

## « MOLECULAR APPROACHES TO MALARIA » (MAM 2004) LORNE - VICTORIA, AUSTRALIE, 1<sup>ER</sup> AU 5 FÉVRIER 2004

V. COMBES, G.E. GRAU

• Travail du Laboratoire d'Immunopathologie (V.C., Ph.D; G.E.G., M.D., Ph.D, Professeur des universités), Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, IFR48 Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France.

• Courriel : georges.grau@medecine.univ-mrs.fr • georges.grau@wanadoo.fr •

Ce congrès international, qui s'intitule *Approches moléculaires du paludisme (Molecular Approaches to Malaria)*, <http://www.mam2004.org>, a pour but de réunir plus de 380 chercheurs venus de nombreuses régions du monde (Europe, Afrique, Australie, Asie, Amérique du Nord, Amérique du Sud) afin que ceux-ci partagent leurs dernières avancées dans le domaine du paludisme.

Ces différents travaux ont tous pour but de mieux comprendre les bases moléculaires non seulement de la biologie ou de la pathogénicité du parasite mais également des mécanismes qui contrôlent la sévérité de la maladie, l'immunité anti-parasite ou la réponse de l'hôte. Pour cela des approches de biologie cellulaire, moléculaire, structurale, de génomique et de protéomique ont été utilisées.

Le congrès s'est ainsi articulé sur 4 jours autour de 13 thèmes majeurs : invasion du globule rouge par le parasite, gènes de virulence, trafic moléculaire et biologie cellulaire, immunité, cibles médicamenteuses, résistance au traitement, pathogénèse, génomique, micro-arrays, métabolisme et physiologie du parasite, stades sexués du parasites, vaccins, génomique structurale et protéomique.

Dans une conférence inaugurale, Kevin Marsh (KEMRI, Kilifi, Kenya) a présenté les différentes raisons qui font, qu'à ce jour, il est encore difficile de comprendre ce qui permet à certains individus de développer une immunité anti-paludisme, c'est à dire être réinfectés par le parasite mais ne pas développer de complications, alors que d'autres ne le peuvent pas. Ces raisons regroupent aussi bien le manque de connaissances sur la réponse immune induite par le parasite que la capacité du parasite à se modifier afin d'échapper aux défenses de l'hôte.

Cependant, grâce au séquençage complet du génome de *Plasmodium falciparum*, on peut, grâce à l'énorme masse de données qui est maintenant disponible, espérer identifier le rôle des gènes et donc les protéines importantes dans le développement de la maladie (David Roos, University of Pennsylvania, Philadelphia) et ainsi intervenir à leur niveau afin d'empêcher l'infection ou de prévenir les complications les plus graves.

### Invasion du globule rouge par le parasite

Afin de pouvoir prévenir l'infection des globules rouges par le parasite, il est nécessaire de connaître les mécanismes ainsi que les molécules impliqués dans le phénomène d'invasion. Les recherches dans ce domaine concernent les membres de la famille des molécules se fixant à l'antigène Duffy ou aux réticulocytes, mais également les molécules parasitaires se fixant aux érythrocytes telles que *EBA-175* qui se lie à la glycophorine A, antigène majeur de la surface érythrocytaire et ligand parasitaire connu depuis de nombreuses années. C'est ce à quoi s'intéressent les équipes d'Alan Cowman (WEHI, Melbourne, Australie) et de Chetan Chitnis (ICGEB, New Delhi, Inde). En développant un grand nombre de molécules modifiées, ces équipes espèrent définir les structures qui sont indispensables à l'accrochage du parasite à la surface de l'érythrocyte et ainsi pouvoir intervenir à leur niveau à l'aide de molécules inhibitrices.

Afin d'identifier et de localiser de nouvelles protéines d'intérêt mises en avant par les études de génomique, de nouvelles technologies de marquage par des sondes fluorescentes ont été

développées et ont donné lieu à de superbes images par les équipes de Doron Greenbaum (University of California, San Francisco), de Tony Holder (NIMR, London) et de Matthew Bogyo (Stanford Medical School, California) permettant d'identifier une protéase parasitaire qui pourrait devenir une cible thérapeutique. L'équipe de D. Soldati (Imperial College, London et Centre Médical Universitaire, Genève) a réalisé une dissection fonctionnelle des mécanismes de motilité et d'invasion chez les apicomplexes.

### Gènes de virulence

Une des caractéristiques principales de *Plasmodium*, rendant la fabrication d'un vaccin efficace délicate, est sa capacité à se modifier très rapidement dans l'organisme afin d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. C'est seulement par l'étude des mécanismes moléculaires très fins qui régulent les gènes var que l'on pourra comprendre la mise en place de ce phénomène et sa modulation. Ces gènes se situent dans des régions très précises, particulièrement dans les télomères (situés aux extrémités des chromosomes). Ces études ont été réalisées par les équipes d'Arthur Scherf (Institut Pasteur, Paris), de Ron Dzikowski (Cornell University, New York), Till Voss (WEHI, Melbourne), Peter Beck (Institut Tropical Suisse, Basel, Suisse), Michael Duffy (University of Melbourne) et Hemando del Portillo (University of Sao Paulo, Brésil).

### Trafic moléculaire et biologie cellulaire

Lors de sa pénétration dans l'érythrocyte, le parasite induit toute une machinerie afin de favoriser sa

maturation et sa propagation à d'autres cellules. En effet, des molécules parasitaires vont être exprimées par le globule rouge qui en était dépourvu au départ. Ces études ont donné lieu à des analyses en microscopie électronique des différents stades de maturation du parasite et à la mise en évidence de nouvelles structures à l'intérieur du globule rouge. La majorité de ces analyses a été initiée par Lawrie Bannister (King's College, London), montrant, à l'heure de la génomique, l'importance de la morphologie, ce qui a été corroboré par les résultats de l'équipe de Lean Tilley (La Trobe University, Bundoora, Australia) permettant de mieux comprendre les mécanismes de trafic intracellulaire aboutissant à une localisation précise de molécules parasitaires. Parmi ces structures permettant l'expression des antigènes parasitaires à la surface érythrocytaire, on retrouve l'étude des «Maurer's clefts», sortes de canaux impliqués dans le transport d'une molécule majeure de *Plasmodium falciparum* : PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) par l'équipe de Brian Cooke (Monash University, Clayton, Australia).

### Immunité

Lors de l'infection par *Plasmodium*, c'est la réponse immune de l'hôte, modulée par différentes cytokines, qui va lui permettre de combattre cette infection. Dans cette réponse, différents types cellulaires sont impliqués de façon majeure. C'est le cas des lymphocytes T CD8+ mémoires qui permettent de prévenir le développement du parasite lorsque celui-ci est en stade hépatique. L'action de ces cellules serait modulée par l'IL-4 comme l'a montré Fidel Zavala (Johns Hopkins University, Baltimore USA). D'autre part, la protection contre les stades sanguins du parasite nécessite l'action de lymphocytes T CD4+ et de lymphocytes B, comme cela a été montré il y a plusieurs années. L'équipe de Jean Langhorne (National Institute of Medical Research, Londres) a utilisé le modèle murin d'infection par *Plasmodium chabaudi* (parasite infectant unique-

ment les rongeurs) pour montrer que la présentation au système immunitaire de la protéine MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1), une protéine d'un des stades sanguins du parasite, entraîne l'activation des lymphocytes T CD4+ qui interviennent alors dans la clairance parasitaire. La réponse immune contre MSP-1 a également été explorée par l'équipe de James Kazura (*Case Western Reserve University, Kenya*) chez des malades (enfants et adultes) au Kenya. L'ensemble des mécanismes de réponse de type Th-1 peut être mis à profit afin de définir de nouvelles stratégies vaccinales comme l'a présenté Michael Good (*The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia*).

### Cibles médicamenteuses et résistance au traitement

Un des problèmes majeurs du traitement des patients par les anti-paludiques est le développement alarmant à grande échelle, de la résistance des parasites à ces médicaments. Certaines zones d'Afrique présentent une résistance telle à la chloroquine, que cette molécule est devenue quasiment inutilisable. Nick White (Mahidol University, Bangkok, Thaïland) a ainsi montré que l'émergence de souches parasitaires résistantes est un problème majeur de santé publique et que l'utilisation de la combinaison de plusieurs principes actifs (association médicamenteuse), comme cela a été fait pour la lutte contre de nombreuses infections telles que la tuberculose, la lèpre, le sida, est une des voies à développer d'urgence. En effet, comme l'artémisinine n'a pas induit à ce jour de résistance, elle devrait être utilisée en association avec d'autres molécules ayant entraîné une résistance. Les mécanismes de résistance et donc d'échec du parasite au traitement sont explorés par différentes équipes dans le monde, plusieurs étant présentes à ce congrès : David Fidock, Albert Einstein College of Medicine, New York ; Ric. Price, Hôpital John Radcliffe, Oxford.

Afin de limiter voire d'empêcher l'émergence de cette résistance aux traitements, il est indispensable de développer de nouvelles molécules

qui vont agir sur des cibles différentes des précédentes. De nombreuses études ont été conduites dans ce sens. Une enzyme parasitaire de *Plasmodium*, la DHFR-TS (DiHydroFolate Reductase-Thymidylate Synthase), sur laquelle travaillent entre autres les équipes de Yongyuth Yuthawong (NSTDA Science Park, Thaïland) et Napaporn Winijnaiyapark (Mahidol University, Bangkok, Thaïland), pourrait être une cible intéressante.

### Pathogénèse

Si les traitements ont échoué, il est nécessaire de pouvoir prévenir le développement de complications qui sont souvent graves voire mortelles (paludisme gestationnel, anémie grave, neuropaludisme). Pour cela, il faut comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent ces complications (Chris Newbold, John Radcliffe Hospital, Oxford). L'adhérence des globules parasités à la surface des vaisseaux, que ce soit dans le cerveau (neuropaludisme) ou au niveau des syncytiotrophoblastes (paludisme gestationnel) est une des caractéristiques de ces complications. En effet le globule parasité utilise des antigènes présents à la surface des cellules endothéliales ou des syncytiotrophoblastes pour s'y fixer. Parmi ces molécules, on retrouve la CSA (Chondroïtine sulfate A, paludisme gestationnel) et ICAM-1 (Intra-Cellular Adhesion Molecule 1, neuropaludisme) étudiées respectivement par les équipes entre autres de Lars Hviid (Université de Copenhague, Danemark) et Alistair Craig (Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool).

Il faut également garder à l'esprit que l'infection palustre est souvent associée à d'autres parasitoses ou maladies virales telles que l'infection à VIH. L'équipe de Stephen Rogerson (*University of Melbourne, Melbourne*) a montré que chez des femmes enceintes au Malawi, l'infection à VIH altère leur immunité en diminuant la production d'immunoglobulines et rend donc ces femmes enceintes plus vulnérables aux complications telles que le paludisme gestationnel.

Au cours d'une deuxième session consacrée à la pathogénèse, 4 équipes (Georges Grau, Christian Engwerda, Nick Hunt et Louis Schofield) ont montré l'intérêt du modèle murin dans la compréhension des phénomènes aboutissant au syndrome cérébral. Georges Grau (Université de la Méditerranée, Marseille, France) a apporté de nouveaux éclaircissements sur le rôle maintenant reconnu des plaquettes dans l'altération endothéliale observée lors du neuropaludisme. D'autre part, un nouveau gène, ABCA1, de la famille des transporteurs à ATP, semble jouer un rôle dans la pathogénèse du neuropaludisme. En effet, la délétion de ce gène entraîne une protection complète contre les complications neurologiques du neuropaludisme, dans le modèle murin d'infection par *Plasmodium berghei* ANKA. Ce parasite de rongeurs entraîne un syndrome cérébral reproduisant, sur le plan histopathologique, celui que l'on retrouve chez l'enfant atteint de neuropaludisme. Ce gène pourrait ainsi être une cible thérapeutique potentielle si son implication dans la pathogénèse du neuropaludisme humain est démontrée. Ce gène contrôle notamment la production de microparticules. Des taux plasmatiques très élevés de microparticules d'origine endothéliale ont été décelés chez des enfants du Malawi atteints de neuropaludisme. Christian Engwerda (The Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia) a montré que la lymphotoxine alpha (LT-alpha, anciennement appelée TNF bêta), une cytokine de la famille du TNF (Tumour Necrosis Factor), acteur majeur du neuropaludisme, avait un rôle primordial dans cette pathogénèse, via une voie qui pourrait être complémentaire de celle du TNF. De plus, il a observé que l'expression de transcrits pour la LT-alpha est différente entre les extraits cérébraux totaux et les cellules endothéliales, suggérant une régulation différentielle de cette cytokine dans des populations cellulaires distinctes au cours du neuropaludisme. Nick Hunt (University of Sydney, Australia) s'intéresse, quant à lui, à la biochimie cérébrale du neuropaludisme. Son équipe a mis en évidence que la voie de l'acide quinoléinique, une molécule

neuroexcitotoxique (toxique pour les neurones) et sa voie inhibitrice, celle de l'acide kynurénique (acide aminé essentiel du métabolisme du tryptophane) sont significativement augmentées durant l'infection. Ces observations faites chez la souris ont été confirmées chez des patients adultes vietnamiens. Un déséquilibre d'expression de la voie neuroexcitotoxique (acide quinoléinique) par rapport à celle neuroprotectrice (acide kynurénique) pourrait être impliqué dans les complications neurologiques. Un autre volet de la pathogénèse a été exploré par Diana Hansen (WEHI, Melbourne, Australia) à travers l'étude de la réponse innée à l'infection via l'exploration des cellules Natural Killer (NK) et du complexe qui les contrôle (NKC). Cette équipe a montré que le polymorphisme au sein de ce complexe régulerait la pathogénèse du neuropaludisme et influencerait la balance des cytokines Th1/Th2 vers une activité Th1. Suite à des études réalisées dans ce modèle murin, Nick Anstey a étudié le rôle de l'oxyde nitrique (NO), un important neuromodulateur dont le rôle protecteur ou toxique est depuis longtemps débattu, ainsi que celui de l'enzyme responsable de la synthèse de NO (NOS2) et d'un acide aminé qui contrôle la synthèse de NO (arginine). La synthèse de NO étant dépendante de la concentration d'arginine, un défaut dans la production de celle-ci pourrait limiter la production de NO mais entraînerait une toxicité via NOS2 qui alors produit des ions superoxydes qui sont délétères.

#### Physiologie et métabolisme du parasite

Pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques il est également nécessaire de connaître le métabolisme et la physiologie du parasite. Lorsqu'elle est infectée par *Plasmodium falciparum*, la membrane des globules rouges devient plus perméable. Cette modification est due à la présence de canaux ioniques induits par le parasite (Plasmodial Surface Anion Channel). Cette molécule pourrait être une cible thérapeutique intéressante (S. Desai, NIH, Bethesda, USA). D'autre

part, l'équipe de Katja Becker (Interdisciplinary Research Center, University of Giessen, Allemagne) s'intéresse à des cibles potentielles pour des drogues anti-malariques. Parmi elles, la glutathion S-transférase, spécifique de *P. falciparum* (PfGST), est retrouvée en plus grande quantité dans les souches de parasites résistantes au traitement par la chloroquine. Des inhibiteurs de PfGST sont en cours de développement. Une nouvelle protéine spécifique de *P. falciparum* appelée plasmorédoxine offre la possibilité d'améliorer les outils diagnostiques et représente une cible spécifique pour le développement de molécules anti-malariques. L'équipe de Sanjeev Krishna (St George's Hospital Medical School, London) a présenté de nouveaux mécanismes d'action potentiels de l'artémisinine.

#### Stades sexuels du parasite

Outre le neuropaludisme, les modèles murins s'avèrent également très utiles pour définir de nouvelles cibles vaccinales et médicamenteuses, grâce à des études de génomique comparée de « plasmodium » (Andy Waters, Centre of Infectious Disease, Leiden University, The Netherlands). Une nouvelle kinase calcium dépendante, la CDPK4, est une molécule clé de la régulation de l'entrée en phase S du gamétoocyte mâle, au cours de son activation dans l'intestin moyen du moustique (Oliver Billker, Imperial College, London). L'équipe d'Elena Levashina (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg Germany), s'est, elle, intéressée, à la variabilité au niveau du vecteur, *Anopheles gambiae*. Un gène du moustique a été identifié, qui contrôle directement la charge parasitaire. Ce gène code pour une protéine « complement-like » TEP-1 dont le knock-out suffit à augmenter de façon significative le nombre d'oocystes chez les moustiques sensibles et pour transformer les moustiques résistants en moustiques sensibles. Deux parasites de rongeur, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*, ont été étudiés au niveau de leur stade hépatocytaire et ont révélé par des études de « profiling » d'expression de gènes plusieurs

gènes codant pour des protéines qui se localisent au niveau des organelles sécrétoires du sporozoïte (Lawrence Bergman, Drexel University, Philadelphia). Enfin, le protéome et l'épigénome de *P. falciparum* ont été analysés au moyen de techniques de spectrométrie de masse de haute précision et à grande échelle. Les analyses ont révélé plus de 1300 protéines dans les stades sanguins, plusieurs centaines au niveau des sporozoïtes et des oocystes (Henk Stunnenberg, University of Nijmegen, The Netherlands).

### Vaccins

Le développement de vaccins est bien sûr un domaine qui intéresse de nombreuses équipes de recherche. Plusieurs molécules font déjà l'objet d'essais cliniques de phase I et II. Il s'agit par exemple des molécules MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1, Jeff Lyon, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland), MSP-2 (Robin Anders, La Trobe University, Bundoora, Australia), MSP-4,5 (Ross Coppel, Monash University, Clayton, Australia). Le vaccin ayant pour cible MSP-2 a la capacité de faire diminuer la densité parasitaire.

### Protéomique et génomique structurale

Pour plusieurs chercheurs (Dan Caucchi, Naval Medical Center, Silver Spring, Maryland ; John Hyde University of Manchester, UK), le développement d'un vaccin efficace nécessitera le ciblage simultané de plusieurs antigènes parasitaires appartenant à plusieurs stades de développement. Il est cependant difficile de savoir quelles protéines, parmi les 5200 protéines connues maintenant pour être exprimées par le parasite, auront un rôle dans la protection conférée par une réponse immune naturelle ou celle

induite par des sporozoïtes atténués par irradiation. C'est grâce à la protéomique, ensemble de techniques associant la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse, qu'il sera possible de classer ces molécules et de déterminer celles qui seront d'intérêt dans le développement d'un vaccin. L'équipe de Rupa Ray (Duke University, Durham, USA) utilise des stratégies basées sur la protéomique pour découvrir de nouvelles drogues anti-paludiques et leurs cibles physiologiques au niveau de *P. falciparum*. Ces chercheurs ont réévalué les cibles moléculaires des quinolines en utilisant la technologie de « proteome minig ». De plus, grâce à une analyse du phosphoprotéome, ils ont commencé à définir les processus de phosphorylation distincts survenant au cours du cycle parasitaire et en réponse à divers éléments tels que des facteurs d'adhérence endothéliaux, des sérums hyper-immuns et même des hormones humaines. La transmission du paludisme repose sur le développement des formes sexuées du parasite, les gamétocytes, au sein du moustique. L'équipe d'Amit Sharma (ICGEB, New Delhi, India) s'intéresse à une protéine cytoplasmique essentielle pour cette gamétocytogenèse de *P. falciparum*, Pfg27. L'étude de sa structure cristalline et des sites de liaisons qu'elle contient ont permis d'identifier, par analyse du protéome de *P. falciparum*, de nombreux motifs protéiques potentiellement impliqués dans des voies de transduction du signal. Cette étude de la structure cristalline de différentes protéines impliquées dans l'invasion, la cytoadhérence et la gamétocytogenèse, fait également partie d'un programme dans lequel est impliquée l'équipe de Claudia Schnick (University of York, UK).

En conclusion, ce congrès a permis d'accéder à de nouvelles données dans le domaine du paludisme, et a permis aux chercheurs travaillant dans le même domaine, de confronter non seulement leurs approches mais également leurs conclusions. Cet excellent congrès a également été l'occasion de lancer de nouvelles collaborations qui vont permettre aux chercheurs de domaines différents de devenir complémentaires ■

## En direct

### ... DE PARIS - VACCINOLOGIE TROPICALE : AVANCÉES ET AVENIR

A. PRANGÉ, J.M. MILLELIRI

• Travail de l'Unité de virologie (A.P., Vétérinaire biologiste principal) et du Centre de documentation (J.M.M., Médecin principal), IMTSSA, BP 46, Le Pharo, 13998 Marseille Armées.

• Courriel : imtssa.asmt@wanadoo.fr •

Pas moins de douze interventions sont venues rythmer cette journée consacrée par la Société de Pathologie Exotique à la vaccinologie tropicale. Même s'il restait encore un peu de place dans l'amphithéâtre Duclaux abritant les débats de cette journée du 11 février 2004, l'assemblée était dense pour suivre les interventions très intéressantes qui se sont succédées.

Dans un état des lieux très large, le Dr. Patrick Zuber (zuberp@who.int) de l'OMS, a rappelé les avancées obtenues depuis la mise en place du Programme élargi de vaccination (PEV) en 1974 prévenant 800 000 décès annuels attribuables à la rougeole et 500 000 au tétanos et à la coqueluche.

Au moins 24 maladies infectieuses peuvent ou pourraient être évitées par la vaccination, aussi le développement