette étude, en l'absence d'IFNAR, les souris ne présentaient pas de perméabilisation de la BHE, et un score histo-pathologique réduit [305:Ball 2013]. En revanche, en l'absence d'IFNAR ou d'IFN-γR, les souris ont développé une pathologie pulmonaire similaire aux souris de type sauvage, indiquant que les interférons ne joueraient pas de rôle majeur dans la complication pulmonaire. Ces observations sont en accord avec l'étude de Brugat *et al.* qui a mis en évidence que, bien que l'infection par *P. chabaudi* induit un recrutement de cellules T productrices d'IFN-γ dans les poumons, des souris déficientes en IFN-γR présentent une pathologie respiratoire identique {Brugat, 2013 #1537}.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance des souris à l'ECM, nous avons par la suite mesuré l'expression de marqueurs de l'inflammation dans le cerveau. Les niveaux des transcrits de *Cd3*, *Cd8*, *GzmB* et *Ifng* étaient significativement plus faibles chez les souris déficientes en IFNAR en comparaison des souris de type sauvage. La production de ces ARNm était encore plus faible chez les souris déficientes en IFN-γR. En effet, différentes études ont déjà montré le rôle de l'IFN-γ dans le recrutement des

lymphocytes $CD8^+$ dans le cerveau [195:Villegas-Mendez 2012 - 197:Belnoue 2008 - 238:Villegas-Mendez 2011]. Par la suite, nous avons confirmé l'analyse des transcrits par cytométrie. La caractérisation des cellules T séquestrées dans le cerveau a mis en évidence qu'en l'absence d'IFNAR, le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ activés et séquestrés était nettement diminué. En effet, il a été montré *in vitro* que les IFN-α/β étaient capables d'agir directement sur les cellules T activées et de favoriser leur survie [306:Marrack 1999]. Par ailleurs, Ball *et al*. ont indiqué que l'expression d'IFNAR sur les cellules T $CD8^+$ serait cruciale pour activer la cytotoxicité de ces cellules et donc pour induire la neuropathologie [305:Ball 2013]. La voie du récepteur IFNAR pourrait donc être directement impliquée dans l'activation et la survie des cellules T effectrices lors de l'ECM.

Cependant, notre analyse des transcrits dans le cerveau a aussi révélé une diminution de la production de chimiokines CXCL9 et CXCL10, attractants les lymphocytes T, ainsi que du récepteur de ces chimiokines CXCR3, en l'absence d'IFNAR après infection par *Pb*A. Nous avons donc également étudié l'expression de CXCR3 sur les lymphocytes séquestrés dans le cerveau. Il s'est avéré que les souris déficientes en IFNAR montraient une diminution du nombre, comme du niveau d'expression, de cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$ exprimant le récepteur CXCR3. Les chimiokines CXCL9 et CXCL10 sont produites rapidement après infection par *Pb*A et sont essentielles pour le recrutement dans le cerveau des lymphocytes T effecteurs et pathogéniques [256:Campanella 2008 - 307:Nie 2009]. Les IFN-I, comme l'IFN-γ, sont susceptibles d'induire l'expression de ces chimiokines. La stimulation *in vitro* de cellules microgliales par de l'IFN-β induit la production par ces cellules de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, et notamment des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [244:Prinz 2008]. Similairement, la stimulation *in vitro* d'astrocytes avec l'association TGF-β, LPS et IFN-γ entraîne une forte augmentation de l'expression de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [258:Hamby 2012]. Il est donc envisageable que les IFN-I soient produits rapidement après infection par *Pb*A et induisent la production des chimiokines attractants les lymphocytes par les éléments de l'unité neurovasculaire (cellules endothéliales, astrocytes, microgliocytes et neurones). En effet, de façon semblable aux IFN-I et aux chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui sont produits précocement après infection par *Pb*A [176:Guermonprez 2013 - 249:Haque 2011], les cellules microgliales sont activées avant le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ dans les vaisseaux cérébraux [171:Pais 2005].

Récemment, Guermonprez *et al*. ont mis en évidence une autre voie dans laquelle sont impliqués les IFN-I. Les auteurs ont montré que l'infection non létale par *P. chabaudi*, comme l'infection par *Pb*A, induisait la production rapide d'IFN-α/β (avec un pic sérique à 24H) par l'intermédiaire de la voie TLR9/MyD88. L'IFN-α/β activerait alors l'expression de l'enzyme Xanthine déshydrogénase (Xdh), qui est capable de convertir la xanthine et l'hypoxanthine libérées par le parasite en acide urique. Puis l'acide urique entrainerait la libération par les mastocytes du facteur de prolifération Flt3L (*Fms-Related Tyrosine Kinase 3 Ligand*) qui serait responsable de l'activation et l'expansion des DC $CD8\alpha^+$. Ces DC pourraient ensuite activer les cellules T $CD8^+$ effectrices, permettant le contrôle du parasite (après infection par *P. chabaudi*) ou bien le développement de la neuropathologie (après infection par *Pb*A) [176:Guermonprez 2013].

Il semble donc que la voie des IFN-I ait un rôle majeur dans le développement de l'ECM, par l'activation directe ou indirecte des lymphocytes effecteurs T $CD8^+$, ainsi que dans le recrutement de ces cellules pathogéniques. Par ailleurs, une étude récente réalisée chez des patients a mis en évidence une association entre un SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide) du gène *IFNB* et le risque de développer la malaria cérébrale après infection par *P. falciparum* [308:Jha 2013]. De la même façon, Ball *et al*. ont montré chez l'homme une association entre un variant du gène *IFNAR1* et la susceptibilité à la malaria cérébrale induite par *P. falciparum* [305:Ball 2013].

℘ Précision du modèle du paludisme murin.

Dans ces trois études, nous avons mis en évidence une dissociation entre l'atteinte cérébrale et la complication pulmonaire après infection par *Pb*A. En effet, l'apparition de pathologie dans les poumons est indépendante de la présence de PKC-θ, IL-12Rβ2, IFN-γR ou IFNAR, ce qui suggère que la réponse lymphocytaire T_H1 n'est pas essentielle à la malaria pulmonaire chez les souris. En effet, Souza *et al.* ont montré que la pathologie respiratoire induite par *Pb*A est caractérisée par de l'œdème, des alvéoles collabées, l'infiltration de neutrophiles et l'augmentation de la production de TNF-α et de la chimiokine KC (CXCL1) attractant les neutrophiles [125:Souza 2013]. Les résultats chez la souris semblent reproduire les caractéristiques de la complication pulmonaire observées chez l'homme. En effet, dans une étude récente, l'autopsie d'enfants atteints de malaria sévère induite par

P. falciparum a mis en évidence l'accumulation de macrophages activés et d'hématies parasitées dans les capillaires ainsi que la présence de micro-thrombi et d'œdème dans les poumons [309:Milner 2013].

Ces trois études nous ont permis de préciser le rôle de plusieurs voies de l'immunité nécessaires au développement de la malaria cérébrale expérimentale. Ces voies sont connectées et interagissent au cours de la pathogenèse. Nous proposons un schéma présentant ces différentes interactions et leur participation au développement de l'ECM dans la **Figure 30**. Les IFN-I sont parmi les premières cytokines produites après infection par *Plasmodium*. Les hématies infectées relarguent en effet différents DAMP susceptibles d'être reconnus par les cellules présentatrices d'antigènes. Et en particulier, les séquences nucléiques riches en AT, l'hémozoïne et/ou l'ADN ainsi que les ancres GPI peuvent signaler par STING, TLR9 et TLR2 respectivement, et activer la libération de médiateurs pro-inflammatoires, comme les IFN-I produits rapidement après infection [160:Schofield 1993 - 164:Parroche 2007 - 170:Sharma 2011 - 176:Guermonprez 2013 - 303:Coban 2010]. La source cellulaire de cette production d'IFN-I n'est pas encore définie. Néanmoins, les IFN-I sont connus pour avoir des effets pléiotropiques et faire le lien entre immunité innée et adaptative. Nos travaux révèlent qu'ils participent à l'induction de la production des chimiokines attractants les lymphocytes (CXCL9, CXCL10 et CXCL11) dans le cerveau. Ils sont aussi susceptibles d'activer directement ou indirectement les DC, ainsi que d'agir sur les cellules NK et les lymphocytes T [170:Sharma 2011 - 176:Guermonprez 2013 - 305:Ball 2013 - 310:Bottger 2013]. Les IFN-I sont notamment capables d'induire l'expression d'IFN-γ, de l'IL-12Rβ2, et de Granzyme B par les lymphocytes T $CD4^+$ humains [241:Filen 2010] (**Figure 25**). Par la suite, les DC activées produisent de l'IL-12 qui induit la libération d'IFN-γ par les cellules T $CD4^+$, et par leurs homologues lymphoïdes innés, les cellules NK. L'IFN-γ est aussi un médiateur clé de la réponse à *Plasmodium*. Il active la production d'IL-12 par les DC, entraîne la libération de chimiokines attractant les lymphocytes dans le cerveau, et est essentiel pour la différenciation et l'activation des cellules T $CD8^+$. Les interférons de type I et de type II signalent classiquement par l'activation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2 [311:Dunn 2006], mais ils peuvent également induire une voie de transduction indépendante de STAT et impliquant PKC-θ [282:Srivastava 2004]. De plus, PKC-θ est cruciale pour la transduction du signal du TCR dans les lymphocytes. La kinase est en effet recrutée au niveau de la synapse immunologique dans les cellules T, ainsi que dans les cellules NK. PKC-θ est aussi exprimée par les cellules endothéliales et est susceptible d'être impliquée

dans la perméabilisation de l'endothélium [288:Rigor 2012]. Ainsi, les voies des interférons de type I et de type II, ainsi que de l'IL-12 et de PKC-θ interagissent et permettent l'activation et le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs et pathogéniques dans le cerveau.

Ces travaux nous ont donc aidés à préciser certains mécanismes impliqués dans l'activation et le recrutement des lymphocytes T $CD8^+$ pathogéniques essentiels au développement de l'ECM. En revanche, le rôle de ces cellules dans la pathologie humaine restait à prouvé, et le modèle murin a parfois été critiqué [155:White 2010]. Néanmoins, Guermonprez *et al*. ont récemment mis en évidence une association chez l'homme entre l'apparition de la malaria sévère, une concentration élevée en Flt3L sérique et un nombre important de cellules T $CD8^+$ activés dans le sang [176:Guermonprez 2013]. Ces travaux suggèrent que les lymphocytes T $CD8^+$ auraient également un rôle dans le développement de la malaria cérébrale chez l'homme. Cette avancée majeure confirme qu'il est essentiel de poursuivre leur étude dans le but de permettre le développement de thérapies efficaces.

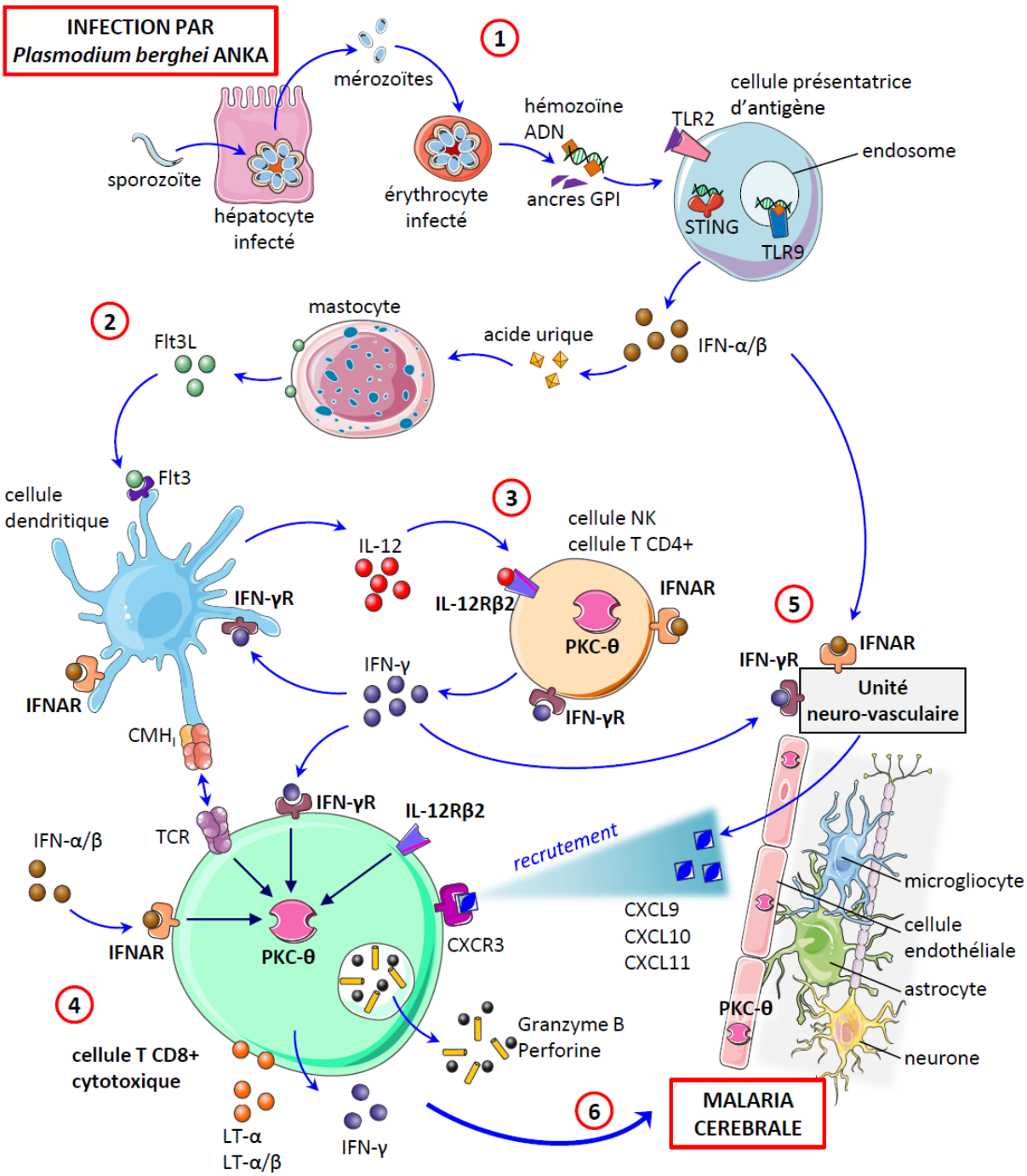


Figure 30 : Modèle du développement de l'ECM après infection par *Pb*A, intégrant les différentes voies étudiées au cours de ma thèse.

(**1**) Les sporozoïtes de *Pb*A infectent les hépatocytes afin de se différencier en mérozoïtes, libérés dans la circulation sanguine. Les érythrocytes infectés par les mérozoïtes libèrent des toxines et des DAMP qui activent les cellules présentatrices d'antigènes. Ces dernières détectent l'hémozoïne et/ou l'ADN, les ancres GPI, les séquences d'ADN riches en AT par TLR9, TLR2 et STING respectivement, et relarguent des IFN-I. (**2**) Les IFN-I activent la production d'acide urique (à partir des xanthine et hypoxanthine du parasite) en augmentant l'expression de la Xanthine déshydrogénase. L'acide urique induit la libération de Flt3L par les mastocytes, ce qui active les DC. (**3**) Une boucle de régulation positive entre les DC produisant de l'IL-12 et les cellules NK et T $CD4^+$ produisant de l'IFN-γ se met en route. (**4**) Les cellules T $CD8^+$ sont ensuite activées par l'interaction entre le TCR et le CMH_I des DC portant des antigènes de *Pb*A, la stimulation par l'IFN-γ, par les IFN-I et par l'IL-12. (**5**) En parallèle, la production précoce des IFN-I puis d'IFN-γ activent les différents éléments de l'unité neurovasculaire à produire les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, attractant les cellules T $CD8^+$. (**6**) Les cellules T cytotoxiques recrutées dans le cerveau engendrent une hyper-inflammation et l'endommagement de l'endothélium, responsables du développement de l'ECM.

℘ Réponse immunitaire anti-pathogène dans le cerveau, entre protection et pathogenèse.

La malaria cérébrale est une complication qui se développe dans seulement 1% des cas d'infection à *P. falciparum*. Néanmoins, elle est à l'origine de 75% des décès associés au paludisme [127:Dorovini-Zis 2011]. Différentes études ont montré l'importance de la réponse immunitaire, et plus particulièrement de la réponse T_H1 dans le contrôle de l'infection lors de malaria clinique. Mais cette réponse est également impliquée dans le développement de la neuropathologie. En effet, la réponse du système immunitaire pour lutter contre la propagation de pathogènes dans le cerveau peut entraîner des complications sévères. Par exemple, le bacille *M. tuberculosis* peut être à l'origine de formes extra-pulmonaires, dont la tuberculose méningée. La multiplication de *M. tuberculosis* se faisant dans les macrophages, la bactérie est aussi susceptible d'infecter les cellules microgliales dans le cerveau. La tuberculose méningée est traitée par des molécules antimicrobiennes qui doivent être associées à des corticostéroïdes. En effet, les séquelles neurologiques induites par cette neuropathologie sont essentiellement dues à une inflammation excessive impliquée dans l'apparition d'œdème et d'endommagement du tissu cérébral [312:Leung 2008 - 313:Marx 2011]. La production de TNF-α, qui est crucial pour le contrôle des bacilles, participe également à l'hyper-inflammation lors de la tuberculose méningée [314:O'Garra 2013]. De façon similaire, lors de la trypanosomiase africaine (ou maladie du sommeil), le parasite *Trypanosoma brucei* (*T. brucei gambiense* ou *rhodesiense*) détourne la réponse immunitaire de l'hôte et induit une méningo-encéphalite qui est fatale sans traitement. L'étude de Masocha et Kristensson propose le modèle murin suivant : après infection par *T. brucei*, la reconnaissance du parasite par le système immunitaire (entre autres via TLR9) active la production de TNF-α et d'IFN-α/β. Mais les mécanismes impliqués dans le recrutement des cellules T sont aussi utilisés par le parasite et facilitent sa dissémination dans le cerveau. En effet, le TNF-α, nécessaire au contrôle du parasite [315:Magez 2007], active également l'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM par les cellules endothéliales, ce qui permet l'adhésion des lymphocytes T. Parallèlement, la production initiale d'IFN-α/β induit la sécrétion de la chimiokine CXCL10 par les cellules endothéliales cérébrales et les astrocytes. CXCL10 active alors le passage de quelques cellules T et de trypanosomes qui traversent la BHE par voie paracellulaire. L'inflammation est alors

amplifiée, notamment par la production d'IFN-γ, et conduit ensuite à l'entrée de nombreuses cellules T accompagnées de trypanosomes [316:Masocha 2012]. Cette réponse immune inadaptée en réponse au parasite est très semblable à celle qui est observée dans le cas de l'ECM induite par *Pb*A, et dévoile une réaction immunitaire T_H1 excessive et pathologique. Face à l'infection par un pathogène dont la multiplication peut être exponentielle, le système immunitaire de l'hôte doit rapidement mettre en place une réponse efficace. Mais lorsque ce pathogène infecte le cerveau, les dommages collatéraux de la réponse inflammatoire peuvent être très délétères. Cependant, la réponse immune n'est pas toujours aussi néfaste. Par exemple, l'apicomplexe *T. gondii* est aussi susceptible de pénétrer le système nerveux central par l'intermédiaire de leucocytes infectés [317:Feustel 2012]. Après infection par *T. gondii*, la production d'IFN-γ est requise pour le contrôle du parasite, mais, associée à la production de NO, la cytokine est également impliquée dans la perméabilisation de la BHE et l'entrée du parasite dans le cerveau [318:Silva 2010 - 319:Goldszmid 2012]. *T. gondii* forme alors des kystes latents dans le tissu cérébral. L'IFN-γ, produit par les cellules T et les microgliocytes, est nécessaire pour contrôler la prolifération du parasite [320:Torres 2013]. En cas d'immunodéficience en réponse T_H1, comme lors de l'infection par le VIH, le défaut d'IFN-γ conduit à la réactivation de l'infection et à une encéphalite sévère [321:Alkali 2013]. Ainsi, bien que la réponse immunitaire ne soit pas assez efficace pour éliminer l'apicomplexe *T. gondii*, elle est nécessaire pour maintenir le *statu quo* et éviter le développement d'une pathologie cérébrale.

L'équilibre entre le contrôle d'un pathogène et l'inflammation pathologie est fragile, en particulier dans le cerveau où l'endommagement tissulaire peut avoir des conséquences sévères. L'étude des mécanismes précis capables de faire pencher cette balance est donc fondamentale.

– Conclusions et Perspectives –

Les différents travaux réalisés dans le cadre du projet de recherche sur la malaria murine ont eu pour objectifs de détailler les mécanismes immunitaires impliqués dans la pathogénèse cérébrale et pulmonaire.

Dans 20% des cas de malaria sévère induite par *P. falciparum*, les patients développent également une atteinte des voies respiratoires. De la même façon, dans le modèle murin d'infection par *Pb*A, les souris développent une pathologie pulmonaire. Néanmoins, l'absence des voies PKC-θ, IL-12Rβ2, IFN-γR ou IFNAR n'a pas eu d'effet sur le développement d'une complication dans les poumons. Nous avons mis en évidence que la pathologie respiratoire était indépendante des voies d'activation des lymphocytes T. Il serait intéressant de caractériser plus en détail la réponse immune, par identification des cellules présentes dans l'espace alvéolaire (après lavage broncho-alvéolaire) et dans le tissu, ou encore par une analyse par immuno-marquage et cytométrie en flux, qui permettraient de définir le nombre et le type de cellules séquestrées.

En parallèle, nous avons détaillé la réponse T cytotoxique impliquée dans le développement de la malaria cérébrale expérimentale (ECM) induite par l'infection à *Pb*A. En effet, les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques sont les cellules effectrices nécessaires au développement de l'ECM. Nous avons d'abord montré le rôle de la Protéine Kinase C – θ (PKC-θ) dans la pathogénèse cérébrale. En l'absence de PKC-θ, l'expression de la molécule d'adhésion ICAM était réduite et le recrutement des cellules T $CD8^+$ effectrices aboli. Ainsi, en l'absence d'endommagement de la BHE, la déficience en PKC-θ permet de protéger contre le développement de l'ECM. Au vu de ces résultats, la kinase apparait comme une cible thérapeutique potentielle. En effet, dans le cas de la malaria cérébrale, l'inhibition de PKC-θ, en plus des antipaludéens, pourrait permettre de modérer la réponse cytotoxique et d'inhiber le développement de la complication. Or, différents inhibiteurs de PKC-θ sont actuellement testés dans d'autres pathologies. L'inhibition de PKC-θ permettrait de réduire l'activité des cellules T effectrices et de favoriser la réponse des T_{reg}, dans les cas d'auto-immunité ou de rejet de greffe [322:Zhang 2013]. L'AEB071 (ou Sotrastaurine) inhibant PKC-θ est par exemple en phase II d'essai clinique contre le rejet de transplantation de foie [323:Russ 2013].

Par la suite, nous avons centré nos études sur l'implication de la voie de l'IL-12 dans la neuro-pathogenèse, et plus particulièrement sur l'importance de l'IL-12Rβ2 dans le développement de l'ECM. En l'absence d'IL-12Rβ2, la protection contre l'ECM était associée à une production d'IFN-γ clairement réduite, et à une réponse cytotoxique diminuée. Cependant, la déficience en IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19 ou IL-12Rβ1 ne reproduit pas le phénotype de résistance à l'ECM observé chez les souris déficientes en IL-12Rβ2. Ces résultats suggèrent une redondance dans les ligands possibles de l'IL-12Rβ2 ou bien l'existence d'une voie de signalisation qui n'a pas encore été décrite, mais rend difficile la description précise de l'implication de l'IL-12Rβ2. L'utilisation d'anticorps neutralisant l'IL-12p70 (IL-12p40/IL-12p35) ou l'IL-35 (Ebi3/IL-12p35) pourrait permettre de préciser le rôle de ces 2 cytokines, et de vérifier l'hypothèse d'un autre ligand.

Et pour finir, nous avons précisé le rôle des interférons de type I dans le développement de l'ECM. En l'absence du récepteur IFNAR, les souris présentaient un retard ou une absence de complication cérébrale. Nous avons mis en évidence qu'après infection par *Pb*A, les IFN-I sont impliqués dans le recrutement des cellules T $CD8^+$ dans le cerveau, par induction de la production des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, ainsi que de

l'expression de CXCR3. Dans notre étude, comme dans les travaux récemment publiés, la source cellulaire des IFN-I n'est pas précisée, mais il a été suggéré qu'il s'agirait de cellules présentatrices d'antigènes [170:Sharma 2011 - 176:Guermonprez 2013 - 305:Ball 2013]. Nous n'avons pas détecté de variation de la production d'IFN-α/β dans le cerveau au moment de l'ECM, mais Guermonprez et al. ont mis en évidence un pic sérique d'IFN-α/β 24H post-infection [176:Guermonprez 2013], il serait donc intéressant de déterminer la cinétique de la production des IFN-I dans le sang, la rate et le cerveau. Les IFN-I ont un effet pléiotropique, le récepteur IFNAR pouvant être exprimé par les DC, les monocytes/macrophages, les cellules NK et les lymphocytes, ainsi que par les éléments de l'unité neurovasculaire. Aussi, il existe un grands nombre de sous-types d'IFN-I (plus de 10 IFN-α, l'IFN-β, l'IFN-ε, l'IFN-ω, l'IFN-κ et l'IFN-ζ). Une piste thérapeutique potentielle pourrait donc être l'inhibition spécifique du récepteur IFNAR.

- Epilogue -

Au cours de ces trois années de thèse effectuées à l'INEM, j'ai eu la très grande chance de prendre part à deux projets de recherche qui avaient pour objectifs l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse de l'hôte à l'infection dans des modèles murins de mucoviscidose et de malaria.

Ces deux pathologies impliquent des voies de réponses immunitaires distinctes. Cependant, dans les deux cas, les mécanismes impliqués dans la réaction de l'hôte en réponse à l'infection par un pathogène sont essentiels. Au niveau pulmonaire, nous avons pu voir que la surproduction d'IL-1β ou d'IL-17 en réponse à l'infection par *P. aeruginosa* pouvait favoriser la multiplication des bactéries et inhiber la résolution de l'inflammation. Dans un contexte mucoviscidosique, où la perte de fonction du canal CFTR induit une hyper-inflammation susceptible d'être amplifiée par une surinfection, la présence de ces cytokines pro-inflammatoires pourrait être d'autant plus délétère. De façon similaire, lors de l'infection par *Plasmodium*, l'adhérence des hématies infectées à l'endothélium pulmonaire est associée avec le recrutement de cellules de l'immunité innée qui peuvent altérer la fonction respiratoire et conduire à une pathologie sévère, notamment au syndrome de détresse respiratoire aiguë. A l'inverse, la complication cérébrale de la malaria est provoquée par une réaction immune adaptative. En effet, l'activation de réponse des lymphocytes T cytotoxiques dans les vaisseaux du cerveau, de façon dépendante des voies PKC-θ, IL-12Rβ2 et IFNAR, est à l'origine de l'endommagement de la BHE et d'une neuropathologie sévère.

Nos résultats mettent en évidence la fragilité de l'équilibre entre la réaction immunitaire de l'hôte nécessaire au contrôle de l'infection et l'excès de réponse inflammatoire qui peut contribuer à la pathogénèse. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de cette réponse immune, dans les modèles murins de mucoviscidose et de malaria, n'est que partielle et de nombreuses voies nécessitent encore d'être décryptées.

– Références Bibliographiques –

1 - **Anderson D. H.** Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938. 56: 344-99.

2 - **Lowe C. U., May C. D. and Reed S. C.** Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child* 1949. 78: 349-74.

3 - **Lubamba B., Dhooghe B., Noel S. and Leal T.** Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 2012. 45: 1132-44.

4 - **Quinton P. M.** Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983. 301: 421-2.

5 - **Zielenski J.** Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000. 67: 117-33.

6 - **Lyczak J. B., Cannon C. L. and Pier G. B.** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002. 15: 194-222.

7 - **Steward M. C., Ishiguro H. and Case R. M.** Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* 2005. 67: 377-409.

8 - **Winfield R. D. and Beierle E. A.** Pediatric surgical issues in meconium disease and cystic fibrosis. *Surg Clin North Am* 2006. 86: 317-27, viii-ix.

9 - **Moyer K. and Balistreri W.** Hepatobiliary disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009. 25: 272-8.

10 - **Paccou J., Zeboulon N., Combescure C., Gossec L. and Cortet B.** The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 2010. 86: 1-7.

11 - **Antunovic S. S., Lukac M. and Vujovic D.** Longitudinal cystic fibrosis care. *Clin Pharmacol Ther* 2013. 93: 86-97.

12 - **Ledford H.** Cystic fibrosis drug Vertex's latest triumph. *Nat Biotech* 2012. 30: 201-02.

13 - **Rowe S. M., Miller S. and Sorscher E. J.** Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005. 352: 1992-2001.

14 - **Denning G. M., Ostedgaard L. S., Cheng S. H., Smith A. E. and Welsh M. J.** Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest* 1992. 89: 339-49.

15 - **Hume J. R., Duan D., Collier M. L., Yamazaki J. and Horowitz B.** Anion transport in heart. *Physiol Rev* 2000. 80: 31-81.

16 - **Lamhonwah A. M., Bear C. E., Huan L. J., Kim Chiaw P., Ackerley C. A. and Tein I.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human muscle: Dysfunction causes abnormal metabolic recovery in exercise. *Ann Neurol* 2010. 67: 802-8.

17 - **Decherf G., Bouyer G., Egee S. and Thomas S. L.** Chloride channels in normal and cystic fibrosis human erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis* 2007. 39: 24-34.

18 - **Di A., Brown M. E., Deriy L. V., Li C., Szeto F. L., Chen Y. *et al.*** CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* 2006. 8: 933-44.

19 - **Vandivier R. W., Richens T. R., Horstmann S. A., deCathelineau A. M., Ghosh M., Reynolds S. D. *et al.*** Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009. 297: L677-86.

20 - **Gaspar M. C., Couet W., Olivier J. C., Pais A. A. and Sousa J. J.** Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013.

21 - **Kerem E.** Mutation specific therapy in CF. *Paediatric Respiratory Reviews* 2006. 7, Supplement 1: S166-S69.

22 - **O'Sullivan B. P. and Freedman S. D.** Cystic fibrosis. *Lancet* 2009. 373: 1891-904.

23 - **Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N. and Lukacs G. L.** C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999. 274: 21873-7.

24 - **Fajac I. and Sermet-Gaudelus I.** Mucoviscidose : nouvelles thérapeutiques ciblant la protéine CFTR. *Revue des Maladies Respiratoires* 2013. 30: 255-61.

25 - **Thibodeau P. H., Richardson J. M., 3rd, Wang W., Millen L., Watson J., Mendoza J. L. *et al.*** The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem* 2010. 285: 35825-35.

26 - **Livraghi A. and Randell S. H.** Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicol Pathol* 2007. 35: 116-29.

27 - **CFF** Patient registry - Annual data report 2011. *Cystic Fibrosis Foundation* 2012. http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2011-Patients-Registry.pdf: accessed online at 22 July 2013.

28 - **Verhaeghe C., Delbecque K., de Leval L., Oury C. and Bours V.** Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros* 2007. 6: 304-8.

29 - **Muhlebach M. S. and Noah T. L.** Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002. 165: 911-5.

30 - **Vij N., Mazur S. and Zeitlin P. L.** CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS ONE* 2009. 4: e4664.

31 - **John G., Yildirim A. O., Rubin B. K., Gruenert D. C. and Henke M. O.** TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010. 42: 424-31.

32 - **Parker D., Cohen T. S., Alhede M., Harfenist B. S., Martin F. J. and Prince A.** Induction of type I interferon signaling by Pseudomonas aeruginosa is diminished in cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012. 46: 6-13.

33 - **Moriceau S., Lenoir G. and Witko-Sarsat V.** In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance. *J Innate Immun* 2010. 2: 260-6.

34 - **Lima-Junior D. S., Costa D. L., Carregaro V., Cunha L. D., Silva A. L., Mineo T. W. *et al.*** Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat Med* 2013. 19: 909-15.

35 - **Wu M. F., Chen S. T., Yang A. H., Lin W. W., Lin Y. L., Chen N. J. *et al.*** CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood* 2013. 121: 95-106.

36 - **Ben Mohamed F., Garcia-Verdugo I., Medina M., Balloy V., Chignard M., Ramphal R. *et al.*** A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by Pseudomonas aeruginosa. *PLoS ONE* 2012. 7: e39888.

37 - **Ernst R. K., Hajjar A. M., Tsai J. H., Moskowitz S. M., Wilson C. B. and Miller S. I.** Pseudomonas aeruginosa lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *J Endotoxin Res* 2003. 9: 395-400.

38 - **Lavoie E. G., Wangdi T. and Kazmierczak B. I.** Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection. *Microbes Infect* 2011. 13: 1133-45.

39 - **Levy H., Murphy A., Zou F., Gerard C., Klanderman B., Schuemann B. *et al.*** IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2009. 44: 580-93.

40 - **Schultz M. J., Rijneveld A. W., Florquin S., Edwards C. K., Dinarello C. A. and van der Poll T.** Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002. 282: L285-90.

41 - **Sutterwala F. S., Mijares L. A., Li L., Ogura Y., Kazmierczak B. I. and Flavell R. A.** Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* 2007. 204: 3235-45.

42 - **Veliz Rodriguez T., Moalli F., Polentarutti N., Paroni M., Bonavita E., Anselmo A. *et al.*** Role of Toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/Toll-like receptor signaling, in resistance to acute Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Infect Immun* 2012. 80: 100-9.

43 - **Gaffen S. L.** Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009. 9: 556-67.

44 - **Baeten D. L. and Kuchroo V. K.** How Cytokine Networks Fuel Inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. *Nat Med* 2013. 19: 824-5.

45 - **Decraene A., Willems-Widyastuti A., Kasran A., De Boeck K., Bullens D. M. and Dupont L. J.** Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respir Res* 2010. 11: 177.

46 - **Hector A., Kormann M., Kammermeier J., Burdi S., Marcos V., Rieber N. *et al.*** Expression and regulation of interferon-related development regulator-1 in cystic fibrosis neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013. 48: 71-7.

47 - **Merk D. and Schubert-Zsilavecz M.** Repairing mutated proteins--development of small molecules targeting defects in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Expert Opin Drug Discov* 2013. 8: 691-708.

48 - **Itani O. A., Chen J. H., Karp P. H., Ernst S., Keshavjee S., Parekh K. *et al.*** Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl- conductance but not increased Na+ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108: 10260-5.

49 - **Wilke M., Buijs-Offerman R. M., Aarbiou J., Colledge W. H., Sheppard D. N., Touqui L. *et al.*** Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros* 2011. 10 Suppl 2: S152-71.

50 - **Rogers C. S., Stoltz D. A., Meyerholz D. K., Ostedgaard L. S., Rokhlina T., Taft P. J. *et al.*** Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008. 321: 1837-41.

51 - **Rogers C. S., Abraham W. M., Brogden K. A., Engelhardt J. F., Fisher J. T., McCray P. B., Jr. *et al.*** The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008. 295: L240-63.

52 - **Sun X., Sui H., Fisher J. T., Yan Z., Liu X., Cho H. J. *et al.*** Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J Clin Invest* 2010. 120: 3149-60.

53 - **Keiser N. W. and Engelhardt J. F.** New animal models of cystic fibrosis: what are they teaching us? *Curr Opin Pulm Med* 2011. 17: 478-83.

54 - **van Doorninck J. H., French P. J., Verbeek E., Peters R. H., Morreau H., Bijman J. *et al.*** A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *EMBO J* 1995. 14: 4403-11.

55 - **Glaccum M. B., Stocking K. L., Charrier K., Smith J. L., Willis C. R., Maliszewski C. *et al.*** Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J Immunol* 1997. 159: 3364-71.

56 - **Secher T., Fauconnier L., Szade A., Rutschi O., Fas S. C., Ryffel B. *et al.*** Anti-Pseudomonas aeruginosa serotype O11 LPS immunoglobulin M monoclonal antibody panobacumab (KBPA101) confers protection in a murine model of acute lung infection. *J Antimicrob Chemother* 2011. 66: 1100-9.

57 - **Kolls J. K., McCray P. B., Jr. and Chan Y. R.** Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 2008. 8: 829-35.

58 - **del Campo R., Martinez E., del Fresno C., Alenda R., Gomez-Pina V., Fernandez-Ruiz I. *et al.*** Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 2011. 6: e29577.

59 - **Karmakar M., Sun Y., Hise A. G., Rietsch A. and Pearlman E.** Cutting edge: IL-1beta processing during Pseudomonas aeruginosa infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and caspase-1. *J Immunol* 2012. 189: 4231-5.

60 - **Kanangat S., Meduri G. U., Tolley E. A., Patterson D. R., Meduri C. U., Pak C. *et al.*** Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect Immun* 1999. 67: 2834-40.

61 - **Meduri G. U.** Clinical review: a paradigm shift: the bidirectional effect of inflammation on bacterial growth. Clinical implications for patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2002. 6: 24-9.

62 - **Tsay T. B., Yang M. C., Chen P. H., Lai K. H., Huang H. T., Hsu C. M. *et al.*** Blocking TNF-alpha enhances Pseudomonas aeruginosa-induced mortality in burn mice through induction of IL-1beta. *Cytokine* 2013. 63: 58-66.

63 - **Liu J., Feng Y., Yang K., Li Q., Ye L., Han L. *et al.*** Early production of IL-17 protects against acute pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011. 61: 179-88.

64 - **Liu J., Qu H., Li Q., Ye L., Ma G. and Wan H.** The responses of gammadelta T-cells against acute Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection in mice via interleukin-17. *Pathog Dis* 2013. 68: 44-51.

65 - **McAllister F., Henry A., Kreindler J. L., Dubin P. J., Ulrich L., Steele C. *et al.*** Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 2005. 175: 404-12.

66 - **Roussel L. and Rousseau S.** IL-17 primes airway epithelial cells lacking functional Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) to increase NOD1 responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2010. 391: 505-9.

67 - **van Heeckeren A. M., Schluchter M., Xue L., Alvarez J., Freedman S., St George J. *et al.*** Nutritional effects on host response to lung infections with mucoid Pseudomonas aeruginosa in mice. *Infect Immun* 2004. 72: 1479-86.

68 - **van Heeckeren A. M., Schluchter M. D., Xue W. and Davis P. B.** Response to acute lung infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006. 173: 288-96.

69 - **Fisher J. T., Zhang Y. and Engelhardt J. F.** Comparative biology of cystic fibrosis animal models. *Methods Mol Biol* 2011. 742: 311-34.

70 - **Bragonzi A.** Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010. 300: 584-93.

71 - **Durie P. R., Kent G., Phillips M. J. and Ackerley C. A.** Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model. *Am J Pathol* 2004. 164: 1481-93.

72 - **Tirkos S., Newbigging S., Nguyen V., Keet M., Ackerley C., Kent G. *et al.*** Expression of S100A8 correlates with inflammatory lung disease in congenic mice deficient of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* 2006. 7: 51.

73 - **Grubb B. R., Paradiso A. M. and Boucher R. C.** Anomalies in ion transport in CF mouse tracheal epithelium. *Am J Physiol* 1994. 267: C293-300.

74 - **Grubb B. R., Pickles R. J., Ye H., Yankaskas J. R., Vick R. N., Engelhardt J. F. *et al.*** Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 1994. 371: 802-6.

75 - **Schroeder T. H., Reiniger N., Meluleni G., Grout M., Coleman F. T. and Pier G. B.** Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of Pseudomonas aeruginosa from the respiratory tract. *J Immunol* 2001. 166: 7410-8.

76 - **Mall M., Grubb B. R., Harkema J. R., O'Neal W. K. and Boucher R. C.** Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 2004. 10: 487-93.

77 - **Saadane A., Soltys J. and Berger M.** Acute Pseudomonas challenge in cystic fibrosis mice causes prolonged nuclear factor-kappa B activation, cytokine secretion, and persistent lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006. 117: 1163-9.

78 - **Lubamba B., Huaux F., Lebacq J., Marbaix E., Dhooghe B., Panin N. *et al.*** Immunomodulatory activity of vardenafil on induced lung inflammation in cystic fibrosis mice. *J Cyst Fibros* 2012. 11: 266-73.

79 - **Chroneos Z. C., Wert S. E., Livingston J. L., Hassett D. J. and Whitsett J. A.** Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa in vivo. *J Immunol* 2000. 165: 3941-50.

80 - **Cressman V. L., Hicks E. M., Funkhouser W. K., Backlund D. C. and Koller B. H.** The relationship of chronic mucin secretion to airway disease in normal and CFTR-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998. 19: 853-66.

81 - **McCray P. B., Jr., Zabner J., Jia H. P., Welsh M. J. and Thorne P. S.** Efficient killing of inhaled bacteria in DeltaF508 mice: role of airway surface liquid composition. *Am J Physiol* 1999. 277: L183-90.

82 - **Heeckeren A., Walenga R., Konstan M. W., Bonfield T., Davis P. B. and Ferkol T.** Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with Pseudomonas aeruginosa. *J Clin Invest* 1997. 100: 2810-5.

83 - **Botelho F. M., Nikota J. K., Bauer C. M., Morissette M. C., Iwakura Y., Kolbeck R. *et al.*** Cigarette smoke-induced accumulation of lung dendritic cells is interleukin-1alpha-dependent in mice. *Respir Res* 2012. 13: 81.

84 - **Bourigault M.-L., Segueni N., Rose S., Court N., Vacher R., Vasseur V. *et al.*** Relative contribution of IL-1α, IL-1β and TNF to the host response to Mycobacterium tuberculosis and attenuated M. bovis BCG. *Immunity, Inflammation and Disease* 2013: n/a-n/a.

85 - **Besnard A. G., Togbe D., Couillin I., Tan Z., Zheng S. G., Erard F. *et al.*** Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 2012. 4: 3-10.

86 - **van Heeckeren A. M. and Schluchter M. D.** Murine models of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Lab Anim* 2002. 36: 291-312.

87 - **Moalli F., Paroni M., Veliz Rodriguez T., Riva F., Polentarutti N., Bottazzi B. *et al.*** The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by Pseudomonas aeruginosa. *J Immunol* 2011. 186: 5425-34.

88 - **Hawass Z., Gad Y. Z., Ismail S., Khairat R., Fathalla D., Hasan N. *et al.*** Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA* 2010. 303: 638-47.

89 - **Butler D.** King Tut's death explained ? *Nature News* 2010: 16.2.2010, Available at: http://www.nature.com.gate1.inist.fr/news/10/100216/full/news.2010.75.html.

90 - **Timmann C. and Meyer C. G.** Malaria, mummies, mutations: Tutankhamun's archaeological autopsy. *Trop Med Int Health* 2010. 15: 1278-80.

91 - **Bogdonoff M. D., Crellin J. K., Good R. A., McGovern J. P., Nuland S. B. and Saffon M. H.** The genuine works of Hippocrates. *Birmingham (AL): Classics of Medicine Library* 1985.

92 - **Laveran C. L.** Classics in infectious diseases: A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922). *Rev Infect Dis* 1982. 4: 908-11.

93 - **Ross R.** PIGMENTED CELLS in MOSQUITOS. *Br Med J* 1898. 1: 550-1.

94 - **Ouedraogo A., Tiono A. B., Diarra A., Bougouma E. C., Nebie I., Konate A. T. *et al.*** Transplacental Transmission of Plasmodium falciparum in a Highly Malaria Endemic Area of Burkina Faso. *J Trop Med* 2012. 2012: 109705.

95 - **Fischer L., Sterneck M., Claus M., Costard-Jackle A., Fleischer B., Herbst H. *et al.*** Transmission of malaria tertiana by multi-organ donation. *Clin Transplant* 1999. 13: 491-5.

96 - **Aly A. S., Vaughan A. M. and Kappe S. H.** Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009. 63: 195-221.

97 - **Amino R., Menard R. and Frischknecht F.** In vivo imaging of malaria parasites--recent advances and future directions. *Curr Opin Microbiol* 2005. 8: 407-14.

98 - **Prudencio M., Rodriguez A. and Mota M. M.** The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol* 2006. 4: 849-56.

99 - **Galinski M. R., Meyer E. V. and Barnwell J. W.** Plasmodium vivax: modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. *Adv Parasitol* 2013. 81: 1-26.

100 - **Maier A. G., Cooke B. M., Cowman A. F. and Tilley L.** Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol* 2009. 7: 341-54.

101 - **Bannister L. H., Hopkins J. M., Fowler R. E., Krishna S. and Mitchell G. H.** A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today* 2000. 16: 427-33.

102 - **Antinori S., Galimberti L., Milazzo L. and Corbellino M.** Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012. 4: e2012013.

103 - **Richter J., Franken G., Mehlhorn H., Labisch A. and Haussinger D.** What is the evidence for the existence of Plasmodium ovale hypnozoites? *Parasitol Res* 2010. 107: 1285-90.

104 - **Oakley M. S., Gerald N., McCutchan T. F., Aravind L. and Kumar S.** Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol* 2011. 27: 442-9.

105 - **Antinori S., Galimberti L., Milazzo L. and Corbellino M.** Plasmodium knowlesi: the emerging zoonotic malaria parasite. *Acta Trop* 2013. 125: 191-201.

106 - **Mita T. and Tanabe K.** Evolution of Plasmodium falciparum drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Jpn J Infect Dis* 2012. 65: 465-75.

107 - **malERA C. G. V.** A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* 2011. 8: e1000398.

108 - **Thera M. A. and Plowe C. V.** Vaccines for malaria: how close are we? *Annu Rev Med* 2012. 63: 345-57.

109 - **Riley E. M. and Stewart V. A.** Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med* 2013. 19: 168-78.

110 - **Good M. F., Xu H., Wykes M. and Engwerda C. R.** Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 2005. 23: 69-99.

111 - **Perkins D. J., Were T., Davenport G. C., Kempaiah P., Hittner J. B. and Ong'echa J. M.** Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* 2011. 7: 1427-42.

112 - **White N. J., Pukrittayakamee S., Hien T. T., Faiz M. A., Mokuolu O. A. and Dondorp A. M.** Malaria. *Lancet* 2013.

113 - **Thawani N., Tam M., Bellemare M. J., Bohle D. S., Olivier M., de Souza J. B. *et al.*** Plasmodium products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors. *J Infect Dis* 2014. 209: 140-9.

114 - **Schofield L. and Grau G. E.** Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005. 5: 722-35.

115 - **Rogerson S. J., Hviid L., Duffy P. E., Leke R. F. and Taylor D. W.** Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 2007. 7: 105-17.

116 - **Hviid L., Marinho C. R., Staalsoe T. and Penha-Goncalves C.** Of mice and women: rodent models of placental malaria. *Trends Parasitol* 2010. 26: 412-9.

117 - **Mohan A., Sharma S. K. and Bollineni S.** Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis* 2008. 45: 179-93.

118 - **Taylor W. R., Hanson J., Turner G. D., White N. J. and Dondorp A. M.** Respiratory manifestations of malaria. *Chest* 2012. 142: 492-505.

119 - **Milner D., Jr., Factor R., Whitten R., Carr R. A., Kamiza S., Pinkus G. *et al.*** Pulmonary pathology in pediatric cerebral malaria. *Hum Pathol* 2013. 44: 2719-26.

120 - **Van den Steen P. E., Geurts N., Deroost K., Van Aelst I., Verhenne S., Heremans H. *et al.*** Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2010. 181: 957-68.

121 - **Lovegrove F. E., Gharib S. A., Pena-Castillo L., Patel S. N., Ruzinski J. T., Hughes T. R. *et al.*** Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog* 2008. 4: e1000068.

122 - **Anidi I. U., Servinsky L. E., Rentsendorj O., Stephens R. S., Scott A. L. and Pearse D. B.** CD36 and Fyn Kinase Mediate Malaria-Induced Lung Endothelial Barrier Dysfunction in Mice Infected with Plasmodium berghei. *PLoS ONE* 2013. 8: e71010.

123 - **Epiphanio S., Campos M. G., Pamplona A., Carapau D., Pena A. C., Ataide R. *et al.*** VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog* 2010. 6: e1000916.

124 - **Deroost K., Tyberghein A., Lays N., Noppen S., Schwarzer E., Vanstreels E. *et al.*** Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013. 48: 589-600.

125 - **Souza M. C., Silva J. D., Padua T. A., Capelozzi V. L., Rocco P. R. and Henriques M.** Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol* 2013. 186: 65-72.

126 - **WHO.** Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000. 94 Suppl 1: S1-90.

127 - **Dorovini-Zis K., Schmidt K., Huynh H., Fu W., Whitten R. O., Milner D. *et al.*** The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol* 2011. 178: 2146-58.

128 - **Idro R., Bitarakwate E., Tumwesigire S. and John C. C.** Clinical manifestations of severe malaria in the highlands of southwestern Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2005. 72: 561-7.

129 - **Murphy S. C. and Breman J. G.** Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001. 64: 57-67.

130 - **Boivin M. J., Bangirana P., Byarugaba J., Opoka R. O., Idro R., Jurek A. M. *et al.*** Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* 2007. 119: e360-6.

131 - **Jain K., Sood S. and Gowthamarajan K.** Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. *Braz J Infect Dis* 2013.

132 - **Rowe J. A., Claessens A., Corrigan R. A. and Arman M.** Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 2009. 11: e16.

133 - **Dondorp A. M., Nyanoti M., Kager P. A., Mithwani S., Vreeken J. and Marsh K.** The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe falciparum malaria and its restoration by blood transfusion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002. 96: 282-6.

134 - **Kaul D. K., Roth E. F., Jr., Nagel R. L., Howard R. J. and Handunnetti S. M.** Rosetting of Plasmodium falciparum-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions. *Blood* 1991. 78: 812-9.

135 - **Vogt A. M., Barragan A., Chen Q., Kironde F., Spillmann D. and Wahlgren M.** Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood* 2003. 101: 2405-11.

136 - **Pain A., Ferguson D. J., Kai O., Urban B. C., Lowe B., Marsh K. *et al.*** Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98: 1805-10.

137 - **Cox D. and McConkey S.** The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 2010. 67: 557-68.

138 - **McMorran B. J., Marshall V. M., de Graaf C., Drysdale K. E., Shabbar M., Smyth G. K. *et al.*** Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 2009. 323: 797-800.

139 - **Lacerda-Queiroz N., Rodrigues D. H., Vilela M. C., Rachid M. A., Soriani F. M., Sousa L. P. *et al.*** Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 2012. 180: 246-55.

140 - **Craig A. G., Khairul M. F. and Patil P. R.** Cytoadherence and severe malaria. *Malays J Med Sci* 2012. 19: 5-18.

141 - **Wilson N. O., Huang M. B., Anderson W., Bond V., Powell M., Thompson W. E. *et al.*** Soluble factors from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol* 2008. 162: 172-6.

142 - **Weinberg J. B., Lopansri B. K., Mwaikambo E. and Granger D. L.** Arginine, nitric oxide, carbon monoxide, and endothelial function in severe malaria. *Curr Opin Infect Dis* 2008. 21: 468-75.

143 - **Razakandrainibe R., Pelleau S., Grau G. E. and Jambou R.** Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria? *Trends Parasitol* 2012. 28: 151-60.

144 - **Combes V., El-Assaad F., Faille D., Jambou R., Hunt N. H. and Grau G. E.** Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol* 2010. 91: 140-51.

145 - **Grab D. J., Chakravorty S. J., van der Heyde H. and Stins M. F.** How can microbial interactions with the blood-brain barrier modulate astroglial and neuronal function? *Cell Microbiol* 2011. 13: 1470-8.

146 - **Renia L., Howland S. W., Claser C., Charlotte Gruner A., Suwanarusk R., Hui Teo T. *et al.*** Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence* 2012. 3: 193-201.

147 - **Deininger M. H., Kremsner P. G., Meyermann R. and Schluesener H.** Macrophages/microglial cells in patients with cerebral malaria. *Eur Cytokine Netw* 2002. 13: 173-85.

148 - **Medana I. M., Idro R. and Newton C. R.** Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *J Neurol Sci* 2007. 258: 93-8.

149 - **Rasalkar D. D., Paunipagar B. K., Sanghvi D., Sonawane B. D. and Loniker P.** Magnetic resonance imaging in cerebral malaria: a report of four cases. *Br J Radiol* 2011. 84: 380-5.

150 - **Potchen M. J., Kampondeni S. D., Seydel K. B., Birbeck G. L., Hammond C. A., Bradley W. G. *et al.*** Acute brain MRI findings in 120 Malawian children with cerebral malaria: new insights into an ancient disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012. 33: 1740-6.

151 - **Craig A. G., Grau G. E., Janse C., Kazura J. W., Milner D., Barnwell J. W. *et al.*** The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog* 2012. 8: e1002401.

152 - **de Souza J. B. and Riley E. M.** Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 2002. 4: 291-300.

153 - **Pongponratn E., Turner G. D., Day N. P., Phu N. H., Simpson J. A., Stepniewska K. *et al.*** An ultrastructural study of the brain in fatal Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2003. 69: 345-59.

154 - **Toure F. S., Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O., Mezui-Me-Ndong J., Ndong-Atome G. R., Bisvigou U., Mazier D. *et al.*** Cytoadherence and genotype of Plasmodium falciparum strains from symptomatic children in Franceville, southeastern Gabon. *Clin Med Res* 2007. 5: 106-13.

155 - **White N. J., Turner G. D., Medana I. M., Dondorp A. M. and Day N. P.** The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol* 2010. 26: 11-5.

156 - **Hunt N. H. and Grau G. E.** Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003. 24: 491-9.

157 - **Franke-Fayard B., Trueman H., Ramesar J., Mendoza J., van der Keur M., van der Linden R. *et al.*** A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 2004. 137: 23-33.

158 - **Arrighi R. B. and Faye I.** Plasmodium falciparum GPI toxin: a common foe for man and mosquito. *Acta Trop* 2010. 114: 162-5.

159 - **Nebl T., De Veer M. J. and Schofield L.** Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 2005. 130 Suppl: S45-62.

160 - **Schofield L. and Hackett F.** Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993. 177: 145-53.

161 - **Perkins D. J., Polumuri S. K., Pennini M. E., Lai W., Xie P. and Vogel S. N.** Reprogramming of murine macrophages through TLR2 confers viral resistance via TRAF3-mediated, enhanced interferon production. *PLoS Pathog* 2013. 9: e1003479.

162 - **Schofield L., Novakovic S., Gerold P., Schwarz R. T., McConville M. J. and Tachado S. D.** Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996. 156: 1886-96.

163 - **Coban C., Ishii K. J., Kawai T., Hemmi H., Sato S., Uematsu S. *et al.*** Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005. 201: 19-25.

164 - **Parroche P., Lauw F. N., Goutagny N., Latz E., Monks B. G., Visintin A. *et al.*** Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104: 1919-24.

165 - **Schwarzer E., Turrini F., Ulliers D., Giribaldi G., Ginsburg H. and Arese P.** Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 1992. 176: 1033-41.

166 - **Schwarzer E. and Arese P.** Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1996. 1316: 169-75.

167 - **Scorza T., Magez S., Brys L. and De Baetselier P.** Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 1999. 21: 545-54.

168 - **Wu X., Gowda N. M., Kumar S. and Gowda D. C.** Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol* 2010. 184: 4338-48.

169 - **Togbe D., Schofield L., Grau G. E., Schnyder B., Boissay V., Charron S. *et al.*** Murine cerebral malaria development is independent of toll-like receptor signaling. *Am J Pathol* 2007. 170: 1640-8.

170 - **Sharma S., DeOliveira R. B., Kalantari P., Parroche P., Goutagny N., Jiang Z. *et al.*** Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome. *Immunity* 2011. 35: 194-207.

171 - **Pais T. F. and Chatterjee S.** Brain macrophage activation in murine cerebral malaria precedes accumulation of leukocytes and CD8+ T cell proliferation. *J Neuroimmunol* 2005. 163: 73-83.

172 - **Chua C. L., Brown G., Hamilton J. A., Rogerson S. and Boeuf P.** Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* 2013. 29: 26-34.

173 - **Woller G., Brandt E., Mittelstadt J., Rybakowski C. and Petersen F.** Platelet factor 4/CXCL4-stimulated human monocytes induce apoptosis in endothelial cells by the release of oxygen radicals. *J Leukoc Biol* 2008. 83: 936-45.

174 - **Imamura T., Sugiyama T., Cuevas L. E., Makunde R. and Nakamura S.** Expression of tissue factor, the clotting initiator, on macrophages in Plasmodium falciparum-infected placentas. *J Infect Dis* 2002. 186: 436-40.

175 - **Mecheri S.** Contribution of allergic inflammatory response to the pathogenesis of malaria disease. *Biochim Biophys Acta* 2012. 1822: 49-56.

176 - **Guermonprez P., Helft J., Claser C., Deroubaix S., Karanje H., Gazumyan A. *et al.*** Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection. *Nat Med* 2013. 19: 730-8.

177 - **Porcherie A., Mathieu C., Peronet R., Schneider E., Claver J., Commere P. H. *et al.*** Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med* 2011. 208: 2225-36.

178 - **Hansen D. S., Bernard N. J., Nie C. Q. and Schofield L.** NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. *J Immunol* 2007. 178: 5779-88.

179 - **Artavanis-Tsakonas K., Eleme K., McQueen K. L., Cheng N. W., Parham P., Davis D. M. *et al.*** Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 2003. 171: 5396-405.

180 - **Ryg-Cornejo V., Nie C. Q., Bernard N. J., Lundie R. J., Evans K. J., Crabb B. S. *et al.*** NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during Plasmodium berghei ANKA infection. *Immunobiology* 2013. 218: 263-71.

181 - **Piva L., Tetlak P., Claser C., Karjalainen K., Renia L. and Ruedl C.** Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2012. 189: 1128-32.

182 - **Maglinao M., Klopfleisch R., Seeberger P. H. and Lepenies B.** The C-Type Lectin Receptor DCIR Is Crucial for the Development of Experimental Cerebral Malaria. *J Immunol* 2013. 191: 2551-9.

183 - **Liu X. Q., Stacey K. J., Horne-Debets J. M., Cridland J. A., Fischer K., Narum D. *et al.*** Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *Eur J Immunol* 2012. 42: 3291-301.

184 - **Bockstal V., Geurts N. and Magez S.** Acute Disruption of Bone Marrow B Lymphopoiesis and Apoptosis of Transitional and Marginal Zone B Cells in the Spleen following a Blood-Stage Plasmodium chabaudi Infection in Mice. *J Parasitol Res* 2011. 2011: 534697.

185 - **Grau G. E., Piguet P. F., Engers H. D., Louis J. A., Vassalli P. and Lambert P. H.** L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol* 1986. 137: 2348-54.

186 - **Yanez D. M., Manning D. D., Cooley A. J., Weidanz W. P. and van der Heyde H. C.** Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 1996. 157: 1620-4.

187 - **Belnoue E., Kayibanda M., Vigario A. M., Deschemin J. C., van Rooijen N., Viguier M. *et al.*** On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2002. 169: 6369-75.

188 - **Bagot S., Nogueira F., Collette A., do Rosario V., Lemonier F., Cazenave P. A. *et al.*** Comparative study of brain CD8+ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage Plasmodium berghei ANKA involved in the development of cerebral malaria. *Infect Immun* 2004. 72: 2817-26.

189 - **Lau L. S., Fernandez Ruiz D., Davey G. M., de Koning-Ward T. F., Papenfuss A. T., Carbone F. R. *et al.*** Blood-stage Plasmodium berghei infection generates a potent, specific CD8+ T-cell response despite residence largely in cells lacking MHC I processing machinery. *J Infect Dis* 2011. 204: 1989-96.

190 - **Miyakoda M., Kimura D., Yuda M., Chinzei Y., Shibata Y., Honma K. *et al.*** Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of Plasmodium berghei infection. *J Immunol* 2008. 181: 1420-8.

191 - **Gromme M. and Neefjes J.** Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002. 39: 181-202.

192 - **Suidan G. L., McDole J. R., Chen Y., Pirko I. and Johnson A. J.** Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS One* 2008. 3: e3037.

193 - **Yewdell J. W.** Immunology. Hide and seek in the peptidome. *Science* 2003. 301: 1334-5.

194 - **Amante F. H., Haque A., Stanley A. C., Rivera Fde L., Randall L. M., Wilson Y. A. *et al.*** Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2010. 185: 3632-42.

195 - **Villegas-Mendez A., Greig R., Shaw T. N., de Souza J. B., Gwyer Findlay E., Stumhofer J. S. *et al.*** IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* 2012. 189: 968-79.

196 - **Nitcheu J., Bonduelle O., Combadiere C., Tefit M., Seilhean D., Mazier D. *et al.*** Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* 2003. 170: 2221-8.

197 - **Belnoue E., Potter S. M., Rosa D. S., Mauduit M., Gruner A. C., Kayibanda M. *et al.*** Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol* 2008. 30: 544-53.

198 - **Hansen D. S., Siomos M. A., De Koning-Ward T., Buckingham L., Crabb B. S. and Schofield L.** CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *Eur J Immunol* 2003. 33: 2588-98.

199 - **Bueno L. L., Morais C. G., Lacerda M. V., Fujiwara R. T. and Braga E. M.** Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural Plasmodium vivax infection. *Acta Trop* 2012. 123: 53-7.

200 - **Ishida H., Matsuzaki-Moriya C., Imai T., Yanagisawa K., Nojima Y., Suzue K. *et al.*** Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem Biophys Res Commun* 2010. 402: 790-5.

201 - **Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M. *et al.*** Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007. 13: 1173-5.

202 - **Hisaeda H., Maekawa Y., Iwakawa D., Okada H., Himeno K., Kishihara K. *et al.*** Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 2004. 10: 29-30.

203 - **Amante F. H., Stanley A. C., Randall L. M., Zhou Y., Haque A., McSweeney K. *et al.*** A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 2007. 171: 548-59.

204 - **Haque A., Best S. E., Amante F. H., Mustafah S., Desbarrieres L., de Labastida F. *et al.*** CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS Pathog* 2010. 6: e1001221.

205 - **Vigario A. M., Gorgette O., Dujardin H. C., Cruz T., Cazenave P. A., Six A. *et al.*** Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2007. 37: 963-73.

206 - **Couper K. N., Blount D. G., Wilson M. S., Hafalla J. C., Belkaid Y., Kamanaka M. *et al.*** IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* 2008. 4: e1000004.

207 - **Nie C. Q., Bernard N. J., Schofield L. and Hansen D. S.** CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of Plasmodium berghei-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect Immun* 2007. 75: 2275-82.

208 - **Cambos M., Belanger B., Jacques A., Roulet A. and Scorza T.** Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during Plasmodium chabaudi adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol* 2008. 38: 229-38.

209 - **Wu J. J., Chen G., Liu J., Wang T., Zheng W. and Cao Y. M.** Natural regulatory T cells mediate the development of cerebral malaria by modifying the pro-inflammatory response. *Parasitol Int* 2010. 59: 232-41.

210 - **Finney O. C., Riley E. M. and Walther M.** Regulatory T cells in malaria--friend or foe? *Trends Immunol* 2010. 31: 63-70.

211 - **Isakov N.** PKCtheta : is a Key Regulator of T-cell Behavior and a Drug Target for T cell-mediated Diseases. *J Clin Cell Immunol* 2012. S12: 008: doi:10.4172/2155-9899.S12-008.

212 - **Meller N., Elitzur Y. and Isakov N.** Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction. *Cell Immunol* 1999. 193: 185-93.

213 - **Cohen S., Braiman A., Shubinsky G. and Isakov N.** Protein kinase C-theta in platelet activation. *FEBS Lett* 2011. 585: 3208-15.

214 - **Chang J. D., Xu Y., Raychowdhury M. K. and Ware J. A.** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase C (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J Biol Chem* 1993. 268: 14208-14.

215 - **Pfeifhofer C., Kofler K., Gruber T., Tabrizi N. G., Lutz C., Maly K. *et al.*** Protein kinase C theta affects Ca2+ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. *J Exp Med* 2003. 197: 1525-35.

216 - **Marsland B. J., Soos T. J., Spath G., Littman D. R. and Kopf M.** Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. *J Exp Med* 2004. 200: 181-9.

217 - **Salek-Ardakani S., So T., Halteman B. S., Altman A. and Croft M.** Protein kinase Ctheta controls Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005. 175: 7635-41.

218 - **Ohayon A., Dong G. and Isakov N.** Involvement of PKCθ in CD4+ T-cell polarization and mouse resistance to cutaneous leishmaniasis 2007. p. 221-238. In N. Isakov (ed.), Lymphocyte activation and signal transduction. Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India.

219 - **Anderson K., Fitzgerald M., Dupont M., Wang T., Paz N., Dorsch M. *et al.*** Mice deficient in PKC theta demonstrate impaired in vivo T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases. *Autoimmunity* 2006. 39: 469-78.

220 - **Baier G. and Wagner J.** PKC inhibitors: potential in T cell-dependent immune diseases. *Curr Opin Cell Biol* 2009. 21: 262-7.

221 - **Vignali D. A. and Kuchroo V. K.** IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 2012. 13: 722-8.

222 - **Trinchieri G.** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 133-46.

223 - **Korzenik J. R. and Podolsky D. K.** Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006. 5: 197-209.

224 - **Yap G., Pesin M. and Sher A.** Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii. *J Immunol* 2000. 165: 628-31.

225 - **Park A. Y., Hondowicz B. D. and Scott P.** IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection. *J Immunol* 2000. 165: 896-902.

226 - **Scharton-Kersten T., Caspar P., Sher A. and Denkers E. Y.** Toxoplasma gondii: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 1996. 84: 102-14.

227 - **Lyke K. E., Dabo A., Arama C., Daou M., Diarra I., Wang A. *et al.*** Reduced T regulatory cell response during acute Plasmodium falciparum infection in Malian children co-infected with Schistosoma haematobium. *PLoS ONE* 2012. 7: e31647.

228 - **Naka I., Patarapotikul J., Tokunaga K., Hananantachai H., Tsuchiya N. and Ohashi J.** A replication study of the association between the IL12B promoter allele CTCTAA and susceptibility to cerebral malaria in Thai population. *Malar J* 2009. 8: 290.

229 - **Sedegah M., Finkelman F. and Hoffman S. L.** Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. 91: 10700-2.

230 - **Schmidt K. E., Schumak B., Specht S., Dubben B., Limmer A. and Hoerauf A.** Induction of pro-inflammatory mediators in Plasmodium berghei infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes Infect* 2011. 13: 828-36.

231 - **Takaoka A. and Yanai H.** Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006. 8: 907-22.

232 - **Lopusna K., Rezuchova I., Betakova T., Skovranova L., Tomaskova J., Lukacikova L. *et al.*** Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol* 2013. 57: 171-9.

233 - **McCall M. B. and Sauerwein R. W.** Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol* 2010. 88: 1131-43.

234 - **Grau G. E., Heremans H., Piguet P. F., Pointaire P., Lambert P. H., Billiau A. *et al.*** Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. 86: 5572-4.

235 - **Cabantous S., Poudiougou B., Traore A., Keita M., Cisse M. B., Doumbo O. *et al.*** Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *J Infect Dis* 2005. 192: 854-60.

236 - **Mirghani H. A., Eltahir H. G., TM A. E., Mirghani Y. A., Elbashir M. I. and Adam I.** Cytokine profiles in children with severe Plasmodium falciparum malaria in an area of unstable malaria transmission in central Sudan. *J Trop Pediatr* 2011. 57: 392-5.

237 - **Su Z. and Stevenson M. M.** IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice. *J Immunol* 2002. 168: 1348-55.

238 - **Villegas-Mendez A., de Souza J. B., Murungi L., Hafalla J. C., Shaw T. N., Greig R. *et al.*** Heterogeneous and tissue-specific regulation of effector T cell responses by IFN-gamma during Plasmodium berghei ANKA infection. *J Immunol* 2011. 187: 2885-97.

239 - **Trinchieri G.** Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010. 207: 2053-63.

240 - **Kalinke U. and Prinz M.** Endogenous, or therapeutically induced, type I interferon responses differentially modulate Th1/Th17-mediated autoimmunity in the CNS. *Immunol Cell Biol* 2012. 90: 505-9.

241 - **Filen S., Ylikoski E., Tripathi S., West A., Bjorkman M., Nystrom J. *et al.*** Activating transcription factor 3 is a positive regulator of human IFNG gene expression. *J Immunol* 2010. 184: 4990-9.

242 - **Carrero J. A., Calderon B. and Unanue E. R.** Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *J Exp Med* 2004. 200: 535-40.

243 - **Desvignes L., Wolf A. J. and Ernst J. D.** Dynamic roles of type I and type II IFNs in early infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 2012. 188: 6205-15.

244 - **Prinz M., Schmidt H., Mildner A., Knobeloch K. P., Hanisch U. K., Raasch J. *et al.*** Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008. 28: 675-86.

245 - **Erdman L. K. and Kain K. C.** Taking the sting out of malaria. *Immunity* 2011. 35: 149-51.

246 - **Luty A. J., Perkins D. J., Lell B., Schmidt-Ott R., Lehman L. G., Luckner D. *et al.*** Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 2000. 68: 3909-15.

247 - **Vigario A. M., Belnoue E., Gruner A. C., Mauduit M., Kayibanda M., Deschemin J. C. *et al.*** Recombinant human IFN-alpha inhibits cerebral malaria and reduces parasite burden in mice. *J Immunol* 2007. 178: 6416-25.

248 - **Morrell C. N., Srivastava K., Swaim A., Lee M. T., Chen J., Nagineni C. *et al.*** Beta interferon suppresses the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2011. 79: 1750-8.

249 - **Haque A., Best S. E., Ammerdorffer A., Desbarrieres L., de Oca M. M., Amante F. H. *et al.*** Type I interferons suppress CD4(+) T-cell-dependent parasite control during blood-stage Plasmodium infection. *Eur J Immunol* 2011. 41: 2688-98.

250 - **Langhorne J., Ndungu F. M., Sponaas A. M. and Marsh K.** Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008. 9: 725-32.

251 - **Wilson E. H., Weninger W. and Hunter C. A.** Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 2010. 120: 1368-79.

252 - **Van den Steen P. E., Deroost K., Van Aelst I., Geurts N., Martens E., Struyf S. *et al.*** CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol* 2008. 38: 1082-95.

253 - **Belnoue E., Costa F. T., Vigario A. M., Voza T., Gonnet F., Landau I. *et al.*** Chemokine receptor CCR2 is not essential for the development of experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2003. 71: 3648-51.

254 - **Belnoue E., Kayibanda M., Deschemin J. C., Viguier M., Mack M., Kuziel W. A. *et al.*** CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 2003. 101: 4253-9.

255 - **Billottet C., Quemener C. and Bikfalvi A.** CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013. 1836: 287-95.

256 - **Campanella G. S., Tager A. M., El Khoury J. K., Thomas S. Y., Abrazinski T. A., Manice L. A. *et al.*** Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. 105: 4814-9.

257 - **Miu J., Mitchell A. J., Muller M., Carter S. L., Manders P. M., McQuillan J. A. *et al.*** Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* 2008. 180: 1217-30.

258 - **Hamby M. E., Coppola G., Ao Y., Geschwind D. H., Khakh B. S. and Sofroniew M. V.** Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple g-protein-coupled receptors. *J Neurosci* 2012. 32: 14489-510.

259 - **Zganiacz A., Santosuosso M., Wang J., Yang T., Chen L., Anzulovic M. *et al.*** TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 2004. 113: 401-13.

260 - **Grau G. E., Lambert P. H., Vassalli P. and Piguet P. F.** [Tumor necrosis factor (TNF) and pathology; its relationships with other cytokines]. *Schweiz Med Wochenschr* 1989. 119: 1756-61.

261 - **Kern P., Hemmer C. J., Van Damme J., Gruss H. J. and Dietrich M.** Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. *Am J Med* 1989. 87: 139-43.

262 - **Kwiatkowski D., Hill A. V., Sambou I., Twumasi P., Castracane J., Manogue K. R. *et al.*** TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 1990. 336: 1201-4.

263 - **Wassmer S. C., Moxon C. A., Taylor T., Grau G. E., Molyneux M. E. and Craig A. G.** Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. *Cell Microbiol* 2011. 13: 198-209.

264 - **Hermsen C. C., Crommert J. V., Fredix H., Sauerwein R. W. and Eling W. M.** Circulating tumour necrosis factor alpha is not involved in the development of cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected C57Bl mice. *Parasite Immunol* 1997. 19: 571-7.

265 - **Rudin W., Eugster H. P., Bordmann G., Bonato J., Muller M., Yamage M. *et al.*** Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor-alpha/beta-deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *Am J Pathol* 1997. 150: 257-66.

266 - **Engwerda C. R., Mynott T. L., Sawhney S., De Souza J. B., Bickle Q. D. and Kaye P. M.** Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* 2002. 195: 1371-7.

267 - **Watts T. H. and Gommerman J. L.** The LIGHT and DARC sides of herpesvirus entry mediator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. 102: 13365-6.

268 - **Adrain C., Murphy B. M. and Martin S. J.** Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* 2005. 280: 4663-73.

269 - **Anthony D. A., Andrews D. M., Watt S. V., Trapani J. A. and Smyth M. J.** Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev* 2010. 235: 73-92.

270 - **Ewen C. L., Kane K. P. and Bleackley R. C.** A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ* 2012. 19: 28-35.

271 - **Bolitho P., Voskoboinik I., Trapani J. A. and Smyth M. J.** Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* 2007. 19: 339-47.

272 - **Hermsen C. C., Konijnenberg Y., Mulder L., Loe C., van Deuren M., van der Meer J. W. *et al.*** Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. *Clin Exp Immunol* 2003. 132: 467-72.

273 - **Haque A., Best S. E., Unosson K., Amante F. H., de Labastida F., Anstey N. M. *et al.*** Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2011. 186: 6148-56.

274 - **Potter S., Chan-Ling T., Ball H. J., Mansour H., Mitchell A., Maluish L. *et al.*** Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006. 36: 485-96.

275 - **Renia L., Potter S. M., Mauduit M., Rosa D. S., Kayibanda M., Deschemin J. C. *et al.*** Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006. 36: 547-54.

276 - **Chaudhary D. and Kasaian M.** PKCtheta: A potential therapeutic target for T-cell-mediated diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 2006. 7: 432-7.

277 - **Ohayon A., Golenser J., Sinay R., Tamir A., Altman A., Pollack Y. *et al.*** Protein kinase C theta deficiency increases resistance of C57BL/6J mice to Plasmodium berghei infection-induced cerebral malaria. *Infect Immun* 2010. 78: 4195-205.

278 - **Hviid L. and Kemp K.** What is the cause of lymphopenia in malaria? *Infect Immun* 2000. 68: 6087-9.

279 - **Marquet S., Doumbo O., Cabantous S., Poudiougou B., Argiro L., Safeukui I. *et al.*** A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria. *Hum Mol Genet* 2008. 17: 2190-5.

280 - **Stevenson M. M., Tam M. F., Wolf S. F. and Sher A.** IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 1995. 155: 2545-56.

281 - **Normaznah Y., Halim A. A., Outhayphone M. and Zamri M. R.** Protective immunity against Plasmodium berghei malaria after administration of interleukin-12. *Malays J Pathol* 1999. 21: 123-5.

282 - **Srivastava K. K., Batra S., Sassano A., Li Y., Majchrzak B., Kiyokawa H. *et al.*** Engagement of protein kinase C-theta in interferon signaling in T-cells. *J Biol Chem* 2004. 279: 29911-20.

283 - **Giannoni F., Lyon A. B., Wareing M. D., Dias P. B. and Sarawar S. R.** Protein kinase C theta is not essential for T-cell-mediated clearance of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 2005. 79: 6808-13.

284 - **Sun Z., Arendt C. W., Ellmeier W., Schaeffer E. M., Sunshine M. J., Gandhi L. *et al.*** PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 2000. 404: 402-7.

285 - **Barouch-Bentov R., Lemmens E. E., Hu J., Janssen E. M., Droin N. M., Song J. *et al.*** Protein kinase C-theta is an early survival factor required for differentiation of effector CD8+ T cells. *J Immunol* 2005. 175: 5126-34.

286 - **Krzewski K., Chen X., Orange J. S. and Strominger J. L.** Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol* 2006. 173: 121-32.

287 - **Aguilo J. I., Garaude J., Pardo J., Villalba M. and Anel A.** Protein kinase C-theta is required for NK cell activation and in vivo control of tumor progression. *J Immunol* 2009. 182: 1972-81.

288 - **Rigor R. R., Beard R. S., Jr., Litovka O. P. and Yuan S. Y.** Interleukin-1beta-induced barrier dysfunction is signaled through PKC-theta in human brain microvascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012. 302: C1513-22.

289 - **Kordes M., Matuschewski K. and Hafalla J. C.** Caspase-1 activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2011. 79: 3633-41.

290 - **Turowski P., Adamson P. and Greenwood J.** Pharmacological targeting of ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* 2005. 25: 153-70.

291 - **Zhang L., Prather D., Vanden Eng J., Crawford S., Kariuki S., ter Kuile F. *et al.*** Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. *Malar J* 2010. 9: 87.

292 - **Melillo A. A., Foreman O. and Elkins K. L.** IL-12Rbeta2 is critical for survival of primary Francisella tularensis LVS infection. *J Leukoc Biol* 2013. 93: 657-67.

293 - **Kumaraguru U., Davis I. A., Deshpande S., Tevethia S. S. and Rouse B. T.** Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J Immunol* 2001. 166: 1066-74.

294 - **Sin J. I., Park J. B., Lee I. H., Park D., Choi Y. S., Choe J. *et al.*** Intratumoral electroporation of IL-12 cDNA eradicates established melanomas by Trp2(180-188)-specific CD8+ CTLs in a perforin/granzyme-mediated and IFN-gamma-dependent manner: application of Trp2(180-188) peptides. *Cancer Immunol Immunother* 2012. 61: 1671-82.

295 - **Reddy M., Wong J., Davis C. and Prabhakar U.** Co-expression of IL-12 receptors along with CXCR3 and CD25 on activated peripheral blood T lymphocytes. *Cell Immunol* 2005. 236: 123-30.

296 - **Collison L. W., Delgoffe G. M., Guy C. S., Vignali K. M., Chaturvedi V., Fairweather D. *et al.*** The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* 2012. 13: 290-9.

297 - **Wang Z., Liu J. Q., Liu Z., Shen R., Zhang G., Xu J. *et al.*** Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. *J Immunol* 2013. 190: 2415-23.

298 - **Becher B., Durell B. G. and Noelle R. J.** Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002. 110: 493-7.

299 - **Elkins K. L., Cooper A., Colombini S. M., Cowley S. C. and Kieffer T. L.** In vivo clearance of an intracellular bacterium, Francisella tularensis LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70. *Infect Immun* 2002. 70: 1936-48.

300 - **Jana M. and Pahan K.** Induction of lymphotoxin-alpha by interleukin-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, but not IL-12 p70. *Immunology* 2009. 127: 312-25.

301 - **Rosas L. E., Satoskar A. A., Roth K. M., Keiser T. L., Barbi J., Hunter C. *et al.*** Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 2006. 168: 158-69.

302 - **Villegas-Mendez A., de Souza J. B., Lavelle S. W., Gwyer Findlay E., Shaw T. N., van Rooijen N. *et al.*** IL-27 receptor signalling restricts the formation of pathogenic, terminally differentiated Th1 cells during malaria infection by repressing IL-12 dependent signals. *PLoS Pathog* 2013. 9: e1003293.

303 - **Coban C., Igari Y., Yagi M., Reimer T., Koyama S., Aoshi T. *et al.*** Immunogenicity of whole-parasite vaccines against Plasmodium falciparum involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 2010. 7: 50-61.

304 - **McQuillan J. A., Mitchell A. J., Ho Y. F., Combes V., Ball H. J., Golenser J. *et al.*** Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2011. 41: 155-63.

305 - **Ball E. A., Sambo M. R., Martins M., Trovoada M. J., Benchimol C., Costa J. *et al.*** IFNAR1 controls progression to cerebral malaria in children and CD8+ T cell brain pathology in Plasmodium berghei-infected mice. *J Immunol* 2013. 190: 5118-27.

306 - **Marrack P., Kappler J. and Mitchell T.** Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999. 189: 521-30.

307 - **Nie C. Q., Bernard N. J., Norman M. U., Amante F. H., Lundie R. J., Crabb B. S. *et al.*** IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog* 2009. 5: e1000369.

308 - **Jha A. N., Singh V. K., Singh R., Pati S. S., Patra P. K., Singh L. *et al.*** A rare non-synonymous c.102C>G SNP in the IFNB1 gene might be a risk factor for cerebral malaria in Indian populations. *Infect Genet Evol* 2013. 14: 369-74.

309 - **Milner D., Jr., Factor R., Whitten R., Carr R. A., Kamiza S., Pinkus G. *et al.*** Pulmonary pathology in pediatric cerebral malaria. *Hum Pathol* 2013.

310 - **Bottger E., Grangeiro de Carvalho E., Meese S., Kun J. F. and Esen M.** Expression of interleukin-6 family receptors in NK92 cells is regulated by cytokines and not through direct interaction with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Interferon Cytokine Res* 2013. 33: 65-71.

311 - **Dunn G. P., Koebel C. M. and Schreiber R. D.** Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006. 6: 836-48.

312 - **Leung C. C., Lam T. H., Chan W. M., Yew W. W., Ho K. S., Leung G. M. *et al.*** Diabetic control and risk of tuberculosis: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2008. 167: 1486-94.

313 - **Marx G. E. and Chan E. D.** Tuberculous meningitis: diagnosis and treatment overview. *Tuberc Res Treat* 2011. 2011: 798764.

314 - **O'Garra A., Redford P. S., McNab F. W., Bloom C. I., Wilkinson R. J. and Berry M. P.** The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013. 31: 475-527.

315 - **Magez S., Radwanska M., Drennan M., Fick L., Baral T. N., Allie N. *et al.*** Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated Trypanosoma congolense parasite killing. *J Infect Dis* 2007. 196: 954-62.

316 - **Masocha W. and Kristensson K.** Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence* 2012. 3: 202-12.

317 - **Feustel S. M., Meissner M. and Liesenfeld O.** Toxoplasma gondii and the blood-brain barrier. *Virulence* 2012. 3: 182-92.

318 - **Silva N. M., Manzan R. M., Carneiro W. P., Milanezi C. M., Silva J. S., Ferro E. A. *et al.*** Toxoplasma gondii: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. *Exp Parasitol* 2010. 126: 167-77.

319 - **Goldszmid R. S. and Trinchieri G.** The price of immunity. *Nat Immunol* 2012. 13: 932-8.

320 - **Torres M., Guiton R., Lacroix-Lamande S., Ryffel B., Leman S. and Dimier-Poisson I.** MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to Toxoplasma gondii infection. *J Neuroinflammation* 2013. 10: 19.

321 - **Alkali N. H., Bwala S. A., Nyandaiti Y. W. and Danesi M. A.** NeuroAIDS in sub-Saharan Africa: a clinical review. *Ann Afr Med* 2013. 12: 1-10.

322 - **Zhang E. Y., Kong K. F. and Altman A.** The yin and yang of protein kinase C-theta (PKCtheta): a novel drug target for selective immunosuppression. *Adv Pharmacol* 2013. 66: 267-312.

323 - **Russ G. R., Tedesco-Silva H., Kuypers D. R., Cohney S., Langer R. M., Witzke O. *et al.*** Efficacy of sotrastaurin plus tacrolimus after de novo kidney transplantation: randomized, phase II trial results. *Am J Transplant* 2013. 13: 1746-56.

Jennifer PALOMO

Etude des réponses immunitaires de l'hôte dans la pathogenèse d'infections : modèles murins de mucoviscidose et malaria

La mucoviscidose est une pathologie pulmonaire causée par un dysfonctionnement du canal CFTR et caractérisée par un mucus visqueux, une susceptibilité accrue aux infections chroniques et une inflammation excessive. Une première partie de ma thèse a eu pour objectif d'étudier les mécanismes inflammatoires impliqués dans le développement de la pathologie. Nous avons plus particulièrement analysé le rôle de l'IL-1β et de l'IL-17 dans la réponse à l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*, dans le modèle murin ΔF508 de mucoviscidose.

La seconde partie de ma thèse a porté sur l'étude de la malaria pulmonaire et cérébrale, une complication létale de l'infection à *P. falciparum*. Nous avons mis en évidence l'importance de trois voies d'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques dans le développement de la neuropathologie induite par *Plasmodium berghei* ANKA chez la souris : la protéine PKC-θ, la sous-unité β2 du récepteur à l'IL-12 et le récepteur des IFN de type I, mais qui ne semblent pas impliquées dans l'inflammation pulmonaire associée.

Mots-clés : mucoviscidose, *P. aeruginosa,* IL-1β, IL-17 ; malaria pulmonaire et cérébrale, *Pb*A, PKC-θ, IL-12Rβ2, IFN de type I

Host immune response in the pathogenesis of infection: murine models of cystic fibrosis and malaria

Cystic fibrosis is a pulmonary pathology, caused by the CFTR channel dysfunction, and characterized by high mucus viscosity, increased sensitivity to chronic infections and excessive inflammation. The aim of my thesis was first to study the inflammatory mechanisms involved in this lung pathology. Indeed, we analyzed the role of IL-1β and IL-17 in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection, in the ΔF508 mouse model of cystic fibrosis.

In the second part of my thesis, I studied pulmonary and cerebral malaria, a lethal complication of *P. falciparum* infection. We showed the importance of three pathways implicated in cytotoxic $CD8^+$ T lymphocytes activation during the *Plasmodium berghei* ANKA-induced neuropathology development in mice: PKC-θ protein, β2 subunit of IL-12 receptor and type I IFN receptor, which did not seem essential for the associated lung inflammation.

Key words**: Cystic fibrosis, *P. aeruginosa*, IL-1β, IL-17; pulmonary and cerebral malaria, *Pb*A, PKC-θ, IL-12Rβ2, type I IFN**

Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans