



HAL
open science

Rôle de l'interféron- γ dans la réponse immunitaire mucosale à l'infection par *Cryptosporidium parvum* chez la souris

Sonia Lacroix-Lamandé

► To cite this version:

Sonia Lacroix-Lamandé. Rôle de l'interféron- γ dans la réponse immunitaire mucosale à l'infection par *Cryptosporidium parvum* chez la souris. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2001. Français. NNT: . tel-02833050

HAL Id: tel-02833050

<https://hal.inrae.fr/tel-02833050>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE FRANÇOIS RABELAIS TOURS



Ecole Doctorale : Santé, Sciences et Technologie.
Année Universitaire 2000-2001

THESE

Pour l'obtention du Grade de Docteur de l'Université de Tours
Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**
Spécialité : **Immunologie Parasitaire**

Présentée et soutenue publiquement
le 20 Novembre 2001
par

Sonia Lacroix-Lamandé

Rôle de l'interféron- γ
dans la réponse immunitaire mucoale
à l'infection par *Cryptosporidium parvum*
chez la souris.

Directeur de Thèse : G. Dambrine
Responsable encadrant : F. Laurent

Membres du Jury :

M D. Bout, Professeur, Université de Tours
Mme I. Schwartz, Chargé de recherche, HDR, INRA de Jouy en Josas
M J.M. Cavaillon, Directeur de recherche, Institut Pasteur de Paris
Mme N. Kapel, Maître de conférences, HDR, Université René Descartes de Paris
M M. Kagnoff, Professeur, Université de San Diego en Californie (Etats-Unis)
Mme G. Dambrine, Directeur de recherche, INRA de Tours
M F. Laurent, Chargé de recherche, INRA de Tours

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
FAE	d'après l'anglais "Follicle-Associated Epithelium"
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GALT	d'après l'anglais "Gut-Associated Lymphoid Tissue"
IEC	d'après l'anglais "Intestinal Epithelial Cell"
IEL	d'après l'anglais "Intra-Epithelial Lymphocyte"
Ig	Immunoglobuline
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LPL	d'après l'anglais "Lamina propria Lymphocyte"
NK	d'après l'anglais "Natural Killer"
NO	Oxyde Nitrique
p.i.	post-inoculation
PBS	d'après l'anglais " Phosphate Buffer Saline "
PE	Phycoerythrine
RT-PCR	d'après l'anglais "Reverse-transcription-Polymerase Chain reaction"
SCID	d'après l'anglais "Severe Combined Immunodeficient mice"
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SVF	Sérum de Veau Fœtal

Les cytokines et chimiokines

IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP-10	IFN γ Inducible Protein 10
i-TAC	d'après l'anglais "interferon-inducible T Cell Alpha Chemoattractant"
MCP	d'après l'anglais "Monocyte Chemoattractant Protein"
MIG	d'après l'anglais "Monokine Induced by IFN γ "
MIP	d'après l'anglais "Macrophage Inflammatory Protein"
TGF	d'après l'anglais "Transforming Growth Factor"
TNF	d'après l'anglais " Tumor Necrosis Factor "

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION	1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	3
<i>I- La cryptosporidiose à Cryptosporidium parvum</i>	<i>3</i>
<i>II- Réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale</i>	<i>13</i>
<i>III- Réponse immunitaire à l'infection par Cryptosporidium parvum</i>	<i>29</i>
OBJECTIFS	51
MATERIEL ET METHODES	53
<i>I- Modèle expérimental : la cryptosporidiose murine</i>	<i>53</i>
<i>II- Microscopie électronique</i>	<i>56</i>
<i>III- Réponse des cellules épithéliales in vitro</i>	<i>57</i>
<i>IV- Etude de la réponse immunitaire par RT-PCR</i>	<i>60</i>
<i>V- Production d'anticorps neutralisants pour l'étude des chimiokines</i>	<i>72</i>
<i>VI- Etude de la réponse immunitaire cellulaire in vivo</i>	<i>74</i>
RESULTATS / DISCUSSION	79
<i>I- Modèles expérimentaux et élaboration d'outils</i>	<i>79</i>
<i>II- Initiation de la réponse immunitaire</i>	<i>89</i>
<i>III- Les cytokines pro-inflammatoires</i>	<i>93</i>
<i>IV- Les chimiokines</i>	<i>108</i>
<i>V- Réponse en cytokines Th1-Th2 et iNOS</i>	<i>126</i>
<i>VI- Les IEL</i>	<i>134</i>
DISCUSSION GENERALE	140
<i>I- Rôle de l'IFNγ</i>	<i>141</i>
<i>II- Rôle des lymphocytes T</i>	<i>144</i>
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	152
ANNEXES	169

SOMMAIRE DETAILLE

INTRODUCTION	1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I- La cryptosporidiose à <i>Cryptosporidium parvum</i>	3
1. Historique	3
2. Taxonomie et spécificité d'hôtes	3
3. Cycle de <i>Cryptosporidium parvum</i>	5
a/ L'excystation	5
b/ Mérogonie ou multiplication asexuée	6
c/ Gamogonie ou reproduction sexuée.	6
d/ Formation de l'oocyste et sporogonie	6
4. Epidémiologie	7
a/ Chez l'homme	7
b/ Chez les animaux	8
5. Source d'infection et mode de contamination	8
6. Pathologie et pathogénèse de la cryptosporidiose	9
7. Diagnostic	10
8. Moyens de lutte	11
a/ Prévention	11
b/ Traitements pharmacologiques	11
c/ Traitements immunologiques et immunoprophylaxie	12
II- Réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale	13
1. La cellule épithéliale	14
a/ Fonctions effectrices dans la réponse innée	14
b/ Fonctions immunorégulatrices	14
2. Présentation de l'antigène dans la muqueuse intestinale	16
a/ Voie des cellules épithéliales	17
b/ Voie des cellules dendritiques	18
c/ Voies des cellules M	18
3. Le système immunitaire associé aux muqueuses du tractus digestif (GALT)	19
a/ Les sites inducteurs de la réponse immune mucoale	19
b/ Les sites effecteurs de la réponse immune mucoale spécifique	20
4. Réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale et recirculation des lymphocytes	24
5. La réponse immunitaire chez le nouveau-né	26
a/ Les composants de l'immunité innée	26
b/ Les composants de l'immunité acquise	27
c/ Facteurs influençant le développement du système immunitaire	28
III- Réponse immunitaire à l'infection par <i>Cryptosporidium parvum</i>	29
1. Réponse immunitaire innée	30
a/ Résistance à l'infection	30
b/ Les cellules épithéliales dans la protection innée	32
c/ Les cytokines	34
d/ Le monoxyde d'azote	36
e/ Les cellules de la réponse immunitaire innée	37

2. Réponse immunitaire spécifique	39
a/ Les anticorps	39
b/ Les lymphocytes T	40
c/ Les cytokines	43
3. L'apoptose dans la cryptosporidiose	46
4. Réponse immunitaire chez le veau	49
OBJECTIFS	51
MATERIEL ET METHODES	53
I- Modèle expérimental : la cryptosporidiose murine	53
1. Les modèles souris	53
2. Le parasite	53
a/ Entretien de la souche de <i>C. parvum</i> et multiplication	53
3. Infections expérimentales / Evaluation de la maladie chez l'hôte	54
a/ Evolution du poids	54
b/ Excrétion des oocystes	55
c/ Mesure de l'expression d'un gène de <i>C. parvum</i>	55
II- Microscopie électronique	56
1. Principe de la MEB	56
2. Principe de la MET	56
3. Préparation des échantillons	56
III- Réponse des cellules épithéliales in vitro	57
1. Mode K	57
2. ICcl2	57
3. HCT-8	57
4. Infection avec des oocystes de <i>C. parvum</i> ou stimulation par des cytokines recombinantes	58
5. Culture de cellules M in vitro	58
a/ Culture des Caco-2 TC7	58
b/ Lymphocytes des plaques de Peyer	58
c/ Coculture	59
d/ Infection par <i>C. parvum</i>	59
IV- Etude de la réponse immunitaire par RT-PCR	60
1. Extraction d'ARN	60
2. RT-PCR qualitative	61
a/ Reverse-transcription (RT)	61
b/ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	61
3. RT-PCR quantitative	62
a/ Principe (figure 11)	62
b/ Constructions moléculaires pour la RT-PCR quantitative	64
c/ Réaction de Transcription <i>in vitro</i>	69
d/ Réaction RT-PCR quantitative	70

V-	<i>Production d'anticorps neutralisants pour l'étude des chimiokines</i>	72
1.	Synthèse des peptides	72
2.	Protocole d'immunisation des lapins SPF	72
3.	Détection des anticorps anti-peptides par ELISA	73
4.	Purification des anticorps	73
VI-	<i>Etude de la réponse immunitaire cellulaire in vivo</i>	74
1.	Immunofluorescence sur coupes congelées	74
a/	Préparation du bloc et des coupes	74
b/	Fixation des coupes	74
c/	Les anticorps utilisés	74
d/	Marquages immunologiques	75
2.	Réponse des IEL	75
a/	Purification des IEL	75
b/	Marquages immunologiques des IEL	76
c/	Analyse en cytométrie en flux	76
d/	Tri des IEL CD4+ et CD8+ par billes magnétiques	78
<i>RESULTATS / DISCUSSION</i>		79
I-	<i>Modèles expérimentaux et élaboration d'outils</i>	79
1.	Les modèles souris	79
2.	Modèle <i>in vitro</i>	81
3.	Construction des plasmides pour la RT-PCR quantitative	82
a/	Construction d'un plasmide pGEM-T Easy + polyA	83
b/	Choix et séquences des amorces pour la réaction de RT-PCR quantitative	84
c/	Réaction de transcription <i>in vitro</i>	86
d/	Avantages de cette technique de RT-PCR quantitative	86
e/	Détermination du niveau d'infection de <i>C. parvum</i> par RT-PCR quantitative	87
II-	<i>Initiation de la réponse immunitaire</i>	89
III-	<i>Les cytokines pro-inflammatoires</i>	93
1.	Les cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules épithéliales infectées par <i>C. parvum</i> <i>in vitro</i>	94
2.	Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souris infectées par <i>C. parvum</i>	95
a/	Chez les souris C57BL/6J normaux	95
b/	Chez les souris GKO	96
c/	Conclusion / Discussion	99
3.	Rôle du TNFα dans l'infection par <i>C. parvum</i>	100
a/	Les différentes approches	100
b/	Conclusion / Discussion	105
IV-	<i>Les chimiokines</i>	108
1.	Expression des chimiokines par les cellules épithéliales intestinales	109
a/	Après infection <i>in vitro</i> par <i>C. parvum</i>	109
b/	Expression des chimiokines par les cellules épithéliales intestinales dans un environnement inflammatoire	112
c/	Conclusion / Discussion	113
2.	Expression des chimiokines dans l'iléon des souris infectées par <i>C. parvum</i>	113
a/	Chez les souris C57BL/6J normaux	113
b/	Chez les souris GKO	117
c/	Conclusion / Discussion	120

3. Inhibition des chimiokines <i>in vivo</i>	122
a/ Production des anticorps	122
b/ Injection des sérums aux souris	124
c/ Conclusion / Discussion	125
V- Réponse en cytokines Th1-Th2 et iNOS	126
1. Chez les souris C57BL/6J normaux	127
2. Chez les souris GKO	129
3. Conclusion et discussion	131
VI- Les IEL	134
1. Objectif de l'étude	134
2. Schéma expérimental	134
3. Essai préliminaire	137
4. Conclusion / Discussion	139
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	<i>140</i>
I- Rôle de l'IFNγ	141
1. Rôle de l'IFNγ dans la présentation de l'Antigène	141
2. Rôle de l'IFNγ dans l'Apoptose	142
II- Rôle des lymphocytes T	144
1. Les cellules productrices d'IFNγ	144
2. La réponse spécifique de l'antigène est-elle importante dans la cryptosporidiose ?	145
a/ Spécificité	145
b/ Environnement intestinal	146
3. Transfert de cellules chez les souris	147
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	<i>150</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	<i>152</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>168</i>
<i>Annexe 1</i> : Naciri, M., Lacroix, S. et Laurent, F. (2000) La Cryptosporidiose des ruminants. Action Vétérinaire, No 1536, p 17-23. Article sélectionné pour être publié dans l'Hebdo vétérinaire en 2001, No 33, p14-19.	
<i>Annexe 2</i> : Naciri, M., Lacroix, S. et Laurent, F. (2001) La Cryptosporidiose des ruminants. II. Diagnostic et moyens de lutte, risques pour l'Homme. Action Vétérinaire, No 1543, p11-18. Article sélectionné pour être publié dans l'Hebdo vétérinaire en 2001, No 37, p13-18.	
<i>Annexe 3</i> : Lacroix, S., Mancassola, R., Naciri, M. and Laurent, F. (2001) <i>Cryptosporidium parvum</i> specific mucosal immune response in C57BL/6 neonatal and IFN- γ deficient mice : Role of TNF- α in protection. Infection and Immunity, Vol 69, No 3, p 1635-1642.	
<i>Annexe 4</i> : Lacroix-Lamandé, S., Mancassola, R., Naciri, M. and Laurent, F. (2001) Chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after <i>Cryptosporidium parvum</i> infection : role of gamma interferon. Soumis à Infection and Immunity.	

La cryptosporidiose est une maladie parasitaire intestinale due au protozoaire *Cryptosporidium parvum* qui affecte tous les mammifères dont l'homme. Ce parasite est responsable de diarrhées dont la gravité dépend du statut immunitaire du sujet. D'un point de vue vétérinaire, *C. parvum* est aujourd'hui la première cause des entérites diarrhéiques du veau nouveau-né, avant les *Escherichia coli* K99, les rotavirus, les coronavirus et les salmonelles (Naciri *et al.*, 1999). La cryptosporidiose occasionne d'importantes pertes économiques en élevage des ruminants par la morbidité, la mortalité et les coûts liés aux réhydratations et aux traitements. Ainsi, les animaux de rente représentent des réservoirs d'oocystes infectieux et ont des répercussions environnementales et zoonotiques importantes (de Graaf *et al.*, 1999). En santé humaine, *C. parvum* est à l'origine d'épidémies liées à la consommation d'eau contaminée dont la plus importante est celle de Milwaukee, qui a touché environ 403 000 personnes (MacKenzie *et al.*, 1994). Chez les personnes immunocompétentes, la diarrhée est ipsostérilisante, par contre elle est de type cholera-like pouvant conduire à la mort les personnes immunodéprimées comme les personnes atteintes du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Clark, 1999). Bien que l'utilisation systématique de la tri-thérapie chez les personnes atteintes du SIDA ait considérablement réduit le nombre de cas de cryptosporidiose humaine, la cryptosporidiose des petits ruminants demeure toutefois un problème en santé vétérinaire (*deux revues du laboratoire retraçant un état des lieux des connaissances actuelles des infections de cryptosporidiose chez les ruminants sont ajoutées en annexe 1 et 2*).

La lutte contre la cryptosporidiose des ruminants passe par la désinfection des locaux et du matériel ainsi que par une bonne gestion des troupeaux avec des règles d'hygiène strictes. Chez l'animal, le seul produit autorisé en France pour le contrôle de la cryptosporidiose est le lactate d'halofuginone ou Halocur® qui a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en novembre 1999 (Lefay *et al.*, 2001). Cette molécule cryptosporidiostatique est efficace, utilisée en prévention de la diarrhée provoquée par *C. parvum*, mais elle ne permet pas une éradication complète du parasite. La résistance des oocystes de *C. parvum* aux thérapies médicamenteuses et aux traitements conventionnels des eaux, nécessite la mise en place de contrôles immunologiques.

La vaccination des veaux est difficilement envisageable puisqu'ils se contaminent dès la naissance. Par contre, la vaccination des vaches pour une protection des veaux par l'intermédiaire du colostrum est une alternative à ce problème. Des essais de vaccination génique ont abouti à des résultats prometteurs chez des chevreaux issus de mères vaccinées par voie nasale avec un plasmide codant pour une protéine immunodominante de 15kDa de *C. parvum* (Sagodira *et al.*, 1999). Cependant, ces essais sont d'ordre expérimental et méritent d'être développés et approfondis avant d'envisager une éventuelle application sur

le terrain. En effet, le développement d'un vaccin ou d'une immunothérapie efficace nécessite des connaissances sur les mécanismes immunitaires mis en place chez l'hôte pour permettre l'élimination du parasite.

Les connaissances des mécanismes de l'immunité protectrice et de l'immunopathologie pendant l'infection à *C. parvum* ont progressé depuis ces dernières années mais sont encore relativement pauvres comparées à celles d'autres protozoaires. L'absence de modèle animal idéal d'infection par *C. parvum* a ralenti la découverte de ces mécanismes. En effet, les animaux adultes dont les rongeurs de laboratoire sont généralement naturellement résistants à *C. parvum*. Bien que les souris nouveau-nées ou immunodéprimées ne représentent pas un modèle adéquat pour étudier la pathogénèse de l'infection à *C. parvum* puisqu'elles n'ont pas de diarrhée, elles ont été très utilisées pour explorer les mécanismes de l'immunité.

Lors d'une infection par *C. parvum*, contrairement à la réponse naturelle en anticorps qui ne semble pas jouer de rôle prépondérant dans la protection, la réponse cellulaire et notamment la réponse des lymphocytes T CD4+, joue un rôle primordial. Par ailleurs, plusieurs études montrent clairement l'importance de l'IFN γ dans la réponse immunitaire protectrice de l'hôte (McDonald *et al.*, 2000), toutefois les mécanismes par lesquels cette cytokine conduit à la protection sont, eux encore mal connus.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc cherché à mettre en évidence des effecteurs locaux de la réponse immunitaire protectrice dépendante de l'IFN γ . Dans ce manuscrit, un mémoire bibliographique rappellera dans un premier temps la biologie du parasite, puis l'organisation du système immunitaire associé aux muqueuses et fera ensuite l'état des lieux des connaissances actuelles sur les mécanismes immunitaires impliqués dans la résistance et la protection de l'infection vis-à-vis de la cryptosporidiose. Après avoir décrit les objectifs de notre travail, nous présenterons les différents résultats obtenus au cours de cette thèse qui ont fait l'objet de deux publications scientifiques ajoutées en annexe (Annexes 3 et 4).

I- LA CRYPTOSPORIDIOSE À *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

1. Historique

En 1907, Tyzzer découvre dans l'épithélium gastrique des souris de laboratoire un nouveau protozoaire qu'il nomme *Cryptosporidium* du grec "spore cachée" parce qu'il n'observait pas de sporocystes autour des sporozoïtes (Tyzzer, 1907). *Cryptosporidium muris* est la première espèce décrite (Tyzzer, 1910), *C. parvum* est découvert quelques années après. Cette dernière diffère de *C. muris* par sa localisation dans l'intestin grêle et par sa plus petite taille (Tyzzer, 1912). Ce parasite n'a suscité l'intérêt des vétérinaires qu'à partir de 1976, lorsqu'il a été associé aux diarrhées néonatales chez le veau (Morin, 1976). Durant cette même année, *C. parvum* a été mis en évidence pour la première fois chez un enfant de 3 ans (Nime *et al.*, 1976) et chez un homme immunodéprimé (Meisel *et al.*, 1976). A partir de 1982, après l'explosion du nombre de cas de SIDA, les infections par *C. parvum* sont de plus en plus fréquentes chez l'homme et *C. parvum* est alors considéré comme responsable de diarrhées chez l'homme. A l'heure actuelle, 1 à 2 % des personnes immunocompétentes en Europe sont atteintes de cryptosporidiose contre environ 20% chez les personnes immunodéficientes. Dans les élevages français bovins, 40 % des veaux diarrhéiques excrètent des oocystes de *C. parvum* et dans 50% des cas *C. parvum* est seul responsable de cette diarrhée.

2. Taxonomie et spécificité d'hôtes

Cryptosporidium est un protozoaire appartenant au phylum des Apicomplexes, classé parmi les coccidies en raison des similarités de leurs cycles biologiques et des caractères morphologiques (Figure 1). La classification du genre *Cryptosporidium* est présentée dans le tableau 1.

D'après les différentes études de transmission croisées, il était admis que *Cryptosporidium parvum* possédait peu de spécificité d'espèces et pouvait infecter tous les mammifères (Fayer *et al.*, 1997). Cependant, il semble exister des sous-types différents qui infectent l'homme et l'animal avec un caractère de virulence variable. Des techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence deux génotypes de *C. parvum* : le génotype 1 ou H (pour "human") qui infecte uniquement l'homme et le génotype 2 ou C (pour "calves") qui infecte un grand nombre de mammifères dont l'homme (Bonnin *et al.*, 1996).

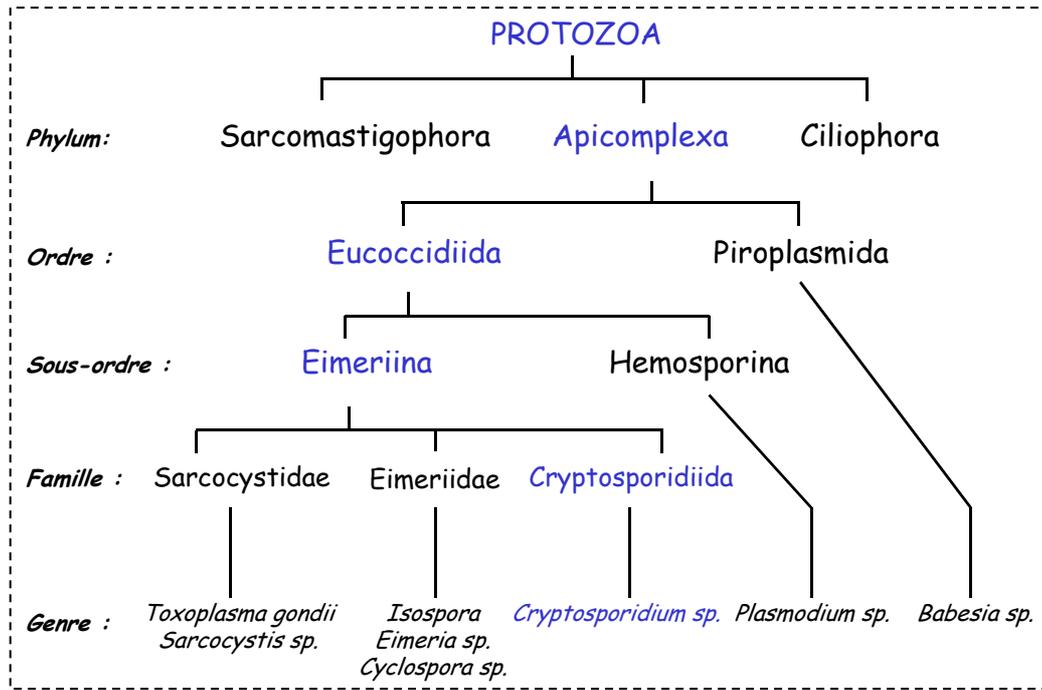


Figure 1 : Taxonomie de *Cryptosporidium* et des autres protozoaires (d'après Adal et al., 1995)

Classification	Nom	Caractéristiques biologiques
Embranchement	Apicomplexa	Complexe apical avec anneaux polaires, rhotries, micronèmes, conoïde et microtubules sous-pelliculaires
Classe	Sporozoasida	Éléments libres mobiles se déplaçant par flexion, glissement et ondulation
Sous-Classe	Coccidiasina	Cycle biologique comprenant mérogonies, gamétogonie et sporogonie
Ordre	Eucoccidiorida	Mérogonie présente chez les vertébrés
Sous-Ordre	Eimeriorina	Macrogamonte et microgamonte se développent indépendamment
Famille	Cryptosporidiidae	Cycle monoxène. Développement sous la membrane de la cellule. Microgamètes sans flagelle.
Genre	<i>Cryptosporidium</i>	Oocystes sans sporocystes avec quatre sporozoïtes.
Espèces	<i>C. muris</i> chez les mammifères <i>C. parvum</i> chez les mammifères <i>C. wrairi</i> chez les cochons d'Inde <i>C. baileyi</i> chez les oiseaux <i>C. meleagridis</i> chez les oiseaux <i>C. serpentis</i> chez les reptiles <i>C. natorum</i> chez les poissons	

Tableau 1 : Taxonomie de *Cryptosporidium*

3. Cycle de *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum est un parasite monoxène dont le cycle de multiplication très rapide (3 à 4 jours) peut-être divisé en 4 grandes étapes (Figure 2).

a/ L'excystation

L'hôte se contamine par ingestion d'oocystes de *C. parvum* présents dans l'environnement, la nourriture ou l'eau. La sortie active des sporozoïtes de l'oocyste (excystation) ne semble pas nécessiter les conditions réductrices particulières et la présence d'enzymes pancréatiques et des sels biliaires indispensables à la plupart des coccidies. Par contre, des sérine et arginine protéases d'origine parasitaire pourraient être les facteurs initiant l'ouverture de la coque de l'oocyste.

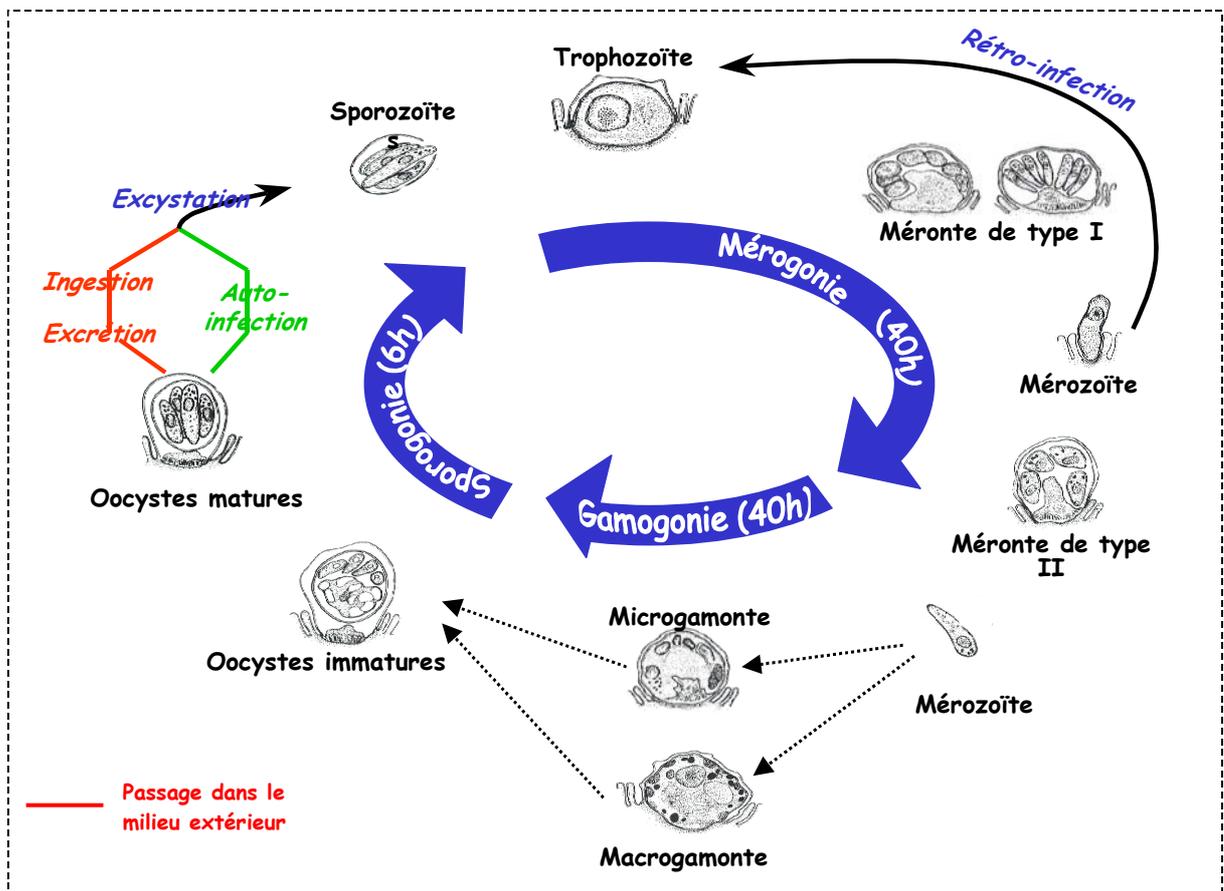


Figure 2 : Cycle de *Cryptosporidium parvum* dans les cellules épithéliales de l'intestin.

b/ Mérogonie ou multiplication asexuée

Le sporozoïte s'attache à la cellule épithéliale de l'hôte par son pôle antérieur (Figure 3) puis la membrane de la cellule s'évagine. De fines extensions des membranes des microvillosités entourent le parasite et forment une vacuole parasitophore intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Une zone d'attache spécifique de *Cryptosporidium* se forme à l'interface du cytoplasme de la cellule hôte et de la vacuole parasitophore. Cette zone d'attache spécifique du genre *Cryptosporidium* augmenterait la surface de contact et faciliterait les échanges entre le parasite et la cellule hôte. Dans la cellule épithéliale, le sporozoïte se différencie en un trophozoïte. Les divisions du noyau du trophozoïte correspondent à la multiplication asexuée : la mérogonie. Une première mérogonie génère un méronte de type I qui libérera 8 mérozoïtes (Figure 3). Ces mérozoïtes sont des formes libres du parasite qui peuvent aller infecter des cellules voisines et initier une mérogonie de type II ou à nouveau une mérogonie de type I ; cette rétro-infection est caractéristique de *Cryptosporidium*. Les mérontes de type II contiennent 4 mérozoïtes.

c/ Gamogonie ou reproduction sexuée.

Les mérozoïtes de type II pénètrent ensuite dans les cellules épithéliales et se différencient en microgamontes ou macrogamontes pour initier la reproduction sexuée. La division du noyau des microgamontes ou gamontes mâles aboutit à la formation de 16 microgamètes dépourvus de flagelles. Le macrogamonte ou gamonte femelle formé d'un seul gros noyau central évolue en un macrogamète dans lequel pénétrera un microgamète.

d/ Formation de l'oocyste et sporogonie

Le zygote est obtenu après fusion des noyaux des gamètes mâle et femelle ; il constitue le seul stade diploïde du cycle. Il s'entoure ensuite d'une coque résistante pour former deux types d'oocystes : des oocystes à paroi épaisse (80%) et des oocystes à paroi mince (20%), tous deux contenant 4 sporozoïtes. Contrairement à la plupart des coccidies, les oocystes de *Cryptosporidium* sporulent dans la cellule hôte avant d'être émis dans la lumière intestinale. Les oocystes à paroi épaisse représentent les formes de résistance et de dissémination du parasite. Ils sont excrétés avec les fèces dans l'environnement où ils sont directement infectants pour un hôte sensible. Les oocystes à paroi fine excystent *in situ* et les sporozoïtes libérés infectent de nouvelles cellules ; ces oocystes sont responsables de l'auto-infection. Les oocystes à paroi fine auto-infectants et le recyclage des mérozoïtes de type I peuvent expliquer la persistance du cycle sans nouveau contact avec le parasite.

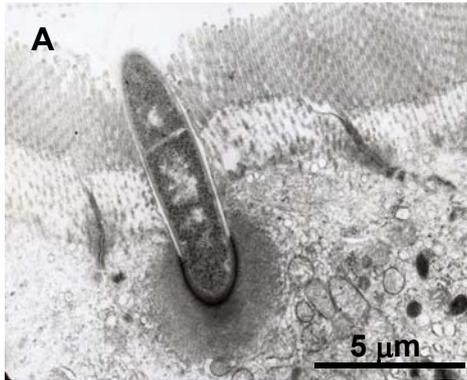
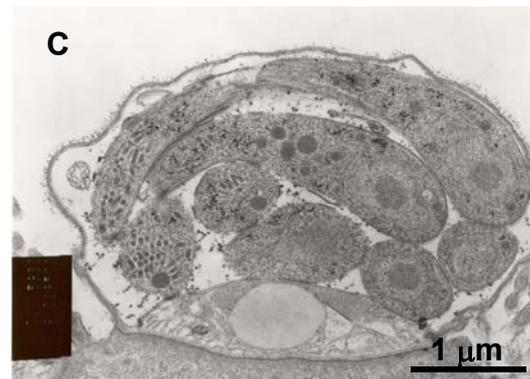


Figure 3 : Photographies de Microscopie Electronique à Transmission de *C. parvum* (Réalisée par le Service Commun de Microscopie Electronique INRA Tours).

*Epithélium de souris knock-out pour l'IFN γ infectées depuis 9 jours par *C. parvum**

- A. Sporozoïte pénétrant dans une cellule épithéliale
- B. Trophozoïte
- C. Méronte de type I contenant les mérozoïtes



4. Epidémiologie

a/ Chez l'homme

C. parvum est un parasite ubiquiste présent sur tous les continents à la fois dans les zones urbaines et rurales. La prévalence de la cryptosporidiose peut varier de 1% en Europe et dans le nord des Etats-Unis à 30% dans les autres continents (Current et Garcia, 1991 ; Fayer et Ungar, 1986). De meilleures conditions d'hygiène et un traitement des eaux plus efficace dans les pays industrialisés peuvent expliquer cette différence. De plus, il semblerait que le climat influe sur la prévalence puisque pendant les périodes chaudes et de pluies, il a été observé une recrudescence du nombre d'infections. Enfin, l'état immunitaire de l'homme est un facteur essentiel pour l'installation de la cryptosporidiose. En effet, les enfants de moins de 2 ans, les personnes âgées, les individus atteints de malnutrition et les personnes immunodéprimées (personnes atteintes du SIDA, les personnes ayant un traitement immunosuppresseur, les personnes hypogammaglobulinémiques...) sont très sensibles à l'infection. Si seulement 1% des sujets immunocompétents sont hospitalisés avec un très faible risque de mortalité (<0,001%), les infections à *C. parvum* chez les personnes immunodéprimées sont associées à une forte mortalité (50%) (Juraneck, 1995 ; Rose, 1997).

b/ Chez les animaux

C. parvum est capable d'infecter toutes les espèces de mammifères. Chez les animaux de rente (bovins, ovins, caprins...), l'infection est asymptomatique, par contre, chez les nouveau-nés, elle entraîne une morbidité et une mortalité élevée. Depuis la mise en place de vaccins contre les rotavirus, les coronavirus, les *E. coli* K99 ou les Salmonelles, *C. parvum* est la première cause de diarrhées néonatales des veaux de 4 à 21 jours environ. Chez les veaux non-diarrhéiques, la prévalence se situe entre 10-20% selon les pays. Elle est plus élevée, 20-50%, chez les veaux diarrhéiques. En France, la prévalence est plus importante chez les veaux d'élevages allaitants que chez les veaux d'élevages laitiers (Naciri *et al.*, 1999). Cette plus forte prévalence en élevage allaitant peut s'expliquer par le contact avec la mère, les litières souillées et la concentration des mises bas sur une courte période de l'année. Au cours d'une saison de vêlages, les diarrhées graves surviennent surtout en moitié et fin de période de mise-bas. Les élevages de chevreux sont également fortement touchés par les diarrhées à *C. parvum*. Dans les élevages bovins ou caprins, la contamination est favorisée par la concentration des animaux, le mélange d'animaux de classes d'âge différentes et le manque d'hygiène.

5. Source d'infection et mode de contamination

La cryptosporidiose se transmet par ingestion des oocystes présents dans l'environnement. La transmission peut être directe (contact entre un individu contaminé et un individu sain) ou indirecte (par l'eau, la nourriture ou le lait) (Fayer *et al.*, 2000) (Figure 4). De façon expérimentale, il a été montré que l'ingestion d'une centaine d'oocystes était suffisante pour qu'un individu sain devienne infecté (Okhuysen *et al.*, 1999).

La transmission directe d'homme à homme est fréquente chez les enfants en bas-âge en contact avec d'autres individus malades, chez les patients atteints du SIDA et chez les personnes hospitalisées puisque la cryptosporidiose fait partie des infections nosocomiales (Casemore *et al.*, 1994). La transmission de l'animal à l'homme est fréquente chez les éleveurs, les vétérinaires et les personnes en contact avec les animaux.

La présence d'oocystes de *C. parvum* dans le sol et les eaux de surface conduit généralement à la contamination de la nourriture, de l'eau de boisson, de l'eau des piscines (Guerrant, 1997 ; MacKenzie *et al.*, 1995) et des rivières et des lacs (Juraneck, 1995). La résistance des oocystes au chlore et à la javellisation ainsi que la petite taille des oocystes rendent difficile le traitement de l'eau qu'il soit chimique ou physique par filtration. La contamination de l'eau est responsable de nombreuses épidémies de cryptosporidioses survenues dans différents pays comme le Japon en 1996, l'Angleterre en 1999... (Fayer *et al.*, 2000). Jusqu'à présent, la plus importante épidémie de cryptosporidiose transmise par

l'eau a eu lieu en 1993 à Milwaukee infectant environ 403 000 individus (MacKenzie *et al.*, 1994). A l'heure actuelle, le traitement de l'eau par ozonation semble être le meilleur moyen pour tuer le parasite (Korich *et al.*, 1990 ; Laberge *et al.*, 1996). La nourriture souillée ainsi que le lait non pasteurisé sont d'autres sources potentielles d'oocystes (Harp *et al.*, 1996 ; Laberge *et al.*, 1996) (Figure 3).

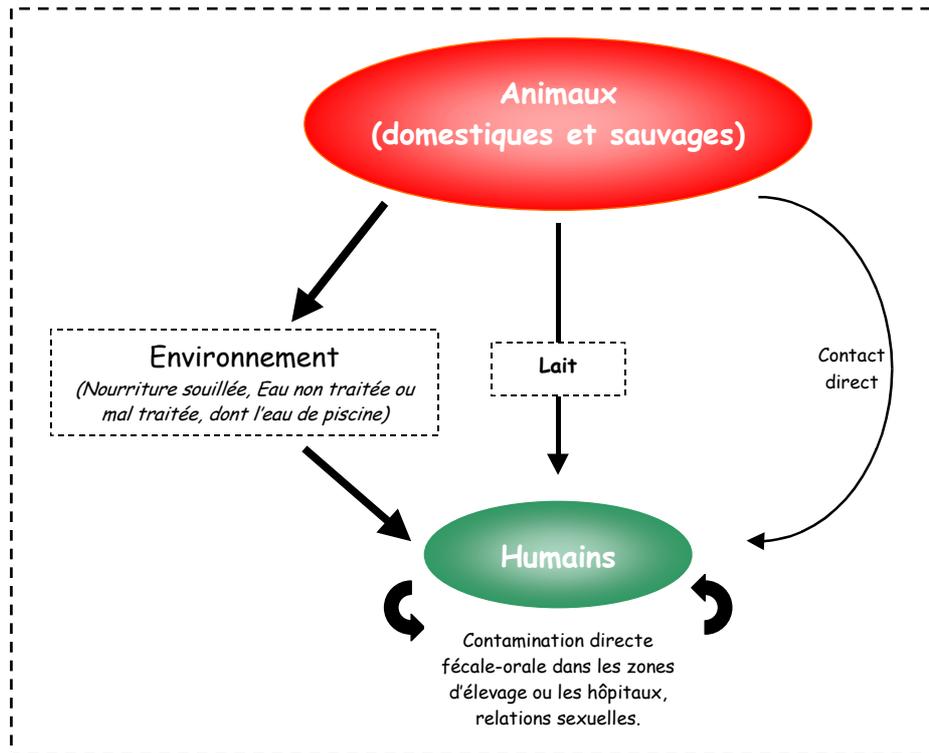


Figure 4 : Réservoirs et voies de dissémination de *Cryptosporidium*.

6. Pathologie et pathogénèse de la cryptosporidiose

Chez la plupart des mammifères dont l'homme, la cryptosporidiose induit une diarrhée de type cholérique associée à une anorexie, une perte de poids, une déshydratation et des crampes abdominales. Chez les hôtes immunocompétents, la multiplication du parasite est confinée à la bordure en brosse des entérocytes dans la partie distale du jéjunum et dans l'iléon. Chez les sujets immunodéprimés, la multiplication du parasite peut s'étendre dans tout l'intestin, dans les canaux pancréatiques et biliaires (Hawkins *et al.*, 1987 ; Pitlik *et al.*, 1983) et dans le système respiratoire (Ma, 1984).

L'infection de l'intestin par le parasite entraîne des changements histologiques caractérisés par une atrophie des villosités qui apparaissent plus courtes, plus larges et

infiltrées par des cellules inflammatoires (Stemmermann *et al.*, 1980 ; Weisburger *et al.*, 1979) . Une hyperplasie des cryptes est aussi souvent observée pendant une infection par *C. parvum*. La multiplication du parasite dans la bordure en brosse des cellules épithéliales induit des changements ultra-structuraux des entérocytes tels que la perte des microvillosités, une vacuolisation importante du cytoplasme et un gonflement des mitochondries.

Ces manifestations pathologiques observées pendant la cryptosporidiose sont responsables de troubles de l'absorption des nutriments notamment du glucose (Kapel *et al.*, 1997), du D-xylose et de la vitamine B12 (Goodgame *et al.*, 1995 ; Modigliani *et al.*, 1985). Les altérations observées suite à l'infection de l'activité des enzymes cellulaires telles que la lactase et la phosphatase alcaline (Gardner *et al.*, 1991) ainsi que la production locale de prostaglandine E2 (Laurent *et al.*, 1998) peuvent également contribuer à la malabsorption des nutriments. Il en résulte une importante croissance bactérienne dans l'intestin, un changement de pression osmotique et donc une fuite d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale conduisant à une diarrhée profuse. Compte tenu de l'importance de la diarrhée, la présence d'un facteur entérotoxique a été évoquée mais sa nature n'a pas encore été déterminée (Guarino *et al.*, 1994).

7. Diagnostic

Dans le cas de la cryptosporidiose, l'expression clinique de la maladie n'est pas spécifique et le diagnostic clinique n'est qu'un diagnostic de suspicion. Les examens coprologiques permettent de confirmer et d'identifier facilement et rapidement la présence ou non du parasite dans les selles des sujets malades. Plusieurs techniques comme la flottation dans la solution de Sheather, la coloration négative de Heine ou la coloration de Ziel Neelsen modifiée sont couramment utilisées pour établir avec certitude un diagnostic (Annexe 2). La recherche d'anticorps sériques spécifiques permet également de diagnostiquer une cryptosporidiose, mais elle présente un inconvénient majeur, notamment pour les nouveau-nés, celui de détecter les anticorps maternels apportés par le colostrum. De plus, cette recherche d'anticorps ne permet pas de dater l'infection. L'immunodiagnostic par des techniques d'immunofluorescence ou de cytométrie en flux qui consiste à détecter la présence d'antigènes de *C. parvum* dans les selles est un autre moyen de diagnostic (Arrowood *et al.*, 1995 ; Mayer et Palmer, 1996). Enfin, depuis quelques années, la biologie moléculaire offre des méthodes de PCR très sensibles pour mettre en évidence et identifier l'espèce de *C. parvum* dans les selles des sujets malades ou dans les eaux contaminées (Gobet *et al.*, 1997 ; Johnson *et al.*, 1995 ; Leng *et al.*, 1996 ; Wagner-Wiening et Kimmig, 1995).

8. Moyens de lutte

a/ Prévention

Le pouvoir infectant des oocystes de *C. parvum* peut être perdu par la congélation, la chaleur ou la dessiccation (20 min à 45°C) et neutralisé par l'action de l'ammoniaque 5%, de l'eau oxygénée 3%, du formol 10% et de l'eau de javel concentrée (5,25 % d'hypochlorite de sodium) pendant 10 min à température ambiante. Les concentrations d'eau de javel habituellement utilisées pour la désinfection ne suffisent pas pour tuer les oocystes et la chloration de l'eau de boisson est inefficace sur le pouvoir infectant des oocystes.

Les oocystes retrouvés dans l'environnement sont donc très résistants et sont directement infectants pour l'hôte, par conséquent des mesures sanitaires rigoureuses, passant par la désinfection des locaux et du matériel, sont nécessaires à la fois dans les hôpitaux, dans les familles où l'un des membres est malade et dans les élevages.

b/ Traitements pharmacologiques

Depuis plusieurs années, environ 200 molécules ont été testées *in vitro* et *in vivo* contre *C. parvum* (Adal *et al.*, 1995 ; Blagburn et Soave, 1997). Seules quelques unes ont montré un effet protecteur prometteur chez l'homme ou l'animal. La paromomycine a révélé une certaine efficacité contre la cryptosporidiose à la fois *in vitro* (Marshall et Flanigan, 1992), chez l'homme immunodéprimé (Danziger *et al.*, 1993 ; Tzipori *et al.*, 1995), chez le veau (Fayer et Ellis, 1993) et le chevreau (Mancassola *et al.*, 1995). Le lactate d'halofuginone prévient également la multiplication du parasite et présente une efficacité comparable à celle de la paromomycine (McDonald *et al.*, 1990 ; Naciri *et al.*, 1993 ; Naciri et Yvoré, 1989). Ces substances pharmacologiques ainsi que l'azythromycine (Hicks *et al.*, 1996 ; Rehg, 1991), le décoquinat (Lindsay *et al.*, 2000 ; Mancassola *et al.*, 1997) et le lasalocid (Castro Hermida *et al.*, 2000) ont permis une réduction de l'infection dans des études *in vitro* et/ou *in vivo*. A l'heure actuelle en France, aucun traitement n'est commercialisé pour l'homme pour lutter contre la cryptosporidiose. Par contre, depuis novembre 1999, la vente du lactate d'halofuginone ou Halocur® est autorisée comme anti-cryptosporidien chez le veau. L'Halocur® est efficace en prévention quand les veaux sont âgés de 24 à 48h et lorsque la posologie est bien respectée. Bien que n'étant pas l'indication de choix, l'Halocur® peut également être utilisé en curatif à la même posologie mais à condition de commencer le traitement dans les 24h suivant l'apparition de la diarrhée.

c/ Traitements immunologiques et immunoprophylaxie

Pour lutter contre la cryptosporidiose, parallèlement à la recherche de molécules chimiques anticryptosporidiennes, la protection par immunité passive a été envisagée. De nombreux essais ont été réalisés avec du colostrum de bovin hyperimmun. Ce colostrum de bovin hyperimmun est obtenu après injection d'extraits parasitaires par voie intramusculaire et intra-mammaire à une vache dans les deux derniers mois de gestation. L'administration de ce colostrum a permis une réduction de l'excrétion parasitaire et de la diarrhée chez le veau nouveau-né (Fayer *et al.*, 1989a), chez l'agneau (Naciri *et al.*, 1994) et chez la souris (Arrowood *et al.*, 1989 ; Fayer *et al.*, 1989b). *In vitro*, l'utilisation du colostrum bovin hyperimmun a également montré une réduction de l'infection suggérant un blocage de l'accès aux récepteurs impliqués dans la pénétration de *C. parvum* (Doyle *et al.*, 1993 ; Flanigan *et al.*, 1991 ; Ungar *et al.*, 1990b). La présence dans le colostrum d'immunoglobulines spécifiques et d'autres facteurs comme les cytokines peut en partie expliquer le rôle protecteur du colostrum bovin hyperimmun contre la cryptosporidiose (Fayer *et al.*, 1991 ; Petersen *et al.*, 1992 ; Tilley *et al.*, 1990).

Il est difficile d'envisager un vaccin contre la cryptosporidiose pour les nouveau-nés puisqu'ils se contaminent dès la naissance. Toutefois des essais de vaccination ont abouti à des résultats encourageants. Harp et Goff ont induit une protection chez des veaux vaccinés dès la naissance avec une préparation d'oocystes lyophilisés, mais cette protection n'était que partielle (Harp et Goff, 1995). De plus, l'efficacité du colostrum bovin hyperimmun suggère qu'une vaccination des mères pour protéger les jeunes *via* le colostrum soit envisageable. Un essai de vaccination génique avec le gène d'une protéine immunodominante de *C. parvum* (Cp 15) a donné des résultats prometteurs chez des chevreaux issus de mères vaccinées par voie nasale (Sagodira *et al.*, 1999).

II- RÉPONSE IMMUNITAIRE DANS LA MUQUEUSE INTESTINALE

La muqueuse intestinale constitue une barrière physiologique et immunologique contre les pathogènes et les corps étrangers. Dans les conditions physiologiques normales, un équilibre entre les mécanismes de tolérance et les mécanismes de défense est maintenu et les processus inflammatoires sont régulés.

La muqueuse digestive est constituée d'un épithélium cylindrique dont la vitesse de renouvellement est très rapide, de la lamina propria (chorion) et de la muscularis mucosae (fine couche de cellules musculaires).

Quatre types cellulaires dérivant de cellules souches pluripotentes logées dans les cryptes constituent cet épithélium :

- les cellules absorbantes constituent la majorité des cellules du tractus digestif (90%) et jouent un rôle important dans l'absorption des nutriments.
- les cellules de Paneth sécrètent des granules riches en lysozyme qui possède une forte activité bactériolytique et des peptides antibiotiques tels que la cryptidine
- les cellules à mucus (caliciformes) contribuent à la formation d'une couche protectrice à la surface des entérocytes
- les cellules entéroendocriniennes produisent des hormones au niveau des capillaires du tissu conjonctif.

Hormis les cellules de Paneth qui restent localisées dans les cryptes, les trois autres types de cellules migrent des cryptes vers le sommet des villosités où elles sont normalement expulsées dans la lumière après 3 ou 4 jours.

La lamina propria est constituée de tissu conjonctif, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de cellules lymphoïdes.

La muqueuse digestive peut se protéger des pathogènes présents dans la lumière intestinale par des mécanismes innés non immunologiques à la fois physiques (mucus, glycocalyx, péristaltisme...) et chimiques (lysozyme, lactoferrine, défensine...). Lorsque ces mécanismes ne sont pas suffisants pour éliminer le pathogène, la muqueuse intestinale peut également mettre en œuvre des moyens de défenses immunitaires spécifiques grâce au GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). En effet, ce tissu lymphoïde associé à l'intestin possède à lui seul plus de cellules immunitaires que le reste de l'organisme.

1. La cellule épithéliale

Les cellules épithéliales constituent une surface d'échange importante avec le milieu extérieur au niveau de laquelle sont absorbés les nutriments. Ces cellules participent également à la protection innée de la muqueuse intestinale, par leur structure et par la sécrétion d'un certain nombre de facteurs, et à la protection spécifique par la régulation du tissu lymphoïde sous-jacent. Elles jouent également un rôle de sentinelle dans la surveillance de la réponse immunitaire en tant que premières cellules présentatrices de l'antigène potentielles en contact avec l'antigène.

a/ Fonctions effectrices dans la réponse innée

Les cellules épithéliales intestinales contribuent significativement à la fonction de barrière notamment par les jonctions serrées qui soudent les cellules épithéliales entre elles et par le glycocalyx qu'elles exposent en surface. Ces cellules et plus particulièrement les cellules à mucus, produisent des petites protéines appelées ITF pour "intestinal trefoil factor" qui interagissent avec les glycoprotéines du glycocalyx (Kindon *et al.*, 1995). Elles participent à la réparation des lésions de l'épithélium et fournissent une résistance naturelle de l'épithélium vis-à-vis des agressions. Les cellules épithéliales sécrètent d'autres facteurs solubles intervenant dans la neutralisation et/ou l'inactivation des micro-organismes et des toxines, comme des composants du complément (Andoh *et al.*, 1993), de la cryptidine (famille des défensines) (Eisenhauer *et al.*, 1992 ; Ouellette *et al.*, 1989) et des IgA.

b/ Fonctions immunorégulatrices

Les cellules épithéliales intestinales expriment un grand nombre de molécules à leur surface de façon constitutive ou inductible, pouvant influencer directement la fonction des cellules immunitaires adjacentes (Figure 5). Parmi les molécules exprimées constitutivement par les cellules épithéliales intestinales, la E-cadhérine dont le ligand est l'intégrine mucoale $\alpha E\beta 7$, joue un rôle important pour la localisation des lymphocytes intra-épithéliaux exprimant cette intégrine (Cepek *et al.*, 1993). De plus, Yio et Mayer ont montré que l'expression de la gp180 (CD66) à la surface des cellules épithéliales a un rôle potentiel dans la présentation de l'antigène en tant que molécule co-stimulatrice (Yio et Mayer, 1997). Les molécules comme ICAM-1 (CD54), LFA3 et CD86 (B7-2) intervenant dans l'adhérence et la régulation de la fonction des leucocytes sont exprimées à la surface des entérocytes lors d'une réaction inflammatoire.

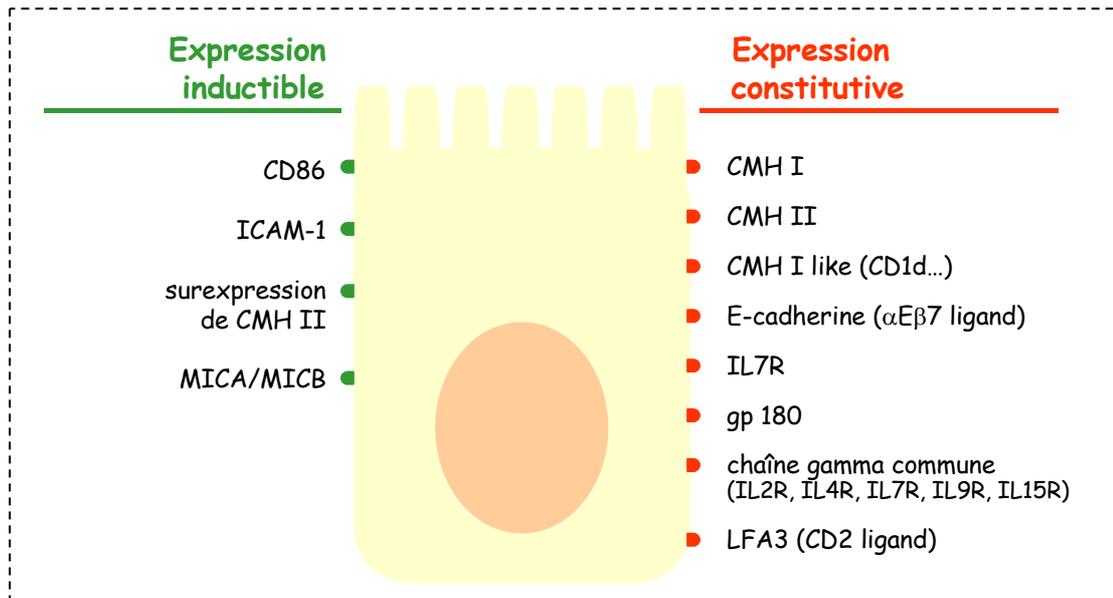


Figure 5 : Molécules exprimées en surface des cellules épithéliales intestinales (reproduite d'après Mayer et Blumberg, 1999)

Les cellules épithéliales intestinales interviennent également dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique par la sécrétion d'une grande variété de facteurs solubles dont les cytokines (Figure 6). Parmi les cytokines sécrétées, l'IL6, l'IL7, l'IL15... interviennent préférentiellement dans le développement et la croissance des lymphocytes T (Reinecker *et al.*, 1996 ; Wang et Klein, 1994 ; Watanabe *et al.*, 1995). D'autres sont impliquées dans la régulation des réponses inflammatoires locales (TGF β , PGE2) et ont une activité suppressive sur les lymphocytes T. Enfin, les cytokines appelées chimiokines (C-C, CXC ou CX₃C) attirent les cellules inflammatoires dans la muqueuse intestinale en réponse à l'infection par différents pathogènes (Eck *et al.*, 2000 ; Kawakami *et al.*, 1999 ; Talvani *et al.*, 2000). Les chimiokines et les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6, le GM-CSF, l'IL1 ou le TNF α peuvent agir en synergie pour réguler l'influx des cellules inflammatoires (Jung *et al.*, 1995). La plupart de ces cytokines peuvent aussi avoir un rôle autocrine puisque les entérocytes expriment une grande majorité des récepteurs des cytokines qu'ils produisent (Reinecker *et al.*, 1996).

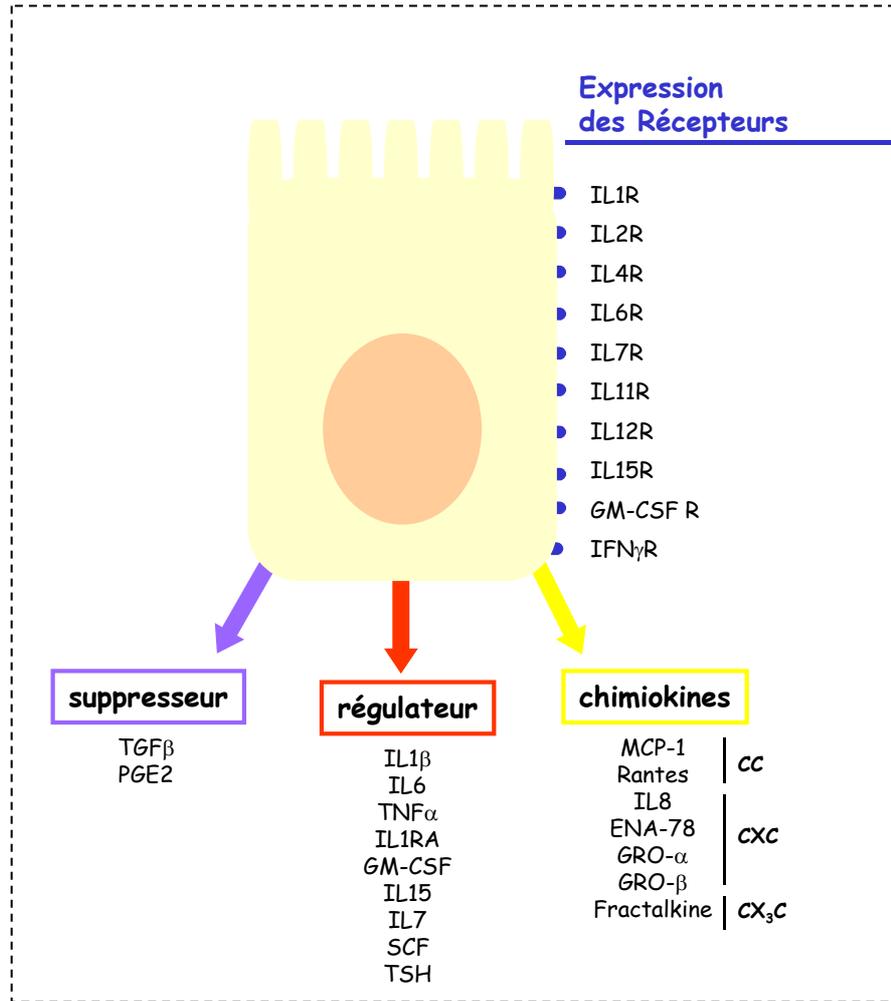


Figure 6 : Sécrétion des cytokines et expression des récepteurs des cytokines (modifiée d'après Mayer et Blumberg, 1999)

2. Présentation de l'antigène dans la muqueuse intestinale

La première étape dans l'induction de la réponse immunitaire mucoale spécifique est le transport de l'antigène à travers la barrière épithéliale. Dans les épithéliums, trois mécanismes peuvent être impliqués : la voie épithéliale, la voie des cellules dendritiques et la voie des cellules M (Figure 7).

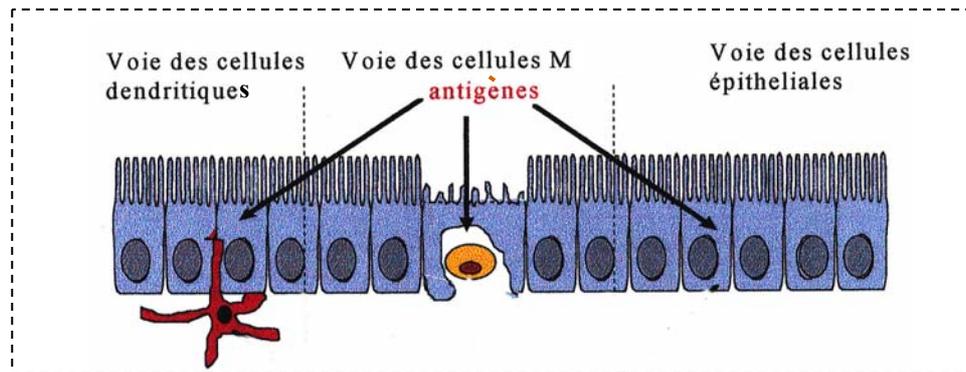


Figure 7 : Initiation de la réponse immunitaire dans l'intestin.
(d'après Kraehenbuhl, 1999)

a/ Voie des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont anatomiquement et immunologiquement de bonnes candidates pour la fonction de cellule présentatrice de l'antigène (CPA). Elles possèdent certaines caractéristiques communes avec les CPA professionnelles suggérant un rôle de ces cellules dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes anatomiquement proches, les lymphocytes intra-épithéliaux et aux lymphocytes sous-jacents à l'épithélium (Hershberg et Mayer, 2000).

Comme les CPA professionnelles, les cellules épithéliales sont capables d'internaliser les antigènes par endocytose à partir de la surface luminale. Le mucus, le glycocalyx et les différents récepteurs (récepteur des immunoglobulines polymériques, ganglioside GM1...) qu'elles expriment à leur surface apicale favorisent l'internalisation des pathogènes. De plus, les cellules épithéliales peuvent exprimer les molécules de classe I et II du CMH (Kaiserlian, 1991 ; Mayer et Shlien, 1987) et des molécules du CMH I non classiques, comme le CD1 chez la souris (Bleicher *et al.*, 1990) ou CD1d chez l'homme (Blumberg *et al.*, 1991) et MICA et MICB (Groh *et al.*, 1996), nécessaires à la présentation de l'antigène.

L'expression des molécules de classe II semble être dépendante de l'environnement inflammatoire de la muqueuse (Bland et Whiting, 1992 ; Mayer *et al.*, 1991). De même, lors d'une infection par *Helicobacter pylori* ou pendant les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD, inflammatory bowel disease) les entérocytes expriment la molécule de co-stimulation B7-2 (CD86) (Nakazawa *et al.*, 1999 ; Ye *et al.*, 1997). Par conséquent, bien que le rôle des molécules de classe II du CMH des entérocytes n'ait jamais été étudié *in vivo*, l'environnement inflammatoire de la muqueuse pourrait favoriser la fonction de présentation de l'antigène par les entérocytes aux lymphocytes T CD4+ *via* les molécules de classe II du CMH.

Les molécules de classe I du CMH semblent ne pas être indispensables à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8+ puisqu'un anticorps anti-HLA classe I

n'inhibe pas la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ induite par les cellules épithéliales de l'intestin (IEC) *in vitro* (Mayer et Shlien, 1987). Balk *et al.* ont montré que la lyse des IEC par les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) était restreinte par le CD1d (Balk *et al.*, 1991). De la même façon, la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ a été inhibée par un anticorps reconnaissant une molécule étroitement associée au CD1d, la gp180 (Yio et Mayer, 1997). Ces résultats suggèrent un rôle de cette molécule du CMH I non classique dans la présentation de l'antigène par les IEC, mais là encore aucune donnée *in vivo* ne peut conforter l'hypothèse du rôle des molécules de classe I non classique dans l'initiation de la réponse immunitaire physiologique ou pathologique des IEC.

b/ Voie des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont présentes dans la lamina propria. L'épithélium libère de façon constitutive des chimiokines qui attirent les monocytes à l'origine des cellules dendritiques retrouvées dans la lamina propria. Lors de la réaction inflammatoire, les monocytes se différencient en cellules dendritiques immatures sous l'effet du GM-CSF et sont alors capables d'internaliser l'antigène. Puis sous l'effet d'autres cytokines libérées par les cellules de la muqueuse, les molécules d'adhérence et les récepteurs de chimiokines exprimés en surface des cellules dendritiques sont modifiés. Les cellules dendritiques ne sont plus retenues dans l'épithélium mais sont attirées par des chimiokines libérées dans les tissus lymphatiques locaux où elles deviennent matures et présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs.

c/ Voies des cellules M

L'épithélium associé aux follicules (FAE) du tissu lymphoïde associé à la muqueuse de l'intestin est composé de cellules épithéliales intestinales et de cellules M. Les cellules M se caractérisent par l'absence de microvillosités, de récepteurs aux immunoglobulines polymériques et par un glycocalyx très différent de celui des entérocytes facilitant l'accès de leur membrane apicale aux antigènes luminaux. De plus, il a été montré que la surface apicale des cellules M possédait peu, voire pas de phosphatase alcaline et de sucrase isomaltase par rapport aux entérocytes. La surface basolatérale des cellules M est profondément invaginée pour former une large "poche" intra-épithéliale dans laquelle vont se loger des lymphocytes B, des lymphocytes T (majoritairement des T CD4⁺) et des cellules dendritiques (Neutra, 1999 ; Neutra *et al.*, 1996). Ainsi, des macromolécules, des particules mais aussi des virus (Sicinski *et al.*, 1990) et des bactéries (Jones *et al.*, 1994 ; Owen *et al.*, 1986 ; Wassef *et al.*, 1989) sont susceptibles d'être transportés non spécifiquement par ces cellules de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-jacent.

3. Le système immunitaire associé aux muqueuses du tractus digestif (GALT)

Le système immunitaire de la muqueuse est constitué de sites inducteurs spécialisés locaux (tissu lymphoïde organisé associé aux muqueuses ou **O-MALT**) et de sites effecteurs plus dispersés (le tissu lymphoïde diffus associé aux muqueuses ou **D-MALT**). Ces deux types de tissus sont séparés des antigènes de surface mucosaux par une barrière constituée par les cellules épithéliales.

a/ Les sites inducteurs de la réponse immune mucosale

Les sites inducteurs de la réponse immunitaire locale de l'intestin sont constitués par les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des amas lymphoïdes composés de follicules lymphoïdes, d'un FAE, et d'une zone parafolliculaire (Figure 8). Elles sont dépourvues de vaisseaux lymphatiques afférents et reçoivent l'information antigénique *via* l'épithélium (Kraehenbuhl et Neutra, 1992).

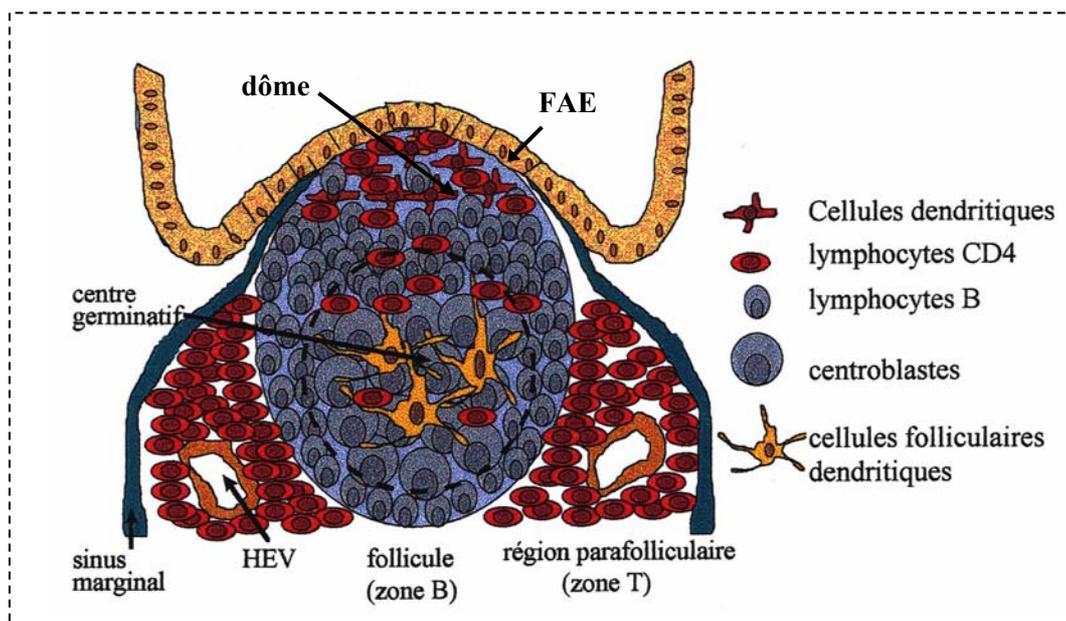


Figure 8 : Représentation schématique d'une plaque de Peyer (d'après Kraehenbuhl, 1998).
FAE, c'est l'épithélium associé aux follicules (de l'anglais Follicle-Associated Epithelium)
HEV, ce sont les veinules post-capillaires (de l'anglais High Endothelium Venule).

• Les follicules du O-MALT

Les follicules lymphoïdes de l'intestin sont constitués de lymphocytes B naïfs IgM+/IgD+, de cellules dendritiques et de macrophages organisés autour d'un ou deux centres germinatifs riches en centrocytes et centroblastes B et contenant quelques cellules dendritiques folliculaires (Neutra *et al.*, 1996). La nature et l'origine des cellules dendritiques folliculaires ne sont pas bien connues à l'heure actuelle. Elles joueraient un

rôle important dans la prolifération des cellules B notamment par la lymphotoxine- α (TNF β) qu'elles produisent et pourraient induire l'expression des molécules d'adhérence. Les follicules sont séparés de l'épithélium par un dôme subépithélial constitué de cellules B, de lymphocytes T CD4+, de cellules dendritiques immatures et de quelques macrophages.

- *L'épithélium associé aux follicules (FAE)*

Les follicules lymphoïdes du O-MALT sont séparés de la lumière intestinale par un FAE spécialisé contenant des entérocytes et des cellules M transportant l'antigène.

- *La zone parafolliculaire*

Les follicules sont séparés les uns des autres par une zone parafolliculaire constituée d'une majorité de lymphocytes T, essentiellement des CD4+, mais aussi de quelques cellules dendritiques matures et de macrophages. Cette zone parafolliculaire renferme des veinules post-capillaires (HEV pour High Endothelium Venule) par lesquelles arrivent les lymphocytes sanguins.

b/ Les sites effecteurs de la réponse immune mucoale spécifique

En dehors des tissus lymphoïdes organisés, beaucoup de cellules lymphoïdes sont réparties dans la lamina propria et dans l'épithélium de l'intestin. Le tissu lymphoïde effecteur ou diffus (D-MALT) est constitué de lymphocytes B à IgA, des lymphocytes T CD4+ et de lymphocytes T CD8+ appelés intra-épithéliaux en raison de leur localisation particulière.

- *Les lymphocytes intra-épithéliaux*

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont des lymphocytes logés entre les cellules épithéliales et possèdent des caractéristiques particulières. Ce sont les premières cellules effectrices du système immunitaire local en contact avec les pathogènes.

- (i) *Les différentes populations d'IEL*

La nature des chaînes, homo ou hétérodimériques, constituant la molécule CD8 portée par la majorité des IEL permet de définir chez la souris deux populations d'IEL (Figure 9) (Guy-Grand *et al.*, 1991).

La population CD8 $\alpha\beta$ + est identique à celle que l'on trouve dans les organes lymphoïdes : elle exprime le TCR $\alpha\beta$ et est Thy-1+ et thymo-dépendante. Ces IEL provenant du thymus migrent dans les plaques de Peyer où ils se différencient sous l'influence des antigènes luminaux apportés par les cellules M. Puis ces IEL débutent un cycle entéro-entérocytaire pour migrer ensuite vers l'épithélium.

La population CD8 $\alpha\alpha$ est thymo-indépendante et majoritairement Thy-1-. Provenant directement de la moelle osseuse, cette population de cellules se différencie dans l'intestin. Elle porte soit le TCR $\alpha\beta$ soit le TCR $\gamma\delta$ et peut exprimer des molécules retrouvées habituellement sur les cellules NK : NK1.1, CD16 et Ly49. Cette population de CD8 $\alpha\alpha$ est particulière de par la nature des chaînes de la molécule CD3 qui transmettent des signaux activateurs. CD3 peut utiliser à la fois la chaîne ζ et la chaîne Fc ϵ RI γ présente également dans les mastocytes et les cellules NK mais absente des lymphocytes d'origine thymique. Cette population d'IEL contrairement à la population d'IEL CD8 $\alpha\beta$ +, n'a pas subi de sélection négative par les antigènes du soi au niveau du thymus (Rocha *et al.*, 1995). Chez la souris, la prolifération des IEL CD8 $\alpha\alpha$ + a lieu au sein de structures particulières de la lamina propria appelées cryptopatches (Saito *et al.*, 1998 ; Suzuki *et al.*, 2000).

Chez l'homme, une proportion importante d'IEL exprime le TCR $\alpha\beta$ contre seulement 13% qui exprime le TCR $\gamma\delta$. On trouve également des IEL CD8 $\alpha\alpha$ mais en très faible quantité (Jarry *et al.*, 1990).

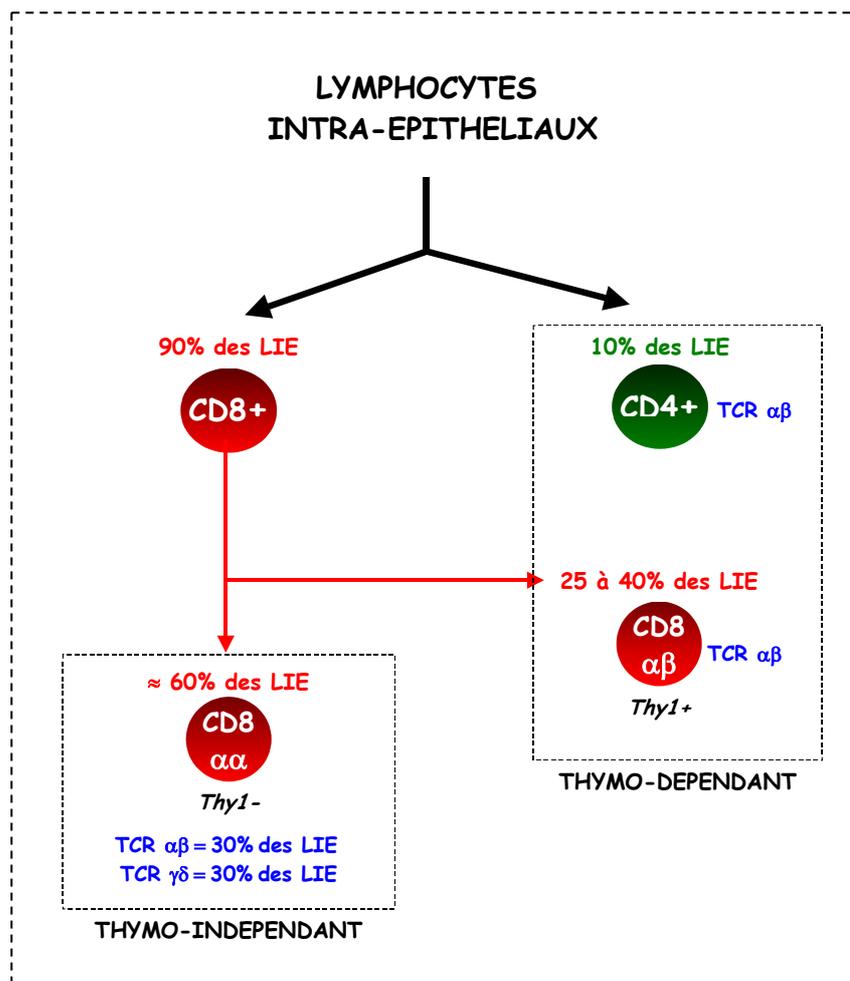


Figure 9 : Phénotypes et origines des différents IEL chez la souris (réalisée d'après Guy-Grand et Vassalli, 1993)

(ii) Fonctions

Quels que soient leurs marqueurs de surface, les IEL sont des cellules différenciées et activées. Ils expriment à leur surface la molécule d'activation CD69, le marqueur CD45RO (85%) et une intégrine qui leur est particulière $\alpha E\beta 7$ (CD103 ou HML-1 chez l'homme) dont le ligand est la E-cadhérine exprimée par les entérocytes (Cerf-Bensussan *et al.*, 1987). Leur prolifération, sous l'influence des antigènes intestinaux, conduit à un répertoire oligoclonal limité, différent pour les IEL thymo-dépendants et thymo-indépendants (Rocha *et al.*, 1995).

Tous les IEL sont fortement cytotoxiques notamment par les molécules qu'ils produisent (perforine, granzyme) ou expriment en surface (Fas-Ligand). De plus, les IEL sont d'importants sécréteurs d'IFN γ et de TNF α (Guy-Grand *et al.*, 1998). Les IEL sont impliqués dans la défense de la barrière intestinale constituée par les entérocytes en induisant une apoptose des cellules infectées ou altérées et donc un renouvellement plus rapide de l'épithélium. Une fois dans l'épithélium, les IEL ne retournent pas dans la lamina propria.

• *Les IgA*

Les lymphocytes B de la lamina propria au contact de l'épithélium se différencient en plasmocytes qui sécrètent des anticorps IgA. Chez la souris, les plasmocytes à IgA constituent en moyenne 40% des cellules de la lamina propria (Mestecky et McGhee, 1987). Les plasmocytes à IgA sont les descendants de précurseurs nés dans les plaques de Peyer (lymphocytes B2) qui ont parcouru les voies lymphatiques et traversé les ganglions mésentériques pour atteindre le canal thoracique puis la circulation sanguine. Certains plasmocytes IgA sont également issus de précurseurs B proliférant dans la cavité péritonéale (lymphocytes B1) (Kroese *et al.*, 1996). Chez les rongeurs, les plasmocytes sécrètent de façon exclusive des immunoglobulines de type IgA polymériques. Chez l'homme, on trouve à côté des plasmocytes IgA, quelques plasmocytes IgG et IgM. Le TGF β est une cytokine sécrétée en grande quantité par l'épithélium intestinal favorisant la production des IgA dans la lamina propria.

(i) Structure des IgA

Les IgA de la muqueuse intestinale sont constituées de deux IgA monomériques jointes par la chaîne J et par une glycoprotéine appelée composante sécrétoire (récepteur des Ig polymériques). Les dimères d'IgA (et IgM pour l'homme) synthétisés par les plasmocytes au niveau de la lamina propria se lient à la surface basolatérale des entérocytes sur un récepteur des Ig polymérisées. Le complexe récepteur-Ig est ensuite internalisé par endocytose, transporté à travers le cytoplasme et relargué à la surface de la

cellule épithéliale. Ce relargage s'accompagne d'un clivage protéolytique qui libère la composante sécrétoire liée au dimère d'IgA dans l'espace extracellulaire. Cette composante sécrétoire confère aux dimères d'IgA une résistance à la protéolyse par les enzymes digestives.

(ii) Fonctions des IgA

La fonction principale des IgA est de protéger la surface des muqueuses par exclusion immune c'est-à-dire que les IgA vont empêcher l'adhérence des micro-organismes ou des antigènes luminaux (enzymes, toxines) à l'épithélium favorisant ainsi leur élimination par péristaltisme (Lamm *et al.*, 1995 ; Russel *et al.*, 1999). Généralement, les IgA exercent leur pouvoir neutralisant dans la lumière intestinale empêchant ainsi la pénétration des pathogènes ou des toxines dans la cellule épithéliale. Mazanec a montré que les IgA polymériques peuvent également neutraliser les virus à l'intérieur de la cellule épithéliale infectée (Mazanec *et al.*, 1992 ; Mazanec *et al.*, 1995). L'agglutination des pathogènes est un autre moyen pour les IgA de protéger la muqueuse intestinale. Les IgA se lient au pathogène et utilisent leur propriété d'hydrophilicité et la présence de charges négatives sur la composante sécrétoire pour former autour du pathogène une sorte d'anneau hydrophile qui empêche l'attachement à la surface mucosale.

• *Les lymphocytes de la lamina propria (LPL)*

Dans la lamina propria, 70% des lymphocytes T sont de type CD4+. Ces lymphocytes exprimant majoritairement le phénotype des cellules mémoires (CD45RO) prolifèrent peu en réponse à une stimulation *via* le TCR/CD3. En revanche, ils prolifèrent fortement en réponse à une stimulation *via* CD2/CD28. Les lymphocytes T CD4+ ou T auxiliaires sont d'importants producteurs de cytokines de type Th1 et Th2. Parce que les LPL CD4+ produisent préférentiellement des cytokines de type Th2 (IL4, l'IL5 et l'IL6), ils favorisent la différenciation des cellules B IgA+ en plasmocytes sécréteurs d'IgA (Beagley *et al.*, 1989). Les LPL peuvent également stimuler l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+, activer les macrophages et renforcer la capacité des cellules NK à détruire les cellules cibles.

4. Réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale et recirculation des lymphocytes

Les lymphocytes recirculent en permanence dans l'organisme *via* la lymphe et le sang. Cette recirculation augmente la probabilité pour les lymphocytes de rencontrer leur antigène spécifique et permet aux lymphocytes activés de migrer du site d'induction de la réponse immune vers les sites effecteurs (Figure 10).

La première étape dans l'induction de la réponse immunitaire muqueuse est le transport de l'antigène à travers la barrière épithéliale. Lorsque la voie des cellules M est empruntée, les cellules lymphoïdes de la poche intra-épithéliale de la cellule M représentant une extension du follicule sous-jacent de la plaque de Peyer captent l'antigène. La rencontre des lymphocytes et de l'antigène présenté par les CPA permet l'amorçage de la réponse immunitaire.

Les précurseurs B activés migrent dans la zone B et commencent leur maturation dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes. Dans le centre germinatif, les cellules B appelées centroblastes prolifèrent et les régions variables de leurs gènes d'immunoglobulines subissent une hypermutation somatique qui génère de nouveaux récepteurs à la surface des lymphocytes. Les cytokines environnantes comme le TGF β ou l'IL5 ou l'IL6 favorisent le "switch" des IgA (Lebman *et al.*, 1990 ; Murray *et al.*, 1987). Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes qui ne prolifèrent plus et interagissent avec les cellules dendritiques folliculaires. Les centrocytes se différencient à leur tour en cellules mémoires ou en cellules effectrices qui migrent dans les tissus muqueux.

Les précurseurs T activés dans les zones interfolliculaires commencent leur maturation dans les ganglions mésentériques. Les blastes B et T vont entamer un cycle entéro-entérocytaire en rejoignant la circulation générale par l'intermédiaire du canal thoracique. Ils se rendent ensuite dans les sites effecteurs c'est-à-dire dans les villosités de l'intestin. L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est essentielle au retour des lymphocytes dans la muqueuse intestinale (Hamann *et al.*, 1994). Le ligand MadCAM1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) est exprimé sur les veinules post-capillaires des ganglions mésentériques et du GALT et sur les veinules post-capillaires de la lamina propria permettant le retour des lymphocytes dans la muqueuse intestinale (Streeter *et al.*, 1988).

Dans la lamina propria, les blastes B se différencient alors en plasmocytes à IgA. Les blastes T migrent, soit dans la lamina propria, soit dans l'épithélium (essentiellement des lymphocytes T CD8+), et achèvent leur différenciation en lymphocytes T sous l'influence de facteurs locaux (Butor *et al.*, 1995). Le TGF β produit en grande quantité par l'épithélium intestinal permet l'expression de l'intégrine $\alpha E \beta 7$ à la surface des IEL ainsi

que le recrutement et la rétention de ces cellules dans l'épithélium (Cerf-Bensussan *et al.*, 1987).

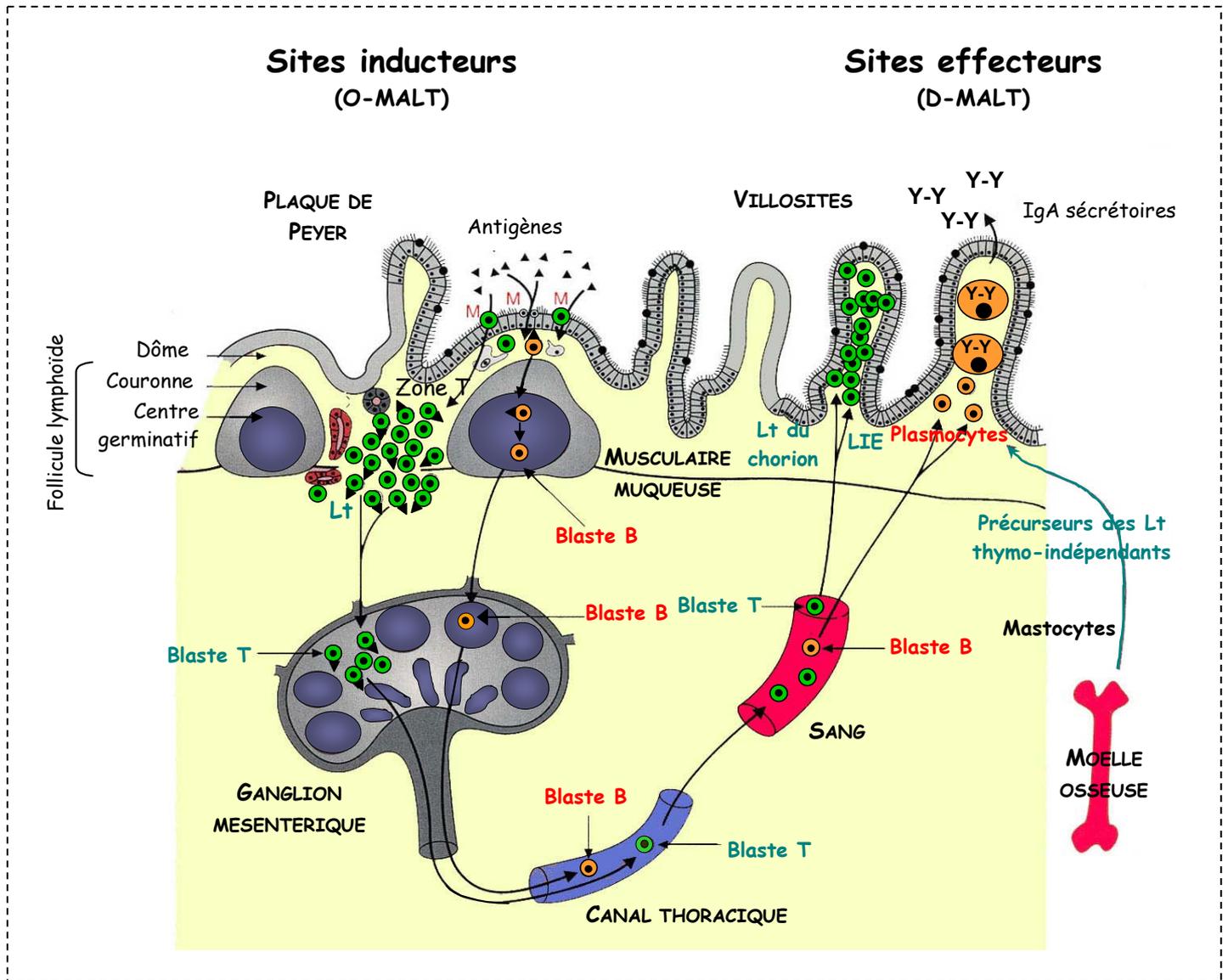


Figure 10 : Cycle entéro-entérique des lymphocytes T et des plasmocytes à IgA (d'après Butor *et al.*, 1995). M : cellules M ; Lt : lymphocytes T.

5. La réponse immunitaire chez le nouveau-né

Chez les animaux de rente, les nouveau-nés sont souvent atteints de cryptosporidiose. Un des modèles murins utilisé pour étudier la réponse immunitaire déclenchée par le développement du parasite dans l'intestin est le modèle des souriceaux. Le système immunitaire du nouveau-né apparaît généralement immature malgré la présence d'un certain nombre de composants fonctionnels dès la naissance. Pendant la période néonatale, d'importants changements se produisent dans l'intestin contribuant à la maturité et à une parfaite efficacité du système immunitaire.

a/ Les composants de l'immunité innée

Parmi les mécanismes impliqués dans la réponse protectrice innée des muqueuses, les concentrations salivaires de l'amylase, du lysozyme et de la lactoferrine sont très faibles chez le nouveau-né et n'atteignent un taux équivalent à celui de l'adulte qu'après environ 20 semaines (Thrane *et al.*, 1991).

De plus, chez le nouveau-né, la barrière épithéliale intestinale n'est pas complètement étanche avant quelques jours favorisant ainsi la pénétration des pathogènes dans l'organisme et donc les infections systémiques dès le plus jeune âge. D'un autre côté, cela permet aux immunoglobulines maternelles de renforcer passivement l'immunité. Des études ont montré que chez les nouveau-nés n'ayant pas reçu de colostrum, la fermeture de cette barrière épithéliale était retardée (Bines et Walker, 1991 ; Gleeson *et al.*, 1986).

Chez le nouveau-né, les composants du système du complément sont présents mais en faible quantité. Puisque l'activation du complément repose sur une activation en cascade des différents composants, la déficience d'un des composants empêche la libération des facteurs chimiotactiques comme le C5a et le C3b et la formation du complexe d'attaque membranaire (Schelonka et Infante, 1998).

La réponse cellulaire innée est relativement inefficace à la naissance et se développe progressivement pendant la période néonatale. Les polymorphonucléaires (PMN) ont la capacité de tuer les pathogènes intracellulaires et de produire de l'IL1. Cependant, leur capacité à répondre aux facteurs chimiotactiques et à adhérer à l'endothélium vasculaire est limitée (Fadel et Sarzotti, 2000). Le nombre de cellules NK est restreint chez les nouveau-nés par rapport aux adultes toutefois ces cellules sont très sensibles aux différents stimuli permettant la synthèse d'IFN γ . Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont présents dès la naissance et il semble que ces cellules soient les plus efficaces chez le nouveau-né pour combattre les pathogènes extracellulaires (Fadel et Sarzotti, 2000). Des études ont montré que les macrophages de nouveau-nés stimulés avec du LPS produisaient moins de TNF α et d'IL6 que les macrophages d'adultes suggérant un défaut de maturité de ces cellules (Mannick et Udall, 1996).

b/ Les composants de l'immunité acquise

Des différences qualitatives et/ou quantitatives entre les lymphocytes T du nouveau-né et de l'adulte pourraient expliquer la moins bonne efficacité de la réponse immunitaire observée chez le nouveau-né.

L'expression des molécules de classe II du CMH commence dès la naissance et augmente pendant la période néonatale (Rognum *et al.*, 1992 ; Russell *et al.*, 1990). Le contact avec des antigènes et l'environnement en cytokines (IFN γ et TNF α) favorisent cette expression et donc la maturation des CPA. De même, l'expression de molécules d'adhérence augmente au cours du temps pour permettre les coopérations cellulaires et la circulation des leucocytes (Keever *et al.*, 1995 ; Sanders *et al.*, 1988).

L'activation des lymphocytes T des nouveau-nés nécessite des signaux différents par rapport aux lymphocytes T des adultes. La stimulation par un anticorps anti-CD2 ou anti-CD3 est plus efficace pour des lymphocytes d'adultes que de nouveau-nés. Par contre, les lymphocytes de nouveau-nés répondent plus à la stimulation par CD28 (Schelonka et Infante, 1998). Pour les lymphocytes T des nouveau-nés qui expriment majoritairement (97%) un phénotype de cellules naïves (CD45RA), la fonction de cellules auxiliaires est très peu développée, au contraire la fonction immunorégulatrice suppressive est importante.

Le nombre et la distribution des lymphocytes T sont différents chez le nouveau-né et l'adulte (Fadel et Sarzotti, 2000). Chez la souris, les nouveau-nés possèdent 100 fois moins de cellules immunitaires que les adultes. A la naissance, le nombre de LPL est supérieur à celui des IEL, il augmente rapidement juste avant le sevrage alors que le nombre d'IEL augmente plus tardivement (Steege *et al.*, 1997). Chez l'homme, le nombre d'IEL augmente avec l'âge atteignant le niveau adulte à 2 ans. Le nombre d'IEL TCR $\alpha\beta$ augmente 10 fois alors que le nombre de TCR $\gamma\delta$ augmente seulement de 2 à 3 fois. Phénotypiquement, les IEL restent CD3/CD8 de la naissance à l'âge adulte (Cerf-Bensussan et Guy-Grand, 1991).

Chez les nouveau-nés, la réponse des lymphocytes T est généralement de type Th2 et les réponses Th1 et CTL sont peu développées voire absentes (Adkins, 1999). La faible expression des complexes TCR et des molécules d'adhérence peut expliquer la stimulation modérée des lymphocytes Th1 et CTL. De plus, il semblerait que les lymphocytes Th1 et CTL des nouveau-nés soient plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes Th2 des nouveau-nés et les lymphocytes T des adultes, expliquant ainsi l'orientation Th2 des réponses aux infections chez les nouveau-nés (Adkins *et al.*, 1996). Il a été montré dans plusieurs études réalisées *in vitro*, que les lymphocytes T ont la capacité de produire des cytokines de type Th1 et d'exercer une fonction CTL pour protéger les nouveau-nés, mais cela nécessite des conditions particulières de stimulation. Par exemple, l'addition d'IL12 ou d'IL6 exogène à des lymphocytes T de nouveau-né humain ou murin peut induire la

synthèse d'IFN γ et d'IL2 respectivement caractérisant une réponse Th1 (Adkins *et al.*, 1994). Après avoir estimé le nombre de cellules lymphoïdes chez un souriceau par rapport à une souris adulte, Sarzotti *et al.* ont montré qu'une dose importante de virus induisait une réponse de type Th2 chez le souriceau alors qu'une faible dose induisait une réponse protectrice de type Th1 (Sarzotti *et al.*, 1996). De plus, l'équivalence de la dose du virus qui induit une réponse Th2 chez le souriceau, induit également une réponse Th2 chez l'adulte suggérant que le nombre des cellules lymphoïdes joue un rôle important dans l'orientation de la réponse. Les nouveau-nés, comme les adultes, sont intrinsèquement capables de développer une réponse de type Th1 ou Th2, la dose d'antigène et l'environnement en cytokines étant déterminants pour l'orientation de la réponse.

Pour finir, la réponse anticorps chez les nouveau-nés est caractérisée par la production majoritaire d'IgM par rapport aux IgG et IgA. Les IgG produites par les cellules B des nouveau-nés sont de type IgG1 et IgG3 (caractéristiques d'une réponse Th2) alors que chez l'adulte elles sont de type IgG2 et IgG4.

c/ Facteurs influençant le développement du système immunitaire

Plusieurs facteurs peuvent affecter le développement de l'immunité mucoale (Cripps et Gleeson, 1999). Le colostrum contribue à la fermeture de la barrière épithéliale et confère une protection passive au nouveau-né. Dans le lait maternel, un certain nombre de cytokines a été mis en évidence, elles pourraient participer à la maturation du système immunitaire en augmentant l'expression des molécules du CMH ou des récepteurs aux immunoglobulines polymériques sur les cellules épithéliales intestinales. De plus, les IEL ou les LPL, les macrophages... pourraient être recrutés ou activés par les cytokines du lait (Goldman *et al.*, 1996). L'alimentation joue un grand rôle dans le développement de l'immunité mucoale puisqu'elle induit par elle-même un stimulus pour le développement du système immunitaire. En effet, un nouveau-né nourri par voie intraveineuse ne produit des IgA que très tardivement par rapport à un nouveau-né nourri normalement par voie orale. Par ailleurs, une malnutrition à l'état fœtal ou après la naissance peut être responsable d'un retard de l'immunité chez les nouveau-nés. Enfin, les corticostéroïdes se trouvant dans le lait de la mère émotionnellement stressée réduisent les défenses immunitaires du nouveau-né.

III- RÉPONSE IMMUNITAIRE À L'INFECTION PAR *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

L'infection par *C. parvum* concerne essentiellement les nouveau-nés et les sujets immunodéprimés comme les patients atteints du SIDA et les patients avec une hypogammaglobulinémie... Chez les animaux, l'infection atteint surtout les ruminants nouveau-nés. Elle conduit à une morbidité et dans certains cas à une mortalité des animaux.

De nombreux modèles murins ont été développés afin d'étudier la réponse immunitaire à l'infection par *C. parvum in vivo* :

- Le modèle de souris (Ernest *et al.*, 1986 ; Heine *et al.*, 1984 ; Novak et Sterling, 1991)
- Les souris dont le système immunitaire est altéré
 - comme les souris SCID (Severe Combined Immunodeficient mice) qui ne possèdent pas de lymphocytes T ni de lymphocytes B (Harp *et al.*, 1992 ; Kuhls *et al.*, 1992 ; Mead *et al.*, 1994)
 - les souris Nude BALB/c c'est-à-dire athymiques, déficientes de tous les lymphocytes T thymo-dépendants (Heine *et al.*, 1984 ; McDonald *et al.*, 1992 ; Ungar *et al.*, 1990a)
 - les souris knock-out pour l'IFN γ (Mead et You, 1998 ; Theodos *et al.*, 1997), le TCR α (Waters et Harp, 1996), le CD40 et CD40L (Cosyns *et al.*, 1998), les molécules de classe II du CMH (Aguirre *et al.*, 1994)...

Pour permettre certaines approches immunologiques, *C. muris* a été utilisé dans différentes études parce que cette espèce de *Cryptosporidium* présente l'avantage d'induire une infection importante chez les souris adultes. En revanche, cette espèce de *Cryptosporidium* se multiplie dans la muqueuse gastrique et non pas dans la muqueuse iléale comme *C. parvum*.

La résistance et la protection contre *C. parvum* nécessitent des réponses immunitaires de l'hôte innées par les cellules épithéliales et les cellules sous-jacentes à l'épithélium et des réponses immunitaires spécifiques médiées par les lymphocytes T et les cellules B. La réponse de l'hôte suite à l'infection par *C. parvum* sera décrite dans ce chapitre.

1. Réponse immunitaire innée

a/ Résistance à l'infection

- *La flore*

Les sujets nouveau-nés sont plus sensibles à l'infection par *C. parvum* que les sujets adultes. Les souriceaux sont sensibles jusqu'à l'âge de 3 semaines (Novak et Sterling, 1991 ; Sherwood *et al.*, 1982) date à laquelle la microflore résidente s'installe dans l'intestin (Davis *et al.*, 1973). A cet âge, les souriceaux sont sevrés et le changement d'alimentation contribue également à la modification de la flore intestinale. Selon Harp *et al.*, la résistance des souris adultes à l'infection par *C. parvum* peut être liée à la présence de la flore intestinale (Harp *et al.*, 1988). Pour tester cette hypothèse, des souris adultes "germ-free" et des souris normales ont été inoculées avec le parasite. Le développement de l'infection chez les souris adultes "germ-free" permet de conclure à un rôle de la flore microbienne dans la résistance initiale à l'infection. Harp *et al.* confirment ce résultat en montrant que les souris SCID "germ-free" sont très infectées 3 semaines après l'inoculation de *C. parvum* par rapport aux souris SCID normales (Harp *et al.*, 1992). Si la flore intestinale peut jouer un rôle dans la résistance à l'infection, la multiplication rapide du parasite chez des souris adultes déficientes en IFN γ suggère que d'autres éléments de la réponse innée peuvent intervenir dans la résistance à l'infection .

- *Facteur labile*

D'après Akili et Harp, la présence dans l'intestin d'un facteur labile à la chaleur pourrait contribuer à la résistance à l'infection. Dans cette étude, des rats âgés de 3 jours reçoivent quotidiennement pendant 11 jours des raclages d'intestin de rat ou de vache adultes et sont inoculés à l'âge de 9 jours. Après 6 jours d'infection, les rats ayant reçu les raclages d'intestin excrètent moins d'oocystes que les rats n'ayant rien reçu ou ayant reçu des raclages d'intestin de veaux. Ce facteur semble être dépendant de l'état de maturation de l'intestin, par contre le statut immunitaire n'a pas d'incidence sur sa fonction. La nature et le rôle exacts de ce facteur restent à être déterminés (Akili et Harp, 2000).

- *La MBL (mannose binding lectin)*

Parmi les mécanismes de défense non spécifiques de l'hôte contre *C. parvum*, la MBL semble jouer un rôle. La MBL est une lectine du sérum qui se lie à des résidus mannose et N-acetyl glucosamine exprimés en surface des micro-organismes. Une fois liée, la MBL active le système du complément d'une manière indépendante des anticorps, *via* deux sérines protéases qui lui sont associées, MASP-1 et MASP-2 qui clivent C4 puis C2 pour former la C3 convertase C4b2a (Figure 11).

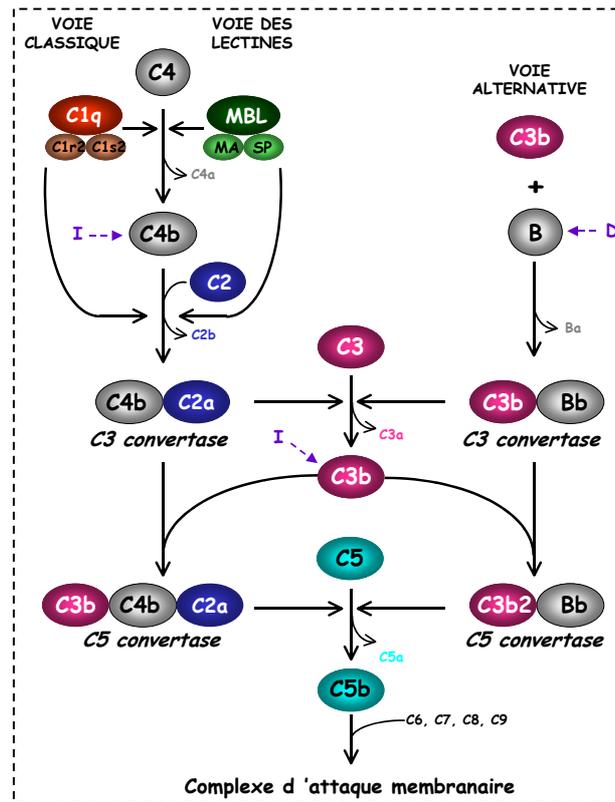


Figure 11 : Les voies d'activation du complément

Chez l'homme, une déficience génétique en MBL augmente le risque d'infection par de nombreux agents pathogènes notamment par *C. parvum* (Kelly *et al.*, 2000 ; Summerfield *et al.*, 1995). La MBL retrouvée dans les fluides duodénaux de patients atteints de cryptosporidiose a la capacité de se lier aux sporozoïtes de *C. parvum* et permet ensuite la fixation de la protéine du complément C4 à la surface des sporozoïtes (Kelly *et al.*, 2000). Ces études réalisées sur des patients atteints du SIDA suggèrent qu'en absence de défense immunitaire spécifique, des mécanismes de défense innée faisant intervenir notamment la MBL puissent jouer un rôle plus important dans l'élimination du parasite.

A l'heure actuelle, ce mécanisme de la protection innée par la MBL est encore peu étudié dans les cas de cryptosporidiose, mais il pourrait en partie expliquer la sensibilité à l'infection observée chez les jeunes dont le système du complément n'est pas encore totalement développé (confère Contexte bibliographique II-5, la réponse immunitaire chez le nouveau-né).

b/ Les cellules épithéliales dans la protection innée

Les cellules épithéliales sont les cellules hôtes de *C. parvum*. Elles répondent de manière non spécifique pour permettre l'élimination du parasite et peuvent également être à l'origine de la réponse immunitaire acquise.

• *Les enzymes de la bordure en brosse*

L'infection des cellules épithéliales par *C. parvum* nécessite une interaction des lectines exprimées en surface de la cellule épithéliale avec les sucres simples ou les complexes carbohydrates des sporozoïtes de *C. parvum* (Kuhls *et al.*, 1991 ; Llovo *et al.*, 1993). Une étude récente montre qu'une alimentation supplémentée en sucrose favorise la résistance des souriceaux à l'infection par *C. parvum*, probablement par compétition avec les récepteurs de type lectine présents à la surface des IEC (Harp, 1999).

Au moment du sevrage, les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes sont modifiées (Klein, 1989). Chez les souriceaux, la lactase est très exprimée avant le sevrage alors que la sucrase est peu exprimée. Après le sevrage, le niveau d'expression pour ces deux enzymes s'inverse (Harp *et al.*, 1999).

Ces observations ne permettent pas de comprendre clairement comment les changements de la composition en enzymes de la bordure en brosse influencent la sensibilité ou la résistance à l'infection par *C. parvum*. Harp *et al.* ont suggéré que l'augmentation de la concentration en sucrase pouvait être reliée à une diminution du nombre de récepteurs de type lectine en surface des IEC, ou à un encombrement stérique de cette enzyme qui cacherait le récepteur aux sporozoïtes (Harp *et al.*, 1999).

• *Les chimiokines*

Les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire jouant un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. L'infection par *C. parvum* de lignées de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2, HCT-8) provoque l'augmentation de l'expression et la production de deux CXC chimiokines, l'IL8 et GRO α . La libération de ces chimiokines est observée au pôle basolatéral des cellules épithéliales ce qui pourrait expliquer la migration des neutrophiles vers l'épithélium à la suite d'une infection par *C. parvum* (Laurent *et al.*, 1997). En 2000, Favennec et ses collaborateurs montrent que les cellules épithéliales humaines peuvent également répondre à l'infection par *C. parvum* en produisant une autre chimiokine appartenant à la famille des CC chimiokines, Rantes (Maillot *et al.*, 2000). Ces études montrent que les cellules épithéliales peuvent jouer un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire par la production des chimiokines. Dans cette thèse, nous avons poursuivi ces travaux sur les

lignées de cellules épithéliales murines et complété les résultats obtenus avec des études *in vivo*.

- *Les prostaglandines*

Les prostaglandines jouent un rôle majeur dans la sécrétion de fluides mucosaux et dans la diarrhée observée dans un modèle expérimental de porcelets atteints de cryptosporidiose (Kandil *et al.*, 1994). Parmi les différentes cellules de l'intestin, les cellules épithéliales infectées par *C. parvum* sont une source de prostaglandines E₂ (PGE₂) et F_{2α} (PGF_{2α}) (Laurent *et al.*, 1998). Généralement, la production de prostaglandines est régulée par deux cyclo-oxygénases, COX I, qui est exprimée constitutivement et COX II dont l'expression est inductible. Pendant une infection par *C. parvum*, la surproduction de prostaglandines est dépendante de COX II (Laurent *et al.*, 1998). Outre leur rôle dans l'induction de la diarrhée, les prostaglandines pourraient également protéger l'hôte de l'infection par les stades libres de *C. parvum*, en participant à la production de mucine observée dans l'intestin des souriceaux infectés (Hill *et al.*, 1991 ; McCool *et al.*, 1990).

- *β-défensines*

Les défensines sont des peptides anti-microbiens de faible poids moléculaire participant à la réponse immunitaire mucoale innée. Une première étude réalisée *in vitro* rapporte l'implication de ces peptides dans la protection contre la cryptosporidiose par la mesure de la viabilité des sporozoïtes après incubation avec différents peptides (Arrowood *et al.*, 1991). Chez le veau infecté par *C. parvum*, Tarver *et al.* observent une forte expression de la β-défensine dans les cellules épithéliales du colon et dans les cryptes du petit intestin. L'expression du messenger pour la β-défensine mesurée par Northern-blot est augmentée 5 à 10 fois dans la partie distale du petit intestin et dans le colon du veau infecté suggérant un rôle des β-défensines dans la réponse innée à l'infection par *C. parvum* (Tarver *et al.*, 1998).

Les cellules épithéliales sont les cellules hôtes de C. parvum dont le développement s'effectue uniquement dans l'espace extracytoplasmique de la cellule. Malgré cette localisation et l'absence de dissémination interne du parasite, les cellules activent différents composants du système immunitaire participant à la protection innée et produisent des signaux initiant une réponse immunitaire spécifique tels que les chimiokines ou les cytokines pro-inflammatoires. Cet aspect de l'initiation de la réponse immunitaire par les cellules épithéliales sera présenté dans la partie Résultats/Discussion de ce manuscrit.

c/ Les cytokines

L'utilisation de souris immunodéficientes ne possédant pas de système immunitaire spécifique permet de déterminer les mécanismes de la réponse immunitaire innée responsables de la résistance à l'infection. Les souris SCID et les souris nude BALB/c contrôlent l'infection à *C. parvum* pendant les 3 à 5 premières semaines suivant l'inoculation puis développent une infection chronique (Harp *et al.*, 1992 ; Kuhls *et al.*, 1992 ; Mead *et al.*, 1991 ; Ungar *et al.*, 1990a). Ces cinétiques d'infection chez les souris SCID et nude BALB/c suggèrent que des facteurs autres que les lymphocytes T et B sont impliqués dans la résistance initiale à l'infection.

• Le TGF β

Le TGF β produit notamment par les cellules épithéliales intestinales stimule la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (collagène et fibronectine) (Ignotz et Massague, 1986) et l'expression des récepteurs de ces protéines, les intégrines. Ainsi, le TGF β joue un rôle important pour les cellules épithéliales dans la formation et le maintien des jonctions étroites et donc pour leur fonction de barrière épithéliale. La destruction de la barrière intestinale par *C. parvum* estimée par la mesure de la résistance d'une monocouche de cellules est significativement retardée pour des cellules pré-traitées avec du TGF β 1. Ainsi, le TGF β 1 participe au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale face à une infection par *C. parvum* (Planchon *et al.*, 1994 ; Roche *et al.*, 2000).

• L'IFN γ

Ungar *et al.* suggèrent pour la première fois un rôle de l'IFN γ dans la résistance initiale à l'infection après avoir observé une augmentation significative du nombre d'oocystes excrétés chez les souris adultes traitées par un anticorps neutralisant les activités de l'IFN γ (Ungar *et al.*, 1991). Par cette même approche, différentes études rapportent que la neutralisation de l'IFN γ exacerbe l'infection chez les souris SCID infectées par *C. parvum* (Chen *et al.*, 1993b ; McDonald et Bancroft, 1994 ; Urban *et al.*, 1996). Ainsi, chez ces souris SCID ne possédant pas de lymphocytes T ni de lymphocytes B, l'IFN γ produit par les cellules NK pourrait participer au contrôle initial de l'infection. L'implication des cellules NK dans la protection innée vis-à-vis de *C. parvum* est rapportée dans le paragraphe III-1.e suivant.

Les différentes études utilisant des souris knock-out pour l'IFN γ confirment l'importance de l'IFN γ endogène dans le contrôle initial de l'infection (Mead et You, 1998 ; Theodos *et al.*, 1997). Chez les souris SCID knock-out pour l'IFN γ infectées par *C. parvum*, la déficience en cellules T et B ajoutée à la déficience en IFN γ est responsable de la forte mortalité et de la morbidité des souris et conforte tous les résultats des études précédentes (Hayward *et al.*, 2000).

Dans une étude récente, McDonald et ses collaborateurs montrent que l'IFN γ inhibe l'infection par *C. parvum* des cellules épithéliales humaines par au moins 2 mécanismes différents : l'inhibition de l'invasion du parasite et la diminution de la concentration en Fe $^{2+}$ intracellulaire disponible (Pollok *et al.*, 2001). En effet, *in vitro*, la supplémentation du milieu de culture en Fe $^{2+}$ inhibe l'effet de l'IFN γ sur *C. parvum*. De manière indirecte, l'IFN γ peut participer à la résistance à l'infection en augmentant l'expression de différentes molécules comme la β 2-intégrine, favorisant ainsi le recrutement des neutrophiles, et l'expression des molécules de classe II du CMH sur les CPA (Colgan *et al.*, 1994) et les cellules épithéliales pour permettre l'initiation de la réponse immunitaire spécifique. L'activation des macrophages et des cellules NK peut également nécessiter l'action de l'IFN γ . En 1997, Martinez *et al.* montrent une action directe de l'IFN γ sur les macrophages alvéolaires et péritonéaux qui affecte *in vitro* le développement de *C. parvum* (Martinez *et al.*, 1997). Enfin, la résistance à l'infection pourrait être médiée par le NO dont la production est dépendante de l'IFN γ .

• *Les cytokines induisant la production d'IFN γ*

(i) L'IL12 produite par les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules B induit la production d'IFN γ par les cellules NK et les lymphocytes T (Wolf *et al.*, 1994). Dans l'étude de Urban *et al.*, l'IL12 protège les souris SCID de l'infection par *C. parvum* (Urban *et al.*, 1996). Des essais de traitement avec de l'IL12 exogène recombinante et des essais de neutralisation de l'IL12 endogène démontrent un rôle significatif de l'IL12 dans la résistance à l'infection dépendante de l'IFN γ mais indépendant du système immunitaire spécifique contre l'infection par *C. parvum*. En effet, l'injection d'anticorps neutralisant l'IL12 en tout début d'infection exacerbe l'infection des souris SCID suggérant de nouveau la participation des cellules NK dans la résistance initiale à l'infection.

(ii) L'IL2 peut participer à la résistance aux infections en induisant la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules NK ainsi que la production d'IFN γ par ces cellules. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, ce mécanisme de stimulation des cellules NK semble inefficace. En effet, chez les souris SCID infectées, des injections répétées d'IL2 recombinante n'ont pas modifié le niveau d'infection chez les souris traitées (McDonald et Bancroft, 1994).

(iii) Le TNF α peut être impliqué dans la résistance à l'infection en stimulant la production d'IFN γ par les cellules NK. L'IL12 peut agir en synergie avec le TNF α pour favoriser cette production d'IFN γ (Hunter *et al.*, 1994). L'implication du TNF α dans la stimulation des cellules NK permettant la synthèse d'IFN γ a été étudiée par Chen et ses collaborateurs en 1993. Les souris SCID infectées par *C. parvum* et traitées avec un anticorps neutralisant le TNF α présentent le même niveau d'infection que les souris non traitées (Chen *et al.*, 1993b).

Parmi les cytokines intervenant dans la résistance à l'infection, l'IFN γ est sûrement celle qui joue un rôle prépondérant. Dans ce travail de thèse, nous avons comparé le développement de l'infection chez des souris normales et des souris knock-out pour l'IFN γ et observé que pendant les 6 à 7 premiers jours suivant l'inoculation, la cinétique et le niveau d'infection étaient équivalents dans les 2 modèles. Après cette date, les souris knock-out pour l'IFN γ n'ont pas survécu à l'infection. Sachant que l'administration d'IFN γ recombinant avant l'inoculation de souris SCID n'empêche pas le développement de l'infection (Kuhls et al., 1994), tous ces résultats suggèrent que lorsque l'IFN γ participe à la résistance initiale à l'infection ce n'est pas par des mécanismes directs. L'identification des composants du système immunitaire dépendants de l'IFN γ qui participent à la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose est l'objectif principal de ce travail de thèse.

d/ Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est le produit de dégradation de l'arginine par la NO synthétase qui existe sous trois isoformes : iNOS (forme inductible), eNOS (exprimée constitutivement par les cellules endothéliales) et nNOS (exprimée par les cellules neuronales) (Figure 12). Au niveau de l'intestin, la forme inductible (iNOS) est exprimée par les cellules épithéliales et les macrophages stimulés par l'IFN γ ou des agents pathogènes. Elle possède des activités antimicrobiennes contre un grand nombre d'agents pathogènes (Clark et Rockett, 1996 ; Fang, 1997 ; James, 1995).

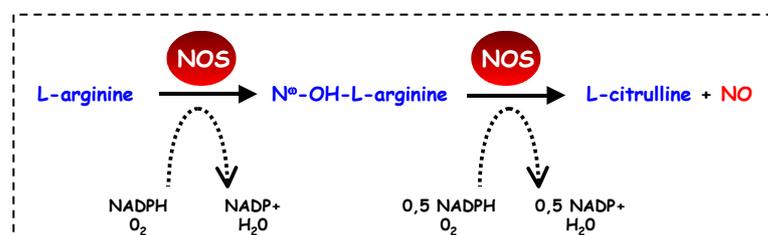


Figure 12 : Synthèse du monoxyde d'azote

Les premières études utilisant des approches indirectes ont rapporté des résultats contradictoires quant au rôle du NO dans la protection contre la cryptosporidiose. L'administration d'aminoguanidine (un inhibiteur de NO) dans le péritoine de souris adultes normales n'augmente pas la sensibilité des souris à l'infection par *C. parvum*. De

même, ce traitement chez les souris SCID infectées n'exacerbe pas l'infection (Kuhls *et al.*, 1994). Au contraire, la supplémentation en L-arginine de la nourriture réduit significativement l'excrétion des oocystes par l'intermédiaire du NO chez les souris Nude BALB/c (Leitch et He, 1994). *In vitro*, le NO réduit significativement la capacité des oocystes à excyster ainsi que la viabilité des sporozoïtes (Leitch et He, 1994). Récemment ces mêmes auteurs sont parvenus à confirmer le rôle du NO dans la protection contre la cryptosporidiose. Ils ont montré que les souriceaux knock-out pour iNOS sont infectés plus longtemps que les souriceaux normaux (Leitch et He, 1999). De plus, l'administration à des souriceaux normaux de donneur de NO diminue significativement le niveau d'infection, et inversement, l'administration d'inhibiteur de NO exacerbe significativement l'infection. Des marquages immunohistologiques montrent que iNOS, et par conséquent le NO, sont produits par les cellules épithéliales. Cette étude suggère une participation du NO produit par les cellules épithéliales dans la résolution de l'infection à *C. parvum* (Leitch et He, 1999).

Cette dernière étude de Leitch et He (1999) montre une participation modérée du NO dans la protection des nouveau-nés infectés par C. parvum. Quelques données obtenues pendant cette thèse complètent ces résultats et seront rapportées dans la partie des résultats puis discutées.

e/ Les cellules de la réponse immunitaire innée

Les cellules de la réponse immunitaire innée ont de nombreuses fonctions de spécificité limitée, rapidement mises en place, mais qui n'aboutissent pas à une mémoire immunologique. Parmi ces cellules, les cellules NK, les mastocytes et les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ ont fait l'objet de différentes études visant à montrer une participation de ces cellules dans la protection contre *C. parvum*.

- *Les cellules NK*

Le rôle prépondérant de l'IFN γ dans la protection innée vis-à-vis de *C. parvum* implique fortement la participation des cellules NK. Cependant, la majorité des études montre que les cellules NK ne contribuent pas significativement à la résistance à l'infection par *C. parvum*. Rholman *et al.* ont utilisé des anticorps anti-asialo-GM1 pour inhiber l'activité des cellules NK dans des souris adultes normales et SCID infectées par *C. parvum*. L'utilisation de cet anticorps n'a pas modifié le niveau d'infection dans les deux modèles souris suggérant que les cellules NK ne participent pas à la résistance à l'infection. L'inhibition de l'activité des cellules NK a été vérifiée uniquement dans la rate et la neutralisation n'a peut-être pas été efficace pour les cellules NK de l'intestin (Rohlman *et al.*, 1993). Quoi qu'il en soit, tous les essais de neutralisation des cellules NK

réalisés aboutissent à la conclusion que ces cellules n'interviennent pas dans la protection innée vis-à-vis de *C. parvum* (McDonald et Bancroft, 1994 ; Ungar *et al.*, 1991).

Rasmussen et Healey (1992) ont utilisé des souris C3H/HeJ/beige pour évaluer l'implication des cellules NK dans la cryptosporidiose (Rasmussen et Healey, 1992). Chez les souris portant la mutation spontanée beige, l'activité bactéricide des granulocytes est réduite et les cellules NK sont absentes. Malgré leur déficience en cellules NK, les souris C3H/HeJ/beige contrôlent le développement du parasite. Au contraire, 7 jours après leur inoculation, les souris C57BL/6J/beige excrètent des oocystes de *C. parvum* alors que les souris normales C57BL/6 ne présentent aucun signe d'infection que ce soit par comptage des oocystes excrétés dans les fèces ou par quantification du nombre d'organismes de *C. parvum* dans l'intestin sur coupe histologique (Enriquez et Sterling, 1991). La différence de fond génétique des souris beige peut expliquer cette divergence des résultats.

• *Les granulocytes*

Harp et Moon (1991) ont étudié la sensibilité à l'infection par *C. parvum* de souris W/W^v qui sont déficientes en mastocytes (Harp et Moon, 1991). Lorsque l'infection est réalisée sur des souriceaux, aucune différence de sensibilité n'est observée entre les souris W/W^v et les souris normales. Par contre, après comptage des organismes de *C. parvum* sur des coupes histologiques d'intestin, les souris adultes W/W^v infectées depuis une semaine semblent plus sensibles à l'infection que les souris normales. Ces résultats suggèrent que les mastocytes pourraient être impliqués dans la résistance à l'infection chez les souris adultes. Nous discuterons du rôle des neutrophiles dans la cryptosporidiose dans la partie des résultats de ce manuscrit.

• *Les lymphocytes T TCR $\gamma\delta$*

Les lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ peuvent participer à la réponse protectrice innée par la production de "keratinocyte growth factor" nécessaire au remplacement des cellules endommagées (Boismenu et Havran, 1994), par la production d'IFN γ ou par l'activation des macrophages. D'après Waters et Harp, les lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$ interviennent dans la protection à l'infection par *C. parvum* (Waters et Harp, 1996). En effet, les souriceaux knock-out pour le TCR γ sont plus sensibles à l'infection que les souriceaux normaux mais ils parviennent tout de même à se débarrasser de l'infection 3 semaines après les souriceaux normaux. Plus récemment, Eichelberger *et al.* ont montré qu'en absence de lymphocytes T TCR $\alpha\beta$, les lymphocytes T portant le TCR $\gamma\delta$ peuvent participer à la protection contre *C. parvum* (Eichelberger *et al.*, 2000). Aucune étude à ce jour n'a montré par quels mécanismes ces lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ participaient à la protection vis-à-vis de l'infection par *C. parvum*.

*Les souris SCID et Nude BALB/c présentent la même cinétique d'infection, à savoir une période de résistance d'environ 3 à 5 semaines pendant laquelle l'IFN γ est l'acteur principal, suivie d'une infection plus ou moins chronique. Aucune étude n'a jusqu'ici clairement mis en évidence le rôle des cellules NK dans cette production précoce d'IFN γ et pourtant cette présomption reste cohérente avec les différents résultats de la littérature. En effet, l'efficacité des neutralisations par les anticorps anti-asialo GM1 (NK) et anti-TNF α d'une part, et des injections d'IL2 recombinant d'autre part, n'ayant pas été contrôlée au niveau de l'intestin, ces résultats peuvent être mis en doute et ne permettent pas de conclure que ces cellules n'interviennent pas dans la réponse immunitaire innée suite à l'infection par *C. parvum*. Cet aspect de la réponse immunitaire non spécifique chez l'hôte infecté par *C. parvum* sera repris dans la discussion de cette thèse.*

2. Réponse immunitaire spécifique

La cinétique d'infection observée chez les souris SCID et Nude BALB/c avec une phase prépatente de 3 à 5 semaines suivie d'une infection chronique suggère l'importance de l'immunité spécifique dans la protection contre *C. parvum*. De plus, la résolution de l'infection des souris SCID ou Nude obtenue après transfert de cellules lymphoïdes montre que le système immunitaire spécifique est indispensable dans le contrôle de la cryptosporidiose.

a/ Les anticorps

Lors d'une infection par *C. parvum*, des anticorps sériques et locaux sont détectés chez les hommes et les animaux. Les anticorps spécifiques d'isotype IgA et IgM sont produits précocement et transitoirement, alors que les IgG persistent beaucoup plus longtemps (Benhamou *et al.*, 1995 ; Casemore, 1987 ; Reperant *et al.*, 1992). Les anticorps sériques ne semblent pas jouer de rôle dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose et le rôle des anticorps locaux n'est pas encore complètement élucidé.

La susceptibilité à *C. parvum* des sujets atteints d'hypogammaglobulinémie suggère un rôle des immunoglobulines dans le contrôle de la cryptosporidiose (Lasser *et al.*, 1979). Les formes libres du parasite sont les cibles potentielles des anticorps neutralisants et plusieurs études montrent que l'infectivité des sporozoïtes et mérozoïtes est inhibée par des anticorps anti-*C. parvum* (Lasser *et al.*, 1979 ; Riggs *et al.*, 1994 ; Riggs *et al.*, 1997). Les IgA qui sont des effecteurs importants dans la protection de la muqueuse intestinale contre différents agents pathogènes peuvent contribuer à cet effet. En effet, Enriquez et Riggs ont produit des IgA monoclonales à partir de lymphocytes de plaques de

Peyer de souris BALB/c immunisées et ont testé leur pouvoir prophylactique et thérapeutique dans un modèle de souriceau (Enriquez et Riggs, 1998). Les IgA monoclonales obtenues dont la spécificité est dirigée contre la protéine p23 du parasite se sont avérées particulièrement efficaces dans le contrôle de l'infection par *C. parvum*. Enfin, les essais de transfert passif de colostrum de bovins hyperimmunisés ayant abouti à une protection chez les sujets receveurs que ce soit chez la souris (Fayer *et al.*, 1990 ; Jenkins *et al.*, 1999), chez le veau (Doyle *et al.*, 1993 ; Fayer *et al.*, 1989a) ou chez l'homme atteint du SIDA (Ungar *et al.*, 1990b) confirment l'implication de la réponse humorale dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose.

Bien que tous ces essais de transfert d'anticorps offrent des résultats prometteurs pour envisager une immunothérapie contre la cryptosporidiose, le rôle de la réponse immunitaire spécifique médiée par les anticorps produits localement est discutable. En effet, la présence d'anticorps intestinaux chez les sujets chroniquement infectés traduit une efficacité insuffisante des anticorps locaux dans la résolution de l'infection (Benhamou *et al.*, 1995 ; Laxer *et al.*, 1990). De plus, chez les souris non sevrées, le lait maternel d'une mère immunisée par *C. parvum* ne réduit pas l'infection malgré le transfert passif d'IgA et IgG spécifiques retrouvées dans l'estomac des nouveau-nés (Arrowood *et al.*, 1989 ; Moon *et al.*, 1988). Ce résultats suggère que lors d'une infection naturelle, il y a peu de chance que le lait maternel protège les jeunes de la cryptosporidiose. Enfin, la déplétion des cellules B chez la souris par un anticorps anti-chaîne μ des immunoglobulines ne rend pas les souris plus sensibles à l'infection confirmant la faible, voire l'absence de, contribution des anticorps dans la protection de la cryptosporidiose (Taghi-Kilani *et al.*, 1990).

*Le transfert passif des anticorps semble avoir un effet thérapeutique dans la cryptosporidiose. Cependant, le très fort taux d'anticorps nécessaire à cette protection (Naciri *et al.*, 1994) suggère fortement que les anticorps spécifiques produits suite à une infection naturelle par *C. parvum* ne soient pas suffisants pour conférer une protection.*

b/ Les lymphocytes T

Le développement d'une infection chronique chez les souris SCID et Nude BALB/c suggère un rôle primordial des lymphocytes T dans la protection contre *C. parvum* (Harp *et al.*, 1992 ; Ungar *et al.*, 1990a). L'importance des lymphocytes T dans le contrôle de la cryptosporidiose a également été mis en évidence par différents essais de transfert de cellules de rate ou de ganglions mésentériques provenant de souris adultes naïves ou immunocompétentes qui protègent les souris Nude BALB/c (Ungar *et al.*, 1990a) et SCID (Chen *et al.*, 1993a ; Mead *et al.*, 1991 ; Perryman *et al.*, 1994) de l'infection par *C. parvum*.

• *Les lymphocytes T CD4+ et CD8+*

L'infection par *C. parvum* est une infection opportuniste chez les personnes atteintes du SIDA suggérant l'importance des lymphocytes T CD4+ dans la protection contre *C. parvum*. De nombreuses études utilisant différents modèles souris et différentes approches montrent le rôle majeur des lymphocytes T CD4+ dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose.

(i) Une infection chronique chez le souriceau infecté par *C. parvum* peut être induite par l'injection d'anticorps anti-CD4, par contre l'injection d'anticorps anti-CD8 n'empêche pas les souriceaux d'éliminer le parasite en environ 3 semaines (Ungar *et al.*, 1990a). De même, l'injection régulière d'un anticorps anti-CD4 induit une infection modérée mais durable chez la souris adulte (Ungar *et al.*, 1991).

(ii) Les approches de transfert de cellules aboutissent également à la conclusion que les cellules T CD4+ jouent un rôle prépondérant dans la protection contre la cryptosporidiose. En effet, chez les souris SCID, la protection conférée par le transfert des cellules de rate de souris immunocompétentes est inhibée si les souris reçoivent au préalable un anticorps anti-CD4 (Chen *et al.*, 1993a). De même, le transfert de cellules de rate préalablement déplétées en lymphocytes T CD4+ n'induit pas la protection des souris SCID receveuses (Perryman *et al.*, 1994).

(iii) Enfin, la persistance de l'infection chez des souris déficientes en molécules de classe II du CMH souligne de nouveau l'importance des lymphocytes T CD4+ dans la protection contre l'infection. En effet, les souris déficientes en molécules de classe II du CMH, c'est-à-dire sans lymphocyte T CD4+, sont très infectées 4 semaines après leur inoculation alors que les souris déficientes en molécules de classe I du CMH, sans lymphocyte T CD8+, contrôlent l'infection (Aguirre *et al.*, 1994).

Quelques études rapportent cependant que les lymphocytes T CD8+ peuvent également participer à la résolution de l'infection. En 1991, Ungar *et al.* montrent que les souris adultes traitées par un mélange des anticorps anti-CD8 et anti-CD4 développent une infection à *C. parvum* un peu plus sévère que les souris traitées uniquement avec un anticorps anti-CD4 (Ungar *et al.*, 1991). De plus, les souris SCID reconstituées avec des cellules de rate déplétées des lymphocytes T CD8+ parviennent à se protéger mais moins rapidement que les souris SCID reconstituées avec des cellules de rate non déplétées (McDonald et Bancroft, 1994 ; Perryman *et al.*, 1994).

Outre la différenciation des lymphocytes T selon l'antigène de surface CD4 ou CD8, la nature des chaînes constituant le récepteur T des lymphocytes permet également de différencier les lymphocytes. Les lymphocytes T CD8+ peuvent exprimer le TCR $\alpha\beta$ ou le TCR $\gamma\delta$ alors que les lymphocytes T CD4+ expriment uniquement le TCR $\alpha\beta$. Dans

l'intestin, les lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ représentent un pourcentage important de la population des IEL. D'après Waters et Harp, les souris knock-out pour la chaîne α du TCR inoculées à la naissance ou à l'âge adulte développent une infection chronique alors que parmi les souris knock-out pour le TCR γ , seuls les souriceaux sont plus infectés que les souriceaux normaux. Par conséquent, la présence des lymphocytes T TCR $\alpha\beta$ est nécessaire pour que les souris récupèrent de l'infection, alors que les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle protecteur mineur qui n'est visible que chez les souriceaux et ne sont pas nécessaires au contrôle de l'infection chez l'adulte (Waters et Harp, 1996). Ces observations peuvent corroborer les différentes études montrant l'importance des lymphocytes T CD4+ puisque ces cellules sont exclusivement TCR $\alpha\beta$.

• *Les IEL*

Dans l'intestin, les lymphocytes intra-épithéliaux sont les premières cellules immunitaires effectrices qui peuvent être en contact avec le parasite ou la cellule infectée.

Lors d'une infection par *C. muris* qui infecte l'épithélium gastrique, les souris SCID reconstituées avec des IEL intestinaux immuns sont moins infectées et présentent une période patente plus courte que les souris recevant des IEL de souris naïves ou ne recevant pas de cellules (McDonald *et al.*, 1996). La déplétion des cellules CD4+ empêche les IEL de conférer une protection aux souris SCID infectées par *C. muris*, de même les souris recevant un anticorps anti-IFN γ ne sont plus protégées par les IEL. Ces résultats suggèrent que les IEL CD4+, qui ne représentent que 10% des IEL, peuvent éliminer le parasite par des mécanismes faisant intervenir l'IFN γ (Culshaw *et al.*, 1997 ; McDonald *et al.*, 1996).

Lors d'une infection par *C. parvum*, le suivi des populations d'IEL dans l'intestin de souris infectées à l'âge de 3 semaines montre un recrutement des lymphocytes T CD4+ après 7 jours d'infection, et un recrutement des lymphocytes T CD8+ plus tardif vers 15 jours p.i. (Chai *et al.*, 1999). Le transfert d'IEL intestinaux provenant de souris naïves et immunes protège les souris SCID de l'infection par *C. parvum* (Adjei *et al.*, 2000). Dans l'intestin des souris receveuses d'IEL provenant de souris immunisées, la proportion importante de lymphocytes TCR $\alpha\beta$ + et CD8 $\alpha\beta$ + suggère un rôle protecteur de ces cellules lors d'une infection par *C. parvum*. Ces deux études sont en faveur d'une participation des lymphocytes T CD8+ dans le contrôle de l'infection à *C. parvum*, mais à ce jour, aucun rôle direct des IEL CD8+ dans le contrôle de l'infection n'a clairement été démontré. La différence quant au rôle des IEL CD8+ lors des infections par *C. muris* et *C. parvum* est peut être due à la différence du site de multiplication entre les 2 espèces de *Cryptosporidium*, respectivement la muqueuse gastrique et la muqueuse intestinale.

- *Spécificité des lymphocytes T*

Une étude récente a utilisé des lymphocytes T de souris RAG^{-/-} transgéniques pour un récepteur T spécifique de l'ovalbumine afin de vérifier si la spécificité des lymphocytes T vis-à-vis de *C. parvum* était indispensable à la protection contre la cryptosporidiose. Dans ces souris déficientes en enzyme RAG, la recombinaison des gènes des immunoglobulines et des chaînes de TCR est impossible. Les lymphocytes provenant de ces souris sont, par conséquent, incapables de participer à une réponse immunitaire spécifique une fois injectés dans la souris SCID receveuse. Le transfert de ces lymphocytes T de rate à des souris SCID infectées permet l'élimination du parasite. Par contre, lorsque les lymphocytes T sont de type CD8⁺, ils ne confèrent pas de protection. Selon ces auteurs, l'absence de CD40L (CD154) sur la majorité des lymphocytes T CD8⁺ pourrait expliquer cette observation (Lukin *et al.*, 2000). Par conséquent, ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ quelle que soit leur spécificité peuvent conférer une protection lors de la cryptosporidiose à partir du moment où ils sont activés et qu'ils expriment à leur surface le CD40L.

Il est évident que les lymphocytes T jouent un rôle important dans la protection contre C. parvum au moins pour la production des cytokines telles que l'IFN γ . L'étude récente de Lukin et al. (2000) introduit un nouveau concept concernant le rôle des lymphocytes T non spécifiques dans la cryptosporidiose. Le rôle des lymphocytes T (spécifiques ou non) dans la cryptosporidiose et notamment des IEL sera discuté plus longuement dans la discussion générale de ce manuscrit.

c/ Les cytokines

Un des mécanismes par lequel les lymphocytes T activés peuvent protéger l'hôte contre une infection par *C. parvum* est par la sécrétion de cytokines. Une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Th1) est généralement orientée par l'IL12 produit par les cellules présentatrices de l'antigène et caractérisée par une production des cytokines IFN γ et IL2. Une réponse immunitaire à médiation humorale (Th2) est caractérisée par la production des cytokines IL4, IL5 et IL10.

- *Les cytokines d'une réponse de type Th1*

(i) Le rôle de l'IFN γ a clairement été mis en évidence dans la résistance et la réponse immunitaire protectrice innée contre l'infection par *C. parvum*. Au contraire, bien que très efficace, la participation de l'IFN γ dans la réponse immunitaire spécifique protectrice n'est apparemment pas toujours indispensable.

Certaines études utilisant des approches de neutralisation de l'IFN γ montrent que la résolution de la cryptosporidiose est possible malgré les injections continues d'anticorps chez des souris adultes BALB/C (McDonald *et al.*, 1992 ; Ungar *et al.*, 1991) et des souris adultes C57BL/6 (Aguirre *et al.*, 1998 ; McDonald *et al.*, 1992). Une neutralisation incomplète au pic d'infection pourrait expliquer les résultats obtenus chez ces souris dans lesquelles l'IFN γ pourrait être produit en plus grande quantité en réponse à l'infection. Toutefois, la résolution de l'infection après 2 semaines observée chez les souris adultes BALB/c GKO infectées conforte l'hypothèse que des mécanismes indépendants de la présence d'IFN γ peuvent être mis en place pour protéger contre la cryptosporidiose.

De nombreuses études suggèrent au contraire que l'IFN γ est indispensable à la protection. Chez des souris SCID déjà infectées, le transfert de cellules lymphoïdes spléniques est efficace pour éliminer le parasite. Cet effet est inhibé si les souris reçoivent des anticorps anti-IFN γ régulièrement après le transfert de cellules (Chen *et al.*, 1993a). Une étude similaire montre que les souris SCID ayant reçu des IEL capables de conférer une protection, ne peuvent pas éliminer le parasite pendant toute la durée d'un traitement avec de l'anti-IFN γ . L'arrêt du traitement anti-IFN γ permet aux souris de se débarrasser de l'infection grâce au transfert des IEL (Culshaw *et al.*, 1997). Enfin, les souris C57BL/6 knock-out pour l'IFN γ sont très sensibles à l'infection et sont incapables d'éliminer le parasite (Griffiths *et al.*, 1998 ; Theodos *et al.*, 1997 ; You et Mead, 1998) suggérant que l'IFN γ soit nécessaire à la résolution de l'infection.

En résumé, l'IFN γ est une cytokine majeure dans la cryptosporidiose puisqu'elle intervient rapidement pour limiter la sévérité de l'infection et parce qu'elle permet l'élimination du parasite en fin d'infection. Les différents modèles murins utilisés ainsi que les différentes approches peuvent expliquer les divergences de résultats. En fait, les cinétiques d'infection observées chez les souris GKO BALB/c et C57BL/6 suggèrent qu'en absence d'IFN γ des mécanismes compensatoires ou accessoires (masqués en temps normal par l'IFN γ) se mettent en place plus ou moins rapidement pour éliminer *C. parvum*.

(ii) En 1996, Urban *et al.* montrent que l'IL12, une cytokine régulatrice majeure pour orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th1, joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire à l'infection par *C. parvum*. L'administration d'anticorps neutralisant l'IL12 augmente l'infection des souris immunocompétents traités (Urban *et al.*, 1996).

(iii) D'après Ungar *et al.*, l'administration d'anticorps neutralisant l'IL2 ou bloquant le récepteur à l'IL2 à des souris adultes normales n'induit pas le développement de l'infection par *C. parvum* (Ungar *et al.*, 1991). Au contraire, dans ce même modèle murin et avec un protocole similaire, l'administration d'anticorps anti-IL2 augmente

légèrement la sensibilité des souris adultes traitées (Tilley *et al.*, 1995). Il semble donc que l'IL2 puisse participer au contrôle de l'infection mais avec un rôle mineur.

(iv) L'implication du TNF α a été étudiée pour la première fois par McDonald *et al.* en 1992 chez des souris adultes BALB/c ou C57BL/6 infectées par *C. muris* après neutralisation du TNF α endogène par un anticorps neutralisant (McDonald *et al.*, 1992). Cette approche n'a pas permis de mettre en évidence la participation du TNF α dans la protection contre *C. parvum*. L'étude du rôle du TNF α dans la cryptosporidiose constitue une part importante de ce travail de thèse, elle sera décrite dans la partie "Résultats" puis discutée par rapport à d'autres modèles d'infection.

• *Les cytokines de type Th2*

Les immunoglobulines de type IgA représentent à elles seules plus de 80% de tous les anticorps produits dans les tissus associés aux muqueuses. Cette production d'IgA est dépendante des cytokines de type Th2 notamment de l'IL4 et l'IL5 (You et Mead, 1998). L'implication des cytokines de type Th2 dans l'infection à *C. parvum* a donc également été étudiée. Lors d'une infection par *C. muris* de souris adultes BALB/c, à la fois des cytokines de type Th1 (IFN γ et IL2) et des cytokines de type Th2 (IL4) sont produites par les lymphocytes T CD4⁺ de la rate (Tilley *et al.*, 1995). En utilisant des anticorps neutralisants, Enriquez et Sterling montrent que l'IL5 seule ou en synergie avec l'IL 4 peut jouer un rôle dans le contrôle de la cryptosporidiose chez les souris adultes BALB/c suggérant qu'à la fois les cytokines de type Th1 et les cytokines de type Th2 sont essentielles à la résolution de l'infection (Enriquez et Sterling, 1993). Deux approches différentes plus récentes mettent en évidence un rôle de l'IL4 dans la protection contre *C. parvum* (Aguirre *et al.*, 1998). Chez des souris adultes C57BL/6, aussi bien la neutralisation de l'IL4 par un anticorps que la déficience du gène pour l'IL4 induisent un développement plus important du parasite par rapport aux souris témoins. Il faut préciser que la sévérité de l'infection est moindre par rapport à celle obtenue chez les souris déficientes en IFN γ soit génétiquement soit par neutralisation.

La production des cytokines par les lymphocytes T est probablement à l'origine de l'effet protecteur de ces cellules. Parmi ces cytokines, l'IFN γ joue un rôle très important mais un certain nombre d'autres cytokines activées plus ou moins rapidement par l'IFN γ ou indépendantes de l'IFN γ (chez les souris BALB/c knock-out pour l'IFN γ qui se protègent en 2 semaines) participent également au contrôle de l'infection. Comme mentionné précédemment, l'identification d'autres composants du système immunitaire intervenant dans cette protection est l'objectif principal de ce travail de thèse.

3. L'apoptose dans la cryptosporidiose

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique normal qui joue un rôle déterminant dans le développement embryonnaire ainsi que dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire. Le terme apoptose est utilisé pour décrire la participation active de la cellule à sa propre destruction. La cellule apoptotique se détache de ses voisines et se désintègre de façon ordonnée (Figure 13). Quels que soient les signaux inducteurs (Fas/FasL ; TNF/TNFR1 ; Granzyme/Perforine...), les processus apoptotiques aboutissent à une phase effectrice commune : l'activation de protéases cytosoliques, les caspases (Figure 14). Une induction inappropriée de l'apoptose peut avoir des implications pathologiques.

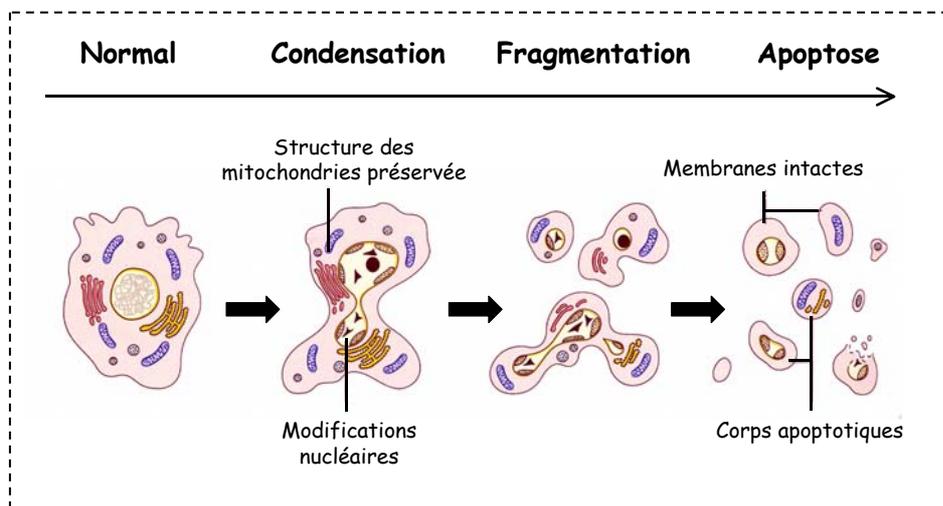


Figure 13 : Mort cellulaire par apoptose

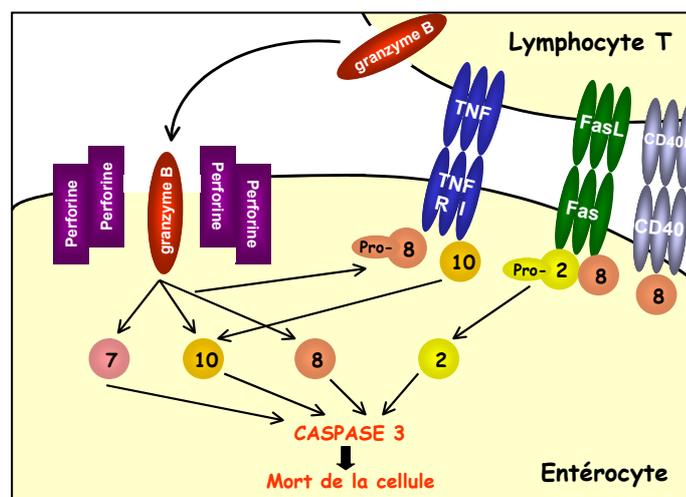


Figure 14 : Activation des caspases pendant l'apoptose des cellules. Les ronds colorés comportant des numéros correspondent à des caspases identifiées par ce numéro.

Pendant un processus infectieux, l'apoptose peut être induite par la cellule infectée pour se débarrasser de l'infection, ou par l'agent pathogène qui bénéficie de la mort de la cellule notamment pour terminer son cycle de développement. Dans l'intestin à l'homéostasie, le renouvellement des cellules épithéliales implique l'apoptose des cellules situées au sommet des villosités. Dans des conditions pathologiques, le dérèglement du processus apoptotique peut aboutir à un raccourcissement des villosités de l'intestin. Lors d'une infection par *C. parvum*, les changements histologiques observés dont l'atrophie des villosités qui apparaissent plus courtes suggèrent un dérèglement du processus apoptotique lors de la cryptosporidiose.

Plusieurs études rapportent que l'infection *in vitro* par des oocystes de *C. parvum* des cellules épithéliales induit l'apoptose de ces dernières (Chen *et al.*, 1999 ; Cosyns *et al.*, 1998 ; McCole *et al.*, 2000 ; Ojcius *et al.*, 1999 ; Widmer *et al.*, 2000). D'après Cosyns *et al.*, cette apoptose nécessite l'interaction du CD40 présent à la surface des cellules avec son ligand (CD40L=CD154) apporté dans la culture sous forme de protéine de fusion (Cosyns *et al.*, 1998). De plus, parmi les mécanismes d'induction de l'apoptose suite à l'infection par *C. parvum*, les molécules Fas et FasL (Chen *et al.*, 1999) semblent jouer un rôle important. L'infection par *C. parvum* augmente l'expression de Fas et FasL et induit la translocation de FasL vers la membrane pour produire la molécule FasL soluble. Cette molécule FasL soluble est capable d'induire l'apoptose des cellules voisines infectées ou non infectées. Les cellules infectées mises en culture avec un anticorps antagoniste de Fas ou avec un anticorps neutralisant le FasL sont significativement moins apoptotiques que les cellules non traitées (Figure 15) (Chen *et al.*, 1999). En collaboration avec notre laboratoire, Ojcius *et al.* ont montré que les caspases 3 et 8 sont activées dans les cellules épithéliales infectées par *C. parvum* et que l'inhibition des caspases augmente le nombre de cellules infectées (Ojcius *et al.*, 1999, communication personnelle). Par ailleurs, il a été montré que l'infection par *C. parvum* active le facteur de transcription NF- κ B qui peut protéger les cellules infectées de l'apoptose (Chen *et al.*, 2001 ; McCole *et al.*, 2000). En revanche, les cellules voisines non infectées dont le facteur de transcription NF- κ B n'est pas activé sont plus souvent apoptotiques. Ce résultat corrobore celui de Chen *et al.* (1999) qui montre que les cellules voisines peuvent être apoptotiques par l'intermédiaire du FasL.

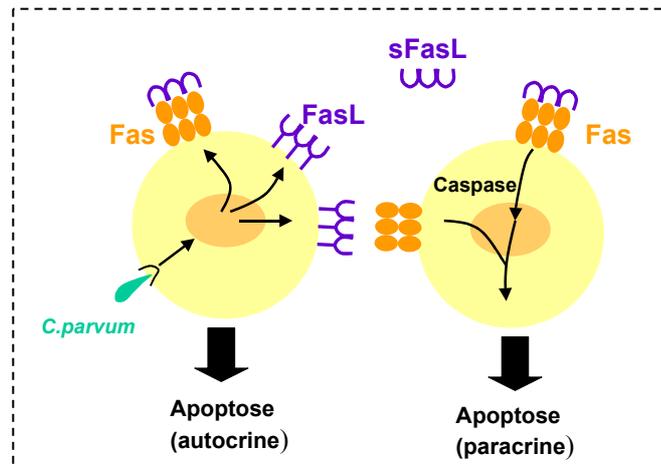


Figure 15 : Apoptose des cellules épithéliales pendant une infection par *C. parvum* (d'après Chen et al. 1999)

Durant cette thèse, nous avons poursuivi les travaux sur l'apoptose en collaboration avec le Dr D. Ojcius (Institut Pasteur, Paris). Ces résultats ne sont pas décrits dans ce manuscrit, et nous avons choisi de les rapporter brièvement. Nous avons observé la surexpression d'un certain nombre d'inducteurs de l'apoptose (FasL, Granzyme B et Granzyme A) dans la muqueuse intestinale de souris infectés par *C. parvum*. Par contre, par la technique du Tunel, l'apoptose n'a jamais pu être mise en évidence sur des coupes histologiques d'intestin de souris infectés. Cependant, il faut savoir que les cellules épithéliales apoptotiques sont très rarement observées dans l'épithélium intestinal car elles sont très rapidement expulsées (Guy-Grand et al., 1998). Chez des souris infectés par *C. parvum*, nous avons réalisé des injections répétées d'inhibiteur des caspases (ZVAD-fmk) afin d'inhiber l'apoptose et d'observer les conséquences de cette inhibition sur le niveau d'infection. Le traitement des souris par le ZVAD-fmk diminue le niveau d'infection dans l'intestin. Cette expérience réalisée plusieurs fois montre toujours la même tendance, mais les résultats ne sont pas significatifs et sont en contradiction avec les données obtenues in vitro par Ojcius et al. (2000) montrant une augmentation des cellules infectées après traitement par un inhibiteur des caspases.

4. Réponse immunitaire chez le veau

Dans les élevages, les veaux et les petits ruminants nouveau-nés sont très sensibles à l'infection par *C. parvum*. La maladie se caractérise le plus souvent par des diarrhées profuses, difficiles à maîtriser qui peuvent conduire à la mort de l'animal. Le coût des expérimentations sur veaux et le manque de réactifs immunologiques justifient que peu d'études caractérisant la réponse immunitaire chez le veau infecté par *C. parvum* soient réalisées.

Dès la naissance jusqu'à l'âge de 1 mois, le veau est très sensible à l'infection par *C. parvum*. Chez des veaux infectés expérimentalement à l'âge de 2 semaines, l'excrétion des oocystes commence 5 jours après l'inoculation et s'étend sur 5 jours. Dès le deuxième jour après l'inoculation, une prolifération des lymphocytes du sang périphérique spécifiques de *C. parvum* est observée, elle est maintenue pendant au moins 23 jours (fin de l'expérimentation). La réponse en anticorps sérique spécifique de *C. parvum* est détectée à partir de 7 jours p.i., elle est également maintenue au moins jusqu'à la fin de l'expérimentation (Whitmire et Harp, 1991). Cependant, comme chez la souris, la réponse en anticorps systémique reflète l'infection mais ne permet pas la protection de l'infection par *C. parvum* localisée dans l'intestin.

Peeters *et al.* ont montré que localement, la production d'IgM spécifiques commençait dès 5 jours p.i. pour diminuer vers le 15^{ème} jour après l'inoculation alors que la production d'IgG diminue vers 3 semaines p.i.. Ces mêmes auteurs ont montré que la production d'IgA fécales commençait un peu plus tardivement que celle des IgM et IgG pour atteindre le pic de production vers 15 j.p.i. (Peeters *et al.*, 1992).

Les études de la réponse cellulaire à l'infection par *C. parvum* chez le veau ont montré que le nombre de cellules N2 (cellules non-T, non-B, population trouvée uniquement chez les ruminants) était augmentée dans la rate et dans les ganglions lymphatiques mésentériques des veaux infectés (Harp *et al.*, 1995). Comme pour les souris SCID dans lesquelles les cellules non-T et non-B jouent un rôle important dans la résistance à l'infection, les cellules N2 du veau pourraient intervenir dans la réponse protectrice à *C. parvum* (Harp *et al.*, 1995). De plus, la réponse cellulaire chez le veau infecté par *C. parvum* est caractérisée par une augmentation et une activation des IEL T CD8⁺ et par une activation des IEL T CD4⁺ (Pasquali *et al.*, 1997 ; Wyatt *et al.*, 1997). Abrahamsen *et al.* ont observé chez des veaux naïfs infectés par *C. parvum* une augmentation du nombre des lymphocytes T TCR $\alpha\beta$ (CD4 et CD8) et TCR $\gamma\delta$ dans la lamina propria. Chez des veaux immuns, l'inoculation du parasite induit une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans les plaques de Peyer et une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ dans l'épithélium. Ces observations sont en faveur d'un rôle des

lymphocytes T CD8⁺ au moins dans la résistance à la réinfection des veaux (Abrahamsen *et al.*, 1997). Une étude récente montre que ces cellules recrutées vers l'épithélium ne proviennent pas de la périphérie, ce sont des lymphocytes de la muqueuse intestinale dont la distribution a été modifiée (Wyatt *et al.*, 1999).

Chez le veau infecté, la réponse en cytokines a été mesurée localement par RT-PCR sur des cellules isolées de la lamina propria ou sur des IEL (Canals *et al.*, 1998 ; Fayer *et al.*, 1998). Les IEL et LPL des veaux infectés expriment plus d'IFN γ et d'IL12 que les cellules de veaux témoins. Au contraire, les IEL de veaux infectés expriment moins de TNF α (Wyatt *et al.*, 1997). Aucune différence dans l'expression de l'IL2, IL4 et IL10 n'a été observée chez les veaux infectés par rapport aux veaux témoins suggérant une réponse cytokine de type Th1. L'étude récente de Wyatt rapportant notamment la surexpression d'IFN γ et d'iNOS dans les lymphocytes de la lamina propria des veaux infectés confirme l'orientation Th1 de la réponse immunitaire locale à l'infection par *C. parvum* (Wyatt *et al.*, 2001).

L'utilisation des modèles murins offre de nombreux avantages pour étudier la réponse immunitaire suite à l'infection par C. parvum. La congénicité des souris permet la réalisation des expériences de transfert de cellules qui confirment les hypothèses issues des études descriptives. La manipulation et le nombre de souris disponibles sont d'autres avantages qui font que les études chez le veau sont plus difficiles à mettre en place. Les données sur la réponse immunitaire des veaux infectés sont généralement en corrélation avec celles obtenues chez les souris malgré la différence majeure dans l'organisation du système immunitaire de l'intestin entre ces deux espèces, à savoir que les plaques de Peyer chez le veau sont un organe lymphoïde primaire.

L'interféron gamma (IFN γ) est une cytokine jouant un rôle majeur dans le contrôle immunologique de la cryptosporidiose. Cependant, les mécanismes mis en jeu par cette cytokine pour protéger l'hôte contre l'infection à *C. parvum* sont encore peu connus. Différentes possibilités, qui ne sont pas mutuellement exclusives, incluent un effet direct de l'IFN γ sur la cellule infectée et/ou un effet indirect favorisant

- (i) l'expression de molécules de surface nécessaires au bon fonctionnement du système immunitaire telles que les molécules de classe II du CMH et les molécules d'adhérence
- (ii) la sécrétion de composants solubles de la réponse immunitaire ayant soit un effet toxique pour le parasite soit un effet chimiotactique pour le recrutement de cellules lymphoïdes protectrices.

L'objectif de ce travail de thèse était de mettre en évidence des effecteurs de la réponse immunitaire protectrice qui sont dépendants de la production d'IFN γ . Par une technique de RT-PCR quantitative nécessitant la construction d'un certain nombre de plasmides compétiteurs, la réponse immunitaire mucoale déclenchée lors d'une infection par *C. parvum* a été étudiée dans deux modèles murins. Dans le premier, l'infection est résorbée spontanément, dans le second, les souris sont déficientes en IFN γ et demeurent chroniquement infectées. Ce premier modèle est un modèle conventionnel de souris nouveau-nées. Il présente l'avantage de posséder un système immunitaire initialement immature mais non altéré, permettant aux souriceaux d'éliminer le parasite spontanément en 3 semaines. De plus, nous considérons que ce modèle est plus adéquat que celui des souris immunologiquement déficientes que sont les souris SCID ou nude pour comprendre la réponse immunitaire chez le veau infecté par *C. parvum*.

Pour connaître l'origine et les conséquences de l'inflammation dans la cryptosporidiose, nous avons dans un premier temps étudié la réponse en cytokines pro-inflammatoires, consécutive à une infection par *C. parvum* à la fois *in vitro*, par une lignée de cellules épithéliales murines, et *in vivo* dans l'iléon de souriceaux. La comparaison de cette réponse à celle des souris GKO infectées nous a ensuite conduits à explorer le rôle du TNF α dans la protection vis-à-vis de *C. parvum*.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la réponse d'autres médiateurs de la réponse inflammatoire que sont les chimiokines. L'expression des chimiokines de différentes familles a été analysée dans les cellules épithéliales infectées *in vitro* par *C. parvum* et au niveau local, dans l'iléon de souris infectées. Par la suite, nous avons étudié le recrutement des cellules inflammatoires dans l'intestin de souris infectées pour voir si celui-ci était corrélé à la réponse en chimiokines. Ces résultats nous ont

conduits à explorer le rôle des chimiokines responsables du recrutement des lymphocytes T et dépendantes de l'IFN γ dans la protection des souriceaux par des essais de neutralisation *in vivo* des chimiokines.

Enfin, toujours dans le but de mettre en évidence les composants de la réponse immunitaire dépendants de l'IFN γ présents en fin d'infection et susceptibles d'intervenir dans la protection, nous avons analysé la réponse en cytokines de type Th1/Th2 dans l'iléon des souris infectées ainsi que l'expression de iNOS à la fois *in vivo* et *in vitro* par les cellules épithéliales. La forte expression d'IFN γ produit probablement par les IEL nous a conduits à entreprendre une étude sur le rôle de ces cellules en tant que cellules productrices d'IFN γ dans la réponse protectrice à l'infection.

I- MODÈLE EXPÉRIMENTAL : LA CRYPTOSPORIDIOSE MURINE

1. Les modèles souris

Cryptosporidium parvum est un parasite qui infecte les mammifères dont l'homme. Les nouveau-nés ou les individus immunodéprimés sont particulièrement sensibles à l'infection. Dans ce travail, nous avons utilisé des souriceaux nouveau-nés, des souris knock-out pour l'IFN γ (GKO) (Dalton *et al.*, 1993) ainsi que des souris knock-out à la fois pour le TNF α et la lymphotoxine alpha (TNF α /LT α -/-) (Amiot *et al.*, 1997). Les souris déficientes en IFN γ et leur témoin (fond génétique C57BL/6J/129) ont été achetées chez Jackson Laboratory et les souris déficientes pour le TNF α et la lymphotoxine- α (fond génétique C57BL/6/129) ainsi que leur témoin, nous ont généreusement été fournies par Dr F Dautry et Dr JM Cavaillon.

Les souris sont élevées et mises en reproduction dans une salle en surpression dont l'air est filtré. Des précautions d'accès sont prises afin d'éviter les contaminations par des agents pathogènes provenant de l'extérieur. Régulièrement, des analyses faites par le CDTA d'Orléans attestent de l'état sanitaire des souris de l'élevage. Après chaque expérimentation, la salle et les cages sont nettoyées puis désinfectées au formol.

Les souriceaux utilisés pour les expériences sont inoculés avec 10^6 oocystes à l'âge de 3 ou 4 jours. L'étude de la réponse immunitaire chez les souriceaux GKO nécessite l'adoption des souriceaux par une mère C57BL/6 dont le fond génétique n'est pas modifié et dont la gestation est synchronisée avec celle des mères GKO. Les souris adultes GKO et TNF α /LT α -/-, mâles ou femelles, utilisées pour les expérimentations sont âgées de 8 à 12 semaines environ.

2. Le parasite

a/ Entretien de la souche de *C. parvum* et multiplication

- *Multiplication des oocystes de C. parvum*

L'isolat de *C. parvum* utilisé dans le laboratoire provient initialement d'un enfant atteint de cryptosporidiose (Arnaud-Battandier *et al.*, 1982), il appartient au génotype 2. Pour maintenir la souche et obtenir des oocystes de *C. parvum*, des veaux mâles âgés de moins de 48 heures sont inoculés *per os* avec environ 10^6 à 10^7 oocystes. Les veaux sont installés sur caillebotis au dessus d'un plateau servant à collecter les fèces quotidiennement. L'excrétion des oocystes débute 3 ou 4 jours après l'infection et persiste pendant 5 à 8 jours. Environ 5×10^7 oocystes par gramme de selles sont excrétés par jour pendant la

période d'excrétion. Les fèces riches en oocystes sont conservées à 4°C mélangées volume à volume avec une solution de bichromate de potassium à 2,5%.

• *Purification des parasites*

Filtration sur tamis métalliques	<ul style="list-style-type: none"> - filtrer les fèces sur des tamis de porosités décroissantes de 1000 µm à 100 µm. - centrifuger le filtrat à 2500 g pendant 10 min à 4°C. - reprendre le culot dans un peu d'eau distillée
Extraction à l'éther	<ul style="list-style-type: none"> - dans un pot de 500 ml, mélanger les oocystes avec l'éther diéthylique dilué 5 fois <i>(Cette étape a pour but d'éliminer les matières grasses présentes dans les selles de veaux ayant une alimentation lactée.)</i> - agiter vigoureusement et centrifuger à 1500 g pendant 10 min à 4°C <i>(Trois phases sont obtenues : une phase supérieure épaisse contenant les matières grasses, une phase intermédiaire aqueuse et un culot contenant les oocystes.)</i> - laver le culot 2 fois pour enlever les traces d'éther, centrifuger 2500 g pendant 10 min à 4°C. - reprendre le culot dans quelques ml d'eau distillée
Purification sur gradient discontinu de saccharose	<ul style="list-style-type: none"> - préparer des gradients discontinus de saccharose : déposer 12 ml d'une solution mère de saccharose (solution de Sheather = 500g de saccharose, 320 ml d'eau, 0.02% d'azide de sodium) diluée au ¼ sur 10 ml de la même solution mère diluée au ½. - déposer 2 ml de la suspension d'oocystes à la surface des gradients de saccharose. - centrifuger les tubes au moins 20 min à 3000g. - récupérer l'anneau blanc à l'interface qui contient les oocystes - laver les parasites 2 fois dans de grands volumes d'eau.
Traitement à l'hypochlorite de sodium	<ul style="list-style-type: none"> - diluer les oocystes dans de l'hypochlorite de sodium (solution commerciale à 3,5% diluée à 1/10). - laisser dans la glace pendant 20 min <i>(ce traitement à l'eau de javel permet d'éliminer les bactéries qui ont été co-purifiées avec les oocystes)</i> - laver les oocystes 2 fois dans du PBS - laver les oocystes 2 fois dans de l'eau distillée - les oocystes purifiés sont conservés à 4°C dans de l'eau distillée contenant de l'amphotéricine B et de la pénicilline et streptomycine.

3. Infections expérimentales / Evaluation de la maladie chez l'hôte

a/ Evolution du poids

Un des critères utilisés pour évaluer l'importance de la maladie est la mesure du poids. Les animaux sont pesés quotidiennement et une perte de poids ou un retard de croissance permettent de caractériser une infection importante chez des souris adultes ou nouveau-nées.

b/ Excrétion des oocystes

• Chez les souriceaux

Les souriceaux étant avec leur mère sur une litière lors des expériences, il est impossible de collecter les fèces d'un jour des souriceaux, de plus les mères en nettoyant leurs petits font de la coprophagie. Pour déterminer le niveau d'infection par comptage des oocystes, les souriceaux sont sacrifiés et la totalité de l'intestin est prélevée. L'intestin est déposé dans 1ml d'eau puis broyé à l'Ultra-Turax dans la glace. Le broyat est alors dilué dans la solution de Sheather et les oocystes sont comptés sur une cellule de Thoma à fond brillant sur laquelle ils apparaissent rose.

NB : Il faut au minimum diluer le broyat au 1/4 dans la solution de Sheather afin de bien voir les oocystes rose.

$$\text{Nbre d'oocystes dans l'intestin} = \text{Nbre d'oocystes sur THOMA} \times 1/\text{dilution} \times 10^4 \times (1 + \text{poids du broyat})$$

• Chez l'adulte

Avec les souris adultes, la cinétique d'excrétion des oocystes peut être mesurée quotidiennement en les plaçant dans des cages sur grille équipée d'un collecteur de fèces en forme d'entonnoir. Les fèces sont broyées puis filtrées successivement sur des tamis de porosités décroissantes 425 µm puis 100 µm à l'aide d'un puissant jet d'eau. Le filtrat est ensuite centrifugé à 2000 tours/min pendant 15 min. Après avoir pesé puis réhomogénéisé le culot, 0,25 g sont prélevés et dilués dans 750 µl d'eau et 4 ml de solution de Sheather (dilution au 1/20 des fèces). Les oocystes sont comptés sur une cellule de Thoma.

$$\text{Nbre d'oocystes / g de fèces} = \text{Nbre d'oocystes sur THOMA} \times 20 \times 10^4$$

c/ Mesure de l'expression d'un gène de *C. parvum*

La technique de RT-PCR quantitative décrite dans les paragraphes suivants est également utilisée pour évaluer le niveau d'infection dans l'iléon des souris. Le gène de *C. parvum* amplifié lors de cette RT-PCR correspond à l'homologue d'une protéine de 19kDa des sporozoïtes d'*Eimeria acervulina*. Chez *C. parvum*, cette protéine est aussi exprimée par les mérozoïtes. Les amorces utilisées pour l'amplification de ce gène ont pour séquence : [5'-AGAATGGTTAATTGACACCGGTAGTGT-3'] pour l'amorce sens 5' et [5'-AACGCCGTTTGGTGCCTTACCTTCG-3'] pour l'amorce antisens 3'.

Ce couple d'amorces permet d'amplifier une séquence de 229 pb du gène cible. Une construction permettant de réaliser de la RT-PCR quantitative appelée pCpNOS a été réalisée et est décrite dans la figure 19.

II- MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Les photographies de microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) ont été réalisées en collaboration avec Mme B Gaillard-Martinie du service de microscopie du centre INRA de Theix et Mme B Delaleu du centre INRA de Tours.

1. Principe de la MEB

La MEB permet l'observation du relief des échantillons grâce à sa profondeur de champ qui la distingue de la microscopie optique. Le principe repose sur le bombardement par un canon à électrons d'un échantillon placé sous vide préalablement recouvert d'un fin film d'or. Cet enrobage permet aux électrons de circuler et de rebondir précisément sur la surface externe de l'objet. Un détecteur récupère au rebond les électrons secondaires (= électrons éjectés de l'échantillon sous l'effet du bombardement) et les transmet à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec le balayage de l'objet.

2. Principe de la MET

La MET permet l'observation de l'ultrastructure des tissus analysés et l'étude de la diffraction électronique par cristallographie. Une source et un système "lentilles magnétiques et diaphragme" permettent de focaliser un faisceau d'électrons qui va traverser l'échantillon et provoquer des excitations variées.

3. Préparation des échantillons

Pour les 2 techniques, les plaques de Peyer de souris GKO infectées depuis 9 jours ont été fixées dans du glutaraldéhyde 3% (Sigma) en tampon cacodylate 0,2 M pH 7,4 (Sigma) pendant 1 h à 4°C. Les échantillons ont ensuite été rincés dans 3 bains successifs de 10 min chacun avec le tampon cacodylate puis conservés à 4°C avant d'être pris en charge par les services de microscopie électronique.

III-RÉPONSE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES *IN VITRO*

1. Mode K

Les cellules Mode-K sont des cellules épithéliales du petit intestin de souris immortalisées par le transfert du gène de l'antigène T du virus SV-40. Cette lignée a été produite en 1993 par le Dr Kaiserlian et ses collaborateurs (Vidal *et al.*, 1993). Ces cellules sont adhérentes et sont cultivées classiquement à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, 5% de SVF, 4 mM de glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sub-confluentes sont décrochées par l'action de la trypsine puis diluées régulièrement 2 fois par semaine.

2. ICcl2

Les cellules ICcl2 sont une autre lignée de cellules épithéliales intestinales également immortalisées par l'antigène T du virus SV40. Cette lignée a été produite en 1996 par le Dr Vandewalle et ses collaborateurs (Bens *et al.*, 1996). Ces cellules sont adhérentes et sont cultivées classiquement à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Le milieu de culture est composé de DMEM : Ham's F12 1 :1 (v/v), 60 nM de sélénate de sodium, 5 µg/ml de transferrine humaine, 2mM glutamine, 5 µg/ml insuline, 50 nM dexaméthasone, 5nM triiodothyronine, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 20 mM de D-glucose, 2% SVF, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sub-confluentes sont décrochées par l'action de la trypsine puis diluées régulièrement 2 fois par semaine.

3. HCT-8

Les cellules HCT-8 sont une lignée de cellules épithéliales humaines provenant d'un patient atteint d'un adénocarcinome du colon et du rectum (ATCC CCL244) (Tompkins *et al.*, 1974). Les cellules sont cultivées à 37°C dans du milieu RPMI 1640, 2 mM glutamine, 1mM Na Pyruvate, 15mM Hépès, 10% SVF, 100 UI/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, (éventuellement 0,25 µg/ml amphotéricine).

4. Infection avec des oocystes de *C. parvum* ou stimulation par des cytokines recombinantes

Les cellules sont mises en culture à raison de 10^6 cellules par puits de P6. Le lendemain, les cellules sont à 80% confluentes et sont infectées pendant 24 h avec $5 \cdot 10^6$ oocystes de *C. parvum* préalablement javellisés. Les puits témoins reçoivent des oocystes inactivés pendant 2h à 60°C ou du milieu de culture seul.

Les cellules peuvent aussi être stimulées pendant 5 heures avec 10 ng d'IL1 β , d'IFN γ et de TNF α murins recombinants (Pharmingen). Les cellules témoins pour cette expérience sont incubées avec du milieu de culture.

5. Culture de cellules M *in vitro*

Kerneis *et al.* (Kerneis *et al.*, 1997) ont mis au point un système de culture cellulaire qui reproduit les caractéristiques principales de l'épithélium associé aux follicules (FAE) et des cellules M par co-culture de lymphocytes de plaque de Peyer avec des cellules intestinales humaines de la lignée Caco-2 différenciées (Figure 16).

a/ Culture des Caco-2 TC7

Les cellules sont mises en culture à 37°C dans du milieu dont la composition est la suivante : DMEM glucose 4,5 g/L, 10% SVF décomplémenté, 1% acides aminés non essentiels, 1% de pénicilline/streptomycine (10 000UI/ml ; 10 000 μ g/ml), de la transferrine humaine (concentration finale 20 μ g/ml). Après centrifugation, les cellules Caco-2 sont comptées en Malassez en présence de bleu Trypan puis diluées afin d'obtenir une suspension à $3 \cdot 10^6$ cellules/ml. Cent μ l sont déposés sur la face inférieure d'une membrane de Transwell en polycarbonate de porosité 3 μ m (Costar). Les filtres sont placés dans une chambre humide (environ 10 ml de DMEM) formée de 2 fonds de boîtes de Pétri inversés l'un sur l'autre. Les filtres sont laissés ainsi pendant environ 18 heures à 37°C, puis ils sont mis dans leur configuration normale dans un puits de p24. Le milieu est changé environ toutes les 48 heures. Après 14 jours de culture, les résistances sont mesurées avec un ohmètre (Millipore) ; elles doivent être d'environ 200 ohm/cm².

b/ Lymphocytes des plaques de Peyer

Des souris femelles BALB/c de 3 à 6 mois d'âge sont sacrifiées. Les plaques de Peyer de l'intestin sont extraites puis placées dans du milieu de composition identique à celui utilisé pour la culture des Caco-2 sauf pour le DMEM qui doit être à 1g/l. Les lymphocytes sont extraits des plaques de Peyer par broyage sur une grille. La suspension est comptée en cellule de Malassez puis centrifugée à 2000 rpm pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans une petite quantité de milieu et ajusté à la concentration de 10^7 cellules / ml.

c/ Coculture

Sur les filtres qui présentent une résistance de 200 ohm/cm^2 , 10^6 lymphocytes isolés des plaques de Peyer sont ajoutés dans la chambre supérieure. Après 4 jours de co-culture la résistance est mesurée.

d/ Infection par *C. parvum*

Des oocystes de *C. parvum* sont mis à 37°C dans du milieu de culture pendant 20 minutes pour leur permettre d'excyster. La suspension est ensuite passée sur un filtre de $5\mu\text{m}$ pour ne garder que les sporozoïtes qui sont comptés sur cellule de Thoma. Environ $5 \cdot 10^6$ sporozoïtes de *C. parvum* sont mis au contact des cellules Caco-2 pendant environ 20 min. Après 20 heures d'infection, les membranes de Transwell sont fixées comme décrit précédemment pour être observées par MET.

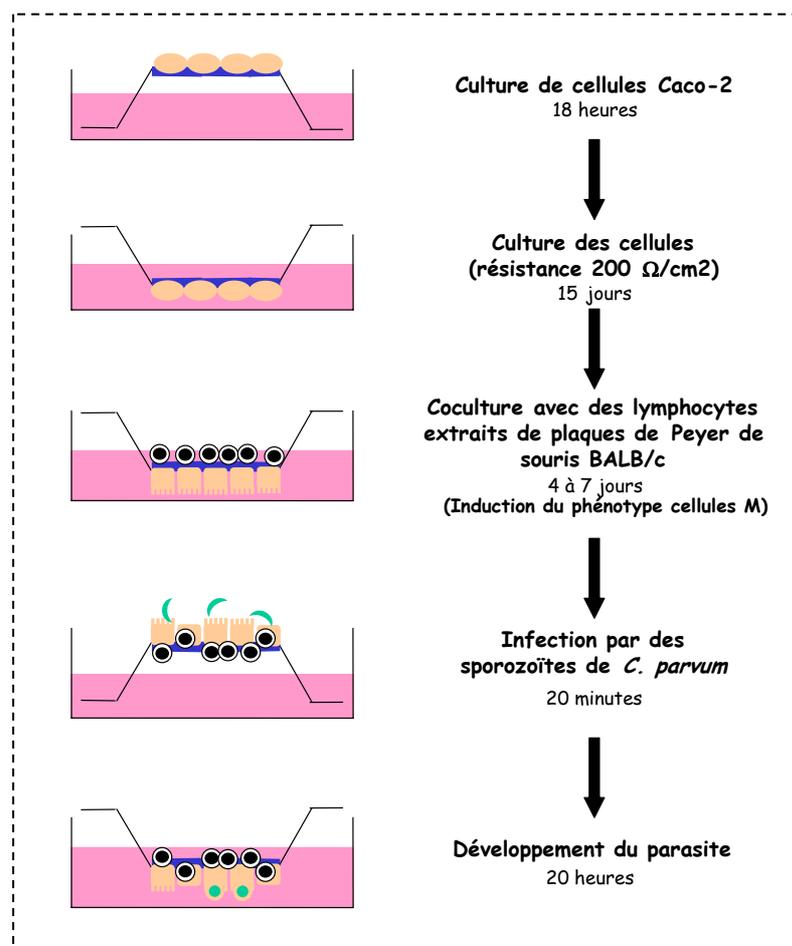


Figure 16 : Représentation schématique du protocole de culture de cellules M *in vitro* et de leur infection par *C. parvum*.

IV- ETUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE PAR RT-PCR

1. Extraction d'ARN

Pour extraire l'ARN total des tissus, le Trizol (Gibco-BRL) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur qui se réfère à la technique de Chomczynski P. and Sacchi N (Chomczynski et Sacchi, 1987).

Le Trizol (Gibco-BRL Life Technologies) contient du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine qui réalise des complexes avec l'ARN et permet de rompre les interactions entre l'ARN et les protéines. L'extraction de l'ARN nécessite trois étapes : une étape d'homogénéisation, une étape de séparation des phases et une dernière étape de précipitation de l'ARN.

Homogénéisation	<ul style="list-style-type: none"> - mettre le tissu dans environ 1 ml de Trizol (<i>le volume de tissu ne doit pas excéder 10% du volume de Trizol</i>), vortexer et laisser incubé à température ambiante pendant au moins 5 min - récupérer le plus possible de Trizol (laisser le tissu) et centrifuger pendant 10 min à 12000 g - récupérer le surnageant et bien mélanger par une dizaine de refoulements successifs à la pipette - possibilité de congeler à - 80°C
Séparation des phases	<ul style="list-style-type: none"> - ajouter 0,2 ml de chloroforme (Sigma RNase free) par ml de Trizol utilisé au départ - agiter fortement pendant 15 secondes (ne pas vortexer) - laisser à température ambiante pendant 2 à 3 minutes - centrifuger à 12 000 g maximum pendant 15 minutes à 4°C <p>Après la centrifugation, le mélange est séparé en une phase organique supérieure (phénol/chloroforme), une interphase et une phase aqueuse inférieure. La phase aqueuse contient l'ARN.</p>
Précipitation de l'ARN	<ul style="list-style-type: none"> - récupérer la phase aqueuse - ajouter 0,5 ml d'isopropanol (Sigma RNase free) pour 1 ml de Trizol utilisé au départ - agiter et laisser à température ambiante pendant 10 min - centrifuger à 12 000 g pendant 10 min à 4°C, l'ARN forme alors un culot
Lavage du culot d'ARN	<ul style="list-style-type: none"> - laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 75 % (fait avec de l'eau traitée au DEPC 0,1%) - vortexer et centrifuger à 7500 g à 4°C pendant 5 min - laisser sécher le culot pendant 5 à 10 min (sous hotte, dans la glace) - resuspendre le culot d'ARN dans de l'eau DEPC 0,1%
Quantification de l'ARN	<ul style="list-style-type: none"> - mesurer la DO à 260 nm et le ratio DO 260nm/DO 280nm - 1 unité de DO à 260 nm correspond à 40 µg/ml d'ARN - si le ratio est entre 1,6 et 1,8, l'extraction est correcte

NB : pour extraire l'ARN total de l'iléon des souris, l'iléon est prélevé et coupé dans le sens de la longueur. Il est ensuite rincé dans du PBS pour éliminer le contenu intestinal puis incubé dans le Trizol et vortexé. L'iléon n'est pas complètement broyé dans le but d'étudier la réponse dans la partie superficielle de la muqueuse c'est-à-dire sous l'épithélium.

2. RT-PCR qualitative

Cette technique a été choisie afin d'étudier la réponse immunitaire suite à l'infection par *C. parvum* car elle présente de nombreux avantages. Elle est très sensible par rapport aux techniques courantes d'étude des ARNm telle que la technique du Northern Blot ou la ribonucléase protection puisqu'elle est capable de détecter des transcripts exprimés par une seule cellule. Par sa simplicité, cette technique permet de cribler rapidement une grande quantité de gènes qui peuvent être surexprimés lors de la cryptosporidiose et qui par conséquent peuvent être intéressants à étudier.

a/ Reverse-transcription (RT)

Pour réaliser la réaction de reverse-transcription, sont mélangés

- 1 µg d'ARN total
- 1 µl d'oligodT 18 mers (133 pmole/µl)
- Eau DEPC 0,1% qsp 11 µl

Le mélange est chauffé pendant 10 min à 65 °C pour débobiner l'ARN puis incubé pendant 2 min dans la glace. Au volume de 11 µl sont ajoutés 9 µl d'E-mix constitué de

- 4 µl de tampon 5X (Eurogentec)
- 2 µl de dNTP (10mM chaque, Eurogentec)
- 0,4 µl de reverse-transcriptase MuMLV (25 U/µl, Eurogentec)
- 2,6 µl d'eau DEPC 0,1%

Les 20 µl sont incubés à 37°C pendant 1h30 puis chauffés à 85°C pendant 10 min pour inactiver l'enzyme.

b/ Réaction de polymérisation en chaîne (de l'anglais PCR)

Pour réaliser la réaction de PCR, sont mélangés

- 2 µl de la réaction de RT
- 2,5 µl de tampon 10X (Sigma)
- 0,5 µl de dNTP (10 mM chaque, Eurogentec)
- 0,5 µl de chacune des amorces 5' et 3' (25 µM)
- 1,25 µl de *Taq* polymérase (1U/µl, Sigma Red Taq)
- Eau DEPC 0,1% qsp 25 µl

Pour chacun des couples d'amorces utilisés dans les PCR, la température d'hybridation optimale a été déterminée. Le programme utilisé est identique pour toutes les réactions de PCR, seul le nombre de cycles d'amplification peut varier selon le niveau d'expression du gène dans la muqueuse intestinale.

Les réactions de PCR sont effectuées dans un thermocycleur PTC 200 (MJ Research) avec couvercle chauffant selon le programme suivant.

- Nombre de cycles
- Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 3 min
 - Dénaturation de l'ADN 92°C pendant 45 secondes
 - Hybridation des amorces pendant 1 min aux températures choisies
 - Elongation de l'ADN à 72°C pendant 1min30
 - Elongation finale à 72°C pendant 10 min.

La taille des produits PCR obtenus est vérifiée par électrophorèse en gel agarose en tampon Tris Borate EDTA (TBE : Tris 45mM, acide Borique 45mM et EDTA-Na₂ 1mM, pH8) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium.

NB : Pour un certain nombre de gènes de cytokines à étudier, nous n'avons pas choisi les séquences des amorces ni la température optimale d'hybridation, car les constructions plasmidiques pour la RT-PCR quantitative dont dépend la séquence des amorces nous ont été gracieusement fournies par Dr M. Kagnoff (voir paragraphe suivant). Ces séquences d'amorces sont données dans le tableau 2. Les séquences des amorces que nous avons choisies pour les gènes de chimiokines et certains gènes de cytokines sont données dans la partie des résultats.

	Amorce S	Amorce AS	Taille cible (pb)	Taille standard (pb)	T° h ¹
β-Actine	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC-3'	540	746	66
Crypto	5'-AGAATGGTTAATTGACACCGGTAGTGT-3'	5'-AACGCCGTTTGGTGCCTTACCTTCG-3'	229	318	68
IL-12p40	5'-AGTGAACCTCACCTGTGACACGCC-3'	5'-GTTTCTTTGACACGATGAGC-3'	303	538	68
iNOS	5'-TCACGCTTGGGTCTTGTTCCTACT-3'	5'-TTGTCTCTGGGTCTCTGGTCA-3'	523	322	59
IL-10	5'-GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAG-3'	5'-CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'	274	396	59
IL-1-α	5'-AAGTTTGTGTCATGAATGATTCCTC-3'	5'-GTCTCACTACCTGTGATGAGT-3'	263	396	59
IL-6	5'-GACAAAGCCAGAGTCCCTTCAGAGAG-3'	5'-CTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC-3'	229	351	62
TNF-α	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'	5'-TACAGCCTTGCTCACTCGAATT-3'	276	393	56

¹T° h, température d'hybridation lors de la PCR

Tableau 2 : Séquences des amorces et tailles des produits PCR.

3. RT-PCR quantitative

a/ Principe (Figure 17)

Cette technique a été utilisée afin de quantifier les surexpressions observées qualitativement. Elle est basée sur la co-amplification compétitive d'un ADNc cible et d'un standard interne spécifique de concentration connue, dans la même réaction de RT-PCR. Le standard interne (ou compétiteur) doit donc posséder les mêmes sites de

reconnaissance pour les amorces servant à amplifier l'ADNc cible. L'ADNc cible et l'ADNc standard sont différents par la taille ce qui permet de les visualiser après migration électrophorétique sur un gel d'agarose. L'avantage principal de cette technique est que les deux ARNm sont dans la même réaction dès la réaction de reverse-transcription. Par conséquent, les différences d'efficacité d'une réaction de RT à l'autre ne perturbent pas la quantification des ARNm.

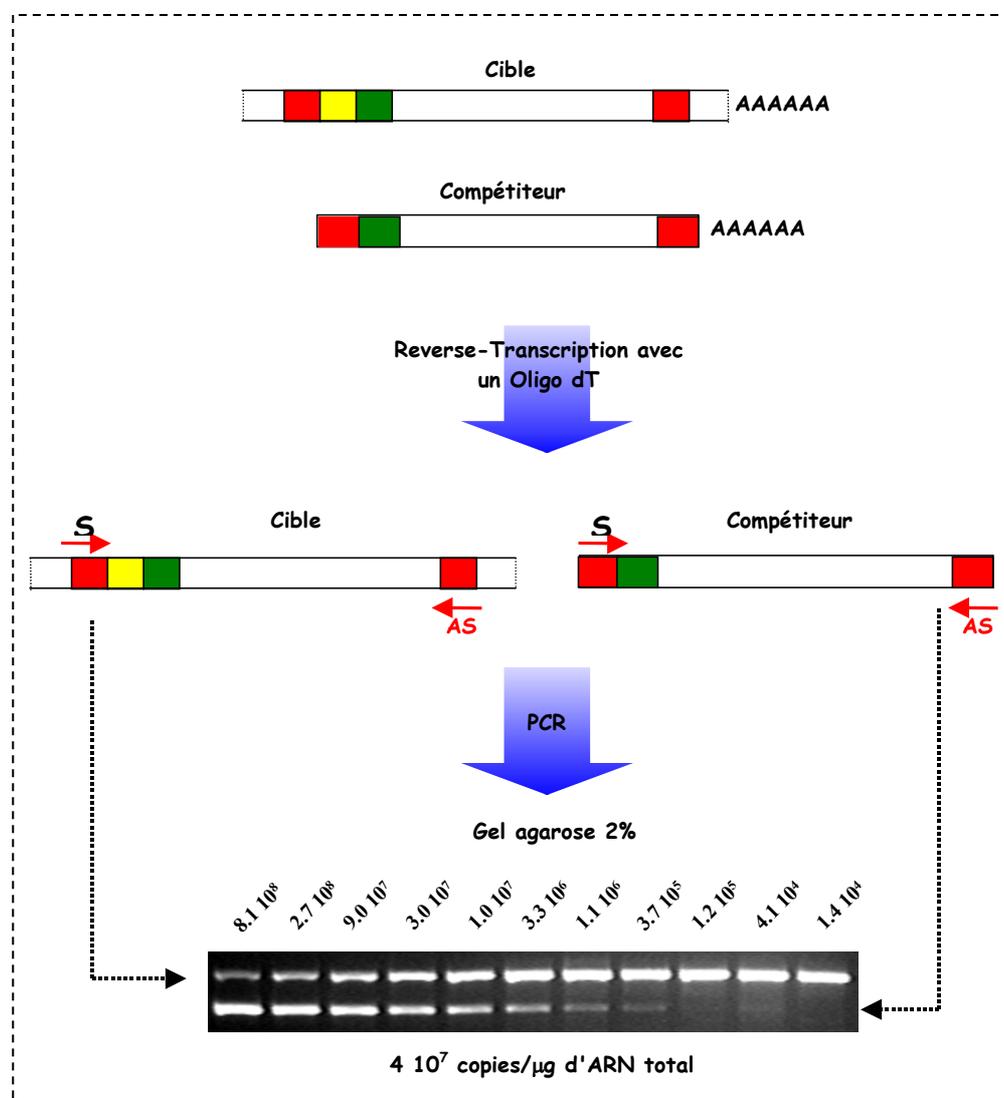


Figure 17 : Principe de la RT-PCR quantitative

b/ Constructions moléculaires pour la RT-PCR quantitative

Le principe de RT-PCR quantitative décrit ci-dessus nécessite la construction de plasmides pour obtenir les ARNm compétiteurs. Ces plasmides peuvent être construits de différentes manières. Le laboratoire du Dr M. Kagnoff nous a gracieusement fourni les plasmides pMCQ (Murine Cytokine Quantitation) 1, 2, 3 et 4 (Figures 18 et 19) pour l'étude des cytokines murines dont la construction a été décrite dans l'article de Eckmann *et al.* (1996). Nous avons utilisé une autre méthode pour construire les plasmides permettant la quantification d'autres cytokines et des chimiokines.

- *Construction d'un plasmide pGEM-T Easy contenant une queue polyA*

Les différents compétiteurs sont construits dans le plasmide pGEM-T Easy (Promega). Le vecteur pGEM-T Easy est conçu pour cloner directement des fragments de PCR. Il possède en amont du site de clonage une séquence de fixation pour l'ARN T7 polymérase permettant de générer après transcription *in vitro* des ARN simples brins qui ne seraient pas polyadénylés. Pour ne pas avoir à insérer dans chaque nouvelle construction un dimère de nucléotides correspondant à la queue polyadénylée, le vecteur pGEM-T Easy a été modifié pour qu'il exprime une extrémité polyadénylée en 3' des gènes clonés exprimés (Figure 20).

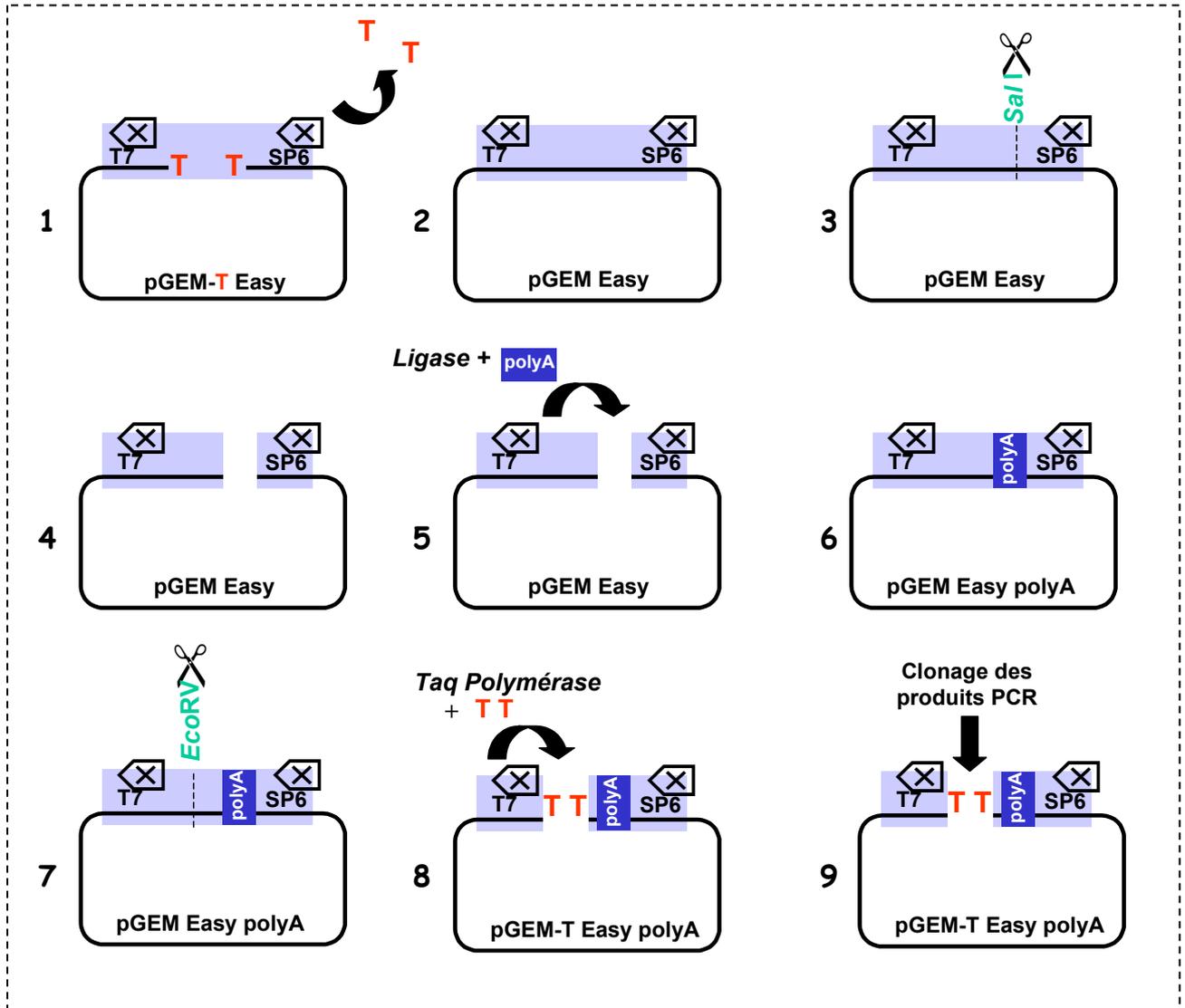


Figure 20 : Schéma expliquant les différentes étapes de construction du vecteur pGEM-T Easy polyA. Le vecteur pGEM-T Easy ayant perdu ses thymines (T) (1) peut se refermer sur lui-même pendant une réaction de ligation (2). Le vecteur est ensuite digéré par *SalI* (3,4). Au niveau du site *SalI*, un dimère d'amorces correspondant à notre séquence polyadénylée (polyA) est inséré (5). Après ligation (6), le vecteur est électroporé dans des bactéries compétentes. Les plasmides des colonies positives sont linéarisés par *EcoRV* (7), et des T sont ajoutés au niveau du site *EcoRV* comme dans la construction initiale de pGEM-T Easy (8). (9) Tous les produits PCR peuvent être clonés dans la construction pGEM-T Easy polyA.

(i) Délétion des T du vecteur pGEM-T Easy (Promega)

Pour pouvoir cloner la séquence correspondant à l'extrémité polyA en aval du site de clonage des produits PCR, le vecteur devait être refermé sur lui-même en lui faisant perdre ses extrémités thymine au niveau du site de clonage. Les T (thymine) de ce type de vecteur sont facilement perdus si le vecteur n'est pas conservé au froid. Si les T sont

perdus, le vecteur peut se refermer sur lui-même et former un site unique à bout franc pour l'enzyme de restriction *EcoRV*.

Un µl de vecteur pGEM-T Easy (50 ng) est laissé une nuit sur la paillasse. Une réaction de ligation est réalisée à 4°C dans un volume réactionnel de 10µl à partir d'un µl du vecteur, 1 µl de tampon 10X et 1 µl de T4 DNA ligase (Kit pGEM-T Easy Promega). Quelques plasmides se referment alors sur eux-même pendant la nuit à 4°C s'ils ont bien perdu leur T.

Des bactéries TG1 électrocompétentes sont électroporées avec 1 µl de la réaction de ligation (Appareil Easyject/Eurogentec, 2500V, 156Ω, 25µF) puis étalées sur des boîtes de LB agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline, de l' IPTG (100 µl à 100 mM) et du X-Gal (20 µl à 50 mg/ml). Les colonies bleues sont mises en culture et l'ADN plasmidique est extrait selon le protocole de Birnboim et Doly (1979).

Les plasmides sont ensuite digérés par *EcoRV* (*Si les clones se sont refermés correctement en perdant uniquement le T alors la digestion par EcoRV se fera correctement*). Les clones positifs sont mis en culture pour faire une midipréparation d'ADN plasmidique (selon le protocole Qiagen).

(ii) Clonage d'une séquence polyA

Les plasmides sont digérés par *Sal I* pendant 1h30 à 37°C (5 µg du plasmide + 2,5 µl de *SalI* (10 U/µl, Promega) + 3 µl tampon 10 X + H₂O qsp 30 µl) puis traités au phénol / chloroforme et précipités à l'acétate de sodium 0,3 M final. Les extrémités 5' du vecteur libérées lors de la digestion sont ensuite déphosphorylées par action de la phosphatase alcaline selon les instructions du fabricant (CIAP, Promega). Afin d'éliminer l'enzyme, le plasmide est de nouveau traité au phénol / chloroforme suivi d'une précipitation à l'acétate de sodium 0,3 M final. Parallèlement, 4 nmoles de chaque amorce reprise dans un tampon tris 50mM, EDTA 2mM, NaCl 100mM, pH7,5 sont mélangées puis dénaturées pendant 10 minutes par incubation dans de l'eau bouillante. L'ADN est ensuite renaturé par refroidissement progressif.

Séquence des 2 amorces

Les amorces sont synthétisées et modifiées (phosphorylation en 5' phosphate) par la société Eurogentec. Ces amorces sont complémentaires et leur appariement laisse des extrémités cohésives compatibles avec le site de clonage, dans notre cas *SalI*. Les bases en gras permettent de conserver une extrémité cohésive avec le site de clonage *SalI* tout en conservant *SalI* en site unique. Un site de restriction (*HindIII*) n'existant pas dans le vecteur a été introduit dans la séquence clonée.

Amorce 1 oligodT3	5' - TCGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTC - 3'
Amorce 2 oligo dT4	5' - TCGAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG - 3'
	$\begin{array}{c} \text{Sal I} \qquad \qquad \qquad \text{Hind III} \\ \hline \end{array}$
Amorces hybridées	TCGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTC GTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAGAGCT

Le plasmide digéré et le couple d'amorces hybridées sont ligués à 4°C pendant la nuit (100 pmoles de dimères de primers + pGEM-T Easy digéré *SalI* et déphosphorylé (50 ng) + 1 µl tampon 10 X + 0,5 µl ligase (3U/µl) (Promega) + H₂O qsp 10 µl) puis électroporés dans des bactéries TG1 électrocompétentes. Les colonies positives sont criblées par PCR avec les amorces T7 et oligodT4 qui se fixent respectivement sur le promoteur T7 et sur la séquence clonée. L'ADN plasmidique des clones révélés positifs par PCR est ensuite extrait par midipréparation (Qiagen) pour la réaction de séquençage. Les réactions de séquençage d'ADN (Méthode de (Sanger *et al.*, 1977)) sont réalisées par M Pelloile du service commun du centre INRA de Tours. La technique utilisée est le die-terminator sur un séquenceur automatique ABI 377 (Applied Biosystems).

(iv) Ajout de T au vecteur pGEM easy contenant une queue polyA

Le plasmide ayant bien incorporé le couple d'amorces hybridées est digéré par *EcoRV* puis traité au phénol/chloroforme et précipité à l'acétate de sodium. Un µg de plasmide digéré est ensuite incubé pendant 2 h à 70°C avec 2 µl de tampon 10 X (Sigma red taq), 0,4 µl de dTTP (deoxythymidine triphosphate) (100 mM) (Promega), 1 µl de Red Taq (1U/µl) (Sigma) et de l'H₂O qsp 20 µl. Pour finir, le plasmide est traité au phénol/chloroforme et précipité à l'acétate de sodium.

• *Clonage des ADNc standards dans le plasmide pGEM-T Easy + polyA*

L'ADNc standard et l'ADNc cible sont différents par leur taille mais possèdent des extrémités 5' et 3' identiques. La délétion dans l'ADNc standard peut être incorporée par RT-PCR en utilisant un oligonucléotide de délétion en tant qu'amorce 5', c'est l'amorce Sc. L'amorce Sc utilisée pour générer la délétion est composée d'environ 45 bases et contient les séquences correspondant aux régions A et B (Figure 21). Ces deux régions entourent la région qui sera délétée lors de la PCR. La région A correspond à la séquence fixant l'amorce S utilisée pour l'amplification de l'ADNc cible et permettra donc d'amplifier également l'ADNc standard.

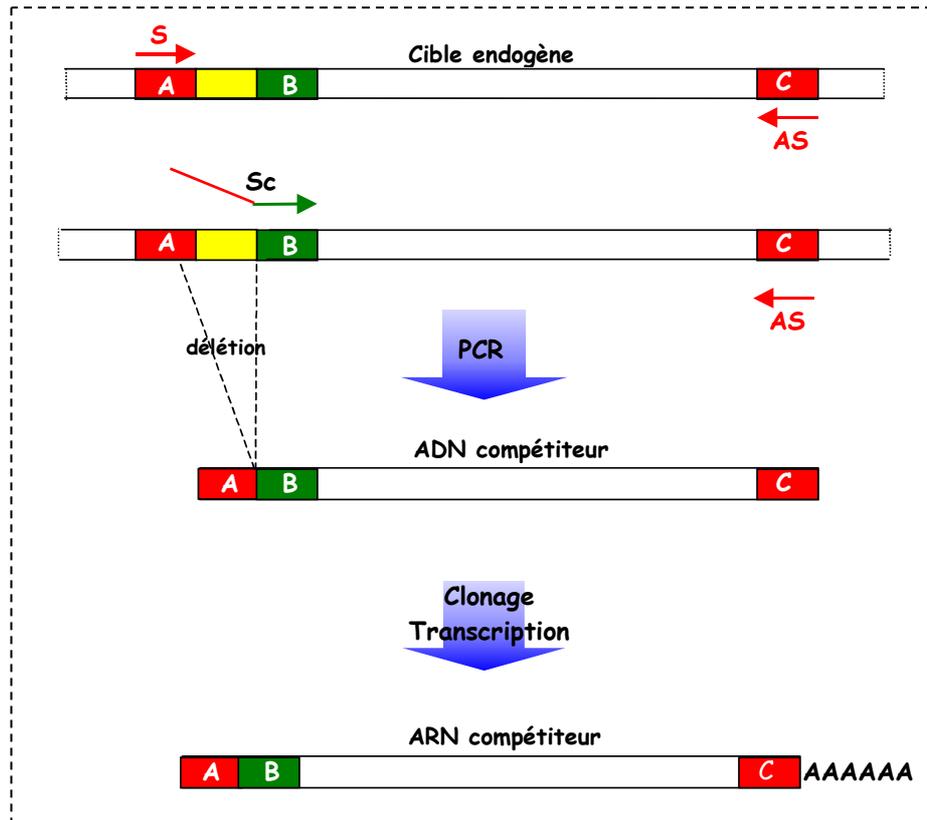


Figure 21 : Méthode pour l'obtention de l'ARNm compétiteur

Les ADNc standards sont obtenus après RT-PCR sur des ARN extraits d'iléons de sourceaux infectés par *C. parvum* avec les amorces Sc-AS (voir réaction PCR). La taille du produit de la réaction de PCR est vérifiée après migration électrophorétique sur gel d'agarose. Le produit de la PCR est ensuite purifié sur une colonne Qiaquick (Qiagen) puis dosé par mesure de la DO à 260nm.

L'ADNc standard est ensuite cloné dans le pGEM-T Easy + polyA avec un ratio insert/vecteur de 5:1. La quantité d'insert ajoutée dans la réaction est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{Qté de vecteur en ng}) \times (\text{taille insert en kb})}{\text{Taille du vecteur en kb}} \times \text{ratio} \frac{\text{insert}}{\text{vecteur}}$$

La réaction de ligation est réalisée dans un volume réactionnel de 10µl avec 50 ng de vecteur, la quantité d'insert calculée selon la formule ci-dessus, 1 µl de tampon ligase 10X (Promega) et 0,33 µl de T4 DNA ligase 3U/µl (Promega). La réaction de ligation se fait à 4°C pendant la nuit et 1 µl de la réaction est ensuite électroporée dans les bactéries TG1 électrocompétentes. Comme décrit précédemment, les bactéries positives après étalement sur des boîtes LB-agar contenant de l'X-gal et l'IPTG sont criblées par PCR avec le couple d'amorces T7 et AS, l'amorce AS étant propre à chacun des inserts. L'ADN plasmidique est ensuite extrait par Midiprep (Qiagen) pour être vérifié par une réaction de séquençage.

c/ Réaction de Transcription *in vitro*

Linéarisation du plasmide	<ul style="list-style-type: none"> - Linéariser 5 µg de plasmide avec l'enzyme de restriction appropriée *. (5 µg ADN + 7 µl de tampon 10X + 50 unités d'enzyme de restriction + H₂O qsp 70 µl) - Incuber environ 2 h à 37°C - Vérifier sur un gel d'agarose 1% que la digestion est complète. - Extraction de l'ADN par deux phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25:24 :1, pH 8) suivie d'un chloroforme. Précipitation avec 2,5 volumes d'éthanol et de l'acétate d'ammonium 0,3M. 	
Digestion par la Klenow	<ul style="list-style-type: none"> - Pour les plasmides digérés par <i>SacI</i> qui libèrent des extrémités 3' sortantes, digérer le plasmide linéarisé par l'ADN polymérase Klenow à 22°C pendant 15 min (4µl de tampon 5X de transcription (Promega) + 1,5 µg de plasmide digéré + 1,5 µl de DNA polymérase I Large Klenow (5U/µl) + H₂O qsp 12 µl) 	
Transcription <i>in vitro</i> (Kit RiboMax™ Large Scale RNA Production System, Promega)	<ul style="list-style-type: none"> Dans l'ordre suivant ajouter : - 0,4 µl de RNAsin (20 à 40 U/µl) Promega - 4 µl de tampon 5X polymérase - 6 µl rNTP (5mM chaque) - 1 µg d'ADN linéarisé purifié - 2 µl T7 ARN polymérase enzyme mix H₂O 0,1% DEPC qsp 20 µl Laisser 3h à 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> Pour les plasmides linéarisés par <i>SacI</i> digérés par Klenow , ajouter : - 12 µl de la digestion de Klenow - 6 µl rNTP - 2 µl d'ARN T7 polymérase "enzyme mix"
Traitement à la DNase	<ul style="list-style-type: none"> - 20 µl transcripts - 1 µl de RQ1 Rnase-free Dnase (1U/µl) - Incuber à 37°C pendant 15 minutes 	
Précipitation des ARNm	<ul style="list-style-type: none"> - Extraction de l'ARN par deux phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25 :24 :1) suivie d'un chloroforme. - Précipitation avec 2,5 volumes d'éthanol et de l'acétate d'ammonium 0,3M à -20°C pendant la nuit - Resuspendre le culot avec 50 µl d'H₂O DEPC 	
Calcul du nombre de copies	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure de la DO à 260nm et de la concentration en ARN - Calcul du nombre de copies par µl : (concentration en ARN en µg / µl × 10⁻¹² × 6,02 10²³) / (Longueur en kb × 0,33) 	

* Les plasmides *pMCQ2*, *3*, *4* et *pCpNOS* sont linéarisés par *NotI*; Le plasmide *pMCQ1* est linéarisé par *SalI*; les plasmides pour *pMCQIP-10*, *pMCQMIG* et *pMCQi-TAC* sont linéarisés par *SacI*; tous les autres plasmides sont linéarisés par *HindIII*.

Pour pouvoir quantifier l'expression de différents gènes avec la même réaction de RT, des pools de transcripts ont été réalisés. Une première série de transcripts a été mélangée ; elle contient en quantité équimolaire tous les standards permettant de doser les cytokines de type Th1/Th2 et les cytokines pro-inflammatoires. Une deuxième série de transcripts contient tous les standards nécessaires au dosage des chimiokines. Pour chacun de ces mélanges de standards ARNm, deux gammes de dilution ont été réalisées dans du TE contenant des ARNt (concentration de 100µg/ml) ce qui prévient l'adsorption des ARNm sur les parois des tubes. Une première avec des transcripts dilués de 10 en 10, et une seconde avec des transcripts dilués de 3 en 3.

d/ Réaction RT-PCR quantitative

Dans un volume réactionnel de 11 µl, 1 µg d'ARN total, 1 µl d'oligodT 18 mers (133 pmole/µl) et une quantité précise d'ARNm standards sont mélangés. Dans un premier temps, une série de RT est réalisée avec des ARNm standards dilués de 10 en 10 pour estimer grossièrement la valeur. Pour quantifier plus précisément le nombre de molécules d'ARNm recherché, une deuxième RT est réalisée avec des standards dilués de 3 en 3. La suite de la réaction est identique à la réaction de reverse-transcription décrite dans le paragraphe IV-2 de cette partie.

L'avantage d'avoir construit des ARN compétiteurs avec une queue polyA est de pouvoir mélanger tous les transcripts que l'on désire, et donc de réaliser à partir de la même réaction de RT toutes les PCR correspondant aux compétiteurs présents dans le mélange. De plus, dès la réaction de RT, les ARN sont en compétition vis-à-vis de l'oligodT.

Les réactions de PCR sont ensuite réalisées comme décrit dans le paragraphe IV-2. Les produits de la réaction de PCR sont séparés sur un gel d'agarose 2% et l'intensité lumineuse des bandes est quantifiée par densitométrie à l'aide des logiciels Molecular Analyst (Bio-Rad) ou Scion Image (2000 Scion Corporation). L'intensité lumineuse des bandes est ensuite corrigée en tenant compte de la différence de taille entre ces deux bandes. Un graphique en double échelle logarithmique correspondant au ratio des intensités de bandes de l'ADNc standard et de l'ADNc cible en fonction du nombre de molécules d'ARN standard introduit dans la réaction par µg d'ARN total est ensuite tracé (Figure 22). Quand le ratio est égal à 1, le nombre de molécules d'ARN cible est équivalent au nombre de molécules d'ARN standard.

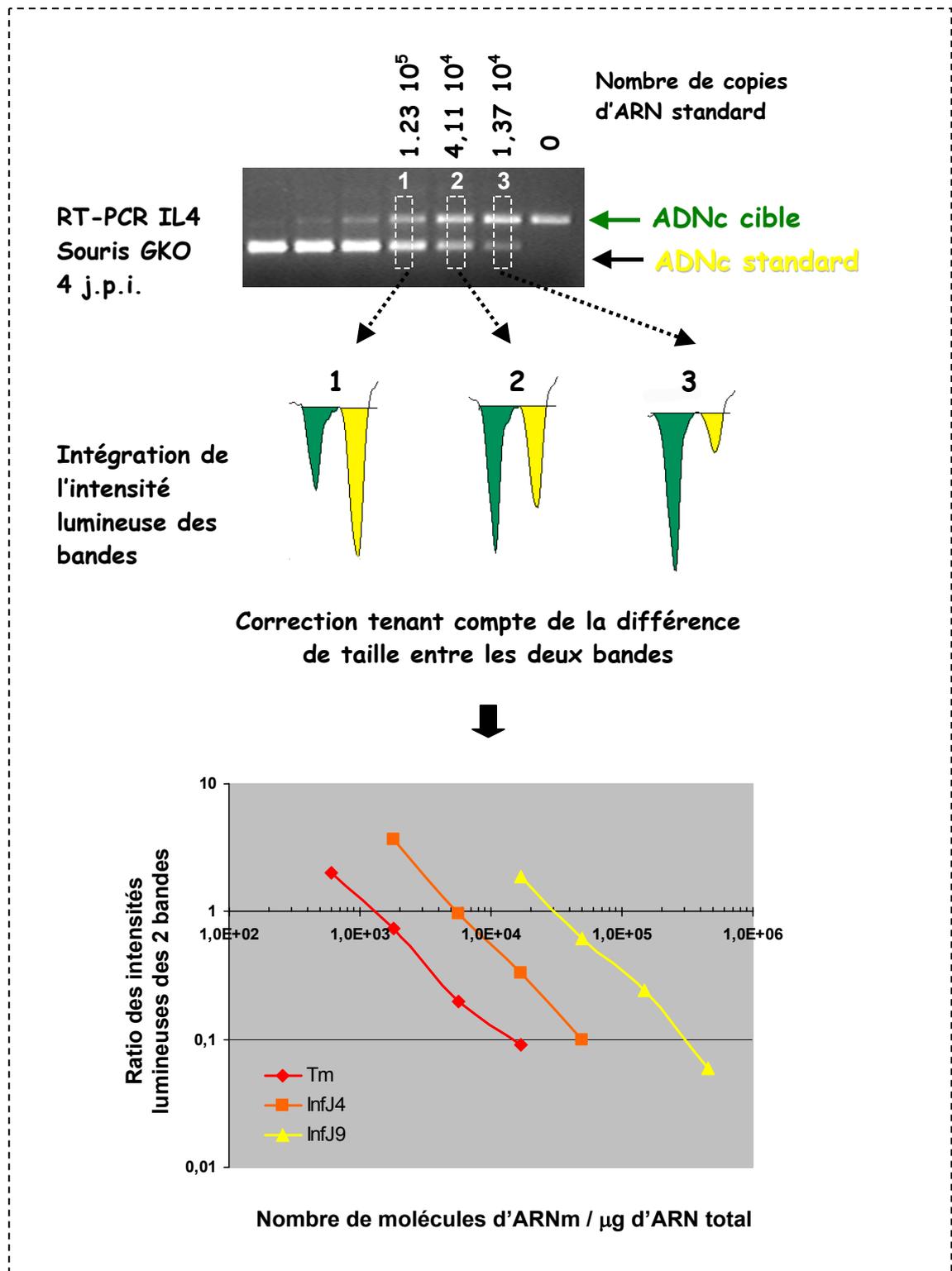


Figure 22 : Exemple de quantification du nombre de molécules d'ARNm de l'IL4 chez les souris adultes GKO infectées ou non infectées. Les valeurs exactes sont retrouvées dans le tableau dans la partie des résultats.

V- PRODUCTION D'ANTICORPS NEUTRALISANTS POUR L'ÉTUDE DES CHIMIOKINES

Afin de réaliser des essais de neutralisation de chimiokines *in vivo*, nous avons produit des anticorps polyclonaux de lapins reconnaissant des peptides d'IP-10, de MIG d'i-TAC et du récepteur de ces chimiokines CXCR3.

1. Synthèse des peptides

La séquence des peptides d'IP-10 et de MIG permettant la synthèse d'anticorps neutralisant la protéine a été décrite dans l'article de Tannenbaum *et al.* (Tannenbaum *et al.*, 1998). Pour déterminer la séquence du peptide d'i-TAC, nous avons réalisé un alignement de séquence protéique pour comparer les homologies en acides aminés entre IP-10, i-TAC et MIG. Comme les 2 peptides publiés avaient été choisis dans la partie NH2 terminale qui présente le moins d'homologie, c'est dans cette même partie que nous avons choisi la séquence du peptide pour i-TAC. Le récepteur CXCR3 appartient à la famille des récepteurs R7TM, récepteur possédant 7 domaines transmembranaires. Nous avons choisi un peptide dans le premier domaine extracellulaire.

Des peptides de 15 à 18 acides aminés ont été synthétisés et couplés à de la KLH (Keyhole Limpets Hemocyanin) par la société Eurogentec.

EP010508	H2N-CIH IDD GPV RMR AIG K – COOH	IP-10 (1,6mg/ml)
EP010509	H2N-CIS TSR GTI HYK SLK DLK-COOH	MIG (1,1 mg/ml)
EP010510	H2N-CIG PGM KAV KMA EIE K-COOH	i-TAC (1,5mg/ml)
EP010511	H2N-YDY GEN ESD FSD SPP C-COOH	CXC-R3 (1mg/ml)

NB : Les peptides nous ont été envoyés resuspendus aux concentrations indiquées.

Une partie des peptides n'a pas été couplée à la KLH.

2. Protocole d'immunisation des lapins SPF

Des lapins exempts de pathogènes spécifiques (SPF, specific pathogen free) âgés de 6 semaines, nourris avec un aliment supplémenté en anticoccidiens, sont utilisés pour la production des sérums. Cinq lots de 2 lapins sont constitués : lot MIG, lot IP-10, lot i-TAC, lot CXCR3, lot témoin KLH. Les lapins reçoivent 150 µg de peptides couplés à la KLH à chaque immunisation par voie sous-cutanée dorsale. Le lot témoin reçoit 220 µg de KLH ce qui correspond à la quantité moyenne de KLH que reçoivent les lapins immunisés avec 150 µg de peptides (d'après le rendement de couplage fourni par la société Eurogentec).

Chaque lapin est immunisé 4 fois (J0, 14, 28 et 56). La première immunisation est réalisée avec de l'adjuvant complet de Freund (Sigma) et les trois autres avec de l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma). Des prélèvements de sang sont effectués régulièrement après la troisième immunisation jusqu'au 66^{ième} jour après la première immunisation, date à laquelle les lapins sont sacrifiés.

3. Détection des anticorps anti-peptides par ELISA

La présence d'anticorps spécifiques de chacun des peptides dans le sang des lapins est analysée par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Les plaques ELISA sont tapissées avec les peptides non couplés à la KLH à raison de 100 ng par puits dans du PBS pendant une nuit à 4°C. La plaque est ensuite lavée 3 fois en PBS-Tween 0,1%, puis saturée pendant 2 heures à 37°C avec de l'albumine bovine diluée à 2% dans du PBS. Différentes dilutions des sérums (de 3 en 3) sont ensuite incubées pendant 1 h à 37°C. Après 3 lavages en PBS-Tween, la plaque est ensuite incubée pendant 1h à 37°C avec un anticorps monoclonal, reconnaissant les immunoglobulines de lapin, couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/50 000 (Sigma). Après 3 nouveaux lavages, la plaque est révélée avec le substrat pNPP (para-Nitrophényl Phosphate diSodium) et la DO est mesurée à 405 nm. Le titre en anticorps correspond à 2 fois la valeur en DO du bruit de fond.

4. Purification des anticorps

Les anticorps des sérums de lapins ont été purifiés par chromatographie d'affinité avec la protéine G en adaptant une colonne de chromatographie HiTrap[™] Protein G (Promega) sur un appareil de chromatographie BioCAD SPRINT (Perkin Elmer). La protéine G utilisée dans la colonne HiTrap[™] Protein G ne possède pas le site de fixation à l'albumine permettant une meilleure efficacité de la purification.

La colonne est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7. Ensuite, le sérum de lapin, dilué au 1/5 dans le tampon d'équilibration et filtré à 0,22µm, est déposé sur la colonne à un débit ne dépassant pas 1ml/min. Après lavage de la colonne avec du tampon phosphate de sodium, les anticorps accrochés à la protéine G sont élués grâce au pH acide du tampon glycine 0,1 M pH 2,7. La colonne est ensuite rééquilibrée dans son tampon.

NB : Après élution des anticorps dans le tampon glycine acide, le pH doit être immédiatement neutralisé avec du tampon tris HCl 1M pH 9 pour que les anticorps conservent leur activité.

VI- ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE *IN VIVO*

1. Immunofluorescence sur coupes congelées

a/ Préparation du bloc et des coupes

L'iléon des souris est prélevé et immédiatement introduit dans un liquide cryoprotecteur (Cryomatrix, Shandon). Le bloc est ensuite congelé dans de la carboglace et conservé au congélateur à -80°C jusqu'à son utilisation. Les coupes d'intestin de souris d'environ $7\mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées avec un cryostat. Elles sont ensuite utilisées, ou congelées à -80°C fixées ou non.

b/ Fixation des coupes

Les coupes sont fixées (avant ou après congélation à -80°C selon le marquage considéré) par un gradient d'acétone c'est-à-dire pendant 3 min dans des concentrations d'acétone croissante à 60%, puis 70%, 80 % et 90%. La fixation se termine par un bain de 3 min dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. Les coupes sont ensuite lavées 2 fois dans du PBS. Si la fixation est réalisée avant la congélation, les coupes fixées sont ensuite déshydratées : elles sont incubées pendant 10 min dans de l'éthanol 70%, puis 90 % et enfin pendant 15 min dans de l'éthanol absolu.

c/ Les anticorps utilisés

	Cellule marquée	Nom du clone	Fournisseur	Dilution d'utilisation	Temps et température d'utilisation
Anticorps monoclonal de rat purifié anti-CD3 de souris	Lymphocyte T	KT3	Serotec (MCA500G)	1/100	2h à 37°C
Anticorps monoclonal de rat purifié anti-CD4 de souris	Lymphocytes T CD4	YTS 191.1.2	Cedarlane (CL012AP)	1/100	2h à 37°C
Anticorps monoclonal de rat purifié anti-CD8 α de souris	Lymphocytes T CD8	CT-CD8a	Caltag Laboratories (RM2200)	1/10	2 h à 37°C
Anticorps monoclonal de rat anti F4/80 de souris	Macrophages	A3-1	Serotec (MCA497)	Non dilué	4°C , pendant la nuit
Anticorps monoclonal de rat purifié anti-neutrophile de souris	Neutrophiles	7/4	Serotec (MCA771G)	1/100	2h à 37°C
Anticorps monoclonal de rat purifié anti-interféron γ de souris	Cellules produisant de l'IFN γ	R4-6A2	Serotec (MCA 1394)	1/10	RT, pendant la nuit

d/ Marquages immunologiques

Après fixation, les coupes sont lavées dans du PBS pendant 5 min à température ambiante. Si les coupes étaient fixées et congelées à -80°C , elles sont réhydratées avec du PBS pendant 10 min. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps de choix à la température, la dilution et pendant le temps déterminé pour chacun des anticorps. Les coupes sont ensuite lavées trois fois dans du PBS puis incubées avec un anticorps monoclonal reconnaissant les chaînes légères des immunoglobulines de rat couplé à la biotine (Sigma) dilué au 1/500 dans du PBS. Après 1h d'incubation à température ambiante, les lames sont lavées 3 fois dans du PBS puis incubées pendant 20 min à température ambiante dans de l'extravidine-FITC (Sigma) dilué au 1/200 dans du bleu Evans (1/10000) permettant la contre-coloration. Du liquide de montage (1ml de tris HCl 1M, 2% de DABCO (Sigma, DiAzaBiCyclo Octane) est ajouté entre la lame et la lamelle et les lames sont observées avec un microscope à fluorescence (Leitz Dialux 20 EB).

NB : Le marquage intra-cellulaire de l'IFN γ nécessite des conditions particulières comme la fixation et la déshydratation des lames avant congélation, et des incubations et des lavages en PBS-Saponine 0,1% pour perméabiliser les cellules.

2. Réponse des IEL

a/ Purification des IEL

Les IEL sont purifiés selon la technique utilisée par Buzoni-Gatel *et al.* (Buzoni-Gatel *et al.*, 1997). L'intestin grêle est prélevé et rincé avec du PBS à l'aide d'une seringue de 20 ml munie d'une canule. Les plaques de Peyer et le gras sont éliminés avant de couper l'intestin transversalement dans un premier temps, puis en petits morceaux d'environ 2 cm. La muqueuse est ensuite grattée à l'aide d'un scalpel et dissociée mécaniquement sous agitation de 15 minutes dans du RPMI contenant 10% de SVF et 1mM de dithioerythritol (DTE). Le tout est réparti dans plusieurs tubes, complété avec du RPMI 10%SVF pour permettre un lavage puis centrifugé pendant 7 min à 1500 tours/min. Le culot est repris dans un petit volume de RPMI 10% SVF puis vortéxé pendant 2 min. Du RPMI 10% SVF est ensuite ajouté aux cellules avant de les passer sur une colonne de laine de verre (1,2 g dans une colonne de 20 ml). Les débris de tissus et les agrégats de cellules sont éliminés après passage sur la colonne de laine de verre préalablement rincée avec du RPMI contenant 10% de SVF. Après centrifugation de l'éluat de la colonne pendant 7 min à 1500 tours/min, les lymphocytes sont obtenus après centrifugation (40 min, 2500 tours/min, sans frein) sur un Ficoll de densité 1,077 (Histopaque, Sigma). Les cellules sont ensuite lavées dans du RPMI 10% SVF et sont resuspendues dans ce même milieu.

b/ Marquages immunologiques des IEL

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec des anticorps reconnaissant les récepteurs Fc. Les lymphocytes sont ensuite marqués pendant 1 heure à 4°C avec des anticorps provenant tous de chez Pharmingen et utilisés à une concentration d'environ 1µg pour 10⁶ cellules. Les cellules sont ensuite lavées deux fois puis fixées dans du paraformaldéhyde 2% en PBS.

Anticorps	Couplage	Isotype	Référence Pharmingen
Anticorps monoclonal de rat anti-CD16/CD32 (Rc FcγIII/II) de souris = Fc BLOCK		IgG2b κ	01241A
Anticorps monoclonal de rat anti-CD4 de souris	Phycoerythrine (PE)	IgG2a κ	9005A
Anticorps monoclonal de rat anti- CD8α de souris	PE	IgG2a κ	01045A
Anticorps monoclonal de rat contrôle isotypique	PE	IgG2a κ	11025A

c/ Analyse en cytométrie en flux

• Principe de fonctionnement du cytomètre utilisé

Pour analyser les cellules, nous avons travaillé sur un analyseur-trieur de cellules FACStar®Plus avec le logiciel LysysTMII (Becton-Dickinson) en collaboration avec Y. Le Vern du service commun de l'INRA de Tours.

Les cellules en suspension sont dirigées sous une pression d'azote vers la cellule d'écoulement où elles sont entourées d'une veine liquide. Elles passent ensuite devant une source lumineuse (un laser argon) à une vitesse moyenne d'environ 60 km/h qui n'endommage pas les cellules. Lorsque les cellules passent devant le laser, elles émettent des signaux de diffusion de lumière et/ou de fluorescence. Les signaux de diffusion de la lumière correspondent à des paramètres morphologiques : la diffusion frontale ou "Forward Scatter" (FSC) reflète la taille des particules analysées et la diffusion latérale ou "Side Scatter" (SSC) reflète la granulométrie des cellules. Les signaux de fluorescence sont recueillis par des détecteurs électroniques à l'aide de filtres spécifiques des fluorochromes utilisés :

- pour l'analyse de la fluorescence verte (FITC), un filtre "Band pass" 530/30 nm
- pour l'analyse de la fluorescence orange (PE), un filtre "Band pass" 575/26 nm

Les signaux de diffusion de la lumière et les signaux de fluorescence sont recueillis et amplifiés par les détecteurs du banc optique. Pour une même cellule, plusieurs

paramètres de morphologie et de fluorescence peuvent être enregistrés simultanément et l'analyse peut donc se faire selon un paramètre donné (analyse monoparamétrique) ou en associant 2 paramètres (analyse biparamétrique) (Figure 23).

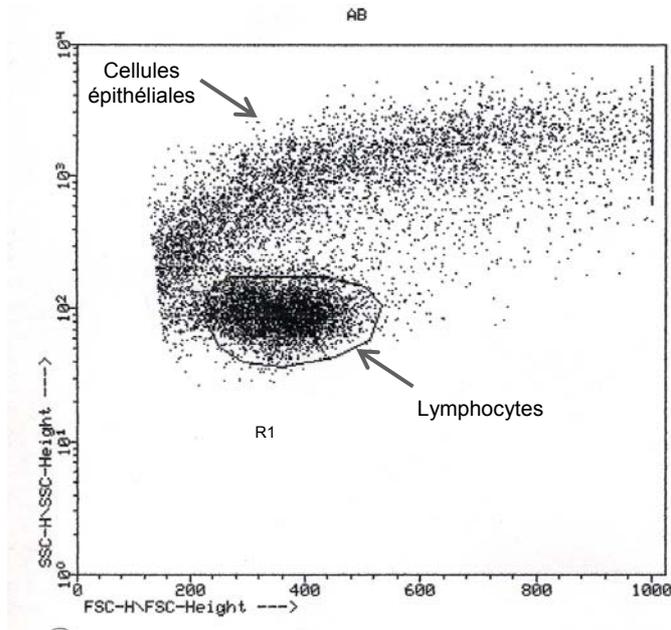


Figure 23 : Analyse biparamétrique de la morphologie des IEL de souris. L'axe des x représente la diffusion frontale de la lumière reflétant la taille des cellules (FSC). L'axe des y représente la diffusion latérale de la lumière (SSC) c'est à dire la granulométrie.

- *Analyse monoparamétrique de la fluorescence*

Dans un premier temps, une fenêtre d'acquisition (R1) est créée. Cette fenêtre définit une population cellulaire en fonction de ses paramètres morphologiques (FSC et SSC). Cette fenêtre correspondant aux lymphocytes exclut les débris cellulaires, les autres leucocytes et les cellules épithéliales. L'analyse de la fluorescence se fait uniquement sur les cellules de la fenêtre. Afin d'évaluer la fluorescence non spécifique et de déterminer un seuil de fluorescence au delà duquel les cellules sont positives, une acquisition est faite sur des cellules ayant été incubées avec un anticorps monoclonal de rat témoin isotypique.

Le pourcentage de cellules positives est défini de la façon suivante : nombre de cellules positives dans la région choisie / nombre total de cellules analysées.

d/ Tri des IEL CD4+ et CD8+ par billes magnétiques

Pour des raisons d'indisponibilité de l'analyseur-trieur de cellules, par facilité et rapidité, nous avons choisi de trier les cellules par séparation magnétique. Pour le tri des cellules par billes magnétiques, le culot final de IEL est repris dans un tampon PBS-BSA 0,5%-EDTA 2mM à raison de 80 μ l pour 10^7 cellules totales (Figure 24). Les billes magnétiques couplées aux anticorps anti-CD4+ et anti-CD8+ de souris (Miltenyi Biotec) sont ensuite incubées avec les cellules (20 μ l de billes de chaque pour 10^7 cellules totales) à 8°C pendant environ 20 minutes. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans le tampon PBS-BSA 0,5%-EDTA 2mM et resuspendues finalement dans 500 μ l de ce même tampon. Sur une colonne de type MS+ (Miltenyi Biotec) préalablement équilibrée avec 500 μ l de tampon et installée sur le support magnétique, on laisse couler par gravité les cellules. Les cellules non fixées sur les billes ne sont pas retenues par la colonne alors que les cellules CD4+ et CD8+ sont retenues. La colonne est rincée 3 fois avec 500 μ l de tampon puis elle est détachée de son support magnétique. A l'aide d'un piston, les cellules sont éluées avec 1 ml de tampon.

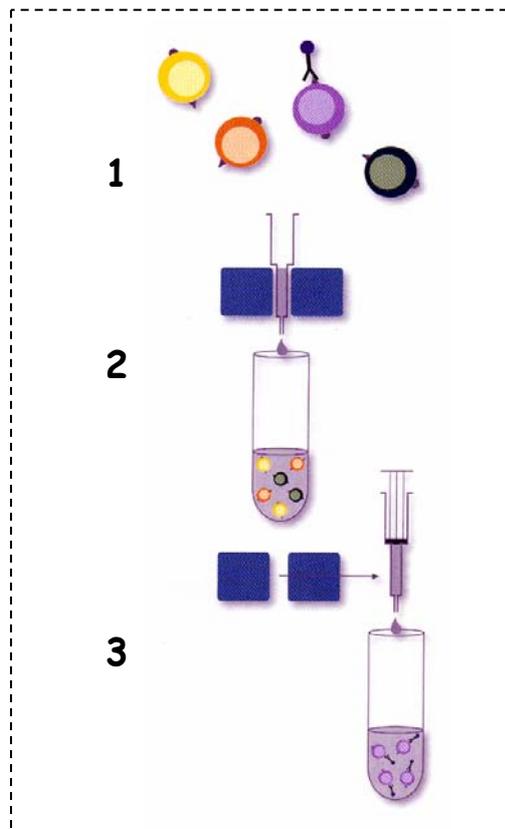


Figure 24 : Purification de IEL CD4+ et/ou CD8+. Après purification, les IEL sont marqués avec des anticorps anti-CD4+ ou CD8+ couplés à des billes magnétiques (1) (Magnetic cell sorting, MACS, Miltenyi Biotec) de souris. Les cellules marquées positivement seront alors retenues par la colonne qui se trouve entre 2 aimants (2). Les cellules CD4+ et/ou CD8+ seront éluées de la colonne lorsque cette dernière sera séparée du support aimanté (3).

I- MODÈLES EXPÉRIMENTAUX ET ÉLABORATION D'OUTILS

Dans le cadre de notre étude, pour étudier la réponse immunitaire locale suite à l'infection par *C. parvum*, nous avons utilisé trois modèles expérimentaux murins : les souriceaux C57BL/6, les souris et les souriceaux C57BL/6 GKO. Afin d'évaluer le rôle des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire à l'infection par *C. parvum*, nous avons également utilisé des lignées de cellules épithéliales murines : Mode-K et ICcl2.

1. Les modèles souris

Chez les souris adultes, l'infection est asymptomatique et peu, voire aucun, oocystes ne sont excrétés dans les fèces. Dans notre étude, les souriceaux âgés de 3 jours sont généralement infectés avec 10^6 oocystes de *C. parvum*. Les premiers oocystes nouvellement formés dans l'intestin sont détectés 4 jours après l'inoculation, ce qui correspond environ à la durée d'un cycle complet de multiplication du parasite. Le nombre d'oocystes dans l'intestin augmente graduellement avec le temps pendant 5 jours. Le maximum d'infection est atteint à 9 jours p.i. puis le niveau d'infection commence à diminuer. Par la technique de comptage dans la solution de Sheather, on ne détecte plus d'oocyste dans l'intestin des souriceaux après 20 jours d'infection (Figure 25).

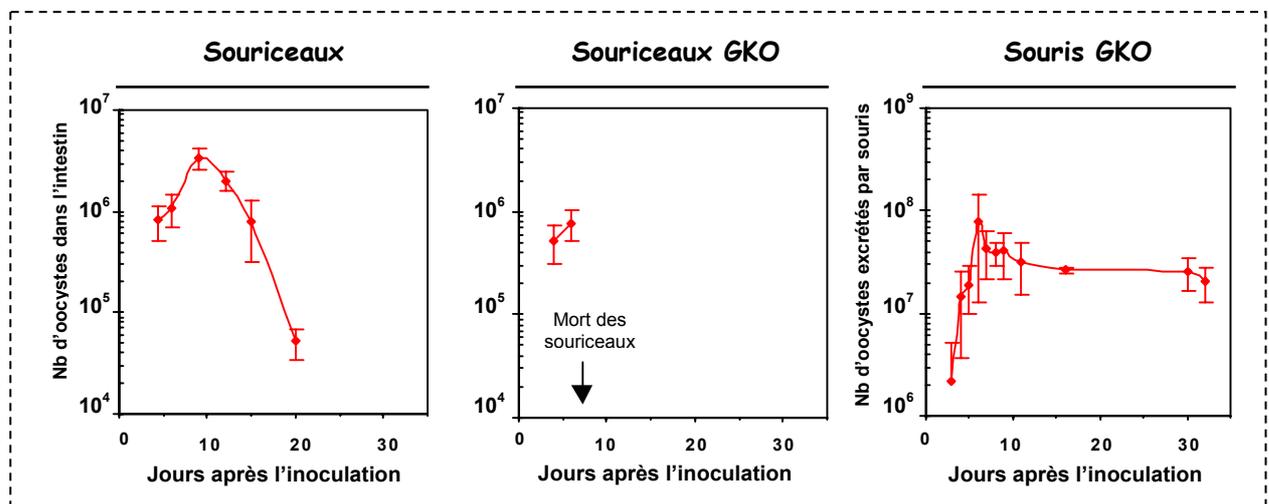


Figure 25 : Cinétiques d'infection chez les souriceaux normaux, les souriceaux GKO et les souris GKO. Les souris ont été inoculées avec 10^6 oocystes par voie orale quel que soit le modèle. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type du nombre d'oocystes excrétés par jour pour les souris adultes GKO ou du nombre d'oocystes dans l'intestin pour les souriceaux (voir matériel et méthodes). Le niveau d'infection chez les souriceaux (normaux ou GKO) a été déterminé avec 5 souriceaux pour chaque point. La charge parasitaire chez les souris adultes GKO a été déterminée avec 21 à 33 souris jusqu'à 9 j.p.i. et avec 6 souris jusqu'à 32 jours.

Chez les souris adultes GKO, également infectées avec 10^6 oocystes, les premiers oocystes sont détectés dans les fèces 3-4 jours après l'inoculation. Comme chez les souriceaux, l'infection maximale est atteinte 9 jours après l'inoculation par contre le fort niveau d'infection reste maintenu au moins pendant 30 jours.

Il n'est pas possible de comparer le niveau d'infection dans ces deux modèles puisque les techniques utilisées pour évaluer le niveau d'infection sont différentes. En revanche, l'histologie au niveau de l'iléon des souris infectées révèle une infection beaucoup plus sévère chez la souris GKO par rapport au souriceau puisque beaucoup plus d'organismes de *C. parvum* sont observés sur les coupes d'iléon (Figure 33).

Les souriceaux GKO infectés avec 10^6 oocystes meurent très rapidement 5 jours après l'inoculation. En effet, les mères GKO étant sensibles à l'infection, elles s'infectent au contact de leurs petits et par conséquent, soit parce qu'elles meurent rapidement, soit parce qu'elles ne nourrissent plus les petits, les souriceaux meurent environ 5 jours après l'inoculation. Pour pallier ce problème, des souriceaux GKO âgés de 1 jour ont été transférés à des mères normales C57BL/6 à qui les petits ont été enlevés. Infectés avec 10^6 oocystes, les souriceaux GKO transférés présentent le même profil d'infection que les souriceaux normaux pendant environ 7 jours après l'inoculation, puis les souriceaux commencent à mourir. Neuf à 10 jours après l'inoculation, tous les souriceaux GKO infectés sont morts.

Du point de vue de l'évolution pondérale, les souriceaux infectés ont un retard de croissance par rapport aux souriceaux témoins. Les souris adultes GKO perdent du poids jusqu'au 9^{ème} jour après l'inoculation puis récupèrent malgré la forte infection qui persiste (Figure 26).

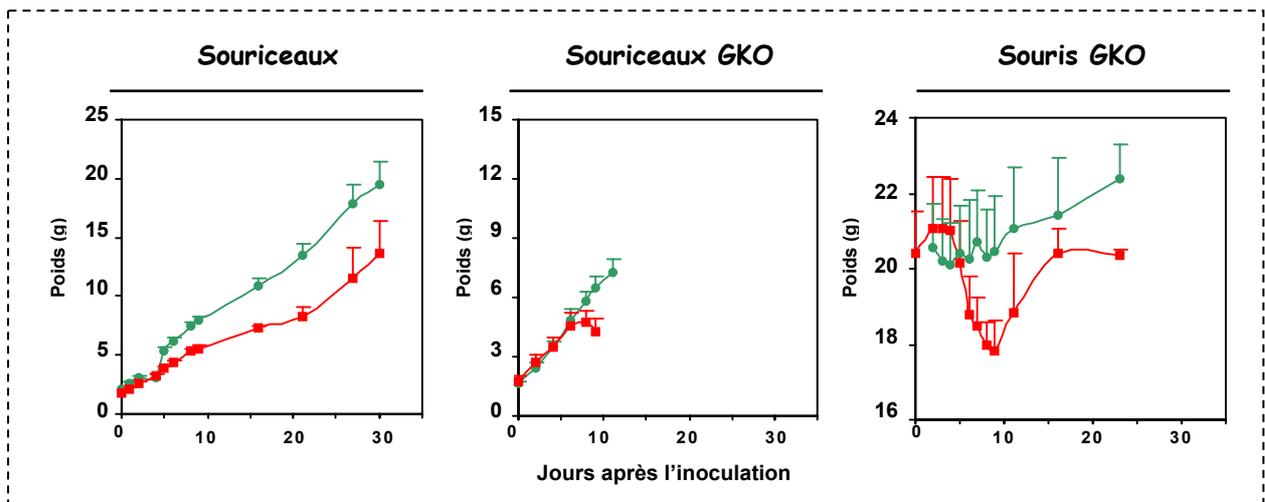


Figure 26 : Evolution du poids chez les souriceaux normaux, les souriceaux GKO et les souris GKO infectés (■) ou non (■) par *C. parvum*. Effectif : souriceaux normaux témoins (n=7 à 11) et infectés (n=6) ; souriceaux GKO témoins (n=20) et infectés (n=23 à 46 jusqu'à 8 j.p.i. et n=6 à 9 j.p.i.) ; souris adultes GKO témoins (n=6) et infectées (n=10 à 15 jusqu'à 9 j.p.i. et n= 3 de 16 à 23 j.p.i.)

2. Modèle *in vitro*

Les cellules épithéliales de l'intestin sont les cellules hôtes de *C. parvum*. Si quelques infections expérimentales *in vitro* ont montré que le parasite pouvait se développer dans des monocytes et des macrophages (Lawton *et al.*, 1997 ; Martinez *et al.*, 1992), les études sur les lignées de cellules épithéliales humaines sont au contraire très nombreuses et révèlent une importante permissivité de ces cellules à l'infection par *C. parvum* (Laurent *et al.*, 1997 ; Pollok *et al.*, 2001 ; Upton *et al.*, 1995). Seules, deux lignées de cellules intestinales murines existent à notre connaissance, celles-ci n'avaient jamais été utilisées pour étudier l'infection par *C. parvum* : les Mode-K (Vidal *et al.*, 1993) et les ICcl2 (Bens *et al.*, 1996). Nous avons montré que ces deux lignées de cellules épithéliales murines étaient permissives à l'infection par *C. parvum*.

Les cellules ICcl2 se cultivent plus facilement que les Mode-K, en effet, elles adhèrent bien au plastique de la flasque de culture par rapport aux cellules Mode-K et par des phénomènes d'inhibition de contact peuvent rester longtemps en monocouche confluentes. De plus, contrairement aux Mode-K, les cellules épithéliales de la lignée ICcl2 sont capables de polariser après une dizaine de jours de culture. Enfin, ces cellules possèdent le même haplotype (H-2^b) que les souris C57BL/6 que nous utilisons et présentent donc l'intérêt de pouvoir être utilisées pour réaliser des co-cultures de cellules. Pour la suite de notre travail, afin d'étudier la réponse des cellules épithéliales à l'infection par *C. parvum*, nous avons donc utilisé préférentiellement la lignée de cellules ICcl2. La lignée de cellules Mode-K nous a servi dans un second temps pour vérifier nos résultats. Nous avons comparé le niveau d'infection des cellules HCT-8 humaines très permissives à l'infection par *C. parvum* (Upton *et al.*, 1995) et celui des cellules ICcl2 murines. Les résultats de cytométrie en flux ont montré que 92% des cellules HCT-8 sont infectées après 24h contre 52% des cellules ICcl2. L'analyse en microscopie de fluorescence des cellules a montré que les cellules infectées pouvaient contenir un ou plusieurs parasites (Figure 27). Ces résultats montrent que les cellules ICcl2 sont un bon modèle pour étudier l'infection *in vitro* des cellules épithéliales intestinales par *C. parvum* malgré une permissivité de ces cellules à *C. parvum* inférieure à celle observée pour les HCT-8.

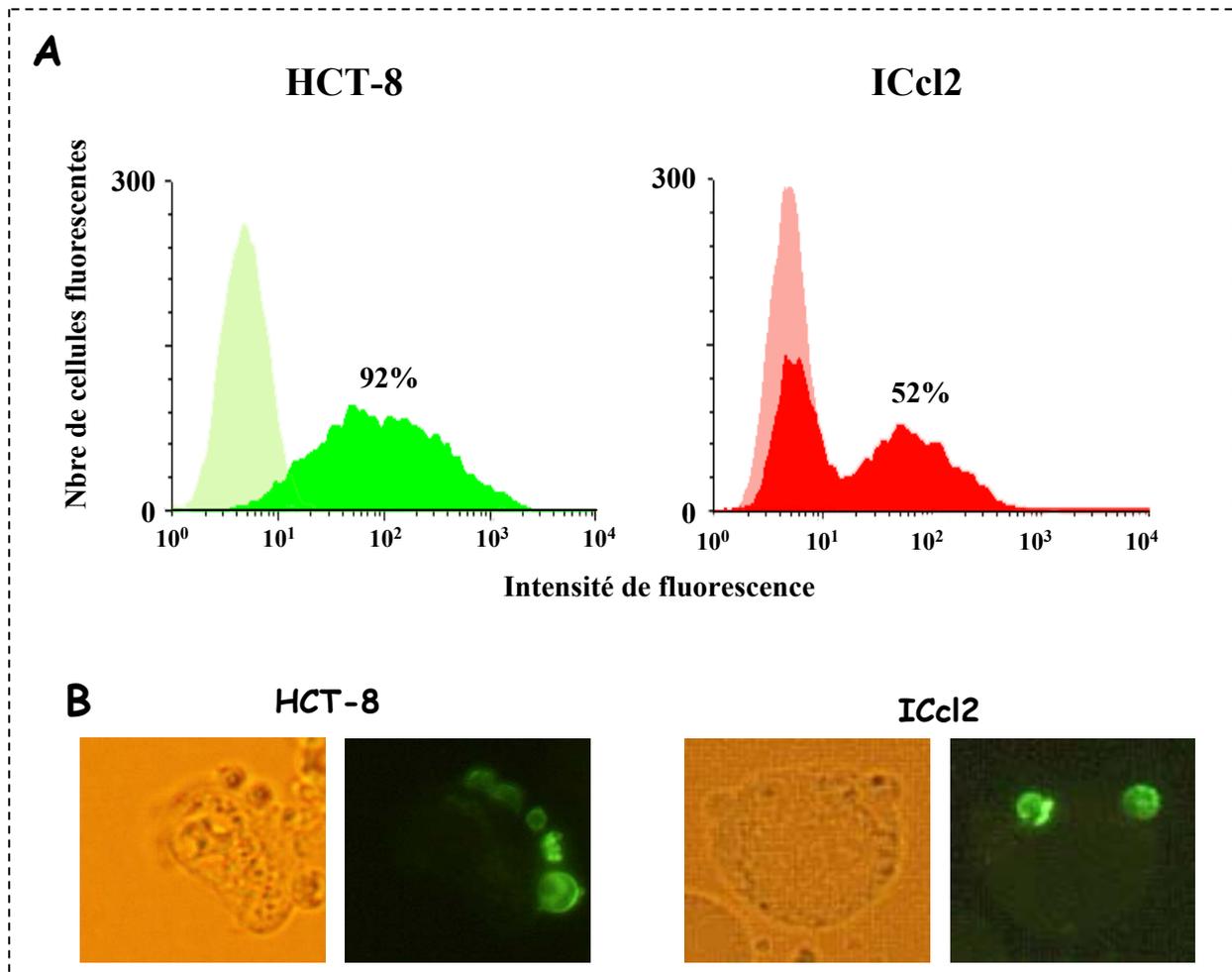


Figure 27 : Permissivité des cellules épithéliales intestinales humaines HCT-8 et murines ICcl2 à l'infection par *C. parvum*. Des puits de P6 contenant des cellules HCT-8 ou ICcl2 confluentes ont été infectés avec des oocystes de *C. parvum* dans une proportion [oocyste : cellule] de [2,5 : 1]. Après 24h d'infection, les cellules adhérentes du puits sont décollées par l'action de la trypsine et les cellules en suspension ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% en PBS pendant 15 minutes à 4°C, puis rincées dans du PBS puis du PBS-saponine 0,1%. Les cellules ont ensuite été marquées avec un surnageant de culture d'hybridome contenant un anticorps monoclonal reconnaissant *C. parvum* dilué au 1/2 dans du PBS-saponine 0,1% (Bonnin *et al.*, 1995) puis incubées avec un conjugué anti-souris couplé au FITC dilué au 1/200 (Sigma) dans du PBS-saponine. Analyse au FACS (A) et au microscope à fluorescence (B).

3. Construction des plasmides pour la RT-PCR quantitative

Pour étudier la réponse immunitaire lors de l'infection par *C. parvum*, nous avons choisi d'utiliser une technique de RT-PCR quantitative. De nombreuses constructions moléculaires permettant la synthèse d'ARNm compétiteurs pour cette technique de RT-PCR quantitative ont donc été réalisées au cours de ce travail notamment pour l'étude des

chimiokines. Toutes les constructions permettant l'étude de la réponse en cytokines de type Th1, Th2 , pro-inflammatoires et iNOS nous ont été fournies par le Dr M. Kagnoff et la séquence des amorces utilisées est indiquée dans la partie "Matériel et méthodes". Nous avons cependant construit de nouveaux plasmides pour obtenir les ARN compétiteurs de l'IFN γ , de l'IL4, de l'IL1 β et du GM-CSF.

NB : Dans nos conditions de PCR, pour quantifier les ARNm de l'IFN γ et de l'IL4, les amorces (qui dépendaient des constructions pMCQ1 et pMCQ2) amplifiaient une bande surnuméraire dont la taille était inférieure à celle de la bande de taille attendue.

a/ Construction d'un plasmide pGEM-T Easy + polyA

Nous avons, dans un premier temps, modifié le plasmide pGEM-T Easy (Promega) en introduisant un dimère de peptides permettant, après transcription *in vitro*, la synthèse d'une extension polyadénylée en extrémité 3' de l'ARN produit comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes". Le plasmide modifié pGEM-T Easy polyA schématisé dans la figure 28 a ensuite été utilisé pour le clonage des différents produits PCR codant pour des parties de gènes.

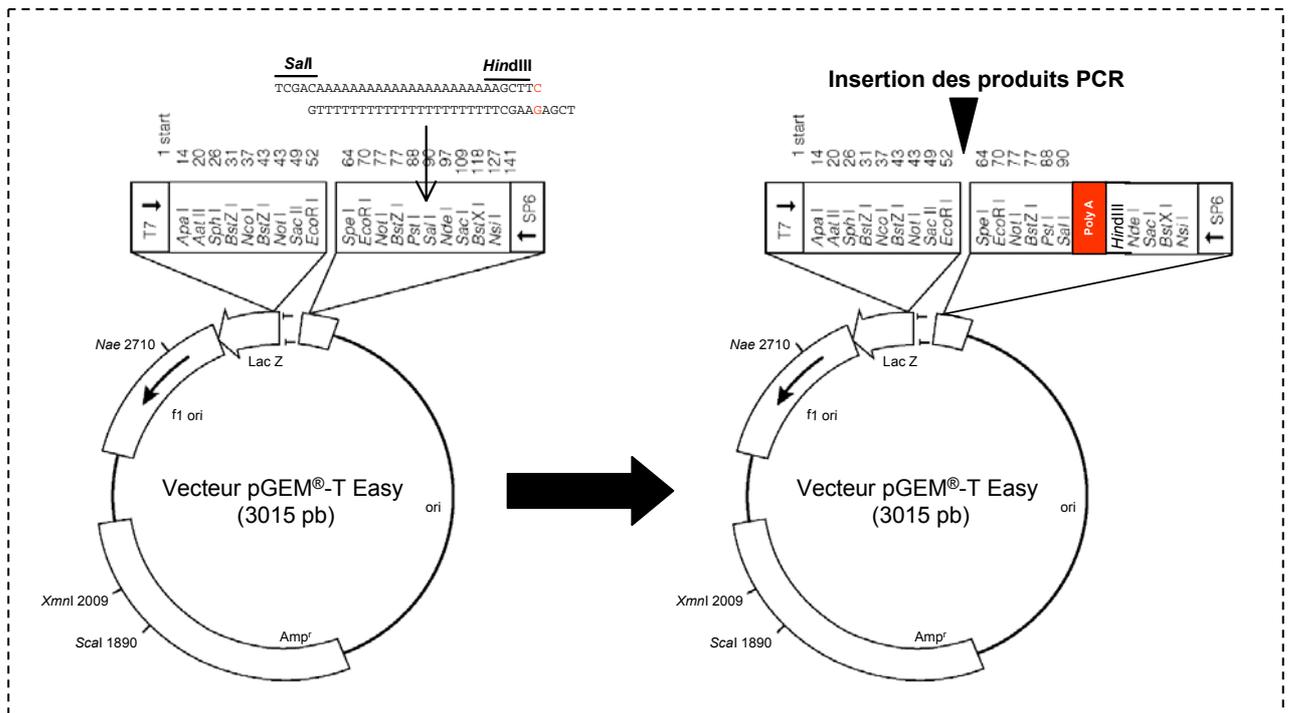


Figure 28 : Schéma représentant le vecteur pGEM-T Easy modifié pour exprimer une extrémité poly A après transcription *in vitro*.

b/ Choix et séquences des amorces pour la réaction de RT-PCR quantitative

Le principe de la méthode de RT-PCR quantitative est décrit dans la partie “Matériel et méthodes”. Cette méthode nécessite la co-amplification d’une partie de l’ADN complémentaire de la cytokine cible et de son homologue délété de plusieurs dizaines de paires de bases. Pour obtenir l’amplification spécifique de ces ADNc, nous avons choisi et utilisé des couples d’amorces appropriées. A partir des banques de données (Genbank), la séquence complète de nombreux ADNc de gènes murins est disponible. Pour l’amplification des ADNc cibles, les amorces ont été choisies de façon à encadrer un fragment compris entre 300 et 500 pb ne contenant pas les sites de restriction *HindIII* ou *SacI*. De plus, si les séquences d’ADN génomique complètes étaient disponibles, nous avons choisi un couple d’amorces encadrant un ou plusieurs introns afin de pouvoir éviter ou détecter d’éventuelles contaminations par de l’ADN génomique. La séquence des amorces utilisées pour l’amplification des ADNc cibles et la taille des produits de PCR attendue sont indiquées dans les tableaux 3 et 4.

	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille cible (pb)	Taille standard (pb)	T° h ¹
C Chimiokine					
Ltn	5' -ATGAGACTTCTCCTCCTGACTTT-3'	5' -ACCCAGTCAGGGT TACTGCTG-3'	343	256	61
C-C Chimiokines					
MCP-1	5' -TGCAGGTCCTGTGTCATGCTTC-3'	5' -AAGTGCTTGAGGTGGTGTGGA -3'	411	307	61
MIP-1β	5' -GCGTGTCTGCCCTCTCTCTC-3'	5' -GCAAGGACGCTTCTCAGTGAG-3'	349	261	61
Rantes	5' -TCTCTGCAGCTGCCCTCACC-3'	5' -TGGGAGTAGGGGATTACTGAGT-3'	367	276	65
TECK	5' -GCCTGGATGCCGGTTGTCCA-3'	5' -GGTCTTCTGGGCATCATCACC-3'	381	NC	61
C-X-C Chimiokines et CXC-R3 (récepteur de IP-10, Mig et i-TAC)					
IP-10	5' -ATGAACCCAAGTGTGCCGTC-3'	5' -TGGAGAGACAGGCTCTCTGCT-3'	355	264	61
I-TAC	5' -CCATAGCCCTGGCTGCGATC-3'	5' -CCAAGACAGCAGAGGGTCCG-3'	379	283	67
MIG	5' -TGAAGTCCGCTGTCTTTTCTCCT-3'	5' -TTATGTAGTCTTCTTGAACGACG-3'	380	284	61
KC	5' -CACCTCAAGAACATCCAGAGCT-3'	5' -CAAGCAGAAGTGAAGTACCATCG-3'	354	272	61
LIX	5' -CCTCCAGCTCCGAGCTCC-3'	5' -CACTGCGAGTGCATTCCGCTT-3'	369	276	65
MIP-2	5' -CTGCCGGCTCCTCAGTGCTG-3'	5' -CAGGTACGATCCAGGCTTCCC-3'	383	283	61
CXC-R3	5' -CTGCTGGTCTCCAGAGCCA-3'	5' -GTCAGTGCACTCCGAGCAAAA-3'	501	389	61
C-X3-C Chimiokine					
Fractalkine	5' -GCCTGGCAACACAGTCCACC-3'	5' -TCACACTGGCACCAGGACGTA-3'	357	265	65

¹T° h , température d’hybridation lors de la PCR, NC non construit

Tableau 3 : Séquences des amorces et taille des produits d’amplification par PCR pour les gènes des chimiokines.

	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille cible (pb)	Taille standard (pb)	T° h ¹
Cytokines de type Th1					
IFN-γ	5'-GCAGCTCTCCTCATGGCTG-3'	5'-CGACTCCTTTCCGCTTCTGAG-3'	432	280	62
Cytokines de type Th2					
IL-4	5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAACGTC-3'	5'-CTGAAAGACTTCTGGAAAGCC-3'	250	176	63
Cytokines pro-inflammatoires					
GM-CSF	5'-CCCATCACTGTACGCGCCTTGG-3'	5'-GTCCGTTCCGGAGTTGGGGGGC-3'	279	347	68
IL-1β	5'-TAACCTGCTGGTGTGTGACGTT-3'	5'-CATTAGAAACAGTCCAGCCATA-3'	501	385	63

¹T° h, température d'hybridation lors de la PCR

Tableau 4 : Séquences des amorces et taille des produits d'amplification par PCR pour les gènes des cytokines.

Pour générer des standards de taille plus courte, une amorce 5' composite (Sc) permettant une délétion de l'ADNc est utilisée (voir "Matériel et méthodes"). Les séquences de ces amorces composites choisies de façon à obtenir un rapport de taille ADNc cible / ADNc standard d'environ 1,3 sont indiquées dans le tableau 5.

gène	Amorce Sens composite (Sc)
Lymphotactine	5'- ATGAGACTTCTCCTCCTGACTTT CGCGGCTGCCAGTTCAA-3'
MCP-1	5'- TGCAGGTCCCTGTATGCTGCTT CCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3'
MIP-1β	5'- GCGTGTCTGCCCTCTCTCTC CGGCAGCTTCACAGAAGCTT-3'
Rantes	5'- TCTCTGCAGCTGCCCTCACCC CGCGCTGCCTCGTGCCC-3'
IP-10	5'- ATGAACCCAAGTGCTGCCGTC GCCAGTGAGAAATGAGGGCCAT-3'
I-TAC	5'- ATGAACAGGAAGGTCACAGCCA GCCGTCAAAATGGCAGAGATC-3'
MIG	5'- TGAAGTCCGCTGTTCTTTTCC TCCACTACAAAATCCCTCAAAGAC-3'
KC	5'- CACCTCAAGAACATCCAGAGCT CCCTGAAGCTCCCTTGGTTCA-3'
LIX	5'- CCTCCAGCTCCGCAGCTCCG CTGCCCTTCCTCAGTC-3'
MIP-2α	5'- CTGCCGGCTCCTCAGTGA CTTCAAGAACATCCAGAG-3'
CXC-R3	5'- CTGCTGGTCTCCAGAGGCCA TGGCCCGCAACTGTGGTCG-3'
Fractalkine	5'- GCCTGGCAACACAGTCCACC GCCACTGCAGATCCCCAGAA-3'
IFNγ	5'- GCAGCTCTTCTCCTCATGGCT GAGCCAGATTATCTCTTTCTACCT -3'
IL4	5'- ACGGAGATGGATGTGCCAAACG TCAAAACATGGGAAAACCCATGCTT-3'
IL1β	5'- TAACCTGCTGGTGTGTGACG TTTATTCTCCATGAGCTTTGTA-3'

Tableau 5 : Séquence des amorces composites pour la construction des standards ARNm. La région en gras correspond à la région fixant l'amorce Sens pendant la réaction de PCR.

c/ Réaction de transcription *in vitro*

Pour obtenir les ARNm compétiteurs à partir de nos nouvelles constructions, nous avons rencontré certaines difficultés lors de la réaction de transcription *in vitro*. La réaction de transcription *in vitro* nécessite une linéarisation préalable du plasmide. Pour cela, nous avons le choix d'utiliser l'enzyme de restriction *Hind*III ou *Sac*I. L'enzyme *Sac*I coupait une seule fois toutes les constructions alors que *Hind*III pouvait couper deux fois certaines constructions, c'est pourquoi nous avons préféré linéariser toutes nos nouvelles constructions avec *Sac*I. Les réactions de transcription *in vitro* réalisées à partir de ces plasmides n'ont pas permis une synthèse efficace de transcripts. Après de nombreuses vérifications de la qualité de nos produits et de nos réactions préalables à l'action de l'ARN T7 polymérase, il s'est avéré que les extrémités 3' sortantes générées par l'enzyme de restriction *Sac*I étaient responsables de la mauvaise efficacité de la réaction de transcription *in vitro*. C'est pourquoi, lorsque cela était possible, les plasmides ont été linéarisés avec l'enzyme de restriction *Hind*III. Dans le cas contraire, la linéarisation des plasmides par *Sac*I était suivie d'une digestion par l'enzyme Klenow pour rendre les bouts francs. La figure 29 représente une migration en gel d'agarose de différents ARNm standards obtenus.

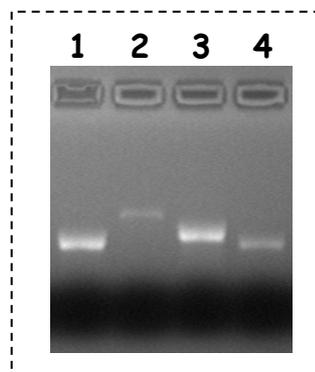


Figure 29: Migration en gel d'agarose 2% dans un tampon TAE de quelques ARNm compétiteurs obtenus après transcription *in vitro*.

- 1- MCP-1 de 429 pb
- 2- β -Actine de 765pb
- 3- CXCR3 de 511 pb
- 4- MIG de 406 pb

d/ Avantages de cette technique de RT-PCR quantitative

L'expression des ARNm est généralement mesurée par les techniques de Northern blot, de nucléase protection (RPA ribonucléase protection assay) et de RT-PCR. Ces techniques sont limitées par leur sensibilité. La technique de RPA est de 10 à 100 fois plus sensible que celle du Northern blot mais nécessite tout de même un minimum de 5×10^5 copies d'ARNm. La technique de RT-PCR est plus sensible que ces techniques puisqu'elle amplifie le signal et permet de détecter des ARN rares. Dans notre étude, le seuil de sensibilité est de 10^3 molécules d'ARNm par μ g d'ARN total.

Différentes approches basées sur la nature des compétiteurs peuvent permettre la quantification des ARNm. Les compétiteurs peuvent être hétérologues c'est-à-dire que leur séquence diffère de la séquence des ARNm cibles, monocompétiteur ou polycompétiteur ou homologues. L'approche que nous avons utilisée pour quantifier les ARNm cibles utilisait des compétiteurs hétérologues (pMCQ1, 2, 3, 4 et pCpNOS) et homologues (nouvelles constructions).

L'exactitude de la quantification du nombre de copies d'ARNm cibles dépend strictement de l'efficacité de la compétition lors de la réaction de RT-PCR. Notre technique de RT-PCR utilisant des compétiteurs de type ARNm et non ADNc permet un rendement d'amplification similaire entre la cible et le standard dès la réaction de RT.

Enfin, l'extrémité polyadénylée en 3' des ARN synthétisés lors de la transcription *in vitro* permet de mélanger les différents transcripts et de réaliser la réaction de RT dans les mêmes conditions pour tous les transcripts. Par conséquent, pour un échantillon donné, l'expression entre les différentes cytokines/chimiokines peut être comparée sans introduire de biais.

Bien qu'une disparité entre l'expression du gène et la sécrétion de la protéine puisse être observée parfois pour certains gènes (Auron et Webb, 1994 ; Kruys *et al.*, 1990), cette technique permet de cribler rapidement et à moindre coût la régulation de différents gènes au cours d'un processus infectieux.

e/ Détermination du niveau d'infection de *C. parvum* par RT-PCR quantitative

La construction plasmidique permettant de quantifier l'expression d'iNOS construite dans le laboratoire du Dr M. Kagnoff (Dr F. Laurent, donnée non publiée) permet également de quantifier l'expression d'un gène de *C. parvum* (voir "Matériel et méthodes"). Ainsi, il est possible de déterminer le niveau d'infection dans un tissu infecté. Nous avons comparé la cinétique d'infection chez des souris infectés par *C. parvum* en utilisant la technique de numération des oocystes dans l'intestin des souris (voir "Matériel et méthodes") et la technique de RT-PCR quantitative. La figure 30 montre que les deux techniques présentent des évolutions similaires du niveau d'infection chez les souris. Toutefois, pour déterminer le niveau d'infection, la technique de RT-PCR quantitative présente un certain nombre d'avantages. Elle permet notamment de déterminer le niveau d'infection à partir du même échantillon d'ARN que celui utilisé pour étudier la réponse immunitaire, ce qui permet de ne pas sacrifier de souris supplémentaires et de pouvoir corrélérer le niveau d'infection aux réponses en cytokines dans le cas de réponse très hétérogène entre les souris. Enfin, contrairement à la technique classique de

numération dans les fèces, cette technique de RT-PCR est beaucoup plus sensible et elle permet de détecter la présence de parasite dans l'intestin de souris adultes.

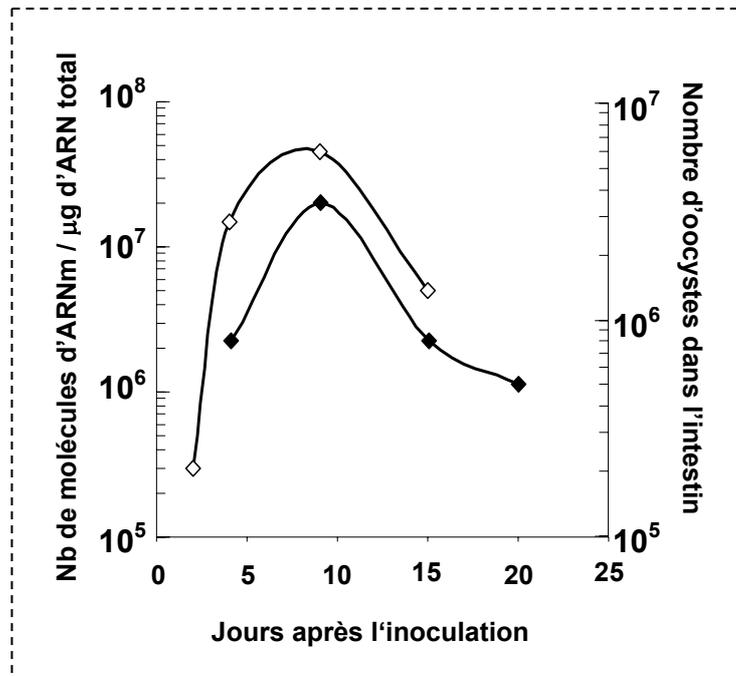


Figure 30 : Mesure du niveau d'infection chez les souriceaux infectés par comptage des oocystes dans l'intestin (◆) et par RT-PCR quantitative (◇). Tous les souriceaux âgés de 3 jours ont reçu 10^6 oocystes par voie orale. Pour la technique de numération des oocystes dans l'intestin, 5 souriceaux ont été utilisés à chaque temps. Pour la technique de RT-PCR quantitative, 5 à 7 souriceaux ont été utilisés à chaque point, et les réactions de RT-PCR ont été réalisées sur les pools d'ARN des différents souriceaux.

II- INITIATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Les animaux nouveau-nés atteints de cryptosporidiose éliminent spontanément le parasite en quelques semaines suggérant un rôle important de la réponse immunitaire dans la défense de l'hôte. Ce parasite qui infecte exclusivement les cellules épithéliales de l'intestin chez les nouveau-nés est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique chez l'hôte infecté. Avant d'étudier la réponse immunitaire locale à l'infection par *C. parvum*, il paraissait intéressant de comprendre comment était initiée cette réponse et qu'elles étaient les cellules impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire.

Comme décrit précédemment dans la partie bibliographique, l'induction de la réponse immunitaire au niveau de l'intestin fait intervenir principalement les cellules M ou les cellules dendritiques. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, puisque le parasite infecte exclusivement les cellules épithéliales, les cellules dendritiques pourraient activer le système immunitaire après avoir capté des antigènes solubles libérés par le parasite. D'autre part, les cellules M étant une porte d'entrée pour de nombreux pathogènes, elles pourraient également permettre la translocation de *C. parvum* de la lumière intestinale vers le compartiment mucosal de l'intestin dans lequel il serait phagocyté par une cellule présentatrice d'antigène.

Jusqu'à ce jour, l'initiation de la réponse immunitaire lors d'une infection par *C. parvum* a très peu été étudiée. Seul un article de Marcial et Madara (1986) montre par microscopie électronique une vésicule présentée comme un sporozoïte de *C. parvum* dans un macrophage sous jacent à une cellule M, suggérant un passage du sporozoïte par la cellule M (Marcial et Madara, 1986). Dans cette étude, aucun marquage immunologique n'a été réalisé pour confirmer la présence d'un organisme de *C. parvum* dans un macrophage. De plus, aucun organisme de *C. parvum* n'a jusqu'ici été mis en évidence dans une cellule M. Dans le but de confirmer l'hypothèse et les résultats de Madara, nous avons réalisé de la microscopie électronique à transmission (MET) et de la microscopie à balayage (MEB) sur des plaques de Peyer de souris adultes GKO infectées pendant 9 jours. Ce travail, effectué parallèlement aux études décrites dans la suite de ce manuscrit, a été réalisé en collaboration avec les services communs de microscopie de l'INRA de Theix et de l'INRA de Tours.

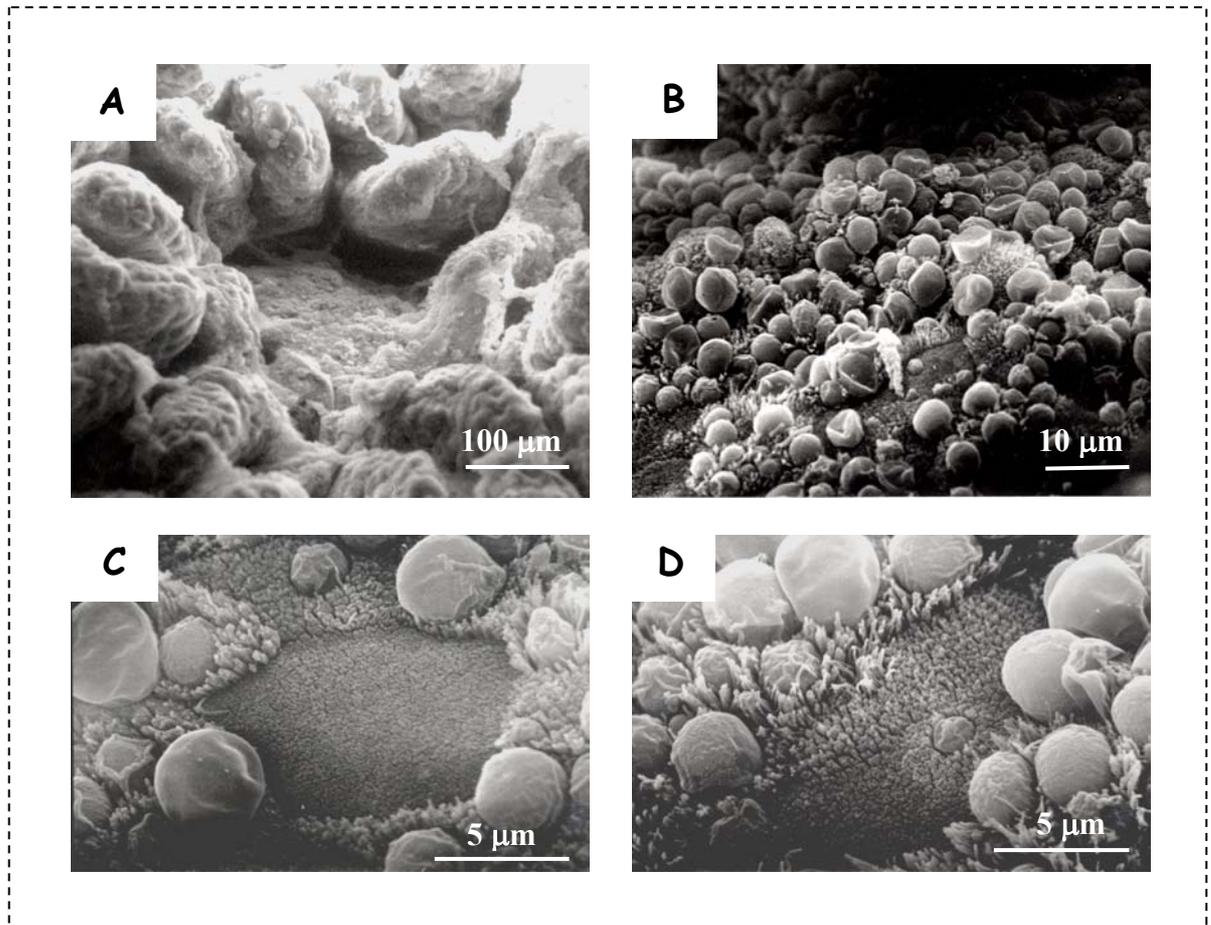


Figure 31 : Photographies de microscopie électronique à balayage (MEB) de plaques de Peyer de souris GKO infectées par *C. parvum* pendant 9 jours.

- A- Plaque de Peyer entourée par des villosités intestinales
- B- Les différents organismes de *C. parvum* tapissent le FAE de la plaque de Peyer
- C- Au niveau du FAE, les cellules M sont facilement détectables par MEB
- D- Un organisme de *C. parvum* a été trouvé sur quelques cellules M

Les résultats de microscopie électronique à balayage ont montré que le FAE des plaques de Peyer était très infecté 9 jours après l'inoculation des souris GKO (Figure 31). Parmi les cellules du FAE, les cellules épithéliales sont les cellules les plus infectées car seulement quelques organismes de *C. parvum* ont pu être retrouvés sur des cellules M. Toutefois, *C. parvum* n'avait jamais été mis en évidence au niveau d'une cellule M auparavant. La petite taille des organismes de *C. parvum* observés sur les cellules M suggère que le parasite ne se développe pas à la surface de ce type de cellule ou/et qu'il est en train de pénétrer dans la cellule M. De la microscopie électronique à transmission a ensuite été réalisée pour tenter de répondre à ces questions. Cependant, nous avons rencontré plus de difficultés à visualiser les cellules M par MET. Pour pallier ces

difficultés, deux possibilités pouvaient être envisagées : la première était d'infecter *ex vivo* pendant 15 minutes des plaques de Peyer avec une grande quantité de sporozoïtes de *C. parvum*. Nous avons d'ores et déjà infecté *ex vivo* les plaques de Peyer de souris mais l'analyse en MET est en cours. La seconde possibilité était d'utiliser le système de culture *in vitro* des cellules M développé par l'équipe du Dr E. Pringault (Kerneis *et al.*, 1997).

Le principe de cette culture de cellules M est basé sur une dé-différenciation des cellules épithéliales polarisées mises en co-culture avec des lymphocytes de plaque de Peyer de souris BALB/c comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes". Pour obtenir des cellules M en culture, nous avons essayé de reproduire cette technique en suivant strictement le protocole provenant du laboratoire du Dr E. Pringault. Après 20 h d'infection, la membrane de Transwell sur laquelle ont poussé les cellules épithéliales qui se sont dé-différenciées en cellules M a été observée en MET. Malgré les nombreux essais réalisés et les nombreux clichés observés, cette méthode ne nous a pas permis de mettre en évidence un organisme de *C. parvum* dans une cellule M. De plus, après 20 h d'infection, aucun méroonte n'était observé sur les cellules épithéliales adjacentes aux cellules M. On peut se demander si le contact de 20 min des cellules épithéliales avec les sporozoïtes était suffisant pour permettre l'attachement puis le développement du parasite. Des études ont montré qu'un contact de 5 minutes est suffisant pour que le sporozoïte adhère à la cellule épithéliale (Hamer *et al.*, 1994 ; Joe *et al.*, 1998). Par contre, de façon étonnante, l'attachement des sporozoïtes est réduit lorsque les cellules épithéliales sont différenciées (Joe *et al.*, 1998), ce résultat pouvant expliquer notre observation. Néanmoins, les photographies de MET montrent que nous sommes parvenus à reproduire la technique mise au point par Kerneis *et al.* en 1997 car quelques cellules ressemblant à des cellules M ont pu être observées (Figure 32).

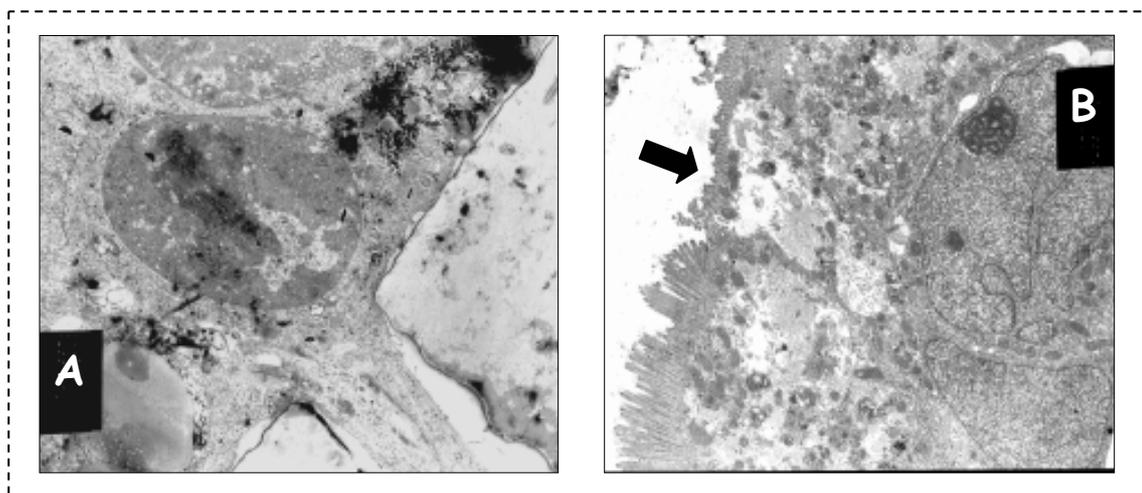


Figure 32 : Culture de cellules M *in vitro*. Photographies de MET montrant un lymphocyte qui traverse un pore de la membrane de Transwell (A, grossissement $\times 6700$) et une cellule M indiquée par la flèche (B, grossissement $\times 5200$).

Il semble très difficile de mettre en évidence un organisme de *C. parvum* dans une cellule M par MET sûrement à cause de la rareté de la pénétration et/ou de la translocation très rapide du parasite. Ceci explique aussi pourquoi peu d'études ont été publiées pour décrire l'initiation de la réponse immunitaire. Nous poursuivrons cette étude en utilisant les deux approches citées complétées par des immuno-marquages à l'or colloïdal.

III- LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES

La réponse inflammatoire faisant intervenir un certain nombre de médiateurs dont les cytokines pro-inflammatoires, est une réponse normale immédiatement déclenchée par toute agression pouvant léser les cellules. L'infection par *C. parvum* est caractérisée par une inflammation modérée de l'intestin. Chez les souris adultes GKO infectées par *C. parvum*, l'inflammation de l'intestin est beaucoup plus sévère que celle observée chez les souriceaux infectés (Figure 33). Dans ces deux modèles murins, nous avons, dans un premier temps, étudié l'expression des cytokines pro-inflammatoires consécutive à l'infection par *C. parvum* puis cherché à mettre en évidence des éléments de cette réponse inflammatoire qui pourraient participer à la protection contre la cryptosporidiose.

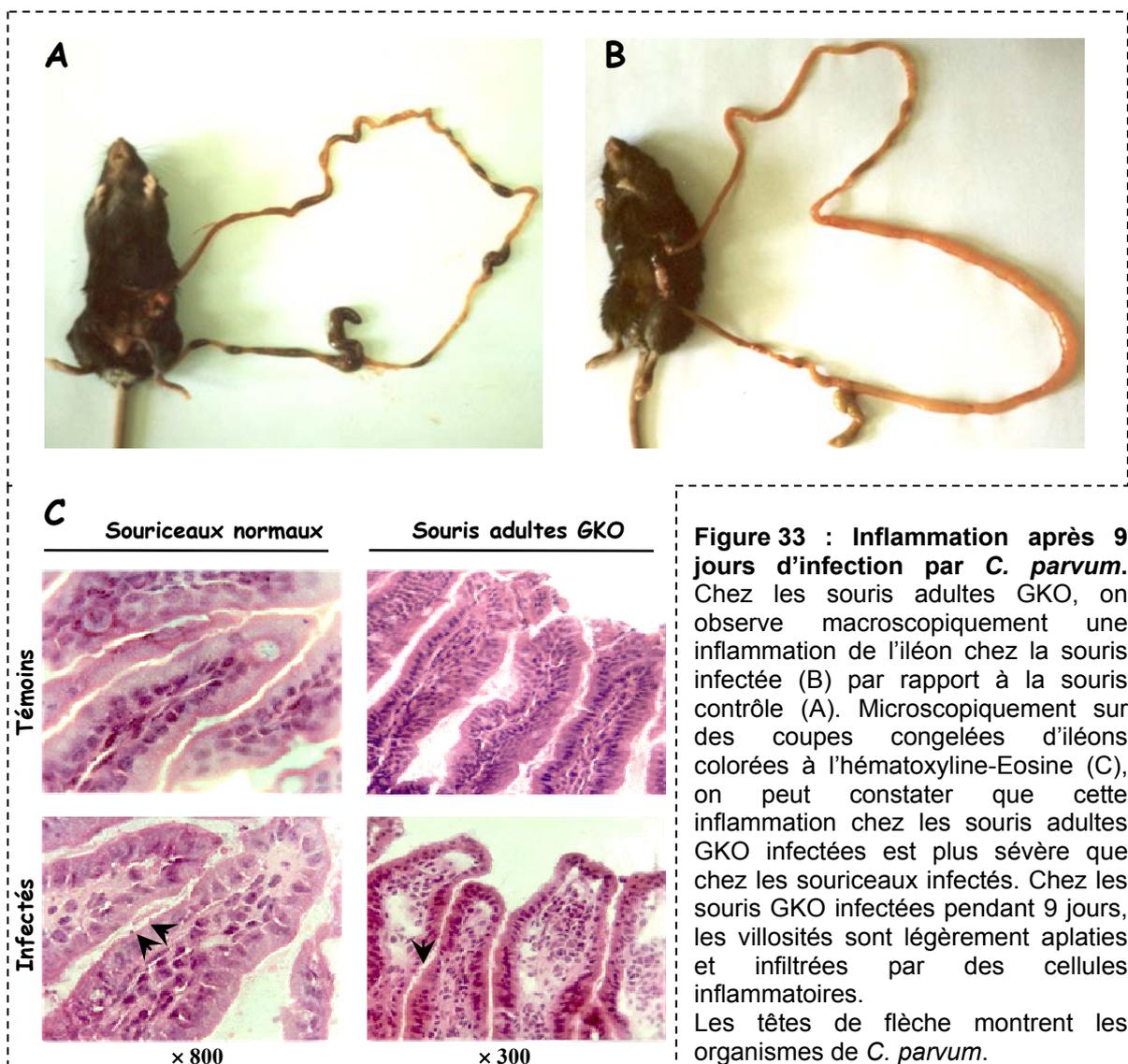


Figure 33 : Inflammation après 9 jours d'infection par *C. parvum*. Chez les souris adultes GKO, on observe macroscopiquement une inflammation de l'iléon chez la souris infectée (B) par rapport à la souris contrôlée (A). Microscopiquement sur des coupes congelées d'iléons colorées à l'hématoxyline-Eosine (C), on peut constater que cette inflammation chez les souris adultes GKO infectées est plus sévère que chez les souriceaux infectés. Chez les souris GKO infectées pendant 9 jours, les villosités sont légèrement aplaties et infiltrées par des cellules inflammatoires. Les têtes de flèche montrent les organismes de *C. parvum*.

1. Les cytokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules épithéliales infectées par *C. parvum* *in vitro*

Les cellules épithéliales sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (Jung *et al.*, 1995). *C. parvum* infectant uniquement les cellules épithéliales intestinales *in vivo*, nous avons voulu étudier l'expression des cytokines IL1, IL6, TNF α et GM-CSF par ces cellules suite à une infection par le parasite. Pour cela, nous avons réalisé une infection expérimentale *in vitro* des cellules épithéliales intestinales de la lignée ICcl2 et mesuré par RT-PCR l'expression des différents gènes cités ci-dessus.

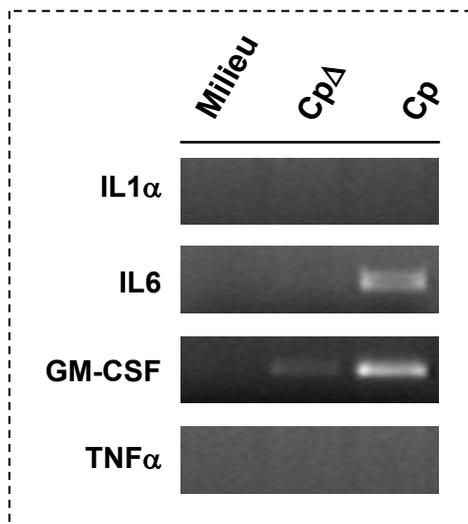


Figure 34 : Expression des cytokines pro-inflammatoires par les cellules ICcl2 infectées par *C. parvum* par RT-PCR qualitative. Les cellules sont infectées avec des oocystes de *C. parvum* (Cp) dans une proportion 5 oocystes pour 1 cellule pendant 24 h. Les puits témoins reçoivent soit du milieu de culture, soit des oocystes inactivés par la chaleur (Cp Δ). L'ARN total des cellules est ensuite extrait avec du Trizol. Toutes les amplifications par PCR sont réalisées avec 35 cycles. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences différentes.

Par RT-PCR qualitative, nous avons montré que l'infection par *C. parvum* des cellules ICcl2 induisait une surexpression des messagers de l'IL6 et du GM-CSF 24 h après l'infection (Figure 34). Les cellules ICcl2 ne semblent pas exprimer d'ARNm pour l'IL1 α et le TNF α ni avant ni après infection. Bien que la production d'IL1 et de TNF α par les cellules épithéliales ait déjà été rapportée dans la littérature (Denney *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 1998), on peut supposer que cette lignée n'a pas la capacité d'exprimer ces cytokines ou alors que les cellules épithéliales ne répondent pas à l'infection par *C. parvum* par la surexpression de ces deux cytokines pro-inflammatoires.

2. Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souris infectées par *C. parvum*

La cinétique d'infection chez les souriceaux et les souris GKO nous a conduits à choisir les points 4 et 9 jours après l'inoculation pour étudier la réponse en cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon :

- à 4 jours, les premiers oocystes sont détectés dans les 2 modèles
- à 9 jours, le maximum d'infection est atteint dans les 2 modèles étudiés.

Dans un premier temps, l'expression des cytokines pro-inflammatoires a été analysée par RT-PCR qualitative afin de contrôler l'homogénéité des réponses entre les différentes souris. Les réactions de RT-PCR quantitatives ont ensuite été réalisées sur un pool d'ARN provenant des différentes souris.

a/ Chez les souriceaux C57BL/6J normaux

Chez les souriceaux infectés par *C. parvum*, les ARNm du TNF α , de l'IL1 β et de l'IL6 sont surexprimés dès le 4^{ème} jour après l'inoculation ($\times 5$; $\times 3,5$; $\times 3,8$ respectivement) au niveau de l'iléon (Figure 35, Tableau 6). Neuf jours après l'inoculation, le niveau d'expression du TNF α est encore plus augmenté ($\times 14$) comparé à la surexpression des gènes de l'IL1 β ($\times 5,5$) et de l'IL6 ($\times 5$). Par RT-PCR qualitative, une légère surexpression du gène du GM-CSF est observée chez les souriceaux infectés pendant 4 et 9 jours, mais ce niveau d'expression est trop faible pour être mesuré par RT-PCR quantitative.

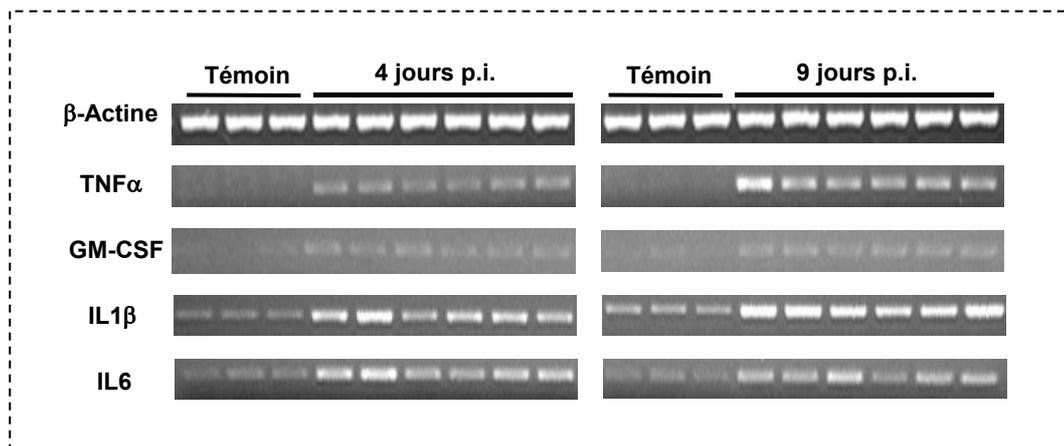


Figure 35 : Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souriceaux normaux infectés ou non par *C. parvum* par RT-PCR qualitative. Sur cette figure est représentée la variation individuelle des souriceaux pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Pour chaque réaction de PCR, 33 cycles d'amplification ont été réalisés sauf pour la β -actine (28 cycles) et le TNF α (35 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Cytokines	4 jours après l'inoculation			9 jours après l'inoculation		
	Transcripts / μg		Ratio	Transcripts / μg		Ratio
	Témoin	Infecté	Infecté/ Témoin	Témoin	Infecté	Infecté/ Témoin
β -Actine	2.7×10^8	2.5×10^8	0.9	2.6×10^8	3.0×10^8	1.1
TNF α	4.0×10^4	2.0×10^5	5.0	7.0×10^4	1.0×10^6	14.0
IL1 β	5.6×10^3	2.0×10^4	3.5	9.0×10^3	5.0×10^4	5.5
IL6	6.5×10^3	2.5×10^4	3.8	5.0×10^3	2.5×10^4	5.0
GM-CSF	$< 10^3$	$< 10^3$	NC	$< 10^3$	$< 10^3$	NC

Les valeurs représentent le nombre de molécules d'ARNm de cytokines / μg d'ARN total. 10^3 molécules d'ARNm correspond à la plus petite valeur mesurable dans notre technique NC, la valeur n'a pas pu être calculée

Tableau 6: Quantification par RT-PCR quantitative des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souriceaux témoins et infectés par *C. parvum*. Pour chaque lot de souris, la quantification par RT-PCR a été réalisée sur un pool d'ARN des différentes souris. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

b/ Chez les souris GKO

Chez les souris adultes GKO, 4 jours d'infection entraînent une surexpression locale d'IL6 ($\times 7,5$) et dans une moindre mesure d'IL1 β ($\times 2$) et de GM-CSF (Figure 36, Tableau 7). Neuf jours après l'inoculation, l'expression des gènes de l'IL1 et de l'IL6 est augmentée de 15 fois (pour les 2 gènes), le gène du GM-CSF étant également surexprimé. Ces augmentations d'expression supérieures à celles mesurées chez les souriceaux infectés peuvent être corrélées à la plus forte infection observée dans l'iléon des souris GKO à 9 jours p.i.. A la différence de l'IL1, de l'IL6 et du GM-CSF, l'expression locale du gène du TNF α ne semble plus être augmentée par l'infection par *C. parvum* en absence d'IFN γ .

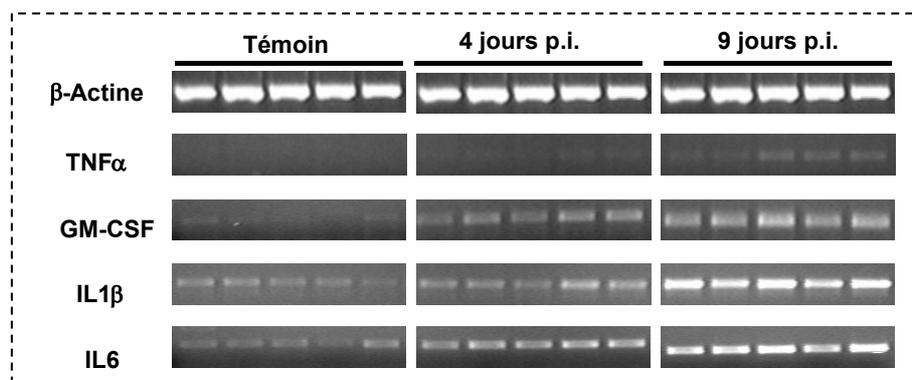


Figure 36 : Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souris adultes GKO infectées ou non par *C. parvum* par RT-PCR qualitative. Idem que pour la figure 35. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Cytokines	4 jours après l'inoculation			9 jours après l'inoculation		
	Témoin	Infecté	Ratio Infecté/Témoin	Témoin	Infecté	Ratio Infecté/Témoin
β -Actine	5.0×10^8	6.0×10^8	1.2	5.0×10^8	5.0×10^8	1.0
TNF α	$<10^3$	$<10^3$	NC	$<10^3$	$<10^3$	NC
IL1 β	2.0×10^4	4.0×10^4	2.0	2.0×10^4	3.0×10^5	15.0
IL6	4.0×10^3	3.0×10^4	7.5	4.0×10^3	6.0×10^4	15.0
GM-CSF	$<10^3$	1.1×10^3	NC	$<10^3$	1.6×10^4	NC

Les valeurs représentent le nombre de molécules d'ARNm de cytokines / μ g d'ARN total.
 10^3 molécules d'ARNm correspond à la plus petite valeur mesurable dans notre technique
 NC, la valeur n'a pas pu être calculée

Tableau 7 : Quantification par RT-PCR quantitative des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souris adultes GKO témoins et infectées par *C. parvum*. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Suite à notre observation que les souris GKO n'exprimaient pas de TNF α en réponse à l'infection, nous avons voulu vérifier que les souris GKO étaient toujours capables d'exprimer du TNF α . Pour cela, nous avons injecté 100 μ g de LPS 0111 d'*Escherichia coli* (Sigma) par voie intraveineuse à des souris GKO et récupéré la rate 1h après pour extraire l'ARN. Les résultats de RT-PCR qualitative montrent que les souris normales et les souris GKO surexpriment de la même façon le message du TNF α suite à l'injection de LPS (Figure 37). Ce résultat suggère que suite à l'infection par *C. parvum*, la surexpression du TNF α observée dans l'iléon des souriceaux soit dépendante de l'IFN γ .

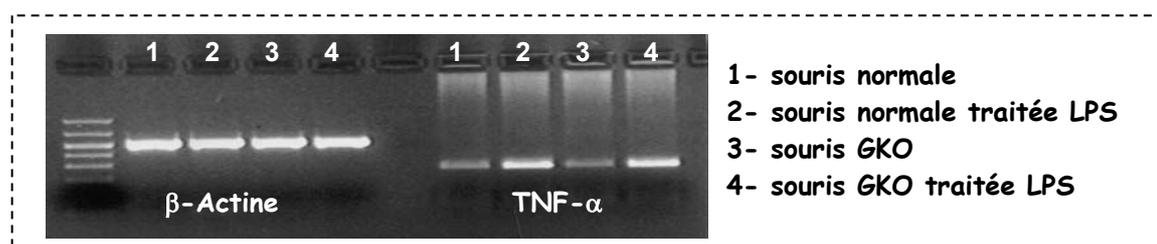


Figure 37 : RT-PCR qualitative montrant l'expression du TNF α dans la rate des souris déficientes en IFN γ . Les réactions de PCR ont été réalisées avec 28 cycles pour la β -actine et 35 cycles pour le TNF α .

Afin de s'assurer que l'âge des souris n'avait pas d'influence sur la réponse en cytokines pro-inflammatoires mesurée dans l'iléon des souris infectées et notamment sur la différence d'expression du TNF α observée entre les souriceaux et les souris GKO, nous avons mesuré la réponse en cytokines pro-inflammatoires chez les souriceaux GKO

préalablement transférés à des mères normales. Dès le 4^{ème} jour après l'inoculation, le niveau d'expression des ARNm de l'IL1 et de l'IL6 est augmenté respectivement de 11 et 21 fois chez les souriceaux GKO infectés par rapport aux souriceaux GKO témoins (Figure 38). Ces augmentations sont supérieures à celles observées chez les souriceaux normaux malgré un niveau d'infection équivalent lors des premiers jours après l'inoculation. Par contre, comme chez l'adulte GKO, le TNF α n'est pas surexprimé suite à l'infection. Nous avons précédemment rapporté que les souriceaux GKO transférés à des mères normales commençaient à mourir dès le 7^{ème} jour après l'inoculation. Neuf jours après l'inoculation les quelques souriceaux encore vivants étaient donc moribonds et les coupes histologiques d'iléons ont montré une importante destruction des villosités intestinales avec une rupture de la barrière épithéliale et la présence de foyers bactériens dans la lamina propria pouvant peut-être expliquer la très forte surexpression de toutes les cytokines pro-inflammatoires étudiées à cette date (Figure 39).

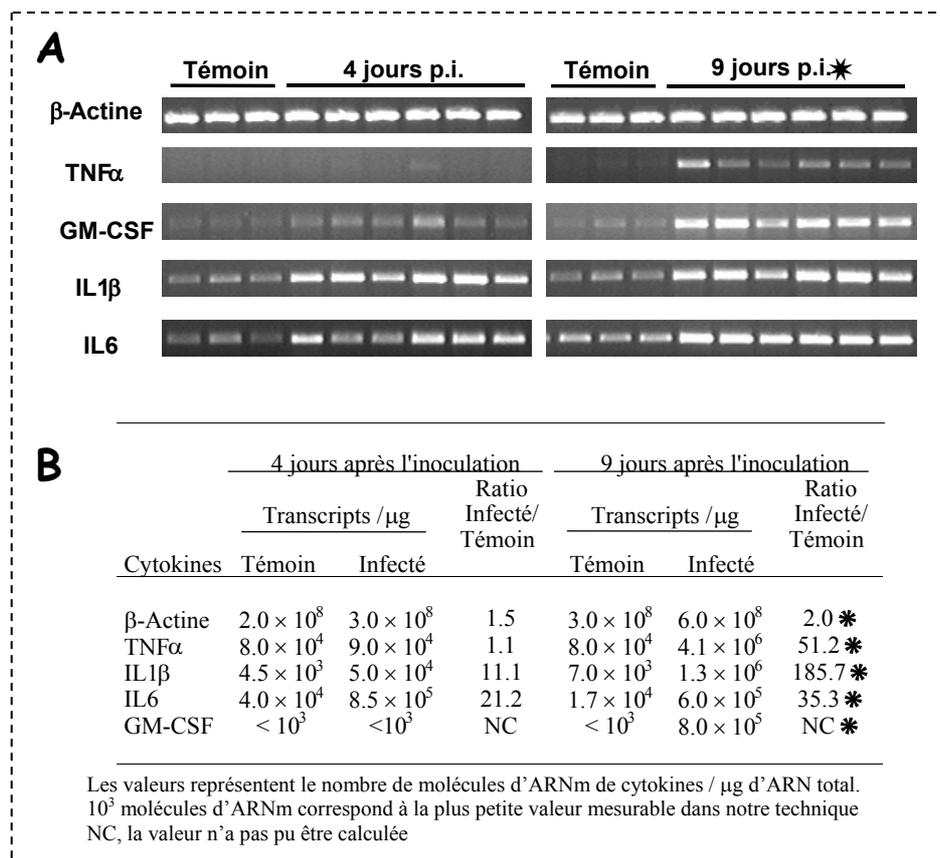


Figure 38 : Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon des souriceaux GKO infectés ou non par *C. parvum* par RT-PCR qualitative (A) et RT-PCR quantitative (B). Les légendes sont identiques à celles des figures précédentes. Le signe * indique que les valeurs ont été mesurées sur des souriceaux moribonds. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

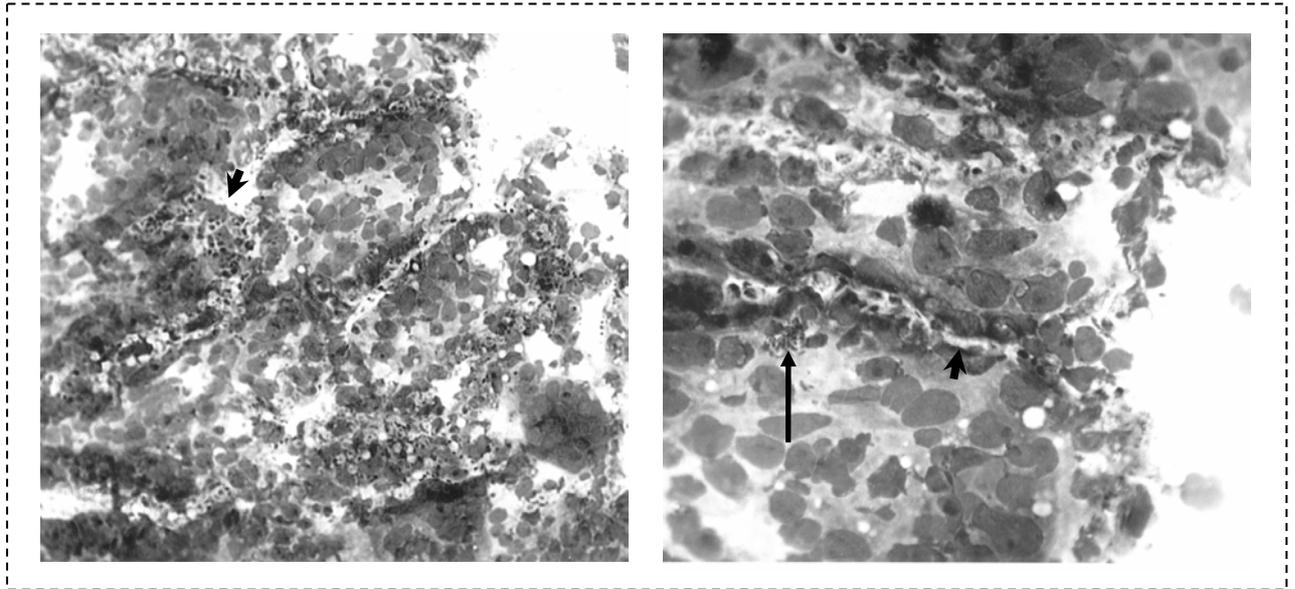


Figure 39 : Coloration à l'hématoxyline-éosine d'une coupe congelée d'iléons de souriceaux GKO infectés pendant 9 jours (= moribonds). Les têtes de flèches montrent les organismes de *C. parvum* et les flèches montrent les foyers bactériens dans la lamina propria.

Pour la suite de notre travail, nous avons donc utilisé le modèle de souriceaux GKO uniquement pour comparer les réponses immunitaires en début d'infection puisqu'à 9 jours p.i. les souriceaux étaient tous moribonds. Même si les résultats bactériologiques n'ont montré aucune septicémie, la présence des foyers bactériens dans la lamina propria des villosités intestinales suggère que le LPS bactérien puisse être responsable de la forte réponse en cytokines pro-inflammatoires observée chez les souriceaux GKO après 9 jours d'infection.

c/ Conclusion / Discussion

Chez les souriceaux infectés pendant 9 jours, les cytokines pro-inflammatoires telles que le GM-CSF, l'IL1, l'IL6 et le TNF α sont surexprimées au niveau de l'iléon. Parmi ces cytokines, le TNF α est la plus surexprimée. Nos études réalisées *in vitro*, laissent supposer que ces cytokines peuvent être produites par les cellules épithéliales infectées. Dans les souris SCID greffées d'un morceau d'intestin humain, l'infection par *C. parvum* induit l'augmentation de l'expression et de la production de TNF α , d'IL1 et d'IL6 humaine. La particularité de ce modèle de xenogreffe est que seul l'épithélium est d'origine humaine ce qui suggère que les cellules épithéliales participent à la production des cytokines pro-inflammatoires après une infection *in vivo* (Seydel *et al.*, 1998). Dans le modèle expérimental de cryptosporidiose du porcelet nouveau-né, les auteurs suggèrent

que les macrophages soient les cellules sources du TNF α produit après infection (Kandil *et al.*, 1994). Au contraire, dans des biopsies de jéjunum de patients volontaires infectés par *C. parvum*, les cellules productrices de TNF α sont sous-jacentes à l'épithélium et au niveau des cryptes (Robinson *et al.*, 2001). Par immunofluorescence, nous ne sommes pas parvenus à identifier les cellules produisant le TNF α et d'après les données de la littérature, plusieurs cellules peuvent être source de TNF α pendant l'infection à *C. parvum* : les cellules épithéliales, les macrophages ou/et les lymphocytes intra-épithéliaux.

Chez les souris adultes GKO infectées pendant 9 jours, l'infection est plus sévère et l'inflammation plus importante. La réponse en cytokines pro-inflammatoires corrobore cette observation puisque les niveaux d'expression de l'IL1, de l'IL6 et du GM-CSF sont très augmentés. Au contraire, en absence d'IFN γ , l'expression du TNF α ne semble plus être augmentée après l'infection. Ces résultats peuvent suggérer que le TNF α n'est pas responsable de l'inflammation observée dans l'intestin infecté par *C. parvum*. Chez des patients volontaires infectés avec *C. parvum*, une étude récente rapporte qu'il n'y a pas de corrélation entre la production de TNF α mesurée et les symptômes associés à la cryptosporidiose (Robinson *et al.*, 2001), ce qui conforte notre hypothèse.

3. Rôle du TNF α dans l'infection par *C. parvum*

L'absence de surexpression du TNF α chez les souris GKO infectées par rapport aux souriceaux infectés suggère un rôle de cette cytokine dans la protection contre *C. parvum*. En effet, l'infection et l'inflammation sont plus sévères en absence d'IFN γ et le niveau de surexpression des cytokines pro-inflammatoires est plus élevé, chez ces souris qui restent chroniquement infectées, sauf pour le TNF α . Au contraire dans le modèle souriceau qui résout naturellement l'infection, l'expression de TNF α est plus élevée que l'expression des autres cytokines pro-inflammatoires.

a/ Les différentes approches

Pour étudier le rôle du TNF α dans la protection contre *C. parvum*, nous avons choisi d'injecter cette cytokine aux souris GKO et de suivre le niveau d'infection. Il est bien connu que l'injection d'une forte quantité de TNF α peut induire un choc toxique chez les souris, c'est pourquoi nous avons choisi de réaliser des injections répétées d'une faible dose (6,5 μ g / kg).

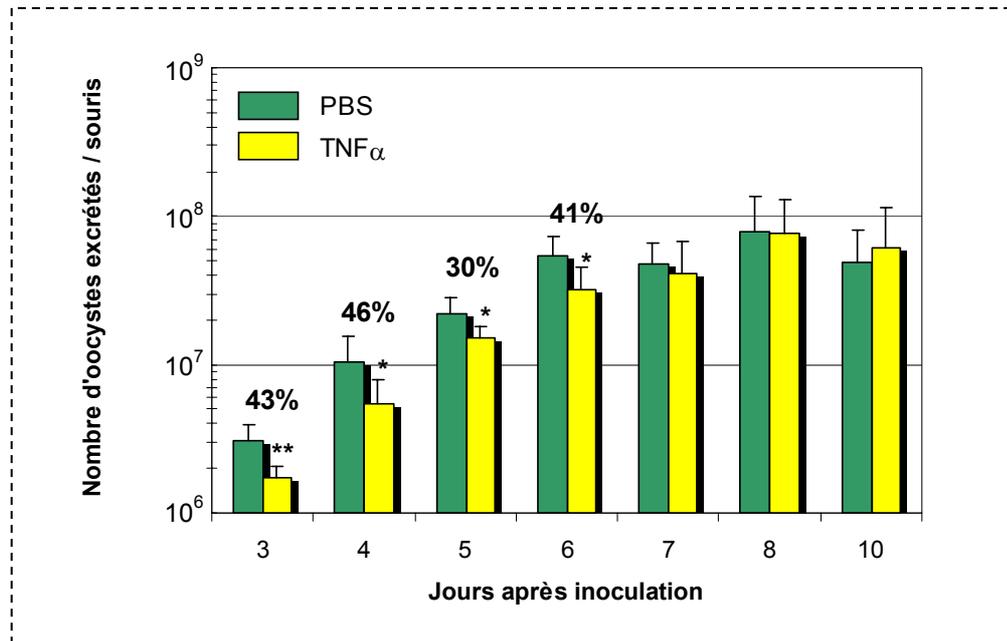


Figure 40 : Le TNF α réduit l'excrétion des oocystes chez les souris déficientes en IFN γ . Des souris GKO âgées de 10 semaines ont été inoculées avec 10⁵ oocystes de *C. parvum*. Ces souris ont reçu des injections répétées de TNF α murin recombinant (6,5 μ g /kg) par voie intra-péritonéale aux jours 0, 1, 2 et 4 p.i. Ce graphique représente les résultats de 2 expériences individuellement significatives réalisées avec 4 souris par lot. Les pourcentages indiquent la réduction d'excrétion parasitaire après traitement par le TNF α . Calculées d'après le test statistique de Mann-Whitney, les différences significatives sont indiquées ** p<0,01 et * p<0,05.

Les injections répétées de TNF α aux souris GKO ont réduit significativement l'excrétion des oocystes de *C. parvum* (Figure 40). Cet effet était visible tant que le TNF α recombinant était injecté ainsi que les 2 jours suivant la dernière injection. Ces résultats suggèrent qu'en absence d'IFN γ , le TNF α puisse être capable de réduire l'infection des souris.

Afin de mettre en évidence des cytokines et des chimiokines pouvant intervenir dans la réduction du niveau d'infection médiée par le TNF α , nous avons analysé l'expression d'un panel de cytokines et de chimiokines au niveau de l'iléon des souris GKO infectées pendant 9 jours ayant reçu du TNF α . Les différentes RT-PCR réalisées ont montré que parmi les gènes étudiés, l'expression locale des gènes de l'IL6, de MCP1, d'i-TAC et d'IP-10 était augmentée par l'action du TNF α (Figure 41). On peut par conséquent supposer que ces interleukines soient des médiateurs de la réponse protectrice partielle du TNF α vis-à-vis de la cryptosporidiose.

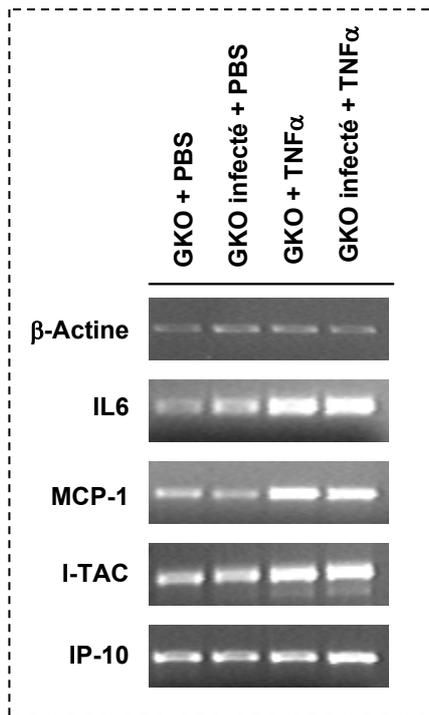


Figure 41 : Surexpression de certains gènes chez les souris déficientes en IFN γ traitées avec du TNF α . Après 9 jours d'infection par *C. parvum* soit 3 jours après la dernière injection de TNF α , les souris sont sacrifiées et les iléons prélevés pour extraire l'ARN et réaliser des réactions de RT-PCR. Chacun des lots était composé de 5 souris et l'ARN des souris de chaque lot a été poolé. Les réactions de PCR ont été réalisées avec 21 cycles d'amplification pour la β -actine et 35 cycles pour les gènes de l'IL6, MCP-1, i-TAC et IP-10.

L'utilisation de souris knock-out pour une cytokine est une approche courante pour étudier l'implication de cette cytokine dans la résistance à l'infection ou la protection contre un agent pathogène. Nous avons eu, dans un premier temps, la possibilité de travailler sur des souris double knock-out pour les gènes du TNF α et de la lymphotoxine- α (TNF α /Lta $^{-/-}$). Ces souris âgées d'environ 5 semaines ont été infectées avec 10^7 oocystes de *C. parvum*. Nous avons vérifié quotidiennement l'excrétion des oocystes dans les fèces mais jamais aucun oocyste n'a pu être détecté (d'après notre technique de comptage en solution de Sheather sur cellules de Thoma). En revanche, nous avons pu observer par RT-PCR qualitative une différence d'infection au niveau de l'iléon entre les souris normales et les souris TNF α /Lta $^{-/-}$ 2 et 4 semaines après l'inoculation (Figure 42). Ainsi, les souris dépourvues de TNF α et de Lta apparaissent plus sensibles à l'infection par *C. parvum* que les souris adultes normales sans toutefois excréter des oocystes.

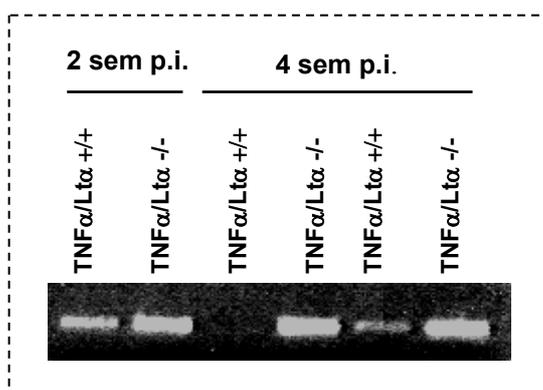


Figure 42 : Détection par RT-PCR d'organismes de *C. parvum* dans l'iléon des souris adultes normales ou TNF α /Lta $^{-/-}$ après 2 ou 4 semaines p.i.. Des souris adultes normales ou TNF α /Lta $^{-/-}$ âgées de 12 semaines environ ont été inoculées avec 10^7 oocystes de *C. parvum*. Deux et 4 semaines après l'inoculation, l'iléon des souris inoculées est prélevé pour extraire l'ARN. La PCR montrant le niveau d'infection par *C. parvum* a été réalisée avec 38 cycles d'amplification.

Par la suite, nous avons voulu vérifier si la déficience en $TNF\alpha$ et en $Lt\alpha$ était également responsable d'une sensibilité plus importante chez les souriceaux infectés. Des souriceaux $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ âgés de 3 jours ont été infectés avec 10^6 oocystes de *C. parvum* et le niveau d'infection entre les souriceaux double knock-out et les souriceaux normaux a été évalué 17 jours p.i.. A cette date, l'infection chez les souriceaux normaux est en train de diminuer et on peut supposer que si les souriceaux $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ sont plus sensibles à l'infection et s'ils ne meurent pas avant, ils seront plus infectés que les souriceaux normaux. Les résultats de deux expériences différentes montrent que 17 jours après l'inoculation, les souriceaux $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ possèdent plus d'oocystes dans l'intestin que les souriceaux normaux (Figure 43). Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par RT-PCR quantitative qui montrent que le gène de *C. parvum* est environ 5 fois plus exprimé dans l'iléon des souriceaux $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ par rapport aux souriceaux normaux (Tableau 8).

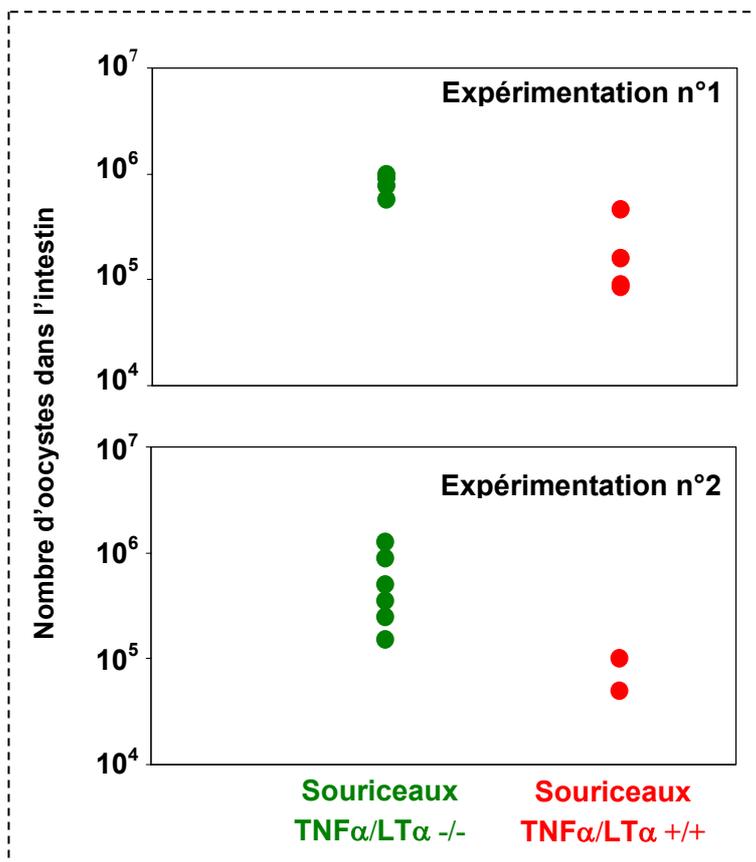


Figure 43 : Nombre d'oocystes dans l'intestin des souriceaux $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ et $TNF\alpha/Lt\alpha$ $+/+$ 17 jours après l'inoculation.

Les souriceaux âgés de 3 jours sont inoculés par voie orale avec 10^6 oocystes de *C. parvum*.

Le lot $TNF\alpha/Lt\alpha$ $-/-$ est composé de 7 souriceaux pour chacun des 2 essais et le lot $TNF\alpha/Lt\alpha$ $+/+$ de 5 et 6 souriceaux dans l'expérience n°1 et 2 respectivement.

Dix sept jours après l'inoculation, les souriceaux sont sacrifiés et l'intestin est prélevé. Après broyage de l'intestin, les oocystes sont comptés dans la solution de Sheather sur une cellule de Thoma (voir Matériel et Méthodes).

	Nombre de copies du messenger par μg d'ARN total corrigé par rapport à 10^7 copies d'Actine		Ratio
	Souriceaux TNF α /Lt α +/+	Souriceaux TNF α /Lt α -/-	
Expérimentation n°1	1.2×10^6	5.2×10^6	4,3
Expérimentation n°2	1.7×10^6	1.1×10^7	6,5

Tableau 8 : Evaluation du niveau d'infection chez les souriceaux TNF α /Lt α +/+ et TNF α /Lt α -/- par RT-PCR quantitative. Pour chacune des expérimentations, les réactions de RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur un pool d'ARN pour chaque lot de souris. Effectif en souris pour l'expérimentation n°1, souriceaux TNF α /Lt α +/+, n=5 et souriceaux TNF α /Lt α -/-, n=7. Effectif en souris pour l'expérimentation n°2, souriceaux TNF α /Lt α +/+, n=6 et souriceaux TNF α /Lt α -/-, n=7.

Ces résultats obtenus avec les souris adultes ou nouveau-nées TNF α /Lt α -/- sont également en faveur d'un rôle du TNF α dans la protection contre la cryptosporidiose. Toutefois, l'absence de ganglions lymphatiques et de plaque de Peyer chez les souris double knock-out TNF α /Lt α -/- peut être un élément important qui pourrait aussi expliquer la sensibilité à l'infection des souris TNF α /Lt α -/- (Ettinger *et al.*, 1998 ; Fu et Chaplin, 1999). Dans ce modèle murin, c'est la Lt α qui est responsable du défaut congénital de plaques de Peyer et de ganglions lymphatiques mésentériques (De Togni *et al.*, 1994). Par conséquent, si cette cytokine est responsable de la sensibilité à l'infection chez les TNF α /Lt α -/-, c'est probablement de manière indirecte puisqu'elle n'est pas surexprimée dans l'iléon des souriceaux normaux infectés (Figure 44).

Par conséquent, pour s'affranchir de ce doute, nous avons récemment acheté des souris knock-out C57BL/6 pour le TNF α et des études sont en cours pour confirmer le rôle de cette cytokine dans la protection contre la cryptosporidiose et mieux comprendre par quel mécanisme elle peut participer à la protection contre *C. parvum*.

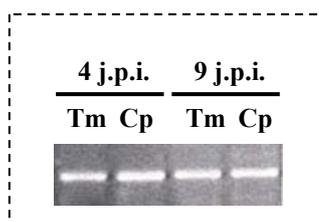


Figure 44 : RT-PCR qualitative montrant l'expression de la lymphotoxine alpha dans l'iléon des souriceaux. Les lots de souriceaux témoins comprenaient 3 souriceaux et les lots de souriceaux infectés comprenaient 6 souriceaux. La réaction de RT-PCR a été réalisée sur un pool d'ARN pour chacun des lots. 35 cycles d'amplification ont été réalisés.

b/ Conclusion / Discussion

Tous les résultats rapportés ci-dessus sont en faveur d'une participation du TNF α dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose chez les souris C57BL/6. Par une approche similaire, Szalay *et al.* ont démontré le rôle du TNF α dans la protection contre *Listeria monocytogenes* (Szalay *et al.*, 1996). Chez les souris knock-out pour le récepteur de l'IFN γ (IFN γ R $^{-/-}$) infectées par *Listeria monocytogenes* la production de TNF α était réduite par rapport à celle mesurée chez les souris normales infectées. Chez ces souris IFN γ R $^{-/-}$, l'administration de TNF α exogène a réduit significativement le pourcentage de mortalité. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, contrairement aux souris C57BL/6 GKO, les souris BALB/c GKO peuvent se protéger après 2 semaines d'infection. La comparaison de la réponse en cytokines dans la rate de ces souris GKO de fond génétique différent montre une réponse plus importante des cytokines de type Th2 mais aussi du TNF α chez les souris BALB/c. Si les auteurs ont considéré que l'effet protecteur était uniquement dû aux cytokines de type Th2, il aurait été intéressant d'injecter des anticorps neutralisant le TNF α endogène chez ces souris afin de vérifier l'effet de cette cytokine dans la protection. Taylor *et al.* ont injecté des anticorps anti-TNF α à des souris BALB/c GKO qui se protégeaient de l'infection par le protozoaire *Leishmania donovani* et ont montré que le TNF α participait à la protection chez ces souris (Taylor et Murray, 1997).

Dans ce travail, nous avons pour la première fois mis en évidence que le TNF α pouvait participer à la protection vis-à-vis de *C. parvum*. Toutefois, la protection médiée par cette cytokine n'est pas prépondérante ce qui peut expliquer les résultats des études précédentes. En effet, les différentes études essayant de mettre en évidence un rôle du TNF α dans la protection vis-à-vis de *C. parvum* n'utilisaient probablement pas la bonne approche et l'effet bénéfique du TNF α dans la protection était peut-être masqué par celui de l'IFN γ endogène (Chen *et al.*, 1993a ; McDonald *et al.*, 1992). Nos résultats avec les souris adultes infectées par *C. parvum* puis traitées par la pentoxifylline vont dans ce sens. En effet, afin de confirmer le rôle du TNF α dans la cryptosporidiose, nous avons inoculé des souris adultes normales par *C. parvum* et injecté 1 mg de Pentoxifylline (Sigma) quotidiennement pendant 6 jours. Aucun oocyste n'avait pu être détecté dans les fèces des souris traitées ou non traitées par cet inhibiteur de TNF α (données non montrées).

Un grand nombre de gènes inductibles par l'IFN γ le sont aussi par la cytokine TNF α et dans la plupart des cas, cette induction est synergistique. La synergie entre ces deux cytokines implique probablement une interaction entre NF- κ B induit par TNF α et un facteur de transcription induit par l'IFN γ (IRF-1, Interferon Regulatory Factors). En effet, la plupart des gènes induits en synergie par l'IFN γ et TNF α contiennent un site de fixation pour NF-KB et un motif ISRE (fixant IRF-1) dans leur promoteur. Par ailleurs, le TNF α peut induire le facteur de transcription IRF-1 et l'IFN γ peut également activer NF- κ B nécessaire à la production de TNF α (Boehm *et al.*, 1997). Enfin, l'IFN γ a la capacité

d'induire l'expression du récepteur au TNF α (Tannenbaum *et al.*, 1993 ; Tsujimoto *et al.*, 1986) et le TNF α permet l'augmentation de la production d'IFN γ dans les lymphocytes T lamina propria (Prehn *et al.*, 1999). Toutes ces données peuvent expliquer que les injections de TNF α exogène chez les souris GKO ont activé l'expression de certains gènes normalement induits par IFN γ lors du processus de guérison. De plus, elles sont en faveur d'une participation du TNF α dans la protection du souriceau infecté par *C. parvum*.

Les différents travaux visant à comparer les niveaux de production du TNF α chez les adultes et les nouveau-nés sont très controversés. Pour certains, la production de TNF α est plus faible chez les nouveau-nés par rapport aux adultes (Garvy et Qureshi, 2000 ; Serushago *et al.*, 1996) alors que pour d'autres, et notamment lorsqu'il s'agit de sensibilité au LPS, c'est chez les nouveau-nés que la production de TNF α est plus importante (Cusumano *et al.*, 1997 ; Lally *et al.*, 2000). La probabilité que la différence d'expression du TNF α observée chez les souriceaux normaux et les adultes GKO soit due à l'âge est minime et cette différence d'expression va plutôt dans le sens d'une régulation du TNF α par la production d'IFN γ locale. En effet, chez les souris déficientes en IFN γ infectées par *Plasmodium chabaudi*, la production de TNF α est dramatiquement altérée par rapport à celle des souris normales infectées (Su et Stevenson, 2000). De plus, Smith *et al.* ont également montré que la surexpression de TNF α était absente dans la rate des souris adultes GKO infectées par *C. parvum* (Smith *et al.*, 2000).

Le TNF α peut agir par différents mécanismes pour protéger de l'infection par *C. parvum*. (i) Comme pour l'IFN γ , Pollok a récemment montré dans une étude *in vitro* que le TNF α réduisait l'infection des entérocytes par *C. parvum* (Pollok *et al.*, 2001). (ii) De plus, le TNF α étant capable d'induire l'apoptose des entérocytes (Piguet *et al.*, 1999), il pourrait avoir réduit la charge parasitaire au niveau de l'intestin en induisant l'apoptose des cellules épithéliales infectées. Ainsi, il permettrait à l'épithélium de se renouveler et en même temps de se débarrasser du parasite. Cette idée va dans le sens que l'apoptose des entérocytes (observée dans de nombreuses études *in vitro*) est induite par l'hôte en réponse à l'infection de façon à éliminer le parasite. (iii) De façon indirecte, le TNF α pourrait également participer à la protection contre *C. parvum*. Chez le souriceau, il pourrait agir en synergie avec l'IL12 pour induire la production d'IFN γ (Hunter *et al.*, 1994) ou avec l'IFN γ pour augmenter la synthèse de NO (Ding *et al.*, 1988). Dans notre modèle de souris GKO, le TNF α peut avoir protégé les souris en induisant l'expression des gènes IL6, MCP-1, i-TAC et IP-10. Nous avons été surpris de ne pas observer de surexpression de iNOS puisque lors d'une infection par *Leishmania major* chez les souris GKO, la protection médiée par le TNF α a été corrélée avec une surexpression de iNOS (Taylor et Murray, 1997). D'une manière générale, le TNF α peut induire la production d'un certains nombres de chimiokines telles que MCP-1, Rantes et MIP1 α et β nécessaires au recrutement de lymphocytes T et de macrophages (Baggiolini *et al.*, 1994) (iv) Par

ailleurs, le TNF α possède une activité chimiotactique pour les IEL (Ebert, 1998). En favorisant le recrutement de ces cellules au niveau du site d'infection, il pourrait faciliter l'élimination du parasite. (v) Enfin, d'une manière moins spécifique le TNF α pourrait induire la synthèse de prostaglandines qui permettraient la protection des souriceaux soit *via* la synthèse de mucine, soit en augmentant les diarrhées qui permettent d'évacuer le parasite.

IV- LES CHIMIOKINES

Les chimiokines sont des petites protéines de faible poids moléculaire jouant un rôle prépondérant dans le processus inflammatoire. A ce jour, les chimiokines sont regroupées en quatre familles qui activent et attirent spécifiquement certaines populations de cellules inflammatoires (Figure 45).

- la famille des C chimiokines
- la famille des CC chimiokines
- la famille des CXC chimiokines
- la famille des CX₃C chimiokines.

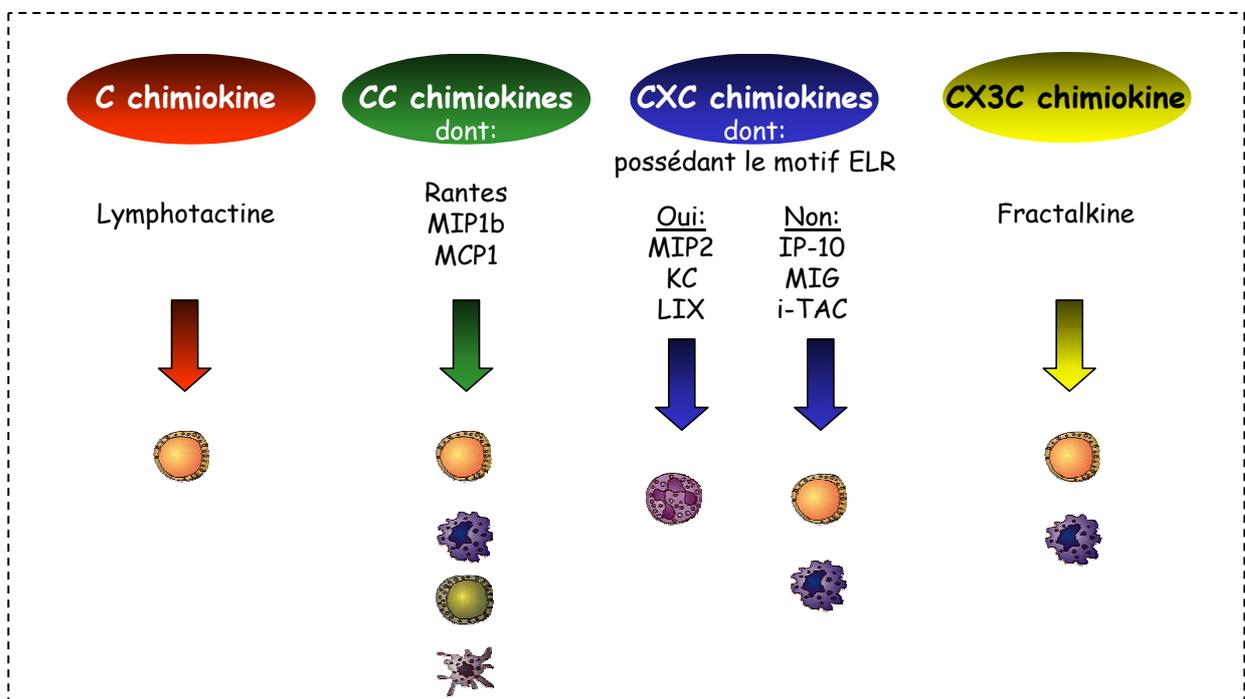


Figure 45 : Les cellules inflammatoires recrutées préférentiellement par les chimiokines.

-  Lymphocyte T
-  Macrophage/ monocyte
-  Neutrophile
-  Cellule dendritique
-  Cellule NK

Comme les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines sont des médiateurs de la réponse inflammatoire. Dans notre étude, nous avons donc cherché à mettre en évidence les chimiokines produites au niveau de l'iléon des souris infectées par *C. parvum* et nous avons étudié la contribution des cellules épithéliales intestinales dans cette réponse. Enfin, dans le but de mettre en évidence les chimiokines pouvant intervenir dans la protection médiée par l'IFN γ , nous avons analysé les réponses en chimiokines chez les souriceaux normaux et chez les souris GKO infectés par *C. parvum*.

1. Expression des chimiokines par les cellules épithéliales intestinales

a/ Après infection *in vitro* par *C. parvum*

Ce parasite à développement intracellulaire obligatoire reste confiné dans l'espace extra-cytoplasmique de la cellule épithéliale et est capable d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules étant les premières à être en contact avec le parasite et ayant des caractéristiques bien connues dans l'initiation de la réponse immunitaire, nous avons voulu savoir si pour initier le processus inflammatoire, elles produisaient également des chimiokines en réponse à l'infection par *C. parvum*.

L'expression de différentes chimiokines par la lignée de cellules épithéliales murines ICcl2 infectée avec *C. parvum* a été étudiée par RT-PCR qualitative. Nous avons analysé la réponse en chimiokines par les cellules épithéliales infectées par *C. parvum* en dehors de tout autre environnement cellulaire après 2, 10 et 24 h d'infection (Figure 46).

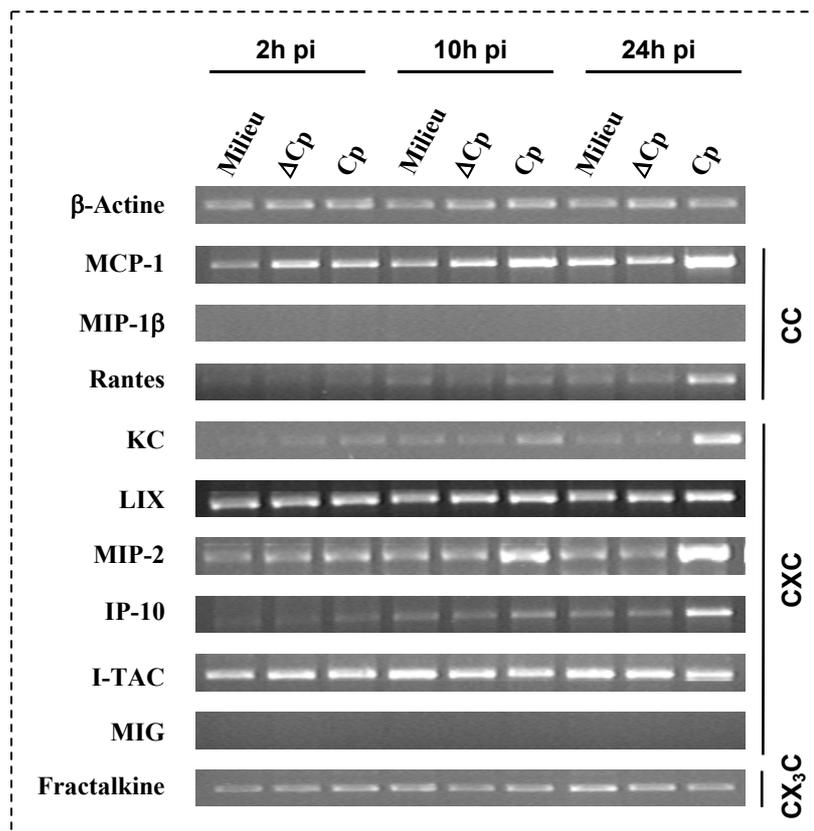


Figure 46 : Expression des chimiokines par les cellules ICcl2 infectées par *C. parvum*.

Les cellules sont infectées avec des oocystes de *C. parvum* (Cp) avec une proportion de 5 oocystes par cellule. Les puits témoins reçoivent soit du milieu de culture, soit des oocystes inactivés par la chaleur (CpΔ). L'ARN total des cellules est ensuite extrait avec du Trizol. Toutes les amplifications par PCR sont réalisées avec 35 cycles sauf pour la β-actine (21 cycles), la fractalkine (28 cycles) et KC (21 cycles). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences différentes.

Après 2 h d'infection, le niveau d'expression des chimiokines étudiées n'a pas changé. Après 10 h d'infection, à la fois, des CC (MCP-1) et des CXC (KC et MIP-2 α) chimiokines sont surexprimées par les ICcl2. Enfin, l'infection par *C. parvum* pendant 24h induit la surexpression de nombreuses chimiokines. Parmi les CC chimiokines étudiées, le niveau d'expression des ARNm de MCP-1 et Rantes est augmenté et parmi les CXC chimiokines, l'expression de KC, MIP-2 α et IP-10 est augmentée. L'expression de la fractalkine pouvant être produite par les cellules épithéliales de l'intestin (Muehlhoefer *et al.*, 2000) n'est pas régulée par l'infection. Ces résultats suggèrent que le développement du parasite induit une réponse en chimiokines très diversifiée permettant à la fois le recrutement des neutrophiles (par KC et MIP-2 α) et le recrutement de lymphocytes et de monocytes (par IP-10, MCP-1 et Rantes).

Les cellules épithéliales sont capables de produire des composants de la réponse immunitaire pouvant agir de façon autocrine puisque ces cellules portent de nombreux récepteurs aux cytokines et aux chimiokines à leur surface (Dwinell *et al.*, 1999). Dans le cas d'une infection *in vitro* des cellules épithéliales par *Entamoeba histolytica*, la lyse des cellules et la libération d'IL1 α étaient à l'origine de la sécrétion d'IL8 par les cellules non infectées (Eckmann *et al.*, 1995). Nous avons, par conséquent, cherché à nous assurer que la réponse en chimiokines observée était directement liée au développement du parasite et que les médiateurs libérés par les cellules épithéliales infectées n'avaient aucune incidence sur cette réponse. Pour cela, nous avons mis en culture des cellules ICcl2 sur une membrane de Transwell et dans le fond du puits de culture contenant la membrane de Transwell. Les cellules ICcl2 du puits de culture ont été infectées avec *C. parvum* et

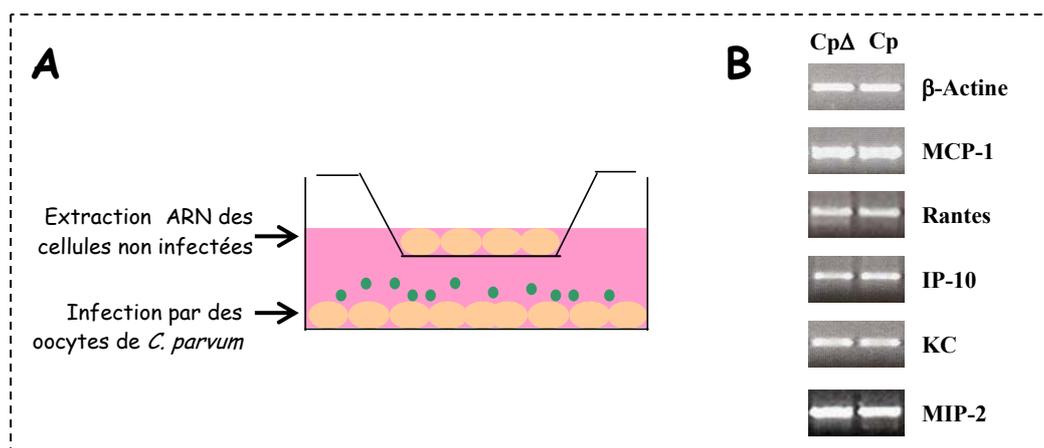


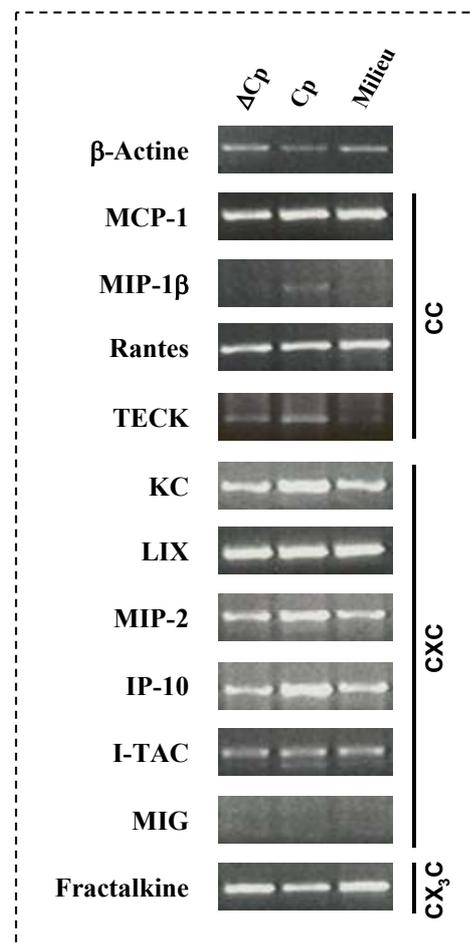
Figure 47 : Expression des chimiokines par les cellules épithéliales en contact avec le surnageant de cellules infectées avec *C. parvum*. (A) 10^6 cellules ICcl2 ont été mises en culture sur la membrane de Transwell et 2×10^6 au fond du puits d'une plaque de culture P6. Les cellules du fond du puits ont été infectées avec des oocystes de *C. parvum* (Cp) (5 oocystes pour 1 cellule) ou des oocystes préalablement inactivés par la chaleur (Cp Δ). Après 24 d'infection, l'ARN des cellules cultivées sur la membrane de Transwell est extrait par du Trizol. (B) Les conditions de RT-PCR sont identiques à celles indiquées dans la légende de la figure 46. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

l'ARN des cellules cultivées sur la membrane de Transwell a été extrait 24 h après l'infection pour analyser l'expression des chimiokines par RT-PCR (Figure 47).

Les résultats de la figure 48 montrent que les gènes des chimiokines étudiées ne sont pas surexprimés par les cellules ICcl2 incubées avec le surnageant des cellules infectées suggérant que la régulation positive de l'expression des chimiokines observées dans les cellules infectées est directement liée à l'infection et au développement du parasite.

Nous avons voulu vérifier que ce panel de cytokines pouvait également être exprimé par l'autre lignée de cellules épithéliales murines que nous avons à notre disposition, les cellules Mode-K. Comme les cellules ICcl2, les cellules Mode-K infectées pendant 24h surexpriment les CXC chimiokines IP-10 et MIP-2 α , par contre, les gènes de MCP-1 et Rantes ne sont pas surexprimés suite à l'infection. Au contraire, MIP1 β et une autre CC chimiokine récemment mise en évidence dans les cellules épithéliales du petit intestin et du thymus appelée TECK (Wurbel *et al.*, 2000) sont légèrement surexprimées dans les cellules Mode-K infectées par *C. parvum*. Malgré une différence dans le panel d'expression des chimiokines entre les deux lignées de cellules épithéliales murines, ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire à *C. parvum* par l'expression et la production de différentes chimiokines.

Figure 48 : Expression des chimiokines par les cellules Mode-K infectées par *C. parvum* pendant 24 h. Les cellules sont infectées avec des oocystes de *C. parvum* (Cp) dans une proportion 5 oocystes pour 1 cellule. Les puits témoins reçoivent soit du milieu de culture, soit des oocystes inactivés par la chaleur (Cp Δ). L'ARN total des cellules est ensuite extrait avec du Trizol. Toutes les amplifications par PCR sont réalisées avec 35 cycles sauf pour la β -actine (21 cycles), la fractalkine (28 cycles) et KC (21 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.



b/ Expression des chimiokines par les cellules épithéliales intestinales dans un environnement inflammatoire

Dans un contexte inflammatoire, l'IL1, le TNF α mais aussi l'IFN γ stimulent la production des chimiokines par de nombreux types cellulaires. Nous avons montré que ces cytokines étaient surexprimées dans l'iléon des souriceaux lors de l'infection par *C. parvum*. Elles pourraient par conséquent stimuler l'expression des chimiokines notamment par les cellules épithéliales. Nous avons testé cette hypothèse en stimulant les cellules ICcl2 pendant 5 h avec de l'IL1, du TNF α ou de l'IFN γ recombinants. Comme décrit dans la littérature, la réponse en chimiokines après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires est souvent étudiée entre 3 et 6 heures de stimulation. Les cinétiques d'expression des chimiokines peuvent effectivement être différentes selon les chimiokines mais après 5 h de stimulation, même si l'augmentation de l'expression n'est pas maximale, elle est souvent observée (Song *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 1997).

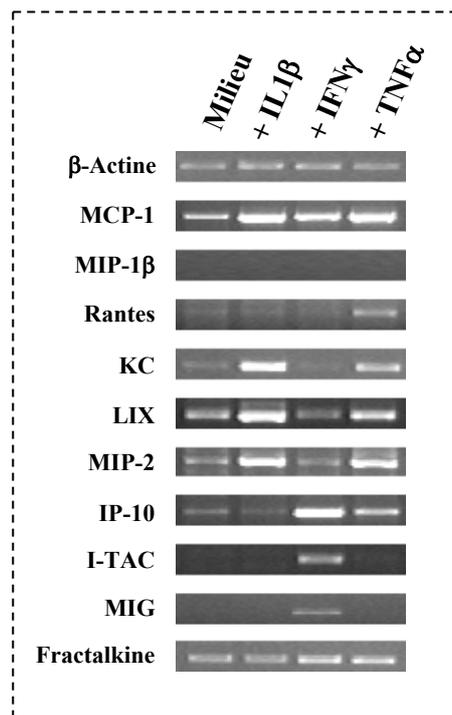


Figure 49 : Expression des chimiokines par les cellules ICcl2 stimulées par l'IL1 β , le TNF α et l'IFN γ . Les cellules ICcl2 confluentes en puits de P6 sont incubées avec de l'IL1 β (10ng/ml), du TNF α (10ng/ml) ou de l'IFN γ (10ng/ml) pendant 5h. Toutes les amplifications par PCR sont réalisées avec 35 cycles sauf pour la β -actine (21 cycles), la fractalkine (28 cycles) et KC (21 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Les cellules de la lignée ICcl2 surexpriment i-TAC et MIG uniquement après une stimulation par l'IFN γ , alors que l'expression du messageur pour l'IP-10 est augmentée après une stimulation par l'IFN γ et dans une moindre mesure par le TNF α (Figure 49). Le TNF α et l'IL1 β sont capables de stimuler l'expression des CXC chimiokines KC, LIX et MIP-2 α par les ICcl2. Le messageur de MCP-1 est surexprimé par la stimulation du TNF α , de l'IFN γ et de l'IL1 β , alors que l'expression de Rantes est régulée positivement uniquement par le TNF α . Enfin, l'expression de la fractalkine ne varie pas quelle que soit

la cytokine testée. De plus, il semble que cette lignée de cellule épithéliale n'exprime pas le messenger pour MIP-1 β puisque ni l'infection ni la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires n'ont induit une expression.

c/ Conclusion / Discussion

L'infection des cellules épithéliales *in vitro* par *C. parvum* pendant 24h a augmenté l'expression des CXC chimiokines KC, MIP-2 α et IP-10, et des CC chimiokines MCP-1 et Rantes. Ces résultats confirment les résultats obtenus avec des lignées de cellules épithéliales humaines infectées par *C. parvum* qui montraient une augmentation d'IL8 (équivalent humain du KC murin), de Gro α (Laurent *et al.*, 1997) et de Rantes (Maillot *et al.*, 2000). C'est la première fois que l'augmentation de l'expression de MIP-2 α (dont l'équivalent humain est Gro β) et d'IP-10 est mise en évidence dans les cellules épithéliales infectées *in vitro* par *C. parvum*. La production de chimiokines par les cellules épithéliales est observée suite à l'infection par de nombreux agents pathogènes comme Rotavirus, *Toxoplasma gondii* et *Mycobacterium avium* (Casola *et al.*, 1998 ; Denney *et al.*, 1999 ; Sangari *et al.*, 1999). Tous ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire locale.

2. Expression des chimiokines dans l'iléon des souris infectées par *C. parvum*

La réponse en chimiokines n'avait jamais été étudiée auparavant *in vivo* lors de la cryptosporidiose. Dans la suite de notre travail, l'expression de ces molécules suite à l'infection par *C. parvum* a été étudiée dans le modèle souriceaux C57BL/6J. De plus, afin de mettre en évidence des chimiokines qui pourraient intervenir dans la protection et qui sont sous la dépendance de l'IFN γ , la réponse des souris déficientes en IFN γ a ensuite été analysée.

a/ Chez les souriceaux C57BL/6J normaux

Chez les souriceaux, la réponse en chimiokines a été étudiée 2, 4, 9 et 15 jours p.i.. Nous avons pensé que l'expression des chimiokines seulement 2 jours après l'inoculation pourrait refléter plus particulièrement la réponse des cellules épithéliales uniquement. Comme pour l'étude de la réponse en cytokines pro-inflammatoires *in vivo* suite à l'infection par *C. parvum*, les jours 4 et 9 ont été choisis parce qu'ils correspondent respectivement au début et au maximum de l'infection. Enfin, la cinétique d'infection chez les souriceaux montre que le nombre d'oocystes produits diminue à J15 et il semblait intéressant d'étudier l'expression des chimiokines connues pour être des médiateurs de la réponse inflammatoire lorsque l'hôte infecté est en train d'éliminer l'infection.

D'une manière générale, chez les souriceaux infectés par *C. parvum*, l'expression de la C chimiokine, des CC chimiokines et des CXC chimiokines est augmentée (Figure 50). Aucune de ces augmentations n'est détectée avant 4 jours d'infection. Ce résultat suggère que si les cellules épithéliales participent à la production de chimiokines, cette réponse n'est pas détectable par notre technique avant qu'un cycle complet de multiplication de *C. parvum* se soit produit et/ou avant une stimulation des cellules épithéliales par l'environnement inflammatoire. Enfin, l'ARNm de la fractalkine n'est pas surexprimé avec l'infection, ce qui confirme également l'absence de surexpression observée *in vitro* après infection ou stimulation par les différentes cytokines pro-inflammatoires.

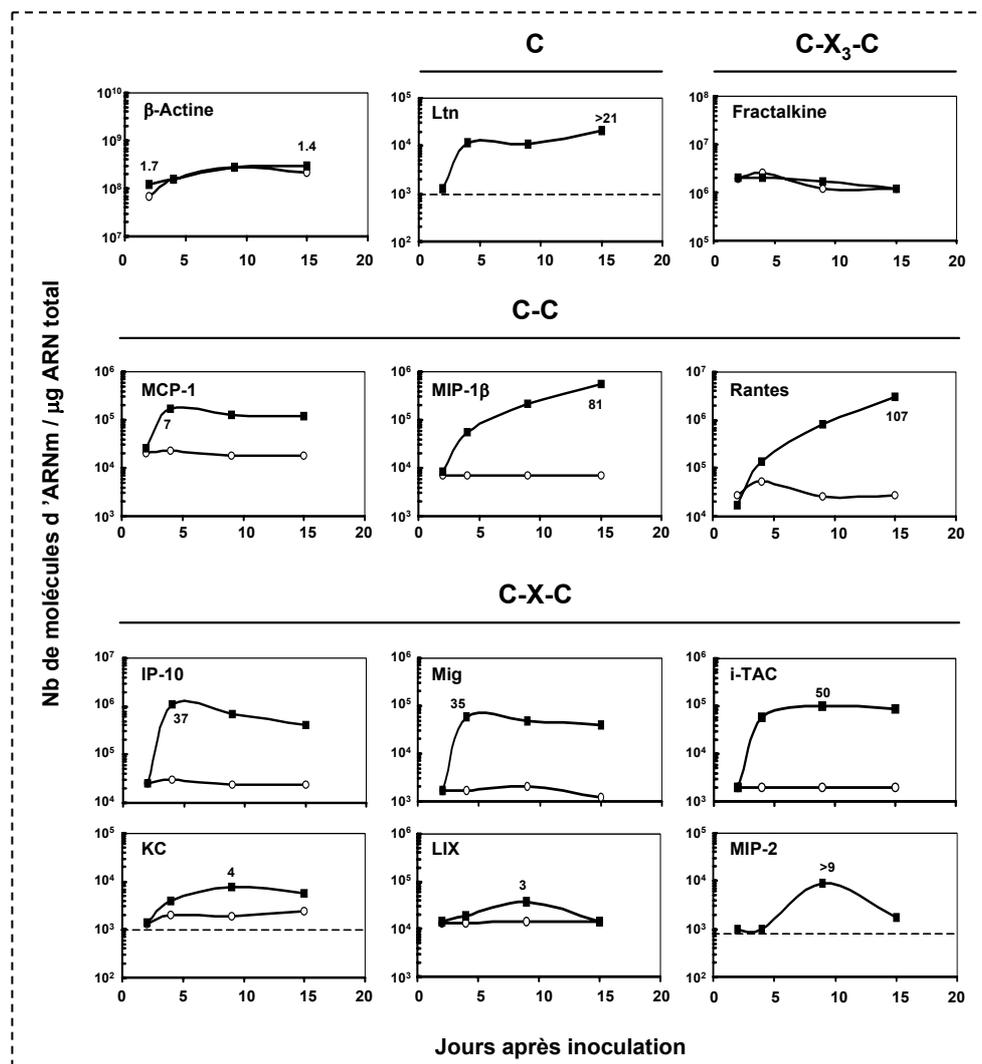


Figure 50 : Réponses en chimiokines dans l'iléon des souriceaux infectés par *C. parvum*. Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur des pools d'ARN. Le lot de souriceaux infectés (■) et le lot témoin âge (○) correspondant contiennent chacun le même nombre de souriceaux : 6 à 2 jours p.i. ; 5 à 4 jours p.i. ; 7 à 9 jours p.i. et 6 à 15 jours p.i.. La ligne en pointillée correspond au seuil de détection. Le nombre inscrit sur chacune des courbes indique la valeur la plus élevée de surexpression chez les souriceaux infectés par rapport aux souriceaux témoins. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Les résultats de RT-PCR quantitatives réalisées sur les pools d'ARN de l'iléon des souriceaux infectés ont montré des cinétiques et des niveaux d'expression différents selon les classes de chimiokines. Les trois CXC chimiokines qui dépendent de l'IFN γ , IP-10, MIG et i-TAC sont rapidement et assez fortement surexprimées. Le niveau d'expression est ensuite maintenu au moins jusqu'au 15^{ème} jour après l'inoculation. Ce même profil d'expression est aussi observé pour la lymphotactine et MCP-1 mais le niveau maximal d'expression atteint est moins élevé (respectivement 21 et 7 fois augmenté par rapport au témoin). Pour Rantes et MIP- β , le niveau d'expression augmente graduellement au cours du temps. Chez les souriceaux infectés pendant 15 jours, l'expression de Rantes est augmentée 107 fois et celle de MIP-1 β 81 fois par rapport aux souriceaux témoins. Enfin, l'infection par *C. parvum* ne semble pas avoir beaucoup d'incidence sur l'expression des trois CXC chimiokines possédant un motif ELR étudiées, KC, LIX et MIP-2 α dont le maximum de surexpression ne dépasse pas 10 fois au jour 9 p.i.. Ce profil d'expression des chimiokines observé chez les souriceaux infectés suggère un recrutement des lymphocytes T principalement mais aussi des macrophages au niveau du site d'infection. Nous avons réalisé différents marquages immunologiques afin d'identifier qu'elles étaient les cellules recrutées dans l'intestin chez le souriceau infecté par *C. parvum* (Figure 51). Nous avons pu observer un recrutement de lymphocytes T à la fois CD4⁺ et CD8⁺ chez le souriceau infecté pendant 9 jours ainsi qu'un important recrutement de macrophages. Il est surprenant de ne pas observer de marquage de cellules chez les souriceaux non infectés qui ont pourtant le même âge que les souriceaux infectés. Ce résultat suggère par conséquent une activation et/ou un recrutement des cellules après infection par *C. parvum* résultant de la réponse en chimiokines observée chez les souriceaux. Des neutrophiles sont également recrutés après infection mais ils restent localisés au bas des villosités et n'infiltrent pas la lamina propria comme les lymphocytes T et les macrophages.

D'après la littérature, ce profil d'expression des chimiokines est souvent associé à une réponse immunitaire de type Th1 (Dixon *et al.*, 2000 ; Eck *et al.*, 2000). En effet IP-10, MIG et i-TAC contribuent à une défense de l'hôte en attirant au niveau du site d'infection des lymphocytes Th1 qui expriment à leur surface le récepteur commun à ces 3 chimiokines CXC-R3 (Farber, 1997). De plus, les chimiokines telles que MIP-1 β et Rantes peuvent être produites par les lymphocytes de type Th1 ou par des macrophages. Ce pattern de chimiokines est également retrouvé lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* à la fois *in vivo* et *in vitro* par les cellules épithéliales intestinales infectées (Amichay *et al.*, 1996 ; Buzoni-Gatel *et al.*, 2001 ; Khan *et al.*, 2000). Outre leur activité chimiotactique, il a été montré récemment que les CXC chimiokines ne possédant pas de motif ELR pouvaient avoir une activité "defensin-like" (Cole *et al.*, 2001).

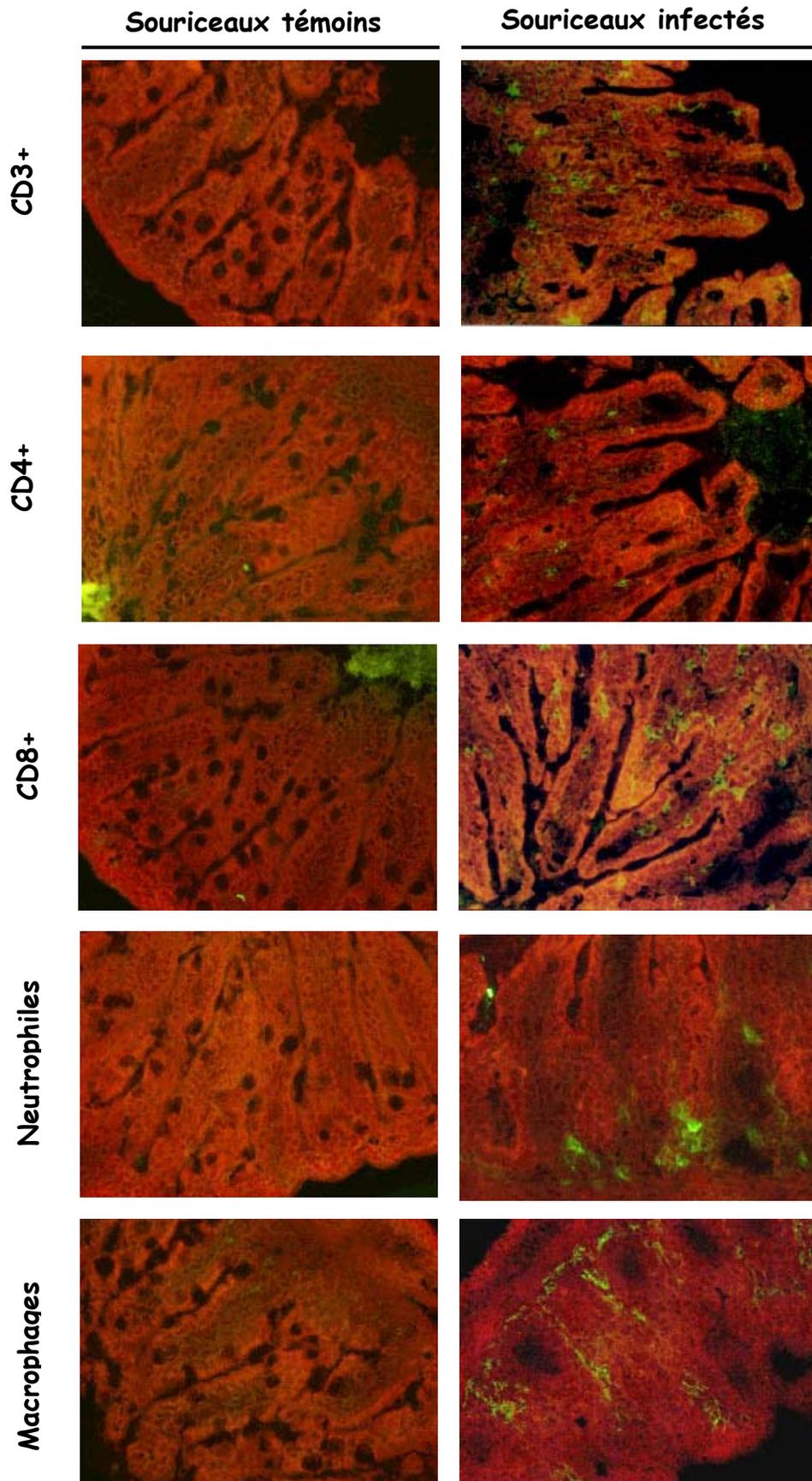


Figure 51 : Recrutement des différentes cellules inflammatoires dans l'iléon des souriceaux infectés pendant 9 jours par *C. parvum*. Les conditions de marquages et les clones d'anticorps monoclonaux utilisés sont indiqués dans la partie "Matériel et Méthodes". Grossissement $\times 175$.

b/ Chez les souris GKO

Après 4 jours d'infection, les trois CXC chimiokines fortement surexprimées chez les souriceaux normaux ($\times 36$ pour IP-10, $\times 35$ pour MIG et $\times 30$ pour i-TAC) ne sont pas surexprimées chez les souriceaux GKO (Figure 52). Au contraire, l'expression de MIP-2 α qui n'était pas augmentée au 4^{ème} jour après l'inoculation chez les souriceaux normaux, est augmentée de 26 fois chez les souriceaux GKO infectés par rapport aux souriceaux GKO témoins. Il est difficile d'interpréter les résultats concernant les autres chimiokines puisqu'à cette date les niveaux d'expression chez les souriceaux normaux infectés étaient faibles et à part pour MIP-2 α , il n'y a pas de changement important d'expression d'autres chimiokines chez les souriceaux GKO. Par conséquent, nous avons choisi de comparer la réponse en chimiokines des souriceaux normaux avec celle des souris adultes GKO au 9^{ème} jour après l'inoculation lorsque le niveau d'infection maximal est atteint.

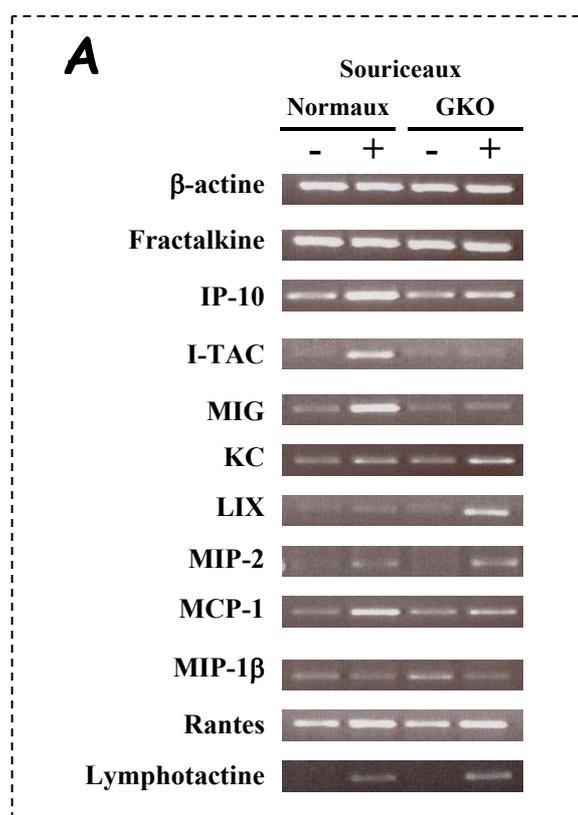


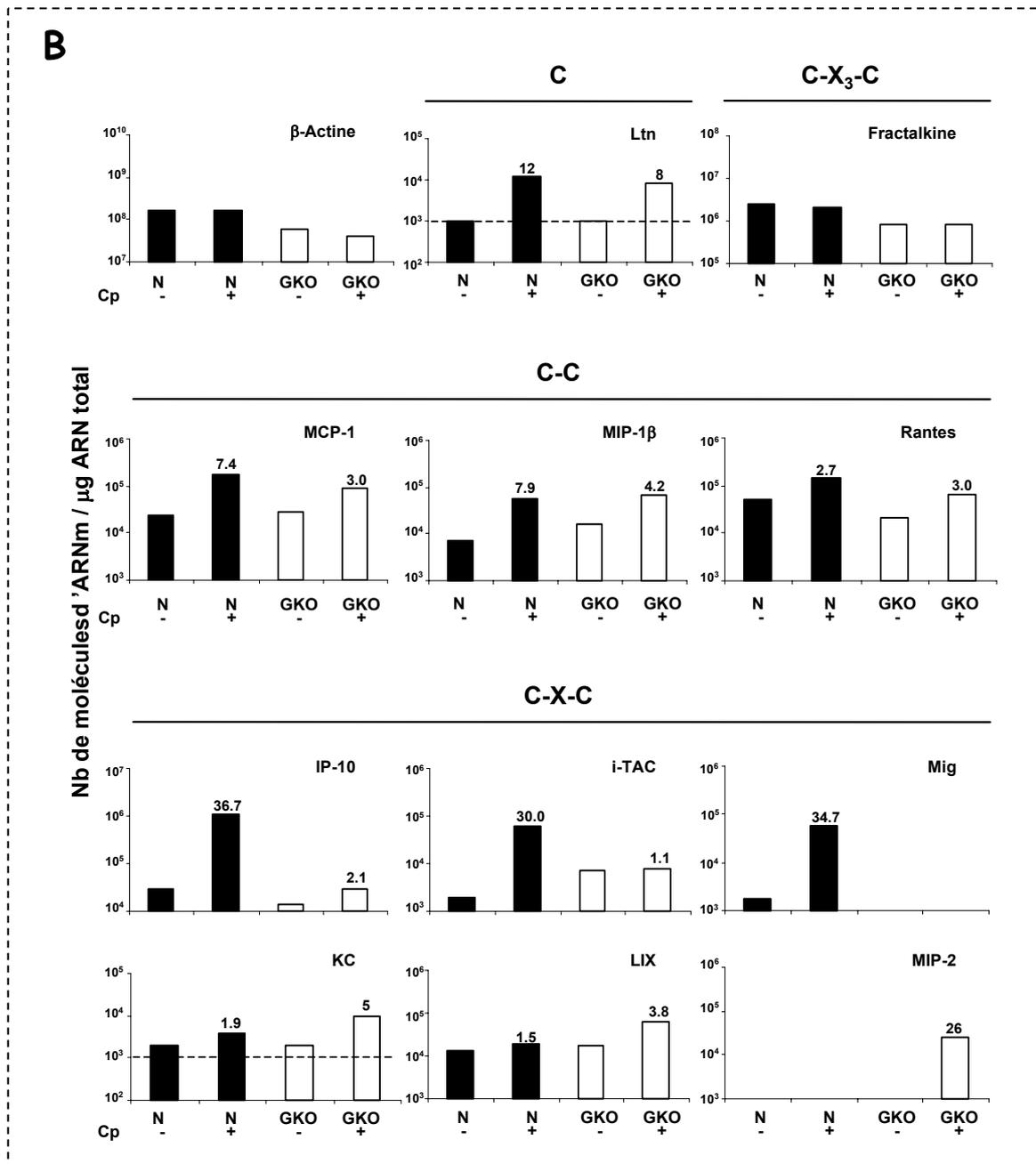
Figure 52 : Comparaison de l'expression des chimiokines chez les souriceaux GKO et les souriceaux normaux après 4 jours d'infection.

A- Par RT-PCR qualitative

B- Par RT-PCR quantitative (souriceaux normaux, plots noirs, et souriceaux GKO, plots blancs)

Les RT-PCR qualitatives ou quantitatives ont été réalisées à partir de pools d'ARN pour chaque lot. Cinq souriceaux normaux témoins et 5 souriceaux infectés ont été utilisés pour faire le pool, et pour le lot de souriceaux GKO, 7 témoins et 7 infectés ont été utilisés. Toutes les amplifications par PCR sont réalisées avec 35 cycles sauf pour la β -actine (21 cycles), la fractalkine (28 cycles) et KC (21 cycles).

Dans la figure B, les nombres inscrits au dessus des plots indiquent les augmentations d'expression entre les souriceaux infectés et les souriceaux témoins et la ligne en pointillée correspond à la limite de détection de notre technique de RT-PCR quantitative. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.



Chez les souris adultes GKO infectées pendant 9 jours, l'expression des chimiokines IP-10, MIG et i-TAC n'est pas augmentée (Tableau 9). Par contre, le niveau d'expression de MIP-2 α est augmenté 588 fois. Ces résultats présentent des réponses en chimiokines dont les tendances sont identiques à celles observées chez les souriceaux GKO infectés pendant 4 jours et suggèrent que l'âge et donc le développement du système immunitaire chez le souriceau n'ont pas d'influence sur cette réponse du moins en ce qui concerne l'expression de ces chimiokines. La comparaison de la réponse en chimiokines au

bout de 9 jours d'infection chez les souris déficientes en IFN γ nous apporte des nouvelles données intéressantes. En effet, il apparaît que l'augmentation du nombre de molécules d'ARNm est nettement plus importante pour les deux autres CXC chimiokines étudiées LIX et KC chez les souris GKO infectées par rapport aux souriceaux normaux infectés. De même, l'expression de MCP-1 est augmentée 19 fois chez les souris déficientes en IFN γ contre 7 fois chez les souriceaux normaux infectés. A l'inverse, les surexpressions de MIP-1 β et de Rantes observées chez les souriceaux infectés pendant 9 jours ($\times 30$ et $\times 31$ respectivement) sont plus faibles chez les souris adultes GKO ($\times 9$ et $\times 2$ respectivement).

Chimiokines	Souriceaux normaux			Souris adultes GKO		
	Transcripts / μg		Ratio Infecté/ Témoin	Transcripts / μg		Ratio Infecté/ Témoin
	Témoin	Infecté		Témoin	Infecté	
β -Actine	2.7×10^8	2.7×10^8	1.0	4.0×10^7	2.5×10^7	0.6
Ltn	1.0×10^3	1.1×10^4	11	1.1×10^3	7.0×10^3	6.4
MCP-1	1.8×10^4	1.3×10^5	7.2	6.2×10^3	1.2×10^5	19
MIP-1 β	7.0×10^3	2.1×10^5	30	7.5×10^4	7.0×10^5	9.3
Rantes	2.6×10^4	8.0×10^5	31	1.0×10^6	1.8×10^6	1.8
KC	1.9×10^3	7.6×10^3	4	3.3×10^3	1.8×10^5	54
LIX	1.4×10^4	3.7×10^4	2.6	2.7×10^3	3.0×10^6	1111
MIP-2	$<10^3$	9.0×10^3	NC	3.4×10^3	2.0×10^6	588
IP-10	2.4×10^4	7.0×10^5	29	3.3×10^4	1.0×10^4	0.3
MIG	2.0×10^3	5.0×10^4	25	6.0×10^3	1.0×10^3	0.16
I-TAC	2.0×10^3	1.0×10^5	50	1.7×10^4	1.4×10^4	0.8
Fractalkine	1.2×10^6	1.7×10^6	1.4	7.0×10^5	9.0×10^5	1.3

Les valeurs représentent le nombre de molécules d'ARNm de cytokines / μg d'ARN total. 10^3 molécules d'ARNm correspond à la plus petite valeur mesurable dans notre technique
 NC, la valeur n'a pas pu être calculée

Tableau 9 : Comparaison de l'expression des chimiokines chez les souriceaux normaux et les souris adultes GKO après 9 jours d'infection. Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur des pools d'ARN. Sept souriceaux normaux témoins et 7 souriceaux normaux infectés ont été utilisés pour faire le pool. Pour les adultes GKO, 6 souris témoins et 5 souris infectées ont été utilisées pour faire le pool d'ARN. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

Tous ces résultats montrent que l'absence d'IFN γ favorise l'expression des CXC chimiokines LIX, KC et MIP-2 α chez les souris infectées. On peut également supposer que l'IFN γ n'a aucune incidence sur les CXC chimiokines MIP-2 α , KC et LIX et que la surexpression observée est uniquement le témoin d'une plus forte charge parasitaire observée chez l'adulte GKO après 9 jours d'infection. Quelle que soit l'origine de la

surexpression des CXC chimiokines possédant un motif ELR, ces données suggèrent un fort recrutement des neutrophiles au niveau du site d'infection. Au contraire, les régulations négatives de l'expression des gènes IP-10, MIG, i-TAC, MIP-1 β et Rantes chez les souris infectées dépourvues d'IFN γ suggèrent un défaut de recrutement des lymphocytes T et des macrophages. Les marquages immunologiques réalisés sur des coupes d'intestin de souris adultes GKO infectées pendant 9 jours supportent ces hypothèses. En effet, chez les souris adultes GKO non infectées, le nombre de lymphocytes T et de macrophages semble ne pas augmenter après l'infection par rapport au nombre de lymphocytes T et de macrophages déjà présents à l'homéostasie. Au contraire, la lamina propria des villosités intestinales des souris GKO infectées est infiltrée par un grand nombre de neutrophiles (Figure 53).

c/ Conclusion / Discussion

Lors d'une infection par *C. parvum*, contrairement aux souriceaux, les souris déficientes en IFN γ n'expriment pas les CXC chimiokines ne possédant pas le motif ELR IP-10, MIG et i-TAC mais au contraire expriment fortement les autres CXC chimiokines MIP-2 α , LIX et KC. De même, par rapport à l'infection chez des souris normales, l'expression de Rantes et de MIP-1 β est faiblement augmentée. Ces résultats peuvent être corrélés à la réponse en chimiokines des cellules épithéliales stimulées par les différentes cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, ce pattern d'expression est en accord avec le recrutement des cellules inflammatoires observé au niveau du site infectieux dans l'intestin des souriceaux et des souris GKO. Cette modification du profil d'expression de chimiokines liée à l'absence d'IFN γ a également été rapportée pour d'autres pathogènes comme *Trypanosoma cruzi* (Aliberti *et al.*, 2001) et *Toxoplasma gondii* (Amichay *et al.*, 1996) et dans un modèle expérimental d'encéphalomyélite auto-immune (Tran *et al.*, 2000). Pendant une infection par *Trypanosoma cruzi* dont la réaction inflammatoire initiée au niveau du site d'inoculation se retrouve ensuite dans le myocarde, ce profil en chimiokines a également été corrélé à un important recrutement des neutrophiles au niveau du myocarde et une absence d'infiltration par les lymphocytes T (Aliberti *et al.*, 2001).

Chez les souris GKO infectées par *C. parvum*, Theodos *et al.* ont montré que les lymphocytes T des ganglions lymphatiques mésentériques proliféraient spécifiquement après stimulation par des antigènes de *C. parvum*. Cette donnée suggère que l'absence d'IFN γ , n'a aucune incidence sur l'activation des lymphocytes T pendant l'infection par *C. parvum* (Theodos *et al.*, 1997). Par conséquent, l'absence de recrutement des lymphocytes T chez les souris GKO infectées n'est probablement pas liée à une mauvaise activation de ces cellules, mais au contraire, on peut supposer qu'elle est le reflet de la déficience en chimiokines dépendantes de l'IFN γ .

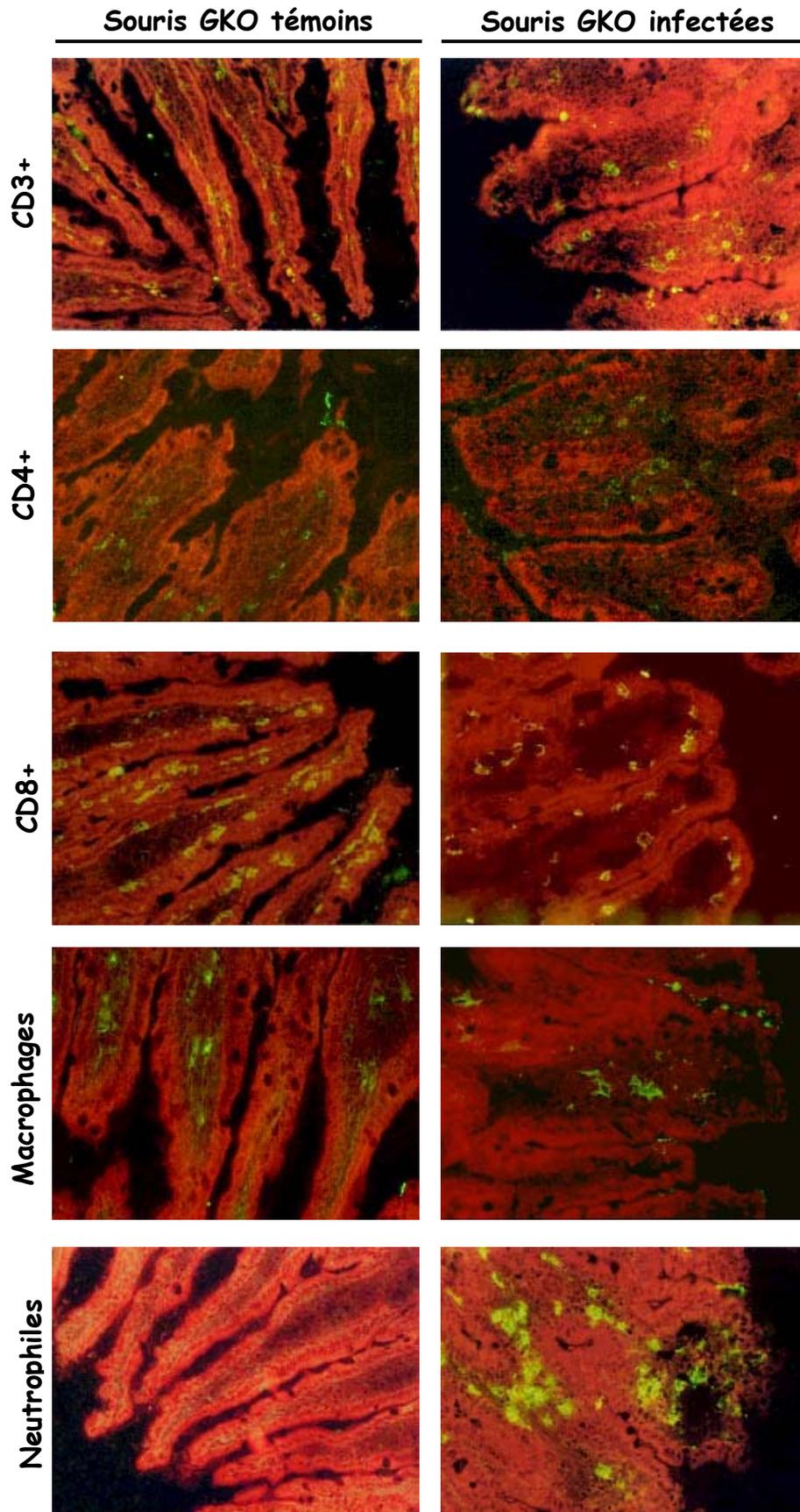


Figure 53 : Recrutement des différentes cellules inflammatoires dans l'iléon des souris GKO infectées pendant 9 jours par *C. parvum*. Les conditions de marquages et les clones d'anticorps monoclonaux utilisés sont indiqués dans la partie "Matériel et Méthodes". Grossissement $\times 175$

3. Inhibition des chimiokines *in vivo*

Les derniers résultats obtenus chez les souris GKO infectées par *C. parvum* comparés à ceux obtenus chez les souriceaux suggèrent un rôle important du recrutement des lymphocytes T et des macrophages *via* la production des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, Rantes et MIP-1 β dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose. Le rôle des lymphocytes T a déjà été décrit dans de nombreuses études, mais aucune étude n'a jusqu'ici mis en évidence par quels mécanismes ces lymphocytes étaient attirés au niveau du site infectieux.

Afin de vérifier que les chimiokines exprimées très rapidement en réponse à l'infection participaient à ce recrutement de lymphocytes T, nous avons cherché à neutraliser ces chimiokines ou leur récepteur à l'aide d'anticorps. Pour cela, nous avons injecté des anticorps reconnaissant les chimiokines IP-10, MIG et i-TAC et leur récepteur commun CXCR3 à des souriceaux infectés.

a/ Production des anticorps

Des lapins ont été immunisés avec des peptides synthétiques couplés à la KLH correspondant aux parties N terminales des chimiokines IP-10, MIG et i-TAC et au premier domaine extracellulaire du récepteur CXCR3 appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Régulièrement après les différentes immunisations, des prélèvements de sang ont été réalisés et la production d'anticorps spécifiques reconnaissant les peptides a été contrôlée par des tests ELISA avec les peptides non couplés à la KLH au fond des puits. Les anticorps produits par les lapins immunisés avec les différents peptides ont ensuite été purifiés sur une colonne de protéine G comme décrits dans la partie "Matériel et Méthodes". Après avoir adapté la colonne sur l'appareil de chromatographie BioCAD SPRINT (Perkin Elmer), nous avons programmé le protocole de purification pour qu'elle soit automatisée. Nous avons également réglé la programmation de façon à ne collecter l'éluat d'anticorps que dans un seul tube en fonction du pic de DO. A partir de 1 ml de sérum de lapin, on a récupéré en moyenne 4 mg d'anticorps. Grâce à l'automatisation, environ 60 mg d'anticorps peuvent ainsi être purifiés en 4 heures.

La qualité de la purification des anticorps a été contrôlée par migration sur gel de polyacrylamide (Figure 54). Afin de vérifier que les anticorps spécifiques des peptides reconnaissent aussi la protéine native, nous avons réalisé de l'immunofluorescence sur des coupes congelées d'iléons de souriceaux infectés pendant 9 jours. Pour les anticorps spécifiques des peptides d'IP-10 et de MIG, dont l'efficacité à reconnaître et à neutraliser

la protéine native avait déjà été publiée, nous avons obtenu un marquage positif de cellules localisées dans la lamina propria (Figure 55). Par contre, pour les anticorps spécifiques d'i-TAC et de CXCR3, nous n'avons pas observé de marquage positif. Ces résultats suggèrent que les anticorps ne reconnaissent pas la protéine native ou que nous n'avons pas utilisé les meilleures conditions pour réaliser cet immunomarquage. Outre la vérification de l'efficacité des anticorps obtenus, ces marquages immunologiques nous montrent que les cellules épithéliales infectées et stimulées par l'IFN γ produit suite à l'infection ne sont pas les principales cellules productrices d'IP-10 et de MIG après 9 jours d'infection. La localisation des cellules productrices dans la lamina propria des villosités intestinales suggère par conséquent que les macrophages puissent être la source majeure de ces chimiokines après 9 jours d'infection.

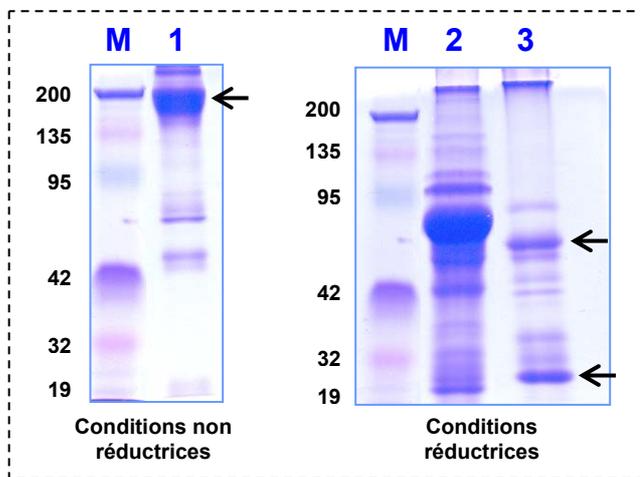


Figure 54 : Vérification de la purification des anticorps par électrophorèse en gel d'acrylamide 10% (anti-CXCR3).

- Piste M : marqueur de taille Biorad "Kaleidoscope prestained standards"
- Piste 1 : anticorps purifié anti-CXC-R3 (conditions non réductrices)
- Piste 2 : sérum du lapin immunisé avec le peptide CXC-R3 (conditions réductrices)
- Piste 3 : anticorps purifié anti-CXC-R3 (conditions réductrices).

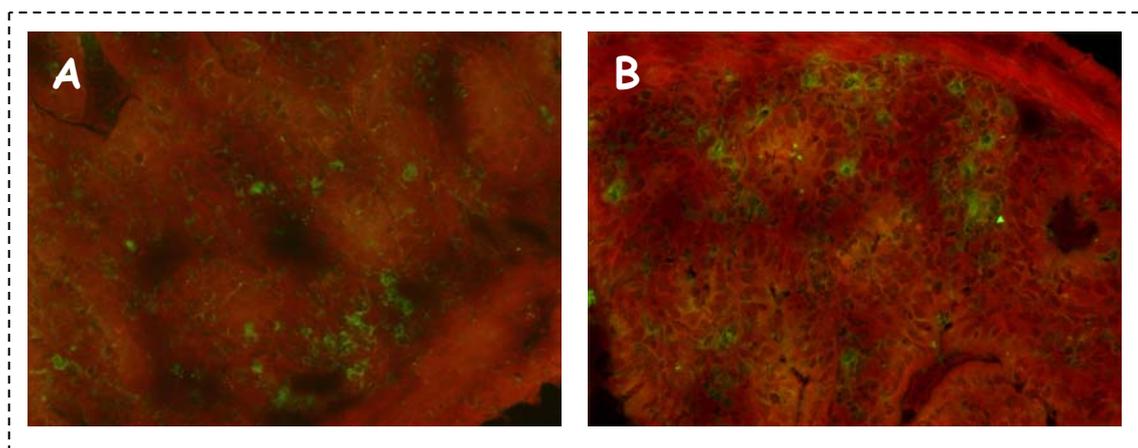


Figure 55 : Immunofluorescence sur des coupes congelées de souriceaux infectés pendant 9 jours avec les sérums de lapin spécifiques des peptides d'IP-10 (A) et de MIG (B). Grossissements $\times 200$). Après purification, les sérums de concentration approximative 10mg/ml ont été dilués 200 fois dans du PBS-saponine 0,1% et incubés 2h sur les coupes d'iléons. Après addition d'un anticorps monoclonal biotinylé (1/300 en PBS saponine 0,1 %) reconnaissant les immunoglobulines de lapin pendant 1h, et addition de l'extravidine FITC 1/200 pendant 20 min, les lames ont été observées au microscope à fluorescence.

b/ Injection des sérums aux souriceaux

Le but était de vérifier que la neutralisation des chimiokines par des anticorps pouvait inhiber le recrutement des lymphocytes T au niveau de l'intestin et pouvait, par conséquent, exacerber l'infection chez les souriceaux infectés. Une fois les anticorps purifiés et concentrés, ils ont été injectés aux souriceaux $\frac{1}{2}$ h avant leur inoculation. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, la neutralisation de l'IFN γ nécessite environ 1 à 2 mg d'anticorps. Nous avons donc choisi les concentrations d'anticorps de lapin à injecter en fonction de cette dose que l'on a modifiée proportionnellement au poids du souriceau. Dix-sept jours après l'injection des anticorps et l'inoculation, le nombre d'oocystes dans l'intestin des souriceaux a été mesuré.

Les résultats de cette première expérience montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents lots de souriceaux (Figure 56). Ni le blocage du récepteur CXCR3, ni l'inhibition d'IP-10, de MIG et d'i-TAC n'ont eu d'effet sur le niveau d'infection. Avant de conclure sur le rôle de ces chimiokines dans la protection contre la cryptosporidiose, bien que la production d'anticorps neutralisant l'IP-10 et MIG ait été décrite et publiée récemment, il faudrait vérifier que tous ces anticorps reconnaissent et neutralisent bien la protéine native. De plus, le protocole expérimental n'était peut-être pas adéquat pour mesurer un effet protecteur de ces chimiokines, peut-être aurait-il fallu injecter plus d'anticorps et à des moments différents. En effet, bien que la production d'IP-10, de MIG et d'i-TAC soit précoce, la neutralisation en début d'infection (injection des anticorps à J0) n'a peut-être pas exacerbé suffisamment l'infection pour que l'effet soit encore mesurable 17 jours après l'inoculation.

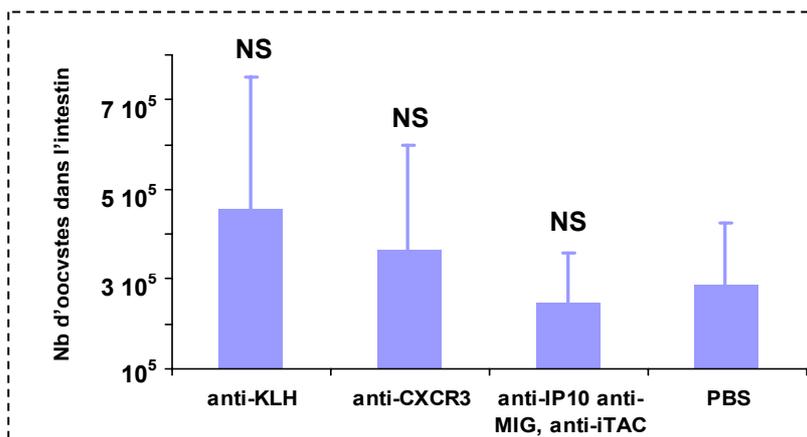


Figure 56 : Essai de neutralisation *in vivo* des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC et de leur récepteur CXCR3 chez des souriceaux infectés. $\frac{1}{2}$ h avant l'inoculation de 10^6 oocystes par souriceaux, les souriceaux âgés de 4 jours ont reçu par voie intra-péritonéale 300 μ g de sérum de lapin reconnaissant soit la KLH (n=12), soit un peptide de CXCR3 (n=10) ou 300 μ g d'un mélange de sérums reconnaissant IP-10

MIG et i-TAC (n=12). Un autre lot témoin a été inoculé et a reçu du PBS (n=10). Après 17 jours d'infection, les souriceaux ont été sacrifiés et les intestins prélevés afin de compter les oocystes dans la solution de Sheather sur cellule de Thoma. Les résultats ont été analysés statistiquement par le test U de Mann-Whitney avec un risque de 5%.

c/ Conclusion / Discussion

L'IFN γ joue un rôle essentiel dans le processus inflammatoire et le recrutement des cellules en facilitant l'expression des molécules d'adhérence telles que iCAM (Bloom *et al.*, 1995) mais aussi en stimulant la synthèse de chimiokines.

Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que l'IFN γ protégeait les souris *via* la production des chimiokines au niveau du site d'infection. D'après nos résultats de marquages immunologiques, cette production de chimiokines dépendantes de l'IFN γ protégerait *via* le recrutement de lymphocytes et de macrophages vers l'épithélium infecté. La première expérience de neutralisation *in vivo* réalisée ne nous permet pas de conclure sur un rôle de ces chimiokines dans la protection. Dans le cas d'une infection par *Toxoplasma gondii*, la neutralisation de l'IP-10 chez les souris infectées inhibe l'infiltration massive des tissus par les lymphocytes T et les fonctions effectrices des lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Cette inhibition des lymphocytes T augmente la charge parasitaire dans les tissus et augmente par conséquent la mortalité des souris (Khan *et al.*, 2000). De même, lors d'une infection neurologique par le virus MHV (coronavirus mouse hepatitis virus), la neutralisation de l'IP-10 augmente la mortalité des souris et retarde l'élimination de l'infection chez les survivants. Chez ces souris traitées avec un sérum anti-IP-10, l'infiltration du système nerveux central par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ est réduite de plus de 70% et est corrélée à une diminution de l'expression de l'IFN γ dans le cerveau (Liu *et al.*, 2000).

Hormis les problèmes liés au protocole expérimental décrits précédemment, une autre hypothèse pourrait expliquer notre résultat. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, IP-10, MIG et i-TAC ne sont peut-être pas à eux trois aussi efficaces qu'IP-10 seul lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* ou le virus MHV. En effet, il est possible que Rantes et MIP-1 β jouent également un rôle très important dans le recrutement des lymphocytes, ce qui expliquerait que l'inhibition d'IP-10, de MIG et d'i-TAC n'ait eu aucune incidence sur l'évolution de l'infection chez les souriceaux. Rantes et MIP-1 β sont deux CC chimiokines pouvant participer au recrutement des lymphocytes T mais aussi des macrophages *via* les récepteurs CCR5 et CCR1 (Weber *et al.*, 2001). De plus, la synthèse de ces 2 CC chimiokines a déjà été associée aux réponses immunitaires de type Th1 (Schrum *et al.*, 1996). Par ailleurs, une étude récente a montré que Rantes augmentait la réponse Th1 au niveau mucosal ainsi que l'expression des molécules de costimulation (CD28, CD40L) sur les lymphocytes T activés (Lillard *et al.*, 2001). Dans notre étude, nous n'avons pas vérifié si la neutralisation des chimiokines IP-10, MIG et i-TAC a effectivement empêché le recrutement des cellules inflammatoires dans l'iléon des souriceaux infectés, ou si faute d'une neutralisation efficace ou par les activités similaires de Rantes et MIP-1 β , le recrutement s'est fait correctement.

V- RÉPONSE EN CYTOKINES TH1-TH2 ET INOS

L'infection par *C. parvum* chez les souriceaux normaux induit le recrutement de lymphocytes T et de macrophages au niveau du site d'infection suggérant un rôle de ces cellules dans la protection contre la cryptosporidiose. Dans la suite de notre travail, nous avons donc étudié l'expression des cytokines qui orientent ou caractérisent une réponse de type Th1 ou Th2 dans la muqueuse intestinale des souriceaux. L'IL12 et l'IL18 sont deux cytokines induisant la production d'IFN γ par les lymphocytes T et les cellules NK (Robinson *et al.*, 1997) mais également par les macrophages lorsqu'elles agissent en synergie (Munder *et al.*, 1998). Une étude récente a montré que la production d'IFN γ par les cellules NK était stimulée par l'action de l'IL12 et la présence d'IL18 ou de CD28 *via* des mécanismes différents. L'IL12 et l'IL18 augmentent le taux de transcription du gène de l'IFN γ alors que l'IL12 et le CD28 stabilisent l'expression de l'ARNm de l'IFN γ (Walker *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été montré récemment que l'IL18 pouvait être produite par les cellules épithéliales intestinales (Takeuchi *et al.*, 1997) et dans notre modèle il semblait donc intéressant d'analyser l'expression de cette cytokine. Aucune étude n'avait décrit jusqu'ici la cinétique d'expression ou de production de ces cytokines pendant une infection à *C. parvum*.

Récemment, plusieurs études ont montré un rôle protecteur du NO contre différents agents pathogènes intracellulaires (Clark et Rockett, 1996 ; Fang, 1997 ; James, 1995). Au début de ce travail, le rôle du NO dans la cryptosporidiose était encore controversé et sa production n'avait jamais été mise en évidence de façon directe. Il semblait donc intéressant d'analyser l'expression de l'enzyme permettant la synthèse du NO, iNOS, au niveau du site d'infection chez le souriceau qui parvient à se protéger et d'envisager des études pour confirmer ou non son implication dans le contrôle de l'infection.

Enfin, afin de mettre en évidence les composants de la réponse immunitaire dépendants de l'IFN γ qui pourraient permettre l'élimination du parasite chez les souriceaux normaux, cette réponse a été comparée à celle des souris déficientes en IFN γ .

Comme pour l'analyse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des cytokines de type Th1, Th2 et de iNOS a dans un premier temps été analysée par RT-PCR qualitative puis par RT-PCR quantitative à partir d'un pool d'ARN provenant des différentes souris.

1. Chez les souris C57BL/6J normales

Chez les souris infectées pendant 4 jours, l'expression d'IFN γ et d'iNOS est fortement augmentée dans la muqueuse intestinale ($\times 250$ et $\times 125$ respectivement) (Figure 57). Par contre, l'expression de l'IL12 et de l'IL18 est inchangée chez les souris infectées par rapport aux souris témoins suggérant une surexpression de ces cytokines plus précoce ou une intervention d'autres composants du système immunitaire pour stimuler la forte réponse en IFN γ .

Chez les souris infectées pendant 9 jours, l'augmentation de l'expression des ARNm de l'IFN γ ($\times 900$) et d'iNOS ($\times 666$) est encore plus importante qu'après 4 jours d'infection. L'expression de l'IL18 ne varie toujours pas alors que celle de

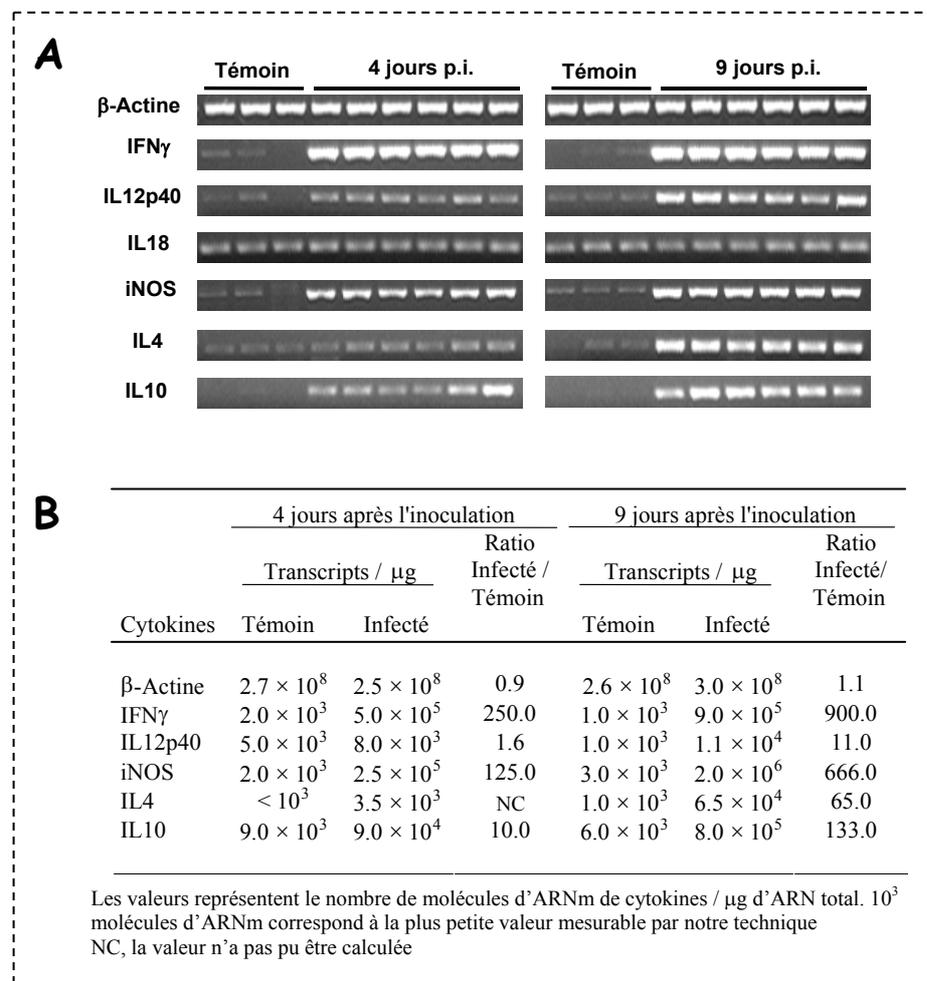


Figure 57 : Expression des cytokines Th1, Th2 et iNOS dans l'iléon des souris infectées ou non par *C. parvum* par RT-PCR qualitative (A) et RT-PCR quantitative (B). Sur la figure A est représentée la variation individuelle des souris pour l'expression des cytokines. Pour chaque réaction de PCR, 35 cycles d'amplification ont été réalisés sauf pour la β -actine (28 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

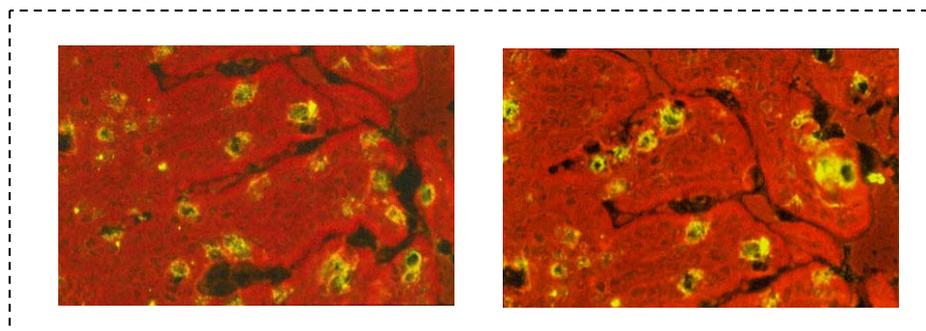


Figure 58 : Marquage par immunofluorescence des cellules produisant de l'IFN γ dans l'intestin de souriceaux infectés pendant 9 jours.

l'IL12 augmente 11 fois. Par une technique d'immunofluorescence sur des coupes congelées d'iléon de souriceaux infectés pendant 9 jours, nous avons cherché à localiser les cellules productrices d'IFN γ dans la muqueuse intestinale. Il apparaît clairement que les cellules productrices d'IFN γ se situent essentiellement près de l'épithélium intestinal ce qui suggère que les IEL ou les LPL sous-jacents aux entérocytes infectés soient les principales cellules sources d'IFN γ (Figure 58). Parallèlement à notre travail, Leitch et He ont montré par immunohistochimie que les cellules épithéliales sont les cellules qui produisent le NO suite à l'infection par *C. parvum* (Leitch et He, 1999). Nous avons complété ce travail en montrant que l'infection par elle-même n'induisait pas la surexpression d'iNOS dans les cellules épithéliales infectées. Par contre, la stimulation des cellules épithéliales par l'IFN γ pouvait induire cette surexpression (Figure 59).

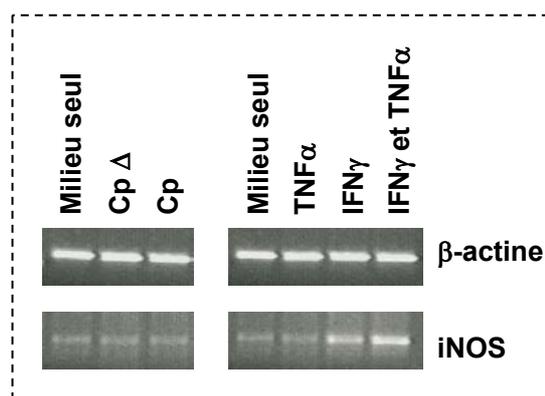


Figure 59 : Expression de iNOS par les cellules épithéliales infectées pendant 24 h avec *C. parvum* ou stimulées avec des l'IFN γ et/ou du TNF α . Les cellules sont infectées avec des oocystes de *C. parvum* à une dose de 5 oocystes/cellule ou stimulées avec les cytokines recombinantes pendant 24h. Respectivement 28 et 35 cycles d'amplification ont été réalisés pour la PCR actine et la PCR iNOS. L'augmentation de l'expression de iNOS suite à une stimulation par les cytokines recombinantes (utilisées à 10 μ g/ml chacune) a été corrélée à la production de NO produite que nous avons mesurée par le test de Griess (données non montrées). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

L'analyse de la réponse en cytokines de type Th2 dans l'iléon des souriceaux infectés montre que l'expression des gènes de l'IL4 et de l'IL10 est augmentée surtout après 9 jours d'infection (respectivement $\times 65$ et $\times 133$). Contrairement à l'IL4 dont la production avait été mise en évidence dans les IEL (Aguirre *et al.*, 1998), l'expression ou la production de l'IL10 suite à l'infection par *C. parvum* n'avait jamais été mise en évidence auparavant. Chez le veau infecté, l'expression de l'IL10 dans les LPL ou IEL ne varie pas après l'infection (Wyatt *et al.*, 2001), ce qui suggère que les cellules épithéliales puissent être la source de cette cytokine dans l'iléon des souriceaux infectés (Autschbach *et al.*, 1998) ou alors que l'expression de ce gène est régulée différemment par l'infection chez le veau ou chez la souris.

2. Chez les souris GKO

En absence d'IFN γ , la surexpression d'iNOS est très faible que ce soit 4 ou 9 jours après l'inoculation (figure 60 et 61). Ce résultat suggère que dans le cas d'une infection par *C. parvum*, la production de NO est dépendante de l'IFN γ et pas de l'infection par elle-même, ce qui est en accord avec nos données obtenues *in vitro*. De même, chez les souris déficientes en IFN γ , l'expression de l'IL12 et de l'IL18 ne varie pas après infection. L'absence de surexpression de l'IL12 chez les souris GKO peut être expliquée par le faible recrutement de macrophages observé dans l'iléon de ces souris infectées par *C. parvum*. Elle peut également être expliquée par un dérèglement de la fonction macrophagique due à l'absence congénitale d'IFN γ et à la mauvaise expression des molécules de classe II du CMH qui en découle (Dalton *et al.*, 1993).

Concernant la réponse des cytokines de type Th2, l'expression d'IL4 est augmentée 25 fois chez les souris adultes infectées pendant 9 jours par rapport aux souris témoins et la réponse en IL10 est également augmentée par l'infection malgré l'absence d'IFN γ . Généralement, l'absence d'IFN γ chez des souris GKO infectées modifie la réponse en cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺ qui augmentent leur production en cytokines de type Th2 comme l'IL4, l'IL10. Ce déplacement vers une réponse en cytokines de type Th2 a été observé chez des souris GKO infectées par *Leishmania major* et le virus *Influenza* (Graham *et al.*, 1993). Au contraire, l'infection de souris GKO par *Mycobacterium tuberculosis* et de souris IFN γ R^{-/-} par le virus pseudorabies n'a pas augmenté le niveau de production d'IL4 par rapport à celui observé chez des souris normales infectées (Flynn *et al.*, 1993 ; Schijns *et al.*, 1994).

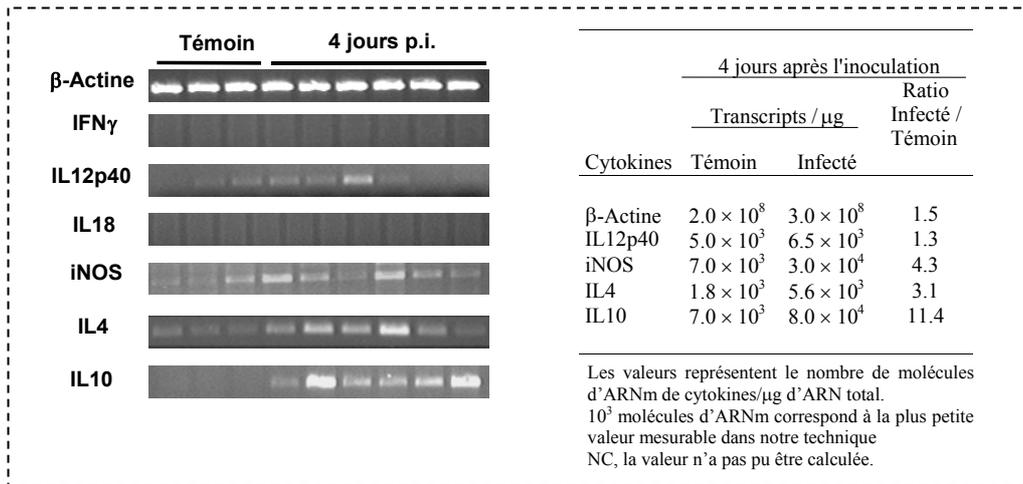


Figure 60 : Expression des cytokines Th1, Th2 et iNOS dans l'iléon des souriceaux GKO infectés pendant 4 jours. Concernant les RT-PCR qualitatives, pour chaque réaction de PCR, 35 cycles d'amplification ont été réalisés sauf pour l'actine (28 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

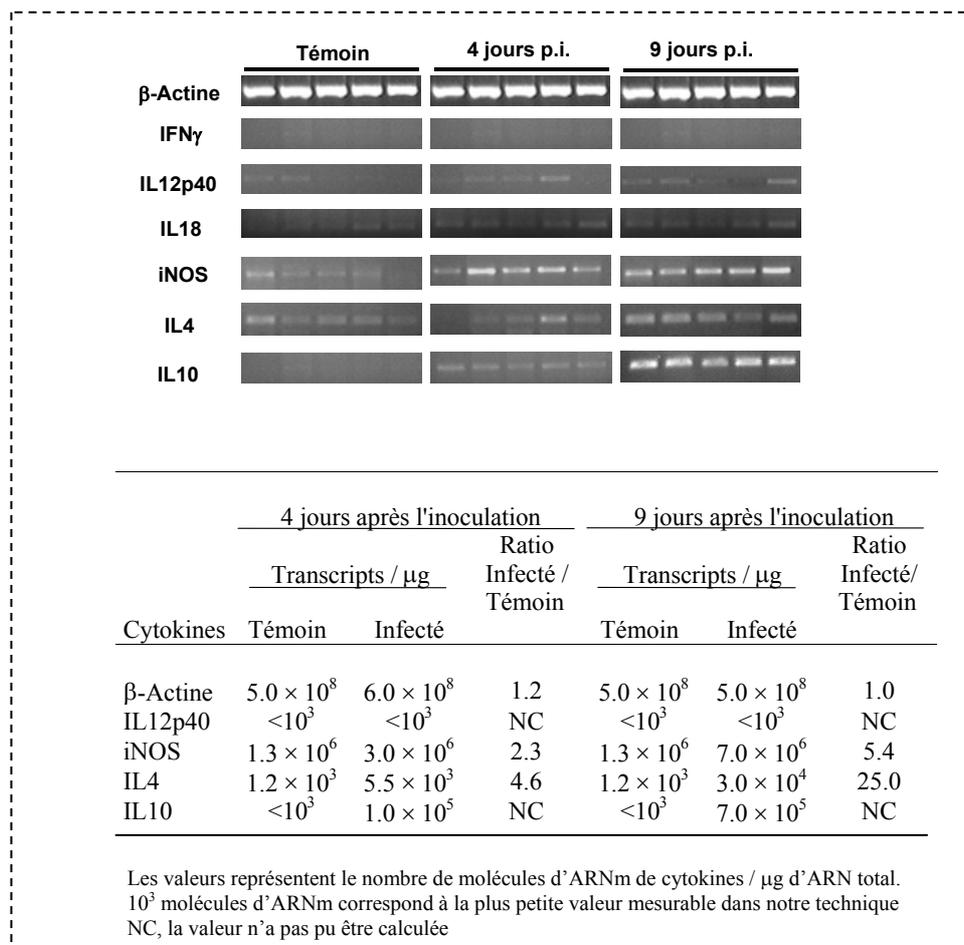


Figure 61 : Expression des cytokines Th1, Th2 et iNOS dans l'iléon des souris adultes GKO. Concernant les RT-PCR qualitatives, pour chaque réaction de PCR, 35 cycles d'amplification ont été réalisés sauf pour l'actine (28 cycles) et iNOS (chez les souris adultes GKO, 33 cycles). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

3. Conclusion et discussion

L'infection par *C. parvum* des souriceaux induit précocement une forte réponse de l'IFN γ et d'iNOS dans la muqueuse iléale. Au pic d'infection, une réponse concomitante des cytokines caractérisant une réponse de type Th1 (IFN γ , iNOS, IL12) et dans une moindre mesure des cytokines de type Th2 (IL4, IL10) a été observée. Par conséquent, la réponse en cytokines Th1/Th2 observée au niveau de l'iléon semble être similaire à celle observée dans la rate des souris infectées par *C. muris* (Tilley *et al.*, 1995). La production précoce d'IFN γ avait également été observée par Kapel *et al.* (1996) dans un homogénat d'intestin de souriceau infecté pendant 3 jours. Cette production précoce d'IFN γ suggère que les cellules de l'immunité non spécifique telles que les cellules NK puissent être la source principale d'IFN γ dès les premiers jours suivant l'infection. Un double marquage localisant les cellules NK et les cellules productrices d'IFN γ nous permettrait de vérifier cette hypothèse sur des coupes d'iléons de souriceaux infectés pendant 4 jours. Par immunofluorescence, nous avons observé que les cellules produisant de l'IFN γ chez les souriceaux infectés pendant 9 jours étaient localisées dans l'épithélium ou juste en dessous. Par conséquent, si les cellules NK sont les cellules productrices d'IFN γ en début d'infection, les IEL semblent être les cellules prenant le relais dans cette production d'IFN γ . Cet aspect de la réponse en IFN γ sera repris dans la discussion générale de ce manuscrit.

L'absence de surexpression de l'IL12 dès le 4^{ème} jour suivant l'inoculation suggère la mise en place d'une boucle de régulation "feed-back" positif entre l'IFN γ et l'IL12 qui joue un rôle prépondérant chez l'hôte pour rapidement mettre en place une réponse immunitaire protectrice dépendante de l'IFN γ . En effet, l'absence de surexpression de l'IL12 chez les souris GKO infectées par *C. parvum* va dans ce sens. Cette hypothèse peut également être confortée par l'étude de Urban dans laquelle l'injection précoce d'IL12 protège les souriceaux de l'infection par *C. parvum* alors qu'une injection plus tardive n'a plus aucun effet (Urban *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'injection d'IL12 exogène à des souris GKO ne les protège pas de l'infection ce qui suggère que la protection médiée par l'IL12 soit strictement dépendante de l'IFN γ (Smith *et al.*, 2001). Par conséquent, l'IFN γ est nécessaire pour une production optimale d'IL12 dès les premiers jours suivant l'inoculation et pour la protection induite par l'IL12.

Nous avons observé une forte induction de l'expression d'iNOS au niveau de l'iléon des souriceaux infectés. L'étude de Leitch et He a montré chez la souris pendant une infection à *C. parvum*, iNOS est produit par les cellules épithéliales de l'intestin. Bien que des bactéries entéroinvasives comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*

dublin activent directement l'expression de iNOS par les cellules épithéliales infectées *in vitro* (Witthoft *et al.*, 1998), nous avons montré que dans le cas d'une infection par *C. parvum*, la production d'iNOS par les cellules épithéliales n'était pas dépendante de l'infection par elle-même mais de l'environnement en cytokines notamment en IFN γ . Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus *in vivo* chez les souris GKO pour lesquelles une très faible surexpression d'iNOS a été observée malgré une infection sévère de l'intestin. L'IFN γ stimule la production de NO en stimulant l'expression de iNOS mais aussi celle de deux enzymes impliquées dans la synthèse de l'arginine, le substrat de iNOS (Argininosuccinate-synthetase) et d'un cofacteur de la réaction le tetra hydrobiopterin ou BH4 (GTP- cyclohydroxylase I) (Flodstrom *et al.*, 1995 ; Togari *et al.*, 1998). Dans notre modèle d'infection, la production de NO étant strictement dépendante de l'IFN γ , elle pourrait être un des médiateurs de la réponse protectrice dépendante de l'IFN γ . Des études publiées pendant cette thèse ont confirmé que le NO pouvait effectivement protéger les souriceaux de l'infection par *C. parvum* (Leitch et He, 1999). Cependant, les travaux de Pollok publiés récemment viennent de nouveau installer un doute quant au rôle protecteur du NO. En effet, ces auteurs ont montré que la production de NO par les cellules épithéliales n'était pas à l'origine de l'effet protecteur de l'IFN γ observé *in vitro* qui réduit l'invasion des cellules épithéliales par les sporozoïtes (Pollok *et al.*, 2001). Par conséquent, ces résultats conduisent à trois hypothèses : (i) le NO ne joue pas de rôle protecteur vis-à-vis de la cryptosporidiose, (ii) le NO produit par les cellules épithéliales ne joue pas de rôle protecteur vis-à-vis de la cryptosporidiose, et d'autres cellules, notamment les macrophages, sont impliquées dans la protection médiée par le NO bien que ces cellules n'aient pas été mises en évidence par les marquages histologiques, (iii) le NO produit par les cellules épithéliales n'agit pas directement sur l'invasion du sporozoïte mais stimulerait les cellules voisines à l'épithélium qui élimineraient le parasite.

D'après la réponse en cytokines de type Th2 mesurée chez les souris adultes GKO, on peut supposer que chez les souris C57BL/6 la réponse en cytokines de type Th2 ne participe pas à la protection et sert uniquement à réguler la réponse Th1 chez le souriceau. En effet, la réponse en cytokines de type Th2 observée chez les souris C57BL/6 déficientes en IFN γ ne semble pas être suffisante pour réduire l'infection à *C. parvum*. Cette hypothèse peut être confortée par l'étude de Smith qui montre une expression plus importante des cytokines de type Th2 chez les souris BALB/c GKO qui parviennent à se débarrasser de l'infection par *C. parvum* en 2 semaines, par rapport aux souris C57BL/6 GKO qui ne se protègent pas (Smith *et al.*, 2000). De plus, ces mêmes auteurs ont montré très récemment que l'injection d'IL4 exogène aux souris C57BL/6 GKO ne protège pas les souris de l'infection par *C. parvum* (Smith *et al.*, 2001). Tous ces résultats sont en faveur d'une inefficacité de l'IL4 dans la protection des souris C57BL/6 vis-à-vis de la

cryptosporidiose. Pourtant, Aguirre est parvenu à démontrer que cette cytokine de type Th2 participait à l'élimination du parasite en neutralisant l'IL4 endogène de souris C57BL/6 et en utilisant des souris C57BL/6 knock-out pour l'IL4 (Aguirre *et al.*, 1998). Par conséquent, les données actuelles concernant l'importance de la réponse en cytokines de type Th2 et notamment en IL4 pendant une infection à *C. parvum* sont contradictoires et les différents modèles murins et les différentes approches utilisés pour mettre en évidence ce rôle ne permettent pas de comparer aisément tous ces résultats.

VI- LES IEL

Les lymphocytes T sont recrutés au niveau de la muqueuse intestinale de l'iléon suite à l'infection par *C. parvum*. De par leur localisation privilégiée au sein de l'épithélium intestinal, les IEL pourraient jouer un rôle dans la réponse protectrice vis-à-vis de la cryptosporidiose. Chez les souris infectées pendant 9 jours, nous avons montré que les cellules productrices d'IFN γ dans la muqueuse iléale semblaient principalement être des IEL. Les IEL étant également une source potentielle de TNF α , il est possible que ces cellules participent à la protection vis-à-vis de *C. parvum* en produisant ces cytokines.

1. Objectif de l'étude

L'objectif principal de ce travail est d'étudier le rôle des IEL dans la protection contre *C. parvum*. Pour cela, nous avons envisagé de transférer des IEL aux souris infectées afin de les protéger. Des études de reconstitution avec des IEL de souris immunes ont permis de réduire l'infection à *C. parvum* des souris SCID receveuses (Adjei *et al.*, 2000). Cependant, aucune étude de reconstitution avec des IEL n'a été réalisée avec des souris infectées en tant que receveurs. Dans ce cas, une protection par les IEL signifierait que les souris n'ont pas suffisamment de cellules ou qu'elles ne sont pas suffisamment matures pour contrôler l'infection par *C. parvum* dès les premiers jours. Culshaw *et al.* ont montré que les IEL de l'intestin de souris infectées par *C. muris* produisaient de l'IFN γ . Après injection d'anticorps anti-IFN γ aux souris receveuses, les souris n'étaient pas protégées par les cellules transférées suggérant un rôle prépondérant de l'IFN γ produit par les IEL dans cette protection (Culshaw *et al.*, 1997). Pendant l'infection par *Toxoplasma gondii*, c'est l'IFN γ des souris recevant les IEL CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ qui semble important et non pas l'IFN γ produit par les IEL transférés (Buzoni-Gatel *et al.*, 1997). En effet, que les IEL proviennent de souris GKO infectées ou de souris normales infectées, le transfert est toujours efficace pour protéger (Lepage *et al.*, 1998). Nous avons voulu vérifier si pendant une infection par *C. parvum*, le même phénomène était observé.

2. Schéma expérimental

Le schéma expérimental pour déterminer le rôle de l'IFN γ produit par les IEL dans la protection vis-à-vis de *C. parvum* est représenté dans la figure 62. Dans le cas de la cryptosporidiose, pour pouvoir répondre à cette question, la difficulté majeure qui se présente à nous est de trouver un modèle murin donneur d'IEL activés par l'infection. En effet, ce donneur d'IEL ne doit pas être génétiquement modifié pour un des composants du

système immunitaire et doit développer une infection suffisante pour permettre une activation spécifique des IEL ainsi que leur recrutement.

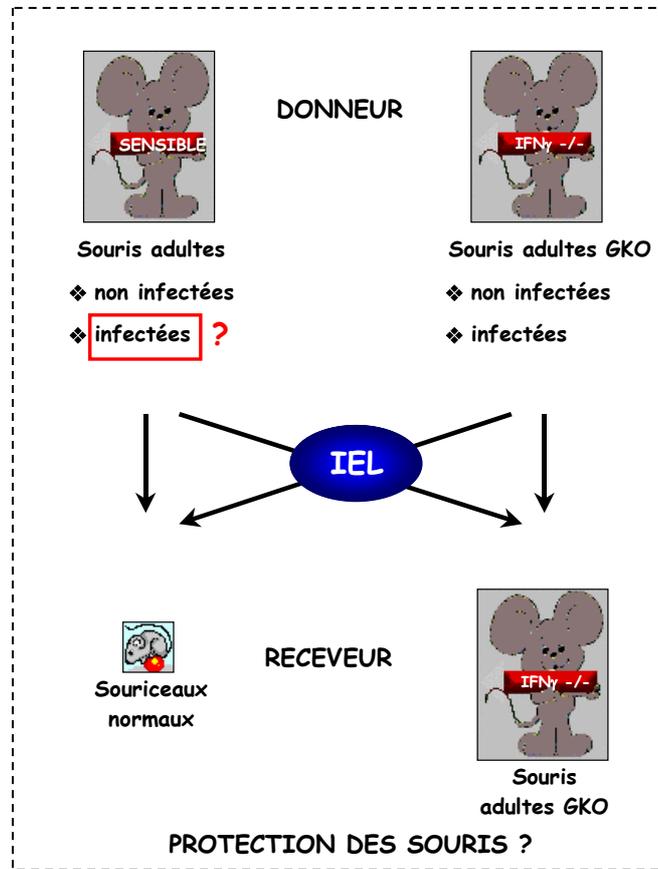
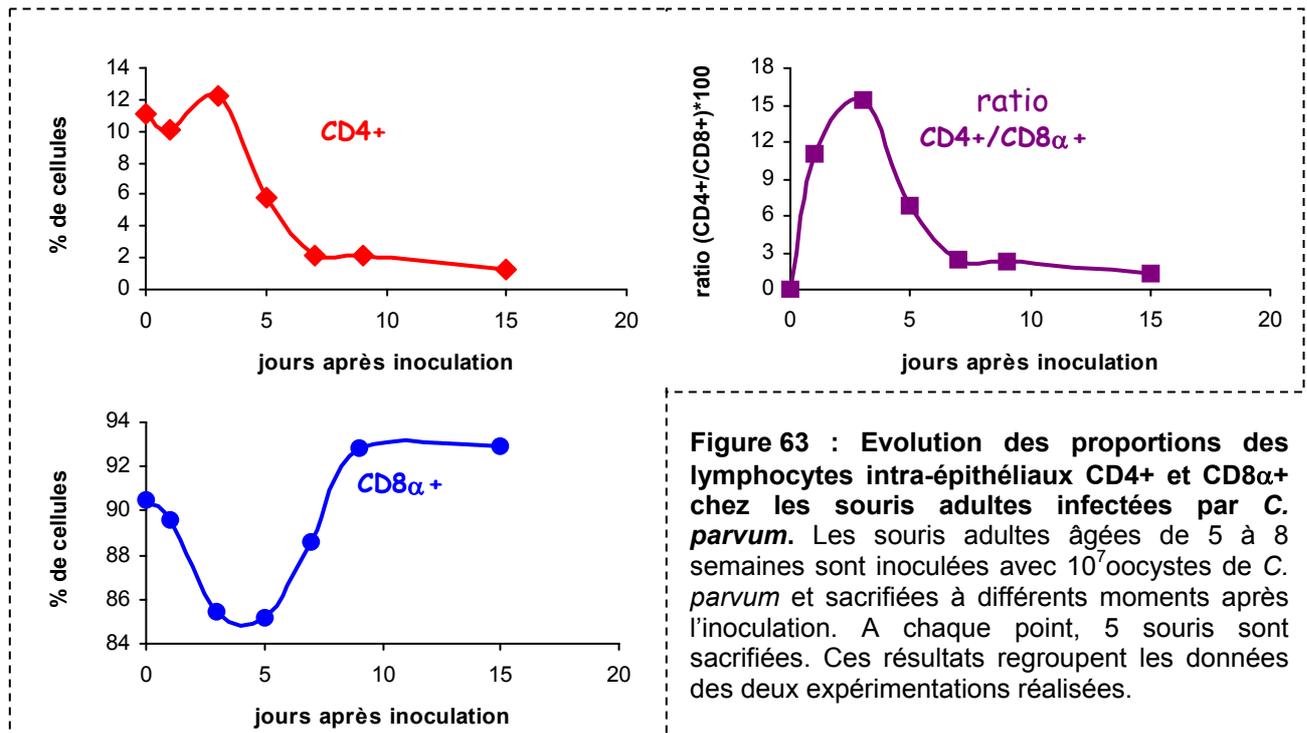


Figure 62 : Schéma expérimental pour déterminer le rôle de l'IFN γ produit par les IEL dans la protection vis-à-vis de *C. parvum*.

Les souris adultes infectées par *C. parvum* contrôlent le développement de l'infection. Nous avons fait l'hypothèse que les IEL qui sont les cellules immunitaires en contact étroit avec les cellules infectées pouvaient être responsables de cet effet. Pour cela, nous avons étudié le recrutement et la nature des différentes populations lymphocytaires au cours de l'infection. Nous avons extrait les IEL de l'intestin des souris adultes inoculées et réalisé des marquages de surface avec des anticorps reconnaissant les cellules CD8⁺ et CD4⁺ avant de les analyser au FACS.

Les pourcentages d'IEL CD4⁺ et CD8⁺ sont légèrement modifiés après l'inoculation des souris adultes suggérant une implication de ces cellules lors de l'infection par *C. parvum* (Figure 63). Jusqu'à 4 jours après l'inoculation, le pourcentage de cellules CD4⁺ se maintient alors que le pourcentage de cellules CD8⁺ diminue légèrement. Au contraire après 4 jours, le pourcentage de cellules CD4⁺ diminue et le pourcentage de

cellules CD8⁺ augmente pour atteindre son niveau de base. Si aucun test statistique n'a été réalisé pour attester des différences significatives, des tendances identiques ont été observées dans deux expérimentations différentes suggérant un rôle des IEL CD8⁺ dans la protection contre *C. parvum*. Faute de temps, nous n'avons pas analysé l'expression d'IFN γ ou de TNF α par ces cellules, ni l'activation spécifique vis-à-vis de *C. parvum*.



Par conséquent, nos données actuelles ne nous permettent pas de décider si les souris adultes infectées par *C. parvum* sont un bon donneur d'IEL activés ou non. Parallèlement à ce travail, des études sont en cours pour trouver le modèle de souris adultes adéquat pour tester notre hypothèse de départ.

- (i) La première possibilité est d'utiliser des souris adultes infectées par *C. parvum* grâce à la neutralisation de l'IFN γ endogène. Nous possédons au laboratoire le clone d'hybridome produisant l'anticorps monoclonal anti-IFN γ de souris XMG1.2 et nous sommes en train de produire l'anticorps de façon à l'injecter à des souris adultes comme décrit dans la littérature (Aguirre *et al.*, 1998 ; Theodos *et al.*, 1997). Notre hypothèse est que le développement de l'infection chez ces souris induira l'activation et le recrutement des IEL que nous récupérerons pendant la phase de guérison des souris. La difficulté majeure de cette approche est de produire suffisamment d'anticorps en culture pour réaliser différents essais de neutralisation de l'IFN γ chez les souris.

- (ii) La seconde possibilité est de vérifier que les souris F1 hétérozygotes issues du croisement [adulte GKO × adulte normale] présente un phénotype de sensibilité à l'infection par *C. parvum* intermédiaire par rapport à celui des souris adultes normales et celui des souris GKO. Ainsi, le développement de l'infection permettrait l'activation et le recrutement d'IEL ayant conservé leur capacité à produire de l'IFN γ .

3. Essai préliminaire

Pour répondre à la question "l'IFN γ des IEL est-il indispensable à la protection ?" différentes conditions expérimentales doivent être testées. En attendant de trouver les donneurs d'IEL activés par l'infection par *C. parvum* qui sont toujours capables de produire de l'IFN γ , nous avons fait des essais de transfert d'IEL provenant de souris GKO infectées ou non infectées à des souriceaux (Figure 64). L'hypothèse était que si l'IFN γ des IEL n'était pas nécessaire pour conférer une protection chez les souriceaux et que seule la production d'IFN γ endogène consécutive au transfert de cellules était nécessaire alors les souriceaux se protégeraient plus rapidement de l'infection à *C. parvum*.

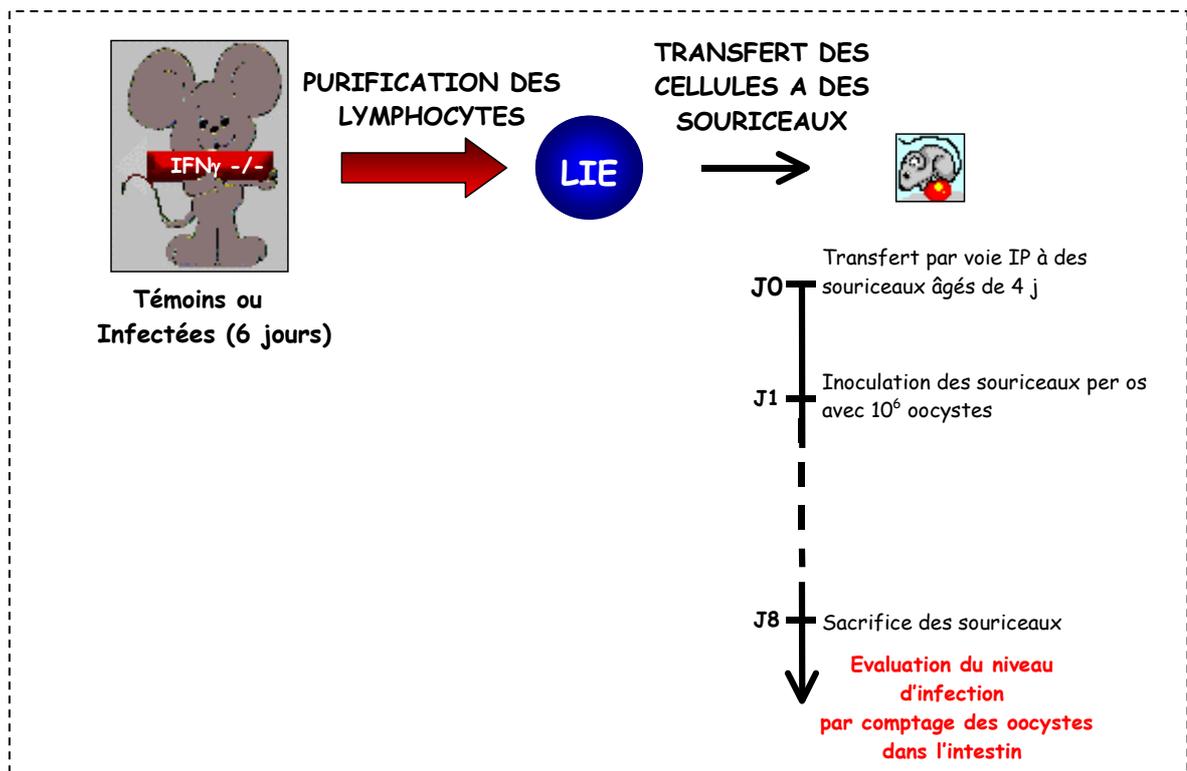


Figure 64 : Protocole de transfert de lymphocytes intra-épithéliaux à des souriceaux. Les IEL de souris GKO adultes témoins et de souris adultes GKO infectées pendant 6 jours avec *C. parvum* sont extraits de l'intestin. Après purification et tri magnétique des cellules CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$, 5×10^5 d'IEL sont injectés par voie intra-péritonéale à des souriceaux âgés de 4 jours. Le lendemain, les souriceaux sont inoculés avec 10^6 oocystes. Huit jours après l'injection des IEL, les souriceaux sont sacrifiés et les intestins prélevés pour compter les oocystes.

Les résultats de l'expérience réalisée ne nous ont pas permis de vérifier l'hypothèse sur l'effet de l'IFN γ endogène. En effet, il n'y a pas de différence significative sur le nombre d'oocystes trouvés dans l'intestin entre les trois différents lots de souriceaux (lot de souriceaux inoculés, lot de souriceaux inoculés et reconstitués avec des IEL de souris adultes GKO témoins et lot de souriceaux inoculés et reconstitués avec des IEL de souris adultes GKO infectées) (Figure 65). De plus, n'ayant pas de témoins positifs pour cette expérience, il est difficile d'affirmer que l'hypothèse de départ était inexacte. Toutefois, on peut s'interroger sur l'efficacité du protocole lui-même notamment sur le nombre de cellules injectées, sur la voie d'injection. Les différentes études réalisées dans le modèle *Toxoplasma gondii* utilisent préférentiellement la voie intraveineuse (Buzoni-Gatel *et al.*, 1999 ; Buzoni-Gatel *et al.*, 1997), cependant dans notre modèle de souris nouveau-nées seule la voie intra-péritonéale est envisageable.

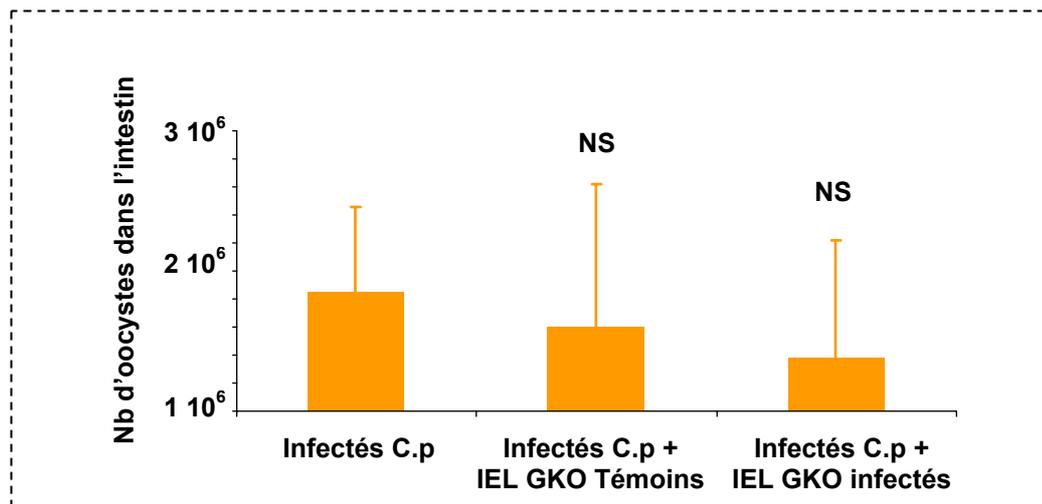


Figure 65 : Résultats du transfert d'IEL à des souriceaux infectés par *C. parvum*. Vingt souris adultes GKO témoins et 20 souris infectées ont été nécessaires pour extraire les IEL. Le lot de souriceaux receveurs d'IEL de souris GKO témoins contenait 9 souriceaux. Le lot de souriceaux receveurs d'IEL de souris GKO infectées contenait 5 souriceaux. Enfin, le lot de souriceaux infectés ne recevant pas de cellules était composé de 8 souriceaux. Les données ont été analysées par le test statistique de Kruskal et Wallis.

4. Conclusion / Discussion

Ce travail visant à étudier le rôle des IEL dans la protection des souriceaux infectés par *C. parvum* a été initié récemment et nécessite de nombreuses expériences supplémentaires pour répondre à la question posée.

La difficulté majeure dans ce travail est de se procurer des IEL de souris adultes infectées capables de produire de l'IFN γ . Nos études actuelles se consacrent à résoudre ce problème en utilisant les souris et le matériel que nous avons à notre disposition au laboratoire. Pour pallier cette difficulté, on pourrait également envisager l'utilisation de souris knock-out pour le récepteur de l'IFN γ .

En faisant abstraction des problèmes liés aux protocoles expérimentaux et en se référant à l'étude de Buzoni-Gatel dans le modèle murin de Toxoplasmose, nos premiers résultats peuvent suggérer que l'IFN γ endogène produit dans l'iléon des souriceaux infectés interagissant avec les IEL de souris GKO transférés ne suffit pas à les protéger. D'un autre côté, nous n'avons pas encore vérifié si les IEL de souris adultes non infectées pouvaient réduire l'infection chez les souriceaux receveurs comme l'a montré Adjei chez les souris SCID (Adjei *et al.*, 2000). Dans le cas d'une protection, cela signifierait que les IEL sont activés *in situ* et peuvent produire plus d'IFN γ permettant la protection des souriceaux.

Les interprétations des expériences de transferts de cellules dans des souris nouveau-nées doivent toutefois être faites avec précautions. En effet, bien que le transfert de cellules provenant de souris adultes protège les souriceaux d'une infection par le virus Herpes simplex (Kohl *et al.*, 1986), il semble que les transferts de cellules ne sont pas toujours aussi efficaces. Nous reviendrons plus longuement sur l'originalité et l'adéquation du modèle souriceaux dans l'étude de la réponse immunitaire à *C. parvum* dans la discussion générale de ce manuscrit.

Cryptosporidium parvum est un protozoaire se développant dans les cellules épithéliales intestinales des mammifères. Les cellules épithéliales sont des cellules sentinelles, capables de répondre à l'infection par *C. parvum* en stimulant les défenses immunitaires de l'hôte à la fois innées et spécifiques. Malgré sa localisation extracytoplasmique, les mécanismes immunitaires induits par le parasite semblent similaires à ceux des autres agents pathogènes intracellulaires. Parmi ces mécanismes, l'IFN γ joue un rôle prépondérant dans la protection contre *C. parvum*. Chez le souriceau infecté, la cinétique de production iléale de l'IFN γ associée à la résolution de l'infection a conduit Kapel et ses collaborateurs à suggérer que la production d'IFN γ soit une première étape dans le développement d'une réponse cellulaire protectrice (Kapel *et al.*, 1996). De même, chez l'homme, l'expression d'IFN γ mise en évidence dans la muqueuse intestinale de sujets volontaires infectés par *C. parvum*, a été associée à la résistance à l'infection (White *et al.*, 2000). Par ailleurs, un consensus semble se dégager de toutes les études réalisées sur souris par des techniques de neutralisation de l'activité de l'IFN γ ou l'utilisation de souris knock-out pour cette cytokine, pour affirmer que l'IFN γ est une cytokine majeure dans la résistance et la protection contre *C. parvum* (Chen *et al.*, 1993a ; Theodos *et al.*, 1997 ; Urban *et al.*, 1996 ; You et Mead, 1998). Cependant, les mécanismes effecteurs de cette cytokine permettant l'élimination du parasite sont encore mal connus. **Dans ce travail de thèse, nous avons donc essayé de comprendre comment cette cytokine régulait la réponse immunitaire de l'hôte et permettait le contrôle de l'infection par *C. parvum*.**

Cette discussion générale est composée de deux grandes parties. Les mécanismes utilisés par l'IFN γ pour protéger l'hôte de *C. parvum* dont nous n'avons pas discuté auparavant seront abordés dans une première partie. Dans la seconde partie, nous tenterons de mieux comprendre le rôle des lymphocytes T dans cette protection et nous discuterons de la nécessité d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique ou non. Dans chacune des deux parties, les particularités du modèle des souris nouveau-nées seront discutées afin de mieux comprendre par quels mécanismes de défense immunitaire les sujets, dont le système immunitaire est en cours de maturation, parviennent à se protéger.

I- RÔLE DE L'IFN γ

Bien que la production d'IFN γ chez les nouveau-nés soit inférieure à celle des adultes (Garvy et Qureshi, 2000 ; Jones et Warner, 1999 ; Wilson *et al.*, 1986), elle est suffisante chez les souriceaux pour permettre l'élimination de *C. parvum* en 3 semaines. En effet, nous avons montré qu'en absence d'IFN γ , les souriceaux GKO ne survivent pas après 9 jours d'infection. Par ailleurs, l'approche de neutralisation de l'IFN γ endogène utilisée par Urban *et al.*, a également montré que cette cytokine était nécessaire à la protection des souriceaux (Urban *et al.*, 1996). Plusieurs données suggèrent que l'IFN γ n'agisse pas directement pour protéger de l'infection par *C. parvum*. Nous avons montré que l'évolution de l'infection chez les souriceaux normaux et les souriceaux GKO était similaire pendant les 7 premiers jours suivant l'infection. De plus, l'injection d'IFN γ recombinant aux souriceaux SCID 3 jours avant leur inoculation n'est pas suffisante pour modifier la sensibilité des souriceaux à l'infection. Pourtant, dans le cas d'une infection par *Listeria monocytogenes* une injection d'IFN γ recombinant est suffisante pour protéger des souris nouveaux-nées de l'infection (Chen *et al.*, 1989). Toutes ces données sont en faveur d'un rôle principalement indirect de l'IFN γ dans la protection à *C. parvum*.

L'IFN γ est une cytokine à effets pleïotropes. Outre ses activités anti-virale et anti-tumorale, cette cytokine est un important régulateur de la réponse immunitaire. En effet, elle est capable d'orchestrer un grand nombre de programmes cellulaires tels que la présentation de l'antigène *via* la régulation de l'expression des molécules de classe II du CMH, les interactions leucocytes/endothélium *via* la régulation des molécules d'adhérence, la cascade du complément (Volanakis, 1995) et bien d'autres... (Boehm *et al.*, 1997). Dans ce travail de thèse, nous avons montré que l'IFN γ augmentait l'expression de TNF α et des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, MIP-1 β et Rantes dans l'iléon des souriceaux C57BL/6 infectés par *C. parvum*. Par ailleurs, nous avons pour la première fois mis en évidence que le TNF α pouvait participer à la protection des souris infectées par *C. parvum* (Figure 66).

1. Rôle de l'IFN γ dans la présentation de l'antigène

L'IFN γ favorise la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices en augmentant l'expression de différents gènes dont les produits jouent des rôles distincts dans les processus de présentation de l'antigène. Dans le processus de présentation de l'antigène par les molécules de classe I du CMH, l'IFN γ augmente l'expression de la protéine TAP qui transporte les peptides du cytosol vers le réticulum endoplasmique de la cellule pour les fixer aux molécules de classe I du CMH (Trowsdale *et al.*, 1990). Cette cytokine régule également positivement l'expression de la β 2 microglobuline et de

certaines sous-unités β du protéasome (Groettrup *et al.*, 1996 ; Johnson et Pober, 1990). Concernant la présentation de l'antigène *via* les molécules de classe II du CMH, l'expression des molécules de classe II et de la chaîne invariante Li est exclusivement dépendante du facteur de transcription CIITA qui est inductible par l'IFN γ (Mach *et al.*, 1996). Sous l'effet de l'IFN γ , les cellules épithéliales expriment les molécules nécessaires à la présentation de l'antigène à savoir les molécules de classe II du CMH et les molécules de co-stimulation CD40 et B7. Toutefois, une étude très récente a suggéré que lors d'une infection par *C. parvum*, la présentation de l'antigène ne se faisait probablement pas par les cellules épithéliales (Hayward *et al.*, 2001). En effet, comme le transfert de cellules de moelle osseuse de souris naïves protège les souris CD40 $^{-/-}$ de l'infection par *C. parvum*, l'absence d'expression de CD40 par les cellules épithéliales semble ne pas empêcher la résolution de l'infection. Par conséquent, les lymphocytes B, les cellules dendritiques ou les macrophages exprimant le CD40 sont nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice (Hayward *et al.*, 2001). Cette étude peut conforter l'hypothèse de Madara qui suggérait une initiation de la réponse immunitaire *via* les macrophages sous-jacents aux cellules M et nous incite également à poursuivre nos travaux sur l'initiation de la réponse immunitaire.

2. Rôle de l'IFN γ dans l'apoptose

L'IFN γ peut intervenir à différents niveaux dans les mécanismes apoptotiques puisqu'il est capable de réguler un certain nombre de facteurs intervenant dans ce processus. En effet, l'expression de Fas (Itoh *et al.*, 1991) et du récepteur au TNF transduisant un signal d'apoptose à la cellule est dépendante de l'IFN γ (Tannenbaum *et al.*, 1993 ; Tsujimoto *et al.*, 1986). Par ailleurs, l'IFN γ est capable d'augmenter l'expression de certaines caspases, dont la caspase 1 ou ICE, les caspases 3 et 8 (Chin *et al.*, 1997 ; Dai et Krantz, 1999).

Au niveau de l'intestin, différentes études ont décrit un rôle de l'IFN γ dans l'apoptose des cellules épithéliales permettant l'élimination des cellules sénescents ou des cellules infectées. Watanabe *et al.* ont montré que le NO produit par les cellules épithéliales suite à l'infection *in vitro* par *Helicobacter pylori* induit l'apoptose des cellules infectées. Cette apoptose est plus sévère quand les cellules sont pré-traitées avec de l'IFN γ et du TNF α (Watanabe *et al.*, 2000). *In vivo*, l'apoptose des cellules épithéliales induite par l'IFN γ résulte de la capacité de cette cytokine à induire l'expression sur les cellules épithéliales des molécules cibles impliquées dans les mécanismes de cytotoxicité utilisés par les IEL (Fas et TNFR), mais aussi de son activité directe pour induire l'apoptose des cellules épithéliales (Guy-Grand *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'IFN γ a la capacité

d'augmenter l'expression de CD40 sur les macrophages, les lymphocytes B ou les cellules épithéliales or l'interaction CD40-CD40L est associée à des mécanismes d'apoptose (Hess et Engelmann, 1996). Ce mécanisme d'apoptose a déjà été décrit pour les cellules épithéliales infectées *in vitro* par *C. parvum* (Cosyns *et al.*, 1998). D'après les différentes études réalisées *in vitro*, l'infection par *C. parvum* par elle-même suffit à induire l'apoptose des cellules épithéliales. Toutefois, on peut imaginer qu'*in vivo*, une synergie entre l'IFN γ , le TNF α et le NO favorise l'apoptose au niveau de l'épithélium intestinal des souris pour permettre l'élimination du parasite.

*Toutes ces données montrent que les mécanismes utilisés par l'IFN γ pour conférer une protection aux souris infectés par *C. parvum* sont divers et probablement complémentaires. Cependant, d'après la littérature, il semble que **la production d'IFN γ et la présence des lymphocytes T CD4+** soient toutes deux nécessaires à la protection des nouveau-nés infectés par *C. parvum*. Cela signifie-t-il que les cellules productrices sont exclusivement les lymphocytes T CD4+, ou existe-t-il une activation et/ou une régulation mutuelle de cette cytokine et des lymphocytes T CD4+ permettant une protection efficace vis-à-vis de la cryptosporidiose ?*

II- RÔLE DES LYMPHOCYTES T

Plusieurs approches ont permis de mettre en évidence le rôle primordial des lymphocytes et surtout des lymphocytes T CD4⁺ dans la cyptosporidiose : la neutralisation par des anticorps, les souris knock-out ou encore les transferts de cellules (McDonald *et al.*, 1994 ; McDonald *et al.*, 1996 ; Ungar *et al.*, 1990a ; Ungar *et al.*, 1991). D'après les résultats de cette thèse, l'expression des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, Rantes et MIP-1 β augmentée dans l'iléon suite à l'infection par *C. parvum* semble être indispensable au recrutement des lymphocytes T et des macrophages nécessaires à la protection. Cependant, face à la protection induite par la reconstitution des souris SCID avec des cellules lymphoïdes provenant de souris naïves, on peut s'interroger sur la nécessité d'une spécificité des lymphocytes vis-à-vis de l'antigène ou sur la participation de l'environnement intestinal dans l'activation des lymphocytes transférés.

1. Les cellules productrices d'IFN γ

L'infection par *C. parvum* induit une production locale et systémique d'IFN γ . Nous avons montré que, dans la muqueuse intestinale des souriceaux infectés depuis 9 jours, la localisation des cellules productrices d'IFN γ était intra ou sub-épithéliale. Ce résultat est en accord avec ceux des études *ex-vivo* montrant que les IEL de souris et de veaux infectés pouvaient être une source d'IFN γ (Canals *et al.*, 1998 ; Wyatt *et al.*, 1997). Chez le veau, les LPL peuvent également produire de l'IFN γ en réponse à l'infection (Canals *et al.*, 1998 ; Wyatt *et al.*, 2001). Cependant, d'après la localisation strictement épithéliale des cellules productrices d'IFN γ observées chez les souriceaux infectés, on peut s'interroger sur la participation des LPL dans cette production d'IFN γ à moins qu'ils n'aient migré vers l'épithélium suite à la production de cytokines pro-inflammatoires ou de chimiokines par les cellules épithéliales. Des marquages *in situ* associant un marquage intracellulaire de l'IFN γ et un marquage membranaire de l'une ou l'autre des intégrines αE et $\alpha 4$ pourraient en partie attester du rôle des LPL ou des IEL dans cette production d'IFN γ . En effet, environ 90% des IEL expriment $\alpha E\beta 7$ alors que seulement 30-40% des LPL expriment cette intégrine (Cerf-Bensussan *et al.*, 1987 ; Schieferdecker *et al.*, 1990). Au contraire, seulement 30% des IEL expriment $\alpha 4\beta 7$ contre plus de 70% des LPL (Farstad *et al.*, 1996).

Par ailleurs, la population d'IEL constituée à 90% de lymphocytes T CD8⁺ contient une population particulière de cellules productrices d'IFN γ qui exprime à la fois les marqueurs des lymphocytes T et ceux des cellules NK. Ces cellules, appelées NKT, possèdent des fonctions cytotoxiques *via* la production de perforine et de FasL. Contrairement aux cellules NK "classiques", cette activité cytotoxique n'est pas régulée

négativement par des signaux délivrés par la reconnaissance des molécules de classe I du CMH (Guy-Grand *et al.*, 1996). L'activation de ces cellules ne nécessite pas obligatoirement l'engagement du TCR, et une stimulation par l'IL12 et l'IL18 est suffisante pour induire la production d'IFN γ et stimuler les fonctions cytotoxiques de ces cellules (Leite-De-Moraes *et al.*, 1999). Ces cellules pourraient également correspondre à la population d'IEL produisant de l'IFN γ lors de l'infection par *C. parvum*.

Toutes ces populations de cellules immunitaires intra-épithéliales sont généralement des lymphocytes T CD8+. Le grand nombre de cellules productrices d'IFN γ observé en immunofluorescence ne semble pas correspondre aux 10% des IEL de phénotype T CD4+. Cette observation soulève deux hypothèses : (i) les lymphocytes T CD8+ produisent l'IFN γ au niveau du site d'infection qui stimule ensuite les lymphocytes T CD4+ (ii) les cellules productrices d'IFN γ sont les lymphocytes T CD4+ de la lamina propria qui, pour libérer la cytokine au plus près de la cellule infectée, ont migré vers l'épithélium. Des études complémentaires sont nécessaires pour bien comprendre le rôle de l'IFN γ produit au niveau du site d'infection dans la protection vis-à-vis de *C. parvum*.

2. La réponse spécifique de l'antigène est-elle importante dans la cryptosporidiose ?

Le transfert adoptif par injection intraveineuse de cellules de rate provenant de souris naïves immunocompétentes a entraîné la protection des souris SCID (Chen *et al.*, 1993a ; McDonald *et al.*, 1994). Plus récemment, le transfert d'IEL de souris naïves a également réduit l'infection chez les souris SCID (Adjei *et al.*, 2000). D'après ces données, on peut s'interroger sur la nécessité d'une réponse spécifique de l'antigène par les lymphocytes dans la protection vis-à-vis de la cryptosporidiose.

a/ Spécificité

Dans le cas d'une infection par *Toxoplasma gondii*, seul le transfert d'IEL provenant de souris immunisées protège (Buzoni-Gatel *et al.*, 1997). Cette protection, restreinte aux molécules du CMH, est spécifique de l'antigène puisque les IEL CD8+ TCR $\alpha\beta$ de souris infectées sont cytotoxiques uniquement envers les macrophages et les entérocytes préalablement infectés avec *T. gondii* (Chardes *et al.*, 1994). Pendant une infection à *C. parvum*, les mécanismes protecteurs mis en place par l'hôte semblent être différents de ceux décrits ci-dessus. En effet, chez les souris SCID, incapables de générer une réponse immunitaire spécifique de l'antigène, il semble que le transfert de lymphocytes T CD4+ naïfs suffise à protéger les souris. Lukin *et al.* ont montré que des souris transgéniques pour un récepteur T spécifique de l'ovalbumine de fond génétique RAG $^{-/-}$ infectées par *C. parvum* éliminent le parasite en 6 semaines alors que les souris

témoins RAG^{-/-} non transgéniques restent chroniquement infectées. Cette protection a été associée à une augmentation du nombre de lymphocytes T de phénotype CD44^{high}, caractéristiques de cellules mémoires dans la rate (Lukin *et al.*, 2000). Par conséquent, en absence de défense immunitaire spécifique, la protection des souris contre *C. parvum* nécessite l'activation de lymphocytes T mais pas obligatoirement une spécificité de ces cellules.

b/ Environnement intestinal

L'environnement de l'intestin infecté par *C. parvum* semble être suffisant pour activer les lymphocytes T et permettre la protection des souris SCID reconstituées.

• *Les IEL*

Les caractéristiques particulières d'activation inhérentes aux IEL peuvent expliquer cette activation *in situ*. En effet, les antigènes de stress exprimés par les cellules épithéliales (Boismenu *et al.*, 1996) ou la production d'IL15 par les entérocytes (Hirose *et al.*, 1998) suffisent à activer les IEL qui produiront davantage d'IFN γ et exerceront leur activité cytotoxique. Dans notre projet concernant le rôle des IEL dans la cryptosporidiose, nous avons prévu de transférer des IEL de souris naïves à des souriceaux infectés. Si l'hypothèse d'une activation *in situ* des IEL naïfs est correcte, alors l'infection chez les souriceaux sera réduite par ce transfert d'IEL. Dans l'autre cas, on pourra remettre en question la notion de spécificité des lymphocytes T chez les souriceaux infectés ou s'interroger sur l'efficacité du système immunitaire du nouveau-né. En effet, d'après la littérature, il semble que les lymphocytes T des nouveau-nés nécessitent des signaux d'activation différents des lymphocytes d'adulte. Alors que la stimulation des lymphocytes T d'adultes avec un anti-CD2 induit une forte réponse proliférative et une importante production d'IL2, elle n'a aucune incidence pour les lymphocytes T des nouveau-nés, ce qui conduit à une faible prolifération et une production d'IL2 minimale. Par contre, cette déficience chez les souriceaux peut être compensée par l'engagement des molécules costimulatrices comme CD28. La stimulation des lymphocytes T *via* l'interaction par le CD28 joue donc un rôle important dans l'expansion et la génération de réponse immunitaire chez le nouveau-né (Hassan *et al.*, 1995).

• *Les splénocytes*

L'activation *in situ* des cellules de rate transférées aux souris SCID passe probablement par un autre mécanisme que celui des IEL de par leur différence ontogénique. Cosyns *et al.* ont montré que l'environnement intestinal infecté par *C. parvum* suffisait à activer les cellules T transférées permettant la protection des souris SCID de l'infection. En effet, le transfert de splénocytes provenant d'une souris RAG^{-/-}

transgénique pour un TCR de l'ovalbumine protège les souris SCID infectées par *C. parvum*. Dans les souris SCID reconstituées, les lymphocytes acquièrent un phénotype de cellules activées (Lukin *et al.*, 2000). Par conséquent, l'environnement intestinal infecté est nécessaire à l'activation de ces lymphocytes mais il est aussi, au préalable, nécessaire pour attirer ces cellules au niveau du site d'infection. En effet, ces mêmes auteurs ont montré que les cellules transgéniques injectées par voie intraveineuse recirculaient dans l'intestin des souris infectées alors qu'elles ne sont pas retrouvées dans l'intestin des souris non infectées. Nos résultats montrant la forte expression mucosale des chimiokines en réponse à l'infection pourraient expliquer cette observation. Pour comprendre les mécanismes d'activation *in situ* des cellules transférées, et notamment pour étudier l'interaction CD40-CD40L dans l'activation des cellules transférées, des lymphocytes T provenant de souris CD40L^{-/-} transgéniques pour un récepteur T de l'ovalbumine ont été transférés aux souris SCID infectées. Le transfert de ces cellules n'a pas protégé les souris reconstituées, ce qui suggère que l'interaction CD40-CD40L soit importante dans cette activation *in situ* des lymphocytes. CD40L est un puissant inducteur de la production d'IL12 par les macrophages et les cellules dendritiques (Kato *et al.*, 1996 ; Kelsall *et al.*, 1996). Lorsqu'il se lie à son ligand, le CD40, il permet d'envoyer un message afférent à la cellule *via* une tyrosine kinase entraînant l'augmentation de la production d'IFN γ (McDyer *et al.*, 1998). Ceci peut expliquer la protection des souris SCID reconstituées avec des lymphocytes T de rate non spécifiques de *C. parvum*.

L'étude de Lukin et al. (2000) montre que les lymphocytes T et notamment les lymphocytes T CD4⁺ protègent les souris SCID de l'infection par C. parvum d'une manière non spécifique faisant intervenir une interaction CD40/CD40L. On peut supposer que la production d'IFN γ résultant de cette interaction est responsable de la protection suggérant que ces cellules soient une source d'IFN γ pendant une infection à C. parvum. Ces résultats ne sont pas en faveur d'une participation des IEL CD8⁺ ou des cellules NK et NKT dans la protection via la production d'IFN γ dans l'intestin. Toutefois, ils n'excluent pas l'hypothèse d'un rôle de ces cellules en tant que cellules sources d'IFN γ (après une coopération avec des lymphocytes T CD4⁺ ou non) puisque l'approche et le modèle de souris SCID utilisés ne permettent pas de la vérifier.

3. Transfert de cellules chez les souriceaux

Tous les mécanismes mis en évidence chez les souris SCID ne permettent pas de comprendre pourquoi le transfert de cellules naïves et immunes réalisé chez les souriceaux ne confère pas de protection. Harp *et al.* ont transféré des cellules de rate ou de ganglions

mésentériques provenant de souris adultes ayant récupéré de l'infection néonatale à *C. parvum* à des souriceaux. Cette reconstitution par des cellules de souris adultes immunes n'a pas modifié le niveau d'infection des souriceaux (Harp et Whitmire, 1991), mais elle a été efficace dans les mêmes conditions pour protéger les souris SCID (Ungar *et al.*, 1990a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat :

(i) le transfert de cellules apporte des lymphocytes CD40L+ mais ne suffit pas pour protéger les souriceaux chez qui l'expression de CD40 en surface des entérocytes, des macrophages et des cellules dendritiques est peut-être faible. En effet, la production d'IFN γ chez les souriceaux étant inférieure à celle observée chez des adultes, elle pourrait être responsable de la faible expression de CD40. Elliott *et al.* ont montré qu'au moins sur les lymphocytes B, l'expression de CD40 ne semble pas varier avec l'âge (Elliott *et al.*, 2000). La comparaison de l'expression de CD40L entre les lymphocytes T des nouveau-nés et les lymphocytes T d'adultes a été très étudiée et les résultats contradictoires de ces différentes études peuvent probablement être attribués aux différentes conditions de stimulation, utilisées *in vitro* (Durandy *et al.*, 1995 ; Fuleihan *et al.*, 1994 ; Nonoyama *et al.*, 1995 ; Splawski *et al.*, 1996 ; Suarez *et al.*, 2000). D'après les études les plus récentes, il semble que les lymphocytes T de nouveau-nés peuvent exprimer à leur surface des molécules CD40L fonctionnelles (Elliott *et al.*, 2000 ; Suarez *et al.*, 2000).

(ii) l'environnement intestinal du souriceau n'est pas efficace pour faire en sorte que les lymphocytes de souris adultes transférés protègent. Lors d'une infection pulmonaire par *Pneumocystis carinii*, des splénocytes de souris adultes infectées protègent les souris adultes SCID reconstituées alors que le niveau d'infection chez les nouveau-nés SCID reconstitués ne varie pas (Garvy et Qureshi, 2000). Par contre, le transfert de splénocytes provenant de souriceaux infectés induit la protection des souris SCID receveuses avec la même efficacité que les splénocytes provenant de souris adultes infectées (Qureshi et Garvy, 2001). Chez les souriceaux infectés depuis 15 jours, l'expression d'IFN γ , de TNF α et de certaines chimiokines est augmentée par rapport aux souriceaux non infectés, mais elle est inférieure à celle observée chez les souris adultes infectées également depuis 15 jours (Qureshi et Garvy, 2001). Ces résultats indiquent que les lymphocytes T des nouveau-nés sont compétents pour contrôler l'infection lorsqu'ils se trouvent dans un environnement adulte et suggèrent que l'environnement pulmonaire, et non pas les lymphocytes T, soit inefficace pour contrôler l'infection. Dans le cas d'une infection des nouveau-nés par *C. parvum*, cette possibilité n'a encore jamais été envisagée et nécessite d'être prise en compte pour comprendre comment les nouveau-nés se protègent de l'infection.

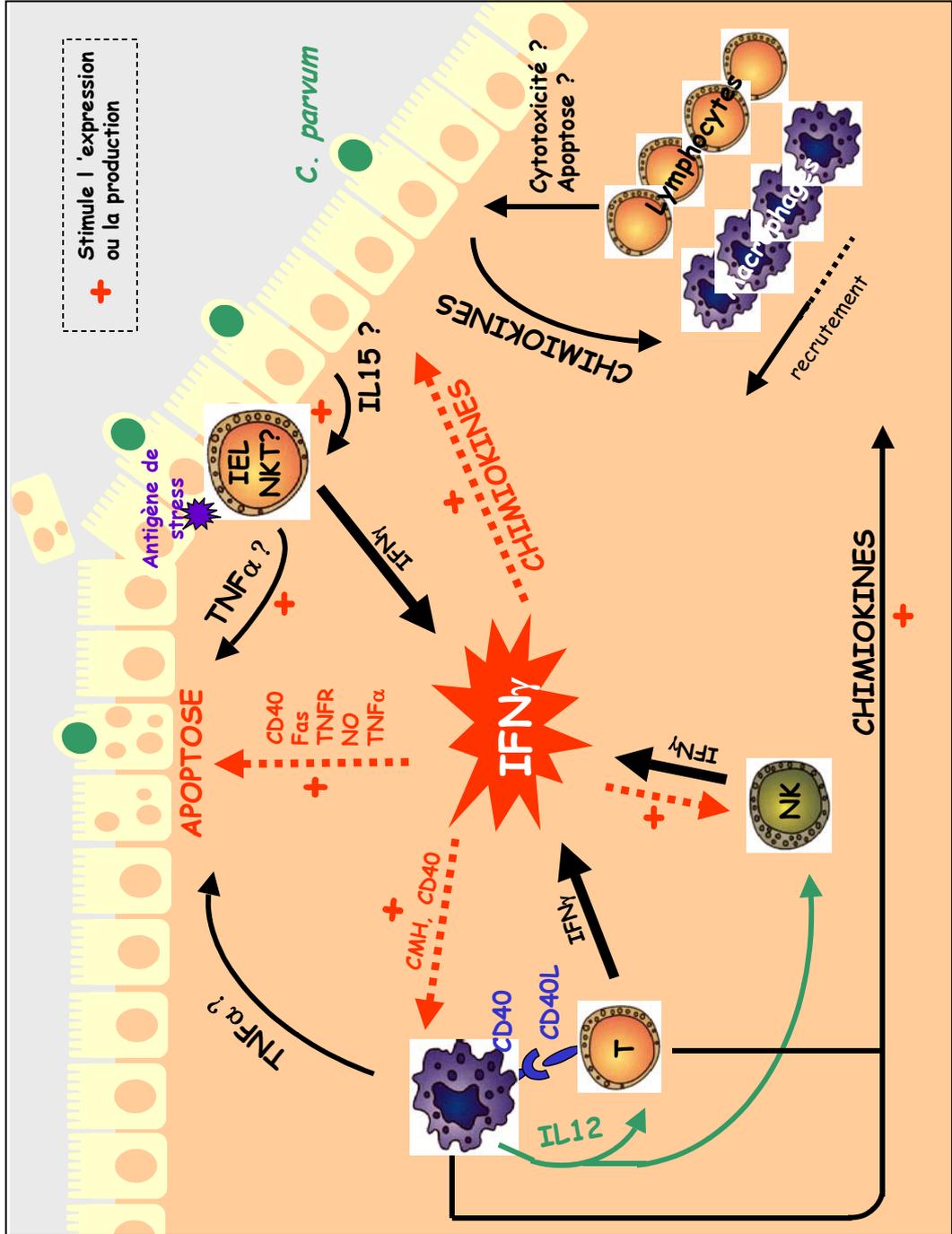


Figure 66 : Rôle de l'IFN γ produit dans la muqueuse intestinale pendant une infection par *C. parvum*

L'objectif de ce travail était de comprendre par quels mécanismes l'IFN γ produit suite à l'infection par *C. parvum* pouvait stimuler la réponse immunitaire protectrice de l'hôte. Nous avons montré que l'IFN γ est fortement exprimé dans l'iléon des souriceaux infectés dès le 4^{ème} jour suivant l'inoculation et de façon plus intense 9 jours après l'infection. Des cellules intra- ou sub-épithéliales sont à l'origine de la forte production d'IFN γ observée 9 jours après l'inoculation des souriceaux. Afin de mieux comprendre le rôle de l'IFN γ dans le déclenchement de la réponse immunitaire locale et dans le contrôle de l'infection, il serait intéressant **de phénotyper *in situ* les cellules productrices d'IFN γ au cours de l'infection des souriceaux.** Aucune étude n'ayant jusqu'ici clairement identifié et localisé ces cellules, des doubles marquages immunohistochimiques sur des coupes d'iléons de souriceaux infectés permettraient de savoir si la source d'IFN γ correspond à la population des lymphocytes T CD4+, des lymphocytes T CD8+ et/ou des cellules NK.

Certains modèles d'infection à *C. parvum* ont décrit une augmentation de la production de TNF α locale résultant de l'infection. Dans ce travail, nous avons observé que l'expression locale du TNF α chez les souriceaux infectés est dépendante de la production d'IFN γ . Par ailleurs, nous avons montré que des injections répétées de TNF α chez des souris déficientes en IFN γ , et par voie de conséquence en TNF α produit localement, réduisaient significativement l'excrétion des souris. Par conséquent, bien que le TNF α ne soit pas un effecteur majeur de la réponse protectrice, il participe au contrôle de l'infection par *C. parvum*. Aucun rôle protecteur n'ayant jusqu'ici été attribué à cette cytokine pro-inflammatoire, **il serait intéressant d'identifier là encore qu'elles sont les cellules productrices de cette cytokine et de mettre en évidence les mécanismes utilisés par le TNF α pour protéger.** Pour se faire, nous comparerons les réponses immunitaires à l'infection par *C. parvum* chez les souriceaux déficients pour le TNF α et les souriceaux normaux. Toutefois, sachant qu'un des facteurs limitant est qu'en présence d'IFN γ , le rôle du TNF α est souvent masqué, la poursuite des études, dans le modèle de souris déficientes en IFN γ recevant du TNF α exogène, pourra d'ores et déjà apporter quelques réponses, notamment sur l'apoptose induite par cette cytokine et sur l'effet chimiotactique du TNF α envers les cellules inflammatoires.

En effet, nous avons montré que le recrutement des cellules inflammatoires et notamment, des lymphocytes T et des macrophages au niveau du site d'infection, semble être déterminant pour le contrôle de l'infection. Chez les souriceaux infectés, parmi les chimiokines étudiées, les plus surexprimées à savoir IP-10, MIG, i-TAC, MIP-1 β et Rantes étaient dépendantes de la production d'IFN γ . Chez le souriceau infecté, cette réponse en chimiokines a été associée au recrutement des lymphocytes T et des macrophages dans la

lamina propria des villosités intestinales. Le premier essai de neutralisation des chimiokines fortement exprimées dès le 4^{ème} jour suivant l'inoculation n'a pas permis de conclure sur le rôle de ces chimiokines dans la protection vis-à-vis de *C. parvum*. Il faudra, par conséquent, poursuivre ces travaux afin de **vérifier si les chimiokines jouent un rôle dans le contrôle de l'infection, et si c'est le cas, comprendre si c'est par un recrutement et/ou une activation des cellules inflammatoires**. Par des approches similaires et dans le même but, il faudra peut-être envisager une **neutralisation de Rantes et de MIP-1 β** .

Parmi les lymphocytes T recrutés, les IEL, de par leur localisation privilégiée, pourraient participer à l'élimination du parasite chez les nouveau-nés. Différentes études ont déjà montré que ces lymphocytes, immuns ou non, réduisaient l'infection à *C. parvum* lorsqu'ils étaient transférés dans des souris SCID. Nous nous sommes alors posés deux questions : **le transfert d'IEL, immuns ou non, protège-t-il les souriceaux ? Si oui, la production d'IFN γ par les IEL transférés est-elle nécessaire à la protection ou encore l'IFN γ produit dans l'intestin suite au transfert d'IEL suffit-il à protéger ?** Ce travail ayant été initié en fin de thèse, nos résultats actuels ne nous permettent pas de répondre à ces questions et nécessitent que ce travail soit mené à bien. En effet, cette étude est primordiale pour la compréhension des mécanismes protecteurs mis en place chez les nouveau-nés. Certaines études ont rapporté que les lymphocytes T des nouveau-nés étaient aussi fonctionnels que des lymphocytes T d'adulte et que seul l'environnement du site infectieux chez le nouveau-né était immature. De plus, il a été montré que dans le cas d'une infection à *C. parvum*, une réponse spécifique des lymphocytes T n'était pas nécessaire à la protection des souris SCID, mais ces auteurs n'ont pas vérifié si l'IFN γ était l'acteur principal de cette réponse protectrice. Au vu de ces données, si les transferts d'IEL n'aboutissent pas à la protection des souriceaux, **il faudra envisager de vérifier la fonctionnalité des lymphocytes et l'efficacité de l'environnement intestinal en cytokines pro-inflammatoires et en chimiokines des souriceaux**.

Ces études pourraient conduire à une thématique appliquée de ce travail visant à stimuler la réponse immunitaire de l'intestin de façon non spécifique permettant une maturation plus précoce du système immunitaire et notamment de l'environnement intestinal pour favoriser la protection des nouveau-nés.

- Abrahamsen, M. S., Lancto, C. A., Walcheck, B., Layton, W., et Jutila, M. A.** (1997). Localization of alpha beta and gamma delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves. *Infect. Immun.* 65, 2428-2433.
- Adal, K. A., Sterling, C. R., et Guerrant, R. L.** (1995). In "Infections of the Gastrointestinal Tract" (M. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, et R. Guerrant, eds.). Raven Press, Ltd., New York. p. 1107-1127.
- Adjei, A. A., Shrestha, A. K., Castro, M., et Enriquez, F. J.** (2000). Adoptive transfer of immunity with intraepithelial lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected severe combined immunodeficient mice. *Am. J. Med. Sci.* 320, 304-309.
- Adkins, B.** (1999). T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol. Today.* 20, 330-335.
- Adkins, B., Chun, K., Hamilton, K., et Nassiri, M.** (1996). Naive murine neonatal T cells undergo apoptosis in response to primary stimulation. *J. Immunol.* 157, 1343-1349.
- Adkins, B., Ghanei, A., et Hamilton, K.** (1994). Up-regulation of murine neonatal T helper cell responses by accessory cell factors. *J. Immunol.* 153, 3378-3385.
- Aguirre, S. A., Mason, P. H., et Perryman, L. E.** (1994). Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 62, 697-699.
- Aguirre, S. A., Perryman, L. E., Davis, W. C., et McGuire, T. C.** (1998). IL-4 protects adult C57BL/6 mice from prolonged *Cryptosporidium parvum* infection: analysis of CD4+ alpha beta +IFN-gamma + and CD4+ alpha beta +IL-4+ lymphocytes in gut-associated lymphoid tissue during resolution of infection. *J. Immunol.* 161, 1891-1900.
- Akili, D., et Harp, J. A.** (2000). A factor derived from adult rat and cow small intestine reduces *Cryptosporidium parvum* infection in infant rats. *J. Parasitol.* 86, 979-982.
- Aliberti, J. C., Souto, J. T., Marino, A. P., Lannes-Vieira, J., Teixeira, M. M., Farber, J., Gazzinelli, R. T., et Silva, J. S.** (2001). Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158, 1433-1440.
- Amichay, D., Gazzinelli, R. T., Karupiah, G., Moench, T. R., Sher, A., et Farber, J. M.** (1996). Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles *in vivo*. *J. Immunol.* 157, 4511-4520.
- Amiot, F., Boussadia, O., Cases, S., Fitting, C., Lebastard, M., Cavaillon, J. M., Milon, G., et Dautry, F.** (1997). Mice heterozygous for a deletion of the tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes: biological importance of a nonlinear response of tumor necrosis factor-alpha to gene dosage. *Eur. J. Immunol.* 27, 1035-1042.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T., et Hosoda, S.** (1993). Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J. Immunol.* 151, 4239-4247.
- Arnaud-Battandier, F., Naceri, M., Fisher, A., Ricour, C., Griscelli, C., et Yvone, P.** (1982). Intestinal cryptosporidiosis: a new cause of human diarrhoea. [French]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 6, 1045-1046.
- Arrowood, M. J., Hurd, M. R., et Mead, J. R.** (1995). A new method for evaluating experimental cryptosporidial parasite loads using immunofluorescent flow cytometry. *J. Parasitol.* 81, 404-409.
- Arrowood, M. J., Jaynes, J. M., et Healey, M. C.** (1991). Hemolytic properties of lytic peptides active against the sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *J. Protozool.* 38, 161S-163S.
- Arrowood, M. J., Mead, J. R., Mahrt, J. L., et Sterling, C. R.** (1989). Effects of immune colostrum and orally administered antiparasite monoclonal antibodies on the outcome of *Cryptosporidium parvum* infections in neonatal mice. *Infect. Immun.* 57, 2283-2288.
- Auron, P. E., et Webb, A. C.** (1994). Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 573-592.
- Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schurmann, G., Niemir, Z. I., Wallich, R., Otto, H. F., et Meuer, S. C.** (1998). In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 153, 121-130.
- Baggiolini, M., Dewald, B., et Moser, B.** (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179.

- Balk, S. P., Ebert, E. C., Blumenthal, R. L., McDermott, F. V., Wucherpfennig, K. W., Landau, S. B., et Blumberg, R. S.** (1991). Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science*. 253, 1411-1415.
- Beagley, K. W., Eldridge, J. H., Lee, F., Kiyono, H., Everson, M. P., Koopman, W. J., Hirano, T., Kishimoto, T., et McGhee, J. R.** (1989). Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.* 169, 2133-2148.
- Benhamou, Y., Kapel, N., Hoang, C., Matta, H., Meillet, D., Magne, D., Raphael, M., Gentilini, M., Opolon, P., et Gobert, J. G.** (1995). Inefficacy of intestinal secretory immune response to *Cryptosporidium* in acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*. 108, 627-635.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J. P., Kahn, A., Pringault, E., et Vandewalle, A.** (1996). Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am. J. Physiol.* 270, C1666-1674.
- Bines, J. E., et Walker, W. A.** (1991). Growth factors and the development of neonatal host defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* 310, 31-39.
- Birnboim, H. C., et Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blagburn, B., et Soave, R.** (1997). In "Cryptosporidium and Cryptosporidiosis" (R. Fayer, ed.) CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. p. 111-128.
- Bland, P. W., et Whiting, C. V.** (1992). Induction of MHC class II gene products in rat intestinal epithelium during graft-versus-host disease and effects on the immune function of the epithelium. *Immunology*. 75, 366-371.
- Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., et Terhorst, C.** (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science*. 250, 679-682.
- Bloom, S., Simmons, D., et Jewell, D. P.** (1995). Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 157-163.
- Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S., et Balk, S. P.** (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 147, 2518-2524.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., et Howard, J. C.** (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
- Boismenu, R., Feng, L., Xia, Y. Y., Chang, J. C., et Havran, W. L.** (1996). Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* 157, 985-992.
- Boismenu, R., et Havran, W. L.** (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science*. 266, 1253-1255.
- Bonnin, A., Fourmaux, M. N., Dubremetz, J. F., Nelson, R. G., Gobet, P., Harly, G., Buisson, M., Puygauthier-Toubas, D., Gabriel-Pospisil, G., Naciri, M., et Camerlynck, P.** (1996). Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 207-211.
- Bonnin, A., Gut, J., Dubremetz, J. F., Nelson, R. G., et Camerlynck, P.** (1995). Monoclonal antibodies identify a subset of dense granules in *Cryptosporidium parvum* zoites and gamonts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 395-401.
- Butor, C., Couëdel-Courteille, A., Venet, A., et Guillet, J. G.** (1995). Local Immunity and Vaccination. *Médecine/Science*. 11, 703-711.
- Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Mennechet, F. J., Martin, V., Lepage, A. C., Schwartzman, J. D., et Kasper, L. H.** (2001). Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 120, 914-924.
- Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Moretto, M., Dimier-Poisson, I. H., Lepage, A. C., Bout, D. T., et Kasper, L. H.** (1999). Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J. Immunol.* 162, 5846-5852.
- Buzoni-Gatel, D., Lepage, A. C., Dimier-Poisson, I. H., Bout, D. T., et Kasper, L. H.** (1997). Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 158, 5883-5889.
- Canals, A., Pasquali, P., Zarlenga, D. S., Fayer, R., Almeria, S., et Gasbarre, L. C.** (1998). Local ileal cytokine responses in cattle during a primary infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 84, 125-130.

- Casemore, D. P.** (1987). The antibody response to *Cryptosporidium*: development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. *J. Infect.* 14, 125-134.
- Casemore, D. P., Gardner, C. A., et O'Mahony, C.** (1994). Cryptosporidial infection, with special reference to nosocomial transmission of *Cryptosporidium parvum*: a review. *Folia Parasitol.* 41, 17-21.
- Casola, A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Ogra, P. L., Ernst, P. B., Garofalo, R. P., et Crowe, S. E.** (1998). Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology.* 114, 947-955.
- Castro Hermida, J. A., Freire Santos, F., Oteiza Lopez, A. M., Vergara Castiblanco, C. A., et Ares-Mazas, M. E.** (2000). In vitro and in vivo efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis. *Vet. Parasitol.* 90, 265-270.
- Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L., et Brenner, M. B.** (1993). Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J. Immunol.* 150, 3459-3470.
- Cerf-Bensussan, N., et Guy-Grand, D.** (1991). Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20, 549-576.
- Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., et Griscelli, C.** (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17, 1279-1285.
- Chai, J., Guk, S., Han, H., et Yun, C.** (1999). Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 85, 234-239.
- Chardes, T., Buzoni-Gatel, D., Lepage, A., Bernard, F., et Bout, D.** (1994). *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite- infected enterocytes. *J. Immunol.* 153, 4596-4603.
- Chen, W. X., Harp, J. A., et Harmsen, A. G.** (1993a). Requirements for CD4⁺ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 61, 3928-3932.
- Chen, W. X., Harp, J. A., Harmsen, A. G., et Havell, E. A.** (1993b). Gamma interferon functions in resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 61, 3548-3551.
- Chen, X. M., Gores, G. J., Paya, C. V., et LaRusso, N. F.** (1999). *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 277, G599-608.
- Chen, X. M., Levine, S. A., Splinter, P. L., Tietz, P. S., Ganong, A. L., Jobin, C., Gores, G. J., Paya, C. V., et LaRusso, N. F.** (2001). *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology.* 120, 1774-1783.
- Chen, Y., Nakane, A., et Minagawa, T.** (1989). Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice. *Infect. Immun.* 57, 2345-2349.
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A., et Fu, X. Y.** (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5328-5337.
- Chomczynski, P., et Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clark, D. P.** (1999). New insights into human cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 554-563.
- Clark, I. A., et Rockett, K. A.** (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* 37, 1-56.
- Cole, A. M., Ganz, T., Liese, A. M., Burdick, M. D., Liu, L., et Strieter, R. M.** (2001). Cutting edge: IFN-inducible ELR(-) CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J. Immunol.* 167, 623-627.
- Colgan, S. P., Parkos, C. A., Matthews, J. B., D'Andrea, L., Awtrey, C. S., Lichtman, A. H., Delp-Archer, C., et Madara, J. L.** (1994). Interferon-gamma induces a cell surface phenotype switch on T84 intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 267, C402-410.
- Cosyns, M., Tsirkin, S., Jones, M., Flavell, R., Kikutani, H., et Hayward, A. R.** (1998). Requirement for CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice. *Infect. Immun.* 66, 603-607.
- Cripps, A. W., et Gleeson, M.** (1999). In "Mucosal Immunology" (P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, et J. R. McGhee, eds.). , San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 253-266.
- Culshaw, R. J., Bancroft, G. J., et McDonald, V.** (1997). Gut intraepithelial lymphocytes induce immunity against *Cryptosporidium* infection through a mechanism involving gamma interferon production. *Infect. Immun.* 65, 3074-3079.

- Current, W. L., et Garcia, L. S.** (1991). Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 325-358.
- Cusumano, V., Mancuso, G., Genovese, F., Cuzzola, M., Carbone, M., Cook, J. A., Cochran, J. B., et Teti, G.** (1997). Neonatal hypersusceptibility to endotoxin correlates with increased tumor necrosis factor production in mice. *J. Infect. Dis.* 176, 168-176.
- Dai, C., et Krantz, S. B.** (1999). Interferon gamma induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood.* 93, 3309-3316.
- Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., et Stewart, T. A.** (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 259, 1739-1742.
- Danziger, L. H., Kanyok, T. P., et Novak, R. M.** (1993). Treatment of cryptosporidial diarrhea in an AIDS patient with paromomycin. *Ann. Pharmacother.* 27, 1460-1462.
- Davis, C. P., McAllister, J. S., et Savage, D. C.** (1973). Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. *Infect. Immun.* 7, 666-672.
- de Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., et Peeters, J. E.** (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29, 1269-1287.
- De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., Shornick, L. P., Strauss-Schoenberger, J., et et al.** (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science.* 264, 703-707.
- Denney, C. F., Eckmann, L., et Reed, S. L.** (1999). Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 67, 1547-1552.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., et Stuehr, D. J.** (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141, 2407-2412.
- Dixon, A. E., Mandac, J. B., Madtes, D. K., Martin, P. J., et Clark, J. G.** (2000). Chemokine expression in Th1 cell-induced lung injury: prominence of IFN- gamma-inducible chemokines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279, L592-599.
- Doyle, P. S., Crabb, J., et Petersen, C.** (1993). Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 61, 4079-4084.
- Durandy, A., De Saint Basile, G., Lisowska-Grospierre, B., Gauchat, J. F., Forveille, M., Kroczeck, R. A., Bonnefoy, J. Y., et Fischer, A.** (1995). Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J. Immunol.* 154, 1560-1568.
- Dwinell, M. B., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N. M., et Kagnoff, M. F.** (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 117, 359-367.
- Ebert, E. C.** (1998). Tumour necrosis factor-alpha enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. *Gut.* 42, 650-655.
- Eck, M., Schmausser, B., Scheller, K., Toksoy, A., Kraus, M., Menzel, T., Muller-Hermelink, H. K., et Gillitzer, R.** (2000). CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin. Exp. Immunol.* 122, 192-199.
- Eckmann, L., Fierer, J., et Kagnoff, M. F.** (1996). Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with *Salmonella dublin*. *J. Immunol.* 156, 2894-2900.
- Eckmann, L., Reed, S. L., Smith, J. R., et Kagnoff, M. F.** (1995). *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J. Clin. Invest.* 96, 1269-1279.
- Eichelberger, M. C., Suresh, P., et Rehg, J. E.** (2000). Protection from *Cryptosporidium parvum* infection by gammadelta T cells in mice that lack alphabeta T cells. *Comp Med.* 50, 270-276.
- Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S., et Lehrer, R. I.** (1992). Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect. Immun.* 60, 3556-3565.
- Elliott, S. R., Roberton, D. M., Zola, H., et Macardle, P. J.** (2000). Expression of the costimulator molecules, CD40 and CD154, on lymphocytes from neonates and young children. *Hum. Immunol.* 61, 378-388.
- Enriquez, F. J., et Riggs, M. W.** (1998). Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 66, 4469-4473.
- Enriquez, F. J., et Sterling, C. R.** (1991). *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J. Protozool.* 38, 100S-102S.
- Enriquez, F. J., et Sterling, C. R.** (1993). Role of CD4+ TH1- and TH2-cell-secreted cytokines in cryptosporidiosis. *Folia Parasitol.* 40, 307-311.

- Ernest, J. A., Blagburn, B. L., Lindsay, D. S., et Current, W. L. (1986). Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in neonatal mice (*Mus musculus*). *J. Parasitol.* 72, 796-798.
- Ettinger, R., Mebius, R., Browning, J. L., Michie, S. A., van Tuijl, S., Kraal, G., van Ewijk, W., et McDevitt, H. O. (1998). Effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on peripheral lymphoid tissue development. *Int. Immunol.* 10, 727-741.
- Fadel, S., et Sarzotti, M. (2000). Cellular immune responses in neonates. *Int. Rev. Immunol.* 19, 173-193.
- Fang, F. C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99, 2818-2825.
- Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 61, 246-257.
- Farstad, I. N., Halstensen, T. S., Lien, B., Kilshaw, P. J., Lazarovits, A. I., Brandtzaeg, P., et Lazarovitz, A. I. (1996). Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue. *Immunology.* 89, 227-237.
- Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B. L. P., et Blagburn, B. (1989a). Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J. Parasitol.* 75, 393-397.
- Fayer, R., Barta, J. R., Guidry, A. J., et Blagburn, B. L. (1991). Immunogold labeling of stages of *Cryptosporidium parvum* recognized by immunoglobulins in hyperimmune bovine colostrum. *J. Parasitol.* 77, 487-490.
- Fayer, R., et Ellis, W. (1993). Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J. Parasitol.* 79, 771-774.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., et Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol.* 28, 49-56.
- Fayer, R., Guidry, A., et Blagburn, B. L. (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect. Immun.* 58, 2962-2965.
- Fayer, R., Morgan, U., et Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305-1322.
- Fayer, R., Perryman, L. E., et Riggs, M. W. (1989b). Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. *J. Parasitol.* 75, 151-153.
- Fayer, R., Speer, C. A., et Dubey, J. P. (1997). In "Cryptosporidium and Cryptosporidiosis" (F. R, ed.) CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. p. 1-41.
- Fayer, R., et Ungar, B. L. (1986). *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50, 458-483.
- Flanigan, T., Marshall, R., Redman, D., Kaetzel, C., et Ungar, B. (1991). In vitro screening of therapeutic agents against *Cryptosporidium*: hyperimmune cow colostrum is highly inhibitory. *J. Protozool.* 38, 225S-227S.
- Flodstrom, M., Niemann, A., Bedoya, F. J., Morris, S. M., Jr., et Eizirik, D. L. (1995). Expression of the citrulline-nitric oxide cycle in rodent and human pancreatic beta-cells: induction of argininosuccinate synthetase by cytokines. *Endocrinology.* 136, 3200-3206.
- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., et Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 178, 2249-2254.
- Fu, Y. X., et Chaplin, D. D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 399-433.
- Fuleihan, R., Ahern, D., et Geha, R. S. (1994). Decreased expression of the ligand for CD40 in newborn lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 1925-1928.
- Gardner, A. L., Roche, J. K., Weikel, C. S., et Guerrant, R. L. (1991). Intestinal cryptosporidiosis: pathophysiologic alterations and specific cellular and humoral immune responses in rnu/+ and rnu/rnu (athymic) rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 49-62.
- Garvy, B. A., et Qureshi, M. H. (2000). Delayed inflammatory response to *Pneumocystis carinii* infection in neonatal mice is due to an inadequate lung environment. *J. Immunol.* 165, 6480-6486.
- Gleeson, M., Cripps, A. W., Clancy, R. L., Hensley, M. J., Dobson, A. J., et Firman, D. W. (1986). Breast feeding conditions a differential developmental pattern of mucosal immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 66, 216-222.

- Gobet, P., Buisson, J. C., Vagner, O., Naciri, M., Grappin, M., Comparot, S., Harly, G., Aubert, D., Varga, I., Camerlynck, P., et Bonnin, A.** (1997). Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in formed human feces by a sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosylase inactivation. *J. Clin. Microbiol.* 35, 254-256.
- Goldman, A. S., Chheda, S., Garofalo, R., et Schmalstieg, F. C.** (1996). Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1, 251-258.
- Goodgame, R. W., Kimball, K., Ou, C. N., White, A. C., Jr., Genta, R. M., Lifschitz, C. H., et Chappell, C. L.** (1995). Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. *Gastroenterology.* 108, 1075-1082.
- Graham, M. B., Dalton, D. K., Giltinan, D., Braciale, V. L., Stewart, T. A., et Braciale, T. J.** (1993). Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene. *J. Exp. Med.* 178, 1725-1732.
- Griffiths, J. K., Theodos, C., Paris, M., et Tzipori, S.** (1998). The gamma interferon gene knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2503-2508.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., et Kloetzel, P. M.** (1996). A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26, 863-869.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., et Spies, T.** (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 12445-12450.
- Guarino, A., Canani, R. B., Pozio, E., Terracciano, L., Albano, F., et Mazzeo, M.** (1994). Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. *Gastroenterology.* 106, 28-34.
- Guerrant, R. L.** (1997). Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 51-57.
- Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C., et Vassalli, P.** (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173, 471-481.
- Guy-Grand, D., Cuenod-Jabri, B., Malassis-Seris, M., Selz, F., et Vassalli, P.** (1996). Complexity of the mouse gut T cell immune system: identification of two distinct natural killer T cell intraepithelial lineages. *Eur. J. Immunol.* 26, 2248-2256.
- Guy-Grand, D., DiSanto, J. P., Henchoz, P., Malassis-Seris, M., et Vassalli, P.** (1998). Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.* 28, 730-744.
- Guy-Grand, D., et Vassalli, P.** (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 247-252.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., et Butcher, E. C.** (1994). Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues *in vivo*. *J. Immunol.* 152, 3282-3293.
- Hamer, D. H., Ward, H., Tzipori, S., Pereira, M. E. A., Alroy, J. P., et Keusch, G. T.** (1994). Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to MDCK cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 62, 2208-2213.
- Harp, J. A.** (1999). Oral dosing of neonatal mice with sucrose reduces infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 85, 952-955.
- Harp, J. A., Akili, D., et Pesch, B. A.** (1999). Changes in murine intestinal epithelium following *Cryptosporidium parvum* infection. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 64S-65S.
- Harp, J. A., Chen, W. X., et Harmsen, A. G.** (1992). Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: the importance of intestinal microflora. *Infect. Immun.* 60, 3509-3512.
- Harp, J. A., Fayer, R., Pesch, B. A., et Jackson, G. J.** (1996). Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2866-2868.
- Harp, J. A., Franklin, S. T., Goff, J. P., et Nonnecke, B. J.** (1995). Effects of *Cryptosporidium parvum* infection on lymphocyte phenotype and reactivity in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44, 197-207.
- Harp, J. A., et Goff, J. P.** (1995). Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 81, 54-57.
- Harp, J. A., et Moon, H. W.** (1991). Susceptibility of mast cell-deficient W/W^v mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59, 718-720.
- Harp, J. A., Wannemuehler, M. W., Woodmansee, D. B., et Moon, H. W.** (1988). Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 56, 2006-2010.

- Harp, J. A., et Whitmire, W. M.** (1991). *Cryptosporidium parvum* infection in mice: inability of lymphoid cells or culture supernatants to transfer protection from resistant adults to susceptible infants. *J. Parasitol.* 77, 170-172.
- Hassan, J., O'Neill, S., O'Neill, L. A., Pattison, U., et Reen, D. J.** (1995). Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 192-198.
- Hawkins, S. P., Thomas, R. P., et Teasdale, C.** (1987). Acute pancreatitis: a new finding in cryptosporidium enteritis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 294, 483-484.
- Hayward, A. R., Chmura, K., et Cosyns, M.** (2000). Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.* 182, 1001-1004.
- Hayward, A. R., Cosyns, M., Jones, M., et Ponnuraj, E. M.** (2001). Marrow-derived CD40-positive cells are required for mice to clear *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 69, 1630-1634.
- Heine, J., Moon, H. W., et Woodmansee, D. B.** (1984). Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect. Immun.* 43, 856-859.
- Hershberg, R. M., et Mayer, L. F.** (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol. Today.* 21, 123-128.
- Hess, S., et Engelmann, H.** (1996). A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* 183, 159-167.
- Hicks, P., Zwiener, R. J., Squires, J., et Savell, V.** (1996). Azithromycin therapy for *Cryptosporidium parvum* infection in four children infected with human immunodeficiency virus. *J. Pediatr.* 129, 297-300.
- Hill, B. D., Blewett, D. A., Dawson, A. M., et Wright, S.** (1991). *Cryptosporidium parvum*: investigation of sporozoite excystation *in vivo* and the association of merozoites with intestinal mucus. *Res. Vet. Sci.* 51, 264-267.
- Hirose, K., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitani, A., Washizu, J., Matsuguchi, T., et Yoshikai, Y.** (1998). Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect. Immun.* 66, 5677-5683.
- Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., et Remington, J. S.** (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 62, 2818-2824.
- Ignotz, R. A., et Massague, J.** (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 261, 4337-4345.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., et Nagata, S.** (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 66, 233-243.
- James, S. L.** (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59, 533-547.
- Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F., et Guy-Grand, D.** (1990). Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 20, 1097-1103.
- Jenkins, M. C., O'Brien, C., Trout, J., Guidry, A., et Fayer, R.** (1999). Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine.* 17, 2453-2460.
- Joe, A., Verdon, R., Tzipori, S., Keusch, G. T., et Ward, H. D.** (1998). Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 3429-3432.
- Johnson, D. R., et Pober, J. S.** (1990). Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 5183-5187.
- Johnson, D. W., Pieniasek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L., et Rose, J. B.** (1995). Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3849-3855.
- Jones, B. D., Ghori, N., et Falkow, S.** (1994). Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 180, 15-23.
- Jones, C. A., et Warner, J. O.** (1999). Regulating a regulator: IFN-gamma production by the neonate. *Clin. Exp. Allergy.* 29, 865-868.

- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., et Kagnoff, M. F.** (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95, 55-65.
- Juranek, D. D.** (1995). Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Infect. Dis.* 21 Suppl 1, S57-61.
- Kaiserlian, D.** (1991). Murine gut epithelial cells express Ia molecules antigenically distinct from those of conventional antigen-presenting cells. *Immunol. Res.* 10, 360-364.
- Kandil, H. M., Berschneider, H. M., et Argenzio, R. A.** (1994). Tumour necrosis factor alpha changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. *Gut.* 35, 934-940.
- Kapel, N., Benhamou, Y., Buraud, M., Magne, D., Opolon, P., et Gobert, J. G.** (1996). Kinetics of mucosal ileal gamma-interferon response during cryptosporidiosis in immunocompetent neonatal mice. *Parasitol. Res.* 82, 664-667.
- Kapel, N., Huneau, J. F., Magne, D., Tome, D., et Gobert, J. G.** (1997). Cryptosporidiosis-induced impairment of ion transport and Na⁺-glucose absorption in adult immunocompromised mice. *J. Infect. Dis.* 176, 834-837.
- Kato, T., Hakamada, R., Yamane, H., et Nariuchi, H.** (1996). Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J. Immunol.* 156, 3932-3938.
- Kawakami, K., Shibuya, K., Qureshi, M. H., Zhang, T., Koguchi, Y., Tohyama, M., Xie, Q., Naoe, S., et Saito, A.** (1999). Chemokine responses and accumulation of inflammatory cells in the lungs of mice infected with highly virulent *Cryptococcus neoformans*: effects of interleukin-12. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 391-402.
- Keever, C. A., Abu-Hajir, M., Graf, W., McFadden, P., Prichard, P., O'Brien, J., et Flomenberg, N.** (1995). Characterization of the alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplant.* 15, 407-419.
- Kelly, P., Jack, D. L., Naeem, A., Mandanda, B., Pollok, R. C., Klein, N. J., Turner, M. W., et Farthing, M. J.** (2000). Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology.* 119, 1236-1242.
- Kelsall, B. L., Stuber, E., Neurath, M., et Strober, W.** (1996). Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 795, 116-126.
- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P., et Pringault, E.** (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science.* 277, 949-952.
- Khan, I. A., MacLean, J. A., Lee, F. S., Casciotti, L., DeHaan, E., Schwartzman, J. D., et Luster, A. D.** (2000). IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity.* 12, 483-494.
- Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthoft, T., et Kagnoff, M. F.** (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 102, 1815-1823.
- Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Lynch-Devaney, K., et Podolsky, D. K.** (1995). Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology.* 109, 516-523.
- Klein, R. M.** (1989). In "Human Gastrointestinal Development" (E. Lebenthal, ed.) Raven Press, New York. p. 367-387.
- Kohl, S., Thomas, J. W., et Loo, L. S.** (1986). Defective production of anti-herpes simplex virus antibody by neonatal mice. Reconstitution with Ia⁺ macrophages and T helper lymphocytes from nonimmune adult syngeneic mice. *J. Immunol.* 136, 3038-3044.
- Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., et Sterling, C. R.** (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1423-1428.
- Kraehenbuhl, J. P.** (1998). The gut-associated lymphoid tissue: a major site of HIV replication and CD4 cell loss. *Trends Microbiol.* 6, 419-420; discussion 420-411.
- Kraehenbuhl, J. P.** (1999). Immunologie des muqueuses. Cours d'immunologie générale et d'immunophysiologie des infections. Avril-Juin 1999. Institut Pasteur.
- Kraehenbuhl, J. P., et Neutra, M. R.** (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72, 853-879.
- Kroese, F. G., de Waard, R., et Bos, N. A.** (1996). B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin. Immunol.* 8, 11-18.

- Kruys, V., Beutler, B., et Huez, G. (1990). Translational control mediated by UA-rich sequences. *Enzyme*. 44, 193-202.
- Kuhls, T. L., Greenfield, R. A., Mosier, D. A., Crawford, D. L., et Joyce, W. A. (1992). Cryptosporidiosis in adult and neonatal mice with severe combined immunodeficiency. *J. Comp. Pathol.* 106, 399-410.
- Kuhls, T. L., Mosier, D. A., Abrams, V. L., Crawford, D. L., et Greenfield, R. A. (1994). Inability of interferon-gamma and aminoguanidine to alter *Cryptosporidium parvum* infection in mice with severe combined immunodeficiency. *J. Parasitol.* 80, 480-485.
- Kuhls, T. L., Mosier, D. A., et Crawford, D. L. (1991). Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. *J. Protozool.* 38, 74S-76S.
- Laberge, I., Ibrahim, A., Barta, J. R., et Griffiths, M. W. (1996). Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3259-3264.
- Lally, K. P., Cruz, E., et Xue, H. (2000). The role of anti-tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 in protecting murine neonates from *Escherichia coli* sepsis. *J. Pediatr. Surg.* 35, 852-854.
- Lamm, M. E., Mazaneca, M. B., Nedrud, J. G., et Kaetzel, C. S. (1995). New functions for mucosal IgA. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 647-650.
- Lasser, K. H., Lewin, K. J., et Ryning, F. W. (1979). Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10, 234-240.
- Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T. C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M., et Kagnoff, M. F. (1997). *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.* 65, 5067-5073.
- Laurent, F., Kagnoff, M. F., Savidge, T. C., Naciri, M., et Eckmann, L. (1998). Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *Infect. Immun.* 66, 1787-1790.
- Lawton, P., Naciri, M., Mancassola, R., et Petavy, A. F. (1997). In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* in the non-adherent human monocytic THP-1 cell line. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 66S.
- Laxer, M. A., Alcantara, A. K., Javato-Laxer, M., Menorca, D. M., Fernando, M. T., et Ranoa, C. P. (1990). Immune response to cryptosporidiosis in Philippine children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 131-139.
- Lebman, D. A., Lee, F. D., et Coffman, R. L. (1990). Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol.* 144, 952-959.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., et Chermette, R. (2001). Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet. Rec.* 148, 108-112.
- Leitch, G. J., et He, Q. (1994). Arginine-derived nitric oxide reduces fecal oocyst shedding in nude mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 62, 5173-5176.
- Leitch, G. J., et He, Q. (1999). Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect. Immun.* 67, 5885-5891.
- Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A., et Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J. Immunol.* 163, 5871-5876.
- Leng, X., Mosier, D. A., et Oberst, R. D. (1996). Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Vet. Parasitol.* 62, 1-7.
- Lepage, A. C., Buzoni-Gatel, D., Bout, D. T., et Kasper, L. H. (1998). Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 161, 4902-4908.
- Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Taub, D. D., et McGhee, J. R. (2001). RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. *J. Immunol.* 166, 162-169.
- Lindsay, D. S., Woods, K. M., Upton, S. J., et Blagburn, B. L. (2000). Activity of decoquinate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice. *Vet. Parasitol.* 89, 307-311.
- Liu, M. T., Chen, B. P., Oertel, P., Buchmeier, M. J., Armstrong, D., Hamilton, T. A., et Lane, T. E. (2000). The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J. Immunol.* 165, 2327-2330.
- Llovo, J., Lopez, A., Fabregas, J., et Munoz, A. (1993). Interaction of lectins with *Cryptosporidium parvum*. *J. Infect. Dis.* 167, 1477-1480.
- Lukin, K., Cosyns, M., Mitchell, T., Saffry, M., et Hayward, A. (2000). Eradication of *Cryptosporidium parvum* infection by mice with ovalbumin-specific T cells. *Infect. Immun.* 68, 2663-2670.

- Ma, P.** (1984). *Cryptosporidium* and the enteropathy of immune deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 488-490.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., et Reith, W.** (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.
- MacKenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., et Davis, J. P.** (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161-167.
- MacKenzie, W. R., Kazmierczak, J. J., et Davis, J. P.** (1995). An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiol. Infect.* 115, 545-553.
- Maillo, C., Gargala, G., Delaunay, A., Ducrotte, P., Brasseur, P., Ballet, J. J., et Favennec, L.** (2000). *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol. Res.* 86, 947-949.
- Mancassola, R., Reperant, J. M., Naciri, M., et Chartier, C.** (1995). Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 75-78.
- Mancassola, R., Richard, A., et Naciri, M.** (1997). Evaluation of decoquinatone to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet. Parasitol.* 69, 31-37.
- Mannick, E., et Udall, J. N., Jr.** (1996). Neonatal gastrointestinal mucosal immunity. *Clin. Perinatol.* 23, 287-304.
- Marcial, M. A., et Madara, J. L.** (1986). *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology.* 90, 583-594.
- Marshall, R. J., et Flanigan, T. P.** (1992). Paromomycin inhibits *Cryptosporidium* infection of a human enterocyte cell line. *J. Infect. Dis.* 165, 772-774.
- Martinez, F., Mascaro, C., Rosales, M. J., Diaz, J., Cifuentes, J., et Osuna, A.** (1992). In vitro multiplication of *Cryptosporidium parvum* in mouse peritoneal macrophages. *Vet. Parasitol.* 42, 27-31.
- Martinez, F., Rosales, M. J., Diaz, J., et Mascaro, C.** (1997). The effects of IFN- gamma activated mouse peritoneal and alveolar macrophages on *Cryptosporidium parvum* development. *Vet. Parasitol.* 68, 305-308.
- Mayer, C. L., et Palmer, C. J.** (1996). Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2081-2085.
- Mayer, L., et Blumberg, R. S.** (1999). In "Mucosal Immunology" (P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, et J. R. McGhee, eds.). Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 365-379.
- Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R., et Piccinini, L.** (1991). Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 100, 3-12.
- Mayer, L., et Shlien, R.** (1987). Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J. Exp. Med.* 166, 1471-1483.
- Mazanec, M. B., Kaetzel, C. S., Lamm, M. E., Fletcher, D., et Nedrud, J. G.** (1992). Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 6901-6905.
- Mazanec, M. B., Kaetzel, C. S., Lamm, M. E., Fletcher, D., Peterra, J., et Nedrud, J. G.** (1995). Intracellular neutralization of Sendai and influenza viruses by IgA monoclonal antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 651-654.
- McCole, D. F., Eckmann, L., Laurent, F., et Kagnoff, M. F.** (2000). Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 68, 1710-1713.
- McCool, D. J., Marcon, M. A., Forstner, J. F., et Forstner, G. G.** (1990). The T84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucin in culture and releases it in response to various secretagogues. *Biochem. J.* 267, 491-500.
- McDonald, V., et Bancroft, G. J.** (1994). Mechanisms of innate and acquired resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Parasite Immunol.* 16, 315-320.
- McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, M., et Bancroft, G. J.** (1992). Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60, 3325-3331.

- McDonald, V., Robinson, H. A., Kelly, J. P., et Bancroft, G. J. (1994). *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infect. Immun.* 62, 2289-2294.
- McDonald, V., Robinson, H. A., Kelly, J. P., et Bancroft, G. J. (1996). Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. *Infect. Immun.* 64, 2556-2562.
- McDonald, V., Smith, R., Robinson, H., et Bancroft, G. (2000). Host immune responses against *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol.* 6, 75-91.
- McDonald, V., Stables, R., Warhurst, D. C., Barer, M. R., Blewett, D. A., Chapman, H. D., Connolly, G. M., Chiodini, P. L., et McAdam, K. P. (1990). In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1498-1500.
- McDyer, J. F., Goletz, T. J., Thomas, E., June, C. H., et Seder, R. A. (1998). CD40 ligand/CD40 stimulation regulates the production of IFN-gamma from human peripheral blood mononuclear cells in an IL-12- and/or CD28- dependent manner. *J. Immunol.* 160, 1701-1707.
- Mead, J. R., Arrowood, M. J., Sidwell, R. W., et Healey, M. C. (1991). Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J. Infect. Dis.* 163, 1297-1304.
- Mead, J. R., Ilksoy, N., You, X. D., Belenkaya, Y., Arrowood, M. J., Fallon, M. T., et Schinazi, R. F. (1994). Infection dynamics and clinical features of cryptosporidiosis in SCID mice. *Infect. Immun.* 62, 1691-1695.
- Mead, J. R., et You, X. (1998). Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 84, 1045-1048.
- Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C., et Rubin, C. E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology.* 70, 1156-1160.
- Mestecky, J., et McGhee, J. R. (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40, 153-245.
- Modigliani, R., Bories, C., Le Charpentier, Y., Salmeron, M., Messing, B., Galian, A., Rambaud, J. C., Lavergne, A., Cochand-Priollet, B., et Desportes, I. (1985). Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. *Gut.* 26, 179-187.
- Moon, H. W., Woodmansee, D. B., Harp, J. A., Abel, S., et Ungar, B. L. P. (1988). Lactal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: immune dams do not protect their suckling pups. *Infect. Immun.* 56, 649-653.
- Morin, M. L., S. Lallier, R. (1976). Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 40: 3, 228-240., 228-240.
- Muehlhoefer, A., Saubermann, L. J., Gu, X., Luedtke-Heckenkamp, K., Xavier, R., Blumberg, R. S., Podolsky, D. K., MacDermott, R. P., et Reinecker, H. C. (2000). Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J. Immunol.* 164, 3368-3376.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., et Modolell, M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187, 2103-2108.
- Murray, P. D., McKenzie, D. T., Swain, S. L., et Kagnoff, M. F. (1987). Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.* 139, 2669-2674.
- Naciri, M., Lefay, M. P., Mancassola, R., Poirier, P., et Chermette, R. (1999). Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet. Parasitol.* 85, 245-257.
- Naciri, M., Mancassola, R., Reperant, J. M., Canivez, O., Quinque, B., et Yvore, P. (1994). Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. *Vet. Parasitol.* 53, 173-190.
- Naciri, M., Mancassola, R., Yvore, P., et Peeters, J. E. (1993). The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet. Parasitol.* 45, 199-207.
- Naciri, M., et Yvoré, P. (1989). Efficacité du Lactate d'Halofuginone dans le Traitement de la Cryptosporidiose chez l'Agneau. *Rec. Méd. Vét.* 165, 823-826.
- Nakazawa, A., Watanabe, M., Kanai, T., Yajima, T., Yamazaki, M., Ogata, H., Ishii, H., Azuma, M., et Hibi, T. (1999). Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. *Gastroenterology.* 117, 536-545.

- Neutra, M. R.** (1999). M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 236, 17-32.
- Neutra, M. R., Pringault, E., et Kraehenbuhl, J. P.** (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 275-300.
- Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., et Yardley, J. H.** (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* 70, 592-598.
- Nonoyama, S., Penix, L. A., Edwards, C. P., Lewis, D. B., Ito, S., Aruffo, A., Wilson, C. B., et Ochs, H. D.** (1995). Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J. Clin. Invest.* 95, 66-75.
- Novak, S. M., et Sterling, C. R.** (1991). Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Protozool.* 38, 102S-104S.
- Ojcius, D. M., Perfettini, J. L., Bonnin, A., et Laurent, F.** (1999). Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes Infect.* 1, 1163-1168.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., et DuPont, H. L.** (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275-1281.
- Ouellette, A. J., Greco, R. M., James, M., Frederick, D., Naftilan, J., et Fallon, J. T.** (1989). Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell Biol.* 108, 1687-1695.
- Owen, R. L., Pierce, N. F., Apple, R. T., et Cray, W. C., Jr.** (1986). M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J. Infect. Dis.* 153, 1108-1118.
- Pasquali, P., Fayer, R., Almeria, S., Trout, J., Polidori, G. A., et Gasbarre, L. C.** (1997). Lymphocyte dynamic patterns in cattle during a primary infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 83, 247-250.
- Peeters, J. E., Villacorta, I., Vanopdenbosch, E., Vandergheynst, D., Naciri, M., Ares-Mazas, E., et Yvone, P.** (1992). *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60, 2309-2316.
- Perryman, L. E., Mason, P. H., et Chrisp, C. E.** (1994). Effect of spleen cell populations on resolution of *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. *Infect. Immun.* 62, 1474-1477.
- Petersen, C., Gut, J., Doyle, P. S., Crabb, J. H., Nelson, R. G., et Leech, J. H.** (1992). Characterization of a > 900,000-M(r) *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. *Infect. Immun.* 60, 5132-5138.
- Piguet, P. F., Vesin, C., Donati, Y., et Barazzone, C.** (1999). TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab. Invest.* 79, 495-500.
- Pitlik, S. D., Fainstein, V., Garza, D., Guarda, L., Bolivar, R., Rios, A., Hopper, R. L., et Mansell, P. A.** (1983). Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Arch. Intern. Med.* 143, 2269-2275.
- Planchon, S. M., Martins, C. A., Guerrant, R. L., et Roche, J. K.** (1994). Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J. Immunol.* 153, 5730-5739.
- Pollok, R. C., Farthing, M. J., Bajaj-Elliott, M., Sanderson, I. R., et McDonald, V.** (2001). Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology.* 120, 99-107.
- Prehn, J. L., Landers, C. J., et Targan, S. R.** (1999). A soluble factor produced by lamina propria mononuclear cells is required for TNF-alpha enhancement of IFN-gamma production by T cells. *J. Immunol.* 163, 4277-4283.
- Qureshi, M. H., et Garvy, B. A.** (2001). Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Immunol.* 166, 5704-5711.
- Rasmussen, K. R., et Healey, M. C.** (1992). Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect. Immun.* 60, 1648-1652.
- Rehg, J. E.** (1991). Activity of azithromycin against cryptosporidia in immunosuppressed rats. *J. Infect. Dis.* 163, 1293-1296.
- Reinecker, H. C., MacDermott, R. P., Mirau, S., Dignass, A., et Podolsky, D. K.** (1996). Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology.* 111, 1706-1713.

- Reperant, J. M., Naciri, M., Chardes, T., et Bout, D. T.** (1992). Immunological characterization of a 17-kDa antigen from *Cryptosporidium parvum* recognized early by mucosal IgA antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 7-14.
- Riggs, M. W., Cama, V. A., Leary, H. L., Jr., et Sterling, C. R.** (1994). Bovine antibody against *Cryptosporidium parvum* elicits a circumsporozoite precipitate-like reaction and has immunotherapeutic effect against persistent cryptosporidiosis in SCID mice. *Infect. Immun.* 62, 1927-1939.
- Riggs, M. W., Stone, A. L., Yount, P. A., Langer, R. C., Arrowood, M. J., et Bentley, D. L.** (1997). Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J. Immunol.* 158, 1787-1795.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., et O'Garra, A.** (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity.* 7, 571-581.
- Robinson, P., Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Lewis, D. E., Shahab, I., Janecki, A., et White, A. C., Jr.** (2001). Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejunum of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infect. Immun.* 69, 1172-1174.
- Rocha, B., Guy-Grand, D., et Vassalli, P.** (1995). Extrathymic T cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 235-242.
- Roche, J. K., Martins, C. A., Cosme, R., Fayer, R., et Guerrant, R. L.** (2000). Transforming growth factor beta ameliorates intestinal epithelial barrier disruption by *Cryptosporidium parvum* *in vitro* in the absence of mucosal T lymphocytes. *Infect. Immun.* 68, 5635-5644.
- Rognum, T. O., Thrane, S., Stoltenberg, L., Vege, A., et Brandtzaeg, P.** (1992). Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr. Res.* 32, 145-149.
- Rohlman, V. C., Kuhls, T. L., Mosier, D. A., Crawford, D. L., et Greenfield, R. A.** (1993). *Cryptosporidium parvum* infection after abrogation of natural killer cell activity in normal and severe combined immunodeficiency mice. *J. Parasitol.* 79, 295-297.
- Rose, J. B.** (1997). Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health.* 18, 135-161.
- Russell, M. W., Kilian, M., et Lamm, M. E.** (1999). In "Mucosal Immunology" (P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, et J. R. McGhee, eds.), San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 225-240.
- Russell, G. J., Bhan, A. K., et Winter, H. S.** (1990). The distribution of T and B lymphocyte populations and MHC class II expression in human fetal and postnatal intestine. *Pediatr. Res.* 27, 239-244.
- Sagodira, S., Buzoni-Gatel, D., Iochmann, S., Naciri, M., et Bout, D.** (1999). Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine.* 17, 2346-2355.
- Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., et Ishikawa, H.** (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science.* 280, 275-278.
- Sanders, M. E., Makgoba, M. W., Sharrow, S. O., Stephany, D., Springer, T. A., Young, H. A., et Shaw, S.** (1988). Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J. Immunol.* 140, 1401-1407.
- Sangari, F. J., Petrofsky, M., et Bermudez, L. E.** (1999). *Mycobacterium avium* infection of epithelial cells results in inhibition or delay in the release of interleukin-8 and RANTES. *Infect. Immun.* 67, 5069-5075.
- Sanger, F., Nicklen, S., et Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-5467.
- Sarzotti, M., Robbins, D. S., et Hoffman, P. M.** (1996). Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science.* 271, 1726-1728.
- Schelonka, R. L., et Infante, A. J.** (1998). Neonatal immunology. *Semin. Perinatol.* 22, 2-14.
- Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Weiss-Breckwoldt, A. N., Schwarting, R., Stein, H., Riecken, E. O., et Zeitz, M.** (1990). The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J. Immunol.* 144, 2541-2549.

- Schijns, V. E., Haagsmans, B. L., Rijke, E. O., Huang, S., Aguet, M., et Horzinek, M. C. (1994). IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J. Immunol.* 153, 2029-2037.
- Schrum, S., Probst, P., Fleischer, B., et Zipfel, P. F. (1996). Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J. Immunol.* 157, 3598-3604.
- Serushago, B., Issekutz, A. C., Lee, S. H., Rajaraman, K., et Bortolussi, R. (1996). Deficient tumor necrosis factor secretion by cord blood mononuclear cells upon *in vitro* stimulation with *Listeria monocytogenes*. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 381-387.
- Seydel, K. B., Zhang, T., Champion, G. A., Fichtenbaum, C., Swanson, P. E., Tzipori, S., Griffiths, J. K., et Stanley, S. L., Jr. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor alpha and interleukin-8. *Infect. Immun.* 66, 2379-2382.
- Sherwood, D., Angus, K. W., Snodgrass, D. R., et Tzipori, S. (1982). Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 38, 471-475.
- Sicinski, P., Rowinski, J., Warchol, J. B., Jarzabek, Z., Gut, W., Szczygiel, B., Bielecki, K., et Koch, G. (1990). Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology.* 98, 56-58.
- Smith, L. M., Bonafonte, M. T., Campbell, L. D., et Mead, J. R. (2001). Exogenous interleukin-12 (IL-12) exacerbates *Cryptosporidium parvum* infection in gamma interferon knockout mice. *Exp. Parasitol.* 98, 123-133.
- Smith, L. M., Bonafonte, M. T., et Mead, J. R. (2000). Cytokine expression and specific lymphocyte proliferation in two strains of *Cryptosporidium parvum*-infected gamma-interferon knockout mice. *J. Parasitol.* 86, 300-307.
- Song, F., Ito, K., Denning, T. L., Kuninger, D., Papaconstantinou, J., Gourley, W., Klimpel, G., Balish, E., Hokanson, J., et Ernst, P. B. (1999). Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 162, 2275-2280.
- Splawski, J. B., Nishioka, J., Nishioka, Y., et Lipsky, P. E. (1996). CD40 ligand is expressed and functional on activated neonatal T cells. *J. Immunol.* 156, 119-127.
- Steege, J. C., Buurman, W. A., et Forget, P. P. (1997). The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine. *Dev. Immunol.* 5, 121-128.
- Stemmermann, G. N., Hayashi, T., Glober, G. A., Oishi, N., et Frankel, R. I. (1980). Cryptosporidiosis. Report of a fatal case complicated by disseminated toxoplasmosis. *Am. J. Med.* 69, 637-642.
- Streeter, P. R., Rouse, B. T., et Butcher, E. C. (1988). Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J. Cell Biol.* 107, 1853-1862.
- Su, Z., et Stevenson, M. M. (2000). Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect. Immun.* 68, 4399-4406.
- Suarez, A., Mozo, L., Gayo, A., Simo, A., et Gutierrez, C. (2000). Induction of functional CD154 (CD40 ligand) in neonatal T cells by cAMP-elevating agents. *Immunology.* 100, 432-440.
- Summerfield, J. A., Ryder, S., Sumiya, M., Thursz, M., Gorchein, A., Monteil, M. A., et Turner, M. W. (1995). Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet.* 345, 886-889.
- Suzuki, K., Oida, T., Hamada, H., Hitotsumatsu, O., Watanabe, M., Hibi, T., Yamamoto, H., Kubota, E., Kaminogawa, S., et Ishikawa, H. (2000). Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. *Immunity.* 13, 691-702.
- Szalay, G., Ladel, C. H., Blum, C., et Kaufmann, S. H. (1996). IL-4 neutralization or TNF-alpha treatment ameliorate disease by an intracellular pathogen in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 157, 4746-4750.
- Taghi-Kilani, R., Sekla, L., et Hayglass, K. T. (1990). The role of humoral immunity in *Cryptosporidium* spp. infection. Studies with B cell-depleted mice. *J. Immunol.* 145, 1571-1576.
- Takeuchi, M., Nishizaki, Y., Sano, O., Ohta, T., Ikeda, M., et Kurimoto, M. (1997). Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 289, 499-503.

- Talvani, A., Ribeiro, C. S., Aliberti, J. C., Michailowsky, V., Santos, P. V., Murta, S. M., Romanha, A. J., Almeida, I. C., Farber, J., Lannes-Vieira, J., Silva, J. S., et Gazzinelli, R. T.** (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2, 851-866.
- Tannenbaum, C. S., Major, J. A., et Hamilton, T. A.** (1993). IFN-gamma and lipopolysaccharide differentially modulate expression of tumor necrosis factor receptor mRNA in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 151, 6833-6839.
- Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M., et Hamilton, T. A.** (1998). The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J. Immunol.* 161, 927-932.
- Tarver, A. P., Clark, D. P., Diamond, G., Russell, J. P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cohen, K. S., Jones, D. E., Sweeney, R. W., Wines, M., Hwang, S., et Bevins, C. L.** (1998). Enteric beta - defensin: molecular cloning and characterization of gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 66, 1045-1056.
- Taylor, A. P., et Murray, H. W.** (1997). Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* 185, 1231-1239.
- Theodos, C. M., Sullivan, K. L., Griffiths, J. K., et Tzipori, S.** (1997). Profiles of healing and nonhealing *Cryptosporidium parvum* infection in C57BL/6 mice with functional B and T lymphocytes: the extent of gamma interferon modulation determines the outcome of infection. *Infect. Immun.* 65, 4761-4769.
- Thrane, P. S., Rognum, T. O., et Brandtzaeg, P.** (1991). Ontogenesis of the secretory immune system and innate defence factors in human parotid glands. *Clin. Exp. Immunol.* 86, 342-348.
- Tilley, M., Fayer, R., Guidry, A., Upton, S. J., et Blagburn, B. L.** (1990). *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. *Infect. Immun.* 58, 2966-2971.
- Tilley, M., McDonald, V., et Bancroft, G. J.** (1995). Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both Th1 and Th2 cytokine secretion. *Parasite Immunol.* 17, 459-464.
- Togari, A., Arai, M., Mogi, M., Kondo, A., et Nagatsu, T.** (1998). Coexpression of GTP cyclohydrolase I and inducible nitric oxide synthase mRNAs in mouse osteoblastic cells activated by proinflammatory cytokines. *FEBS Lett.* 428, 212-216.
- Tompkins, W. A., Watrach, A. M., Schmale, J. D., Schultz, R. M., et Harris, J. A.** (1974). Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 1101-1110.
- Tran, E. H., Prince, E. N., et Owens, T.** (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J. Immunol.* 164, 2759-2768.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., et Kelly, A.** (1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* 348, 741-744.
- Tsujimoto, M., Yip, Y. K., et Vilcek, J.** (1986). Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 136, 2441-2444.
- Tyzzer, E. E.** (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Med. Assoc.* 5, 12-13.
- Tyzzer, E. E.** (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23, 487-516.
- Tyzzer, E. E.** (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26, 394-412.
- Tzipori, S., Griffiths, J., et Theodos, C.** (1995). Paromomycin treatment against cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 171, 1069-1070.
- Ungar, B. L. P., Burris, J. A., Quinn, C. A., et Finkelman, F. D.** (1990a). New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect. Immun.* 58, 961-969.
- Ungar, B. L. P., Kao, T. C., Burris, J. A., et Finkelman, F. D.** (1991). *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model: independent roles for IFN- gamma and CD4⁺ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147, 1014-1022.

- Ungar, B. L. P., Ward, D. J., Fayer, R., et Quinn, C. A. (1990b). Cessation of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. *Gastroenterology (New York)*. 98, 486-489.
- Upton, S. J., Tilley, M., et Brillhart, D. B. (1995). Effects of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. *J. Clin. Microbiol.* 33, 371-375.
- Urban, J. F., Jr., Fayer, R., Chen, S., Gause, W. C., Gately, M. K., et Finkelman, F. D. (1996). IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Immunol.* 156, 263-268.
- Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J. P., Gespach, C., et Kaiserlian, D. (1993). Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J. Immunol. Methods.* 166, 63-73.
- Volanakis, J. E. (1995). Transcriptional regulation of complement genes. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 277-305.
- Wagner-Wiening, C., et Kimmig, P. (1995). Detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4514-4516.
- Walker, W., Aste-Amezaga, M., Kastelein, R. A., Trinchieri, G., et Hunter, C. A. (1999). IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma. *J. Immunol.* 162, 5894-5901.
- Wang, J., et Klein, J. R. (1994). Thymus-neuroendocrine interactions in extrathymic T cell development. *Science.* 265, 1860-1862.
- Wassef, J. S., Keren, D. F., et Mailloux, J. L. (1989). Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect. Immun.* 57, 858-863.
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., et Ishii, H. (1995). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95, 2945-2953.
- Watanabe, S., Takagi, A., Koga, Y., Kamiya, S., et Miwa, T. (2000). *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 168-174.
- Waters, W. R., et Harp, J. A. (1996). *Cryptosporidium parvum* infection in T-cell receptor (TCR)- alpha - and TCR- delta -deficient mice. *Infect. Immun.* 64, 1854-1857.
- Weber, C., Weber, K. S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., et Nelson, P. J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood.* 97, 1144-1146.
- Weisburger, W. R., Hutcheon, D. F., Yardley, J. H., Roche, J. C., Hillis, W. D., et Charache, P. (1979). Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 72, 473-478.
- White, A. C., Robinson, P., Okhuysen, P. C., Lewis, D. E., Shahab, I., Lahoti, S., DuPont, H. L., et Chappell, C. L. (2000). Interferon-gamma expression in jejunal biopsies in experimental human cryptosporidiosis correlates with prior sensitization and control of oocyst excretion. *J. Infect. Dis.* 181, 701-709.
- Whitmire, W. M., et Harp, J. A. (1991). Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 59, 990-995.
- Widmer, G., Corey, E. A., Stein, B., Griffiths, J. K., et Tzipori, S. (2000). Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development *in vitro*. *J. Parasitol.* 86, 922-928.
- Wilson, C. B., Westall, J., Johnston, L., Lewis, D. B., Dower, S. K., et Alpert, A. R. (1986). Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J. Clin. Invest.* 77, 860-867.
- Witthoft, T., Eckmann, L., Kim, J. M., et Kagnoff, M. F. (1998). Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275, G564-571.
- Wolf, S. F., Sieburth, D., et Sypek, J. (1994). Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells.* 12, 154-168.
- Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., Malissen, B., Carrier, A., et Naquet, P. (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur. J. Immunol.* 30, 262-271.
- Wyatt, C. R., Brackett, E. J., et Barrett, W. J. (1999). Accumulation of mucosal T lymphocytes around epithelial cells after *in vitro* infection with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 85, 765-768.

- Wyatt, C. R., Brackett, E. J., Perryman, L. E., Rice-Ficht, A. C., Brown, W. C., et O'Rourke, K. I.** (1997). Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 65, 185-190.
- Wyatt, C. R., Brackett, E. J., et Savidge, J.** (2001). Evidence for the emergence of a type-1-like immune response in intestinal mucosa of calves recovering from cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 87, 90-95.
- Yang, S. K., Eckmann, L., Panja, A., et Kagnoff, M. F.** (1997). Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology.* 113, 1214-1223.
- Ye, G., Barrera, C., Fan, X., Gourley, W. K., Crowe, S. E., Ernst, P. B., et Reyes, V. E.** (1997). Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Invest.* 99, 1628-1636.
- Yio, X. Y., et Mayer, L.** (1997). Characterization of a 180-kDa intestinal epithelial cell membrane glycoprotein, gp180. A candidate molecule mediating t cell-epithelial cell interactions. *J. Biol. Chem.* 272, 12786-12792.
- You, X., et Mead, J. R.** (1998). Characterization of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in IFN-gamma knockout mice. *Parasitology.* 117, 525-531.

Rôle de l'IFN γ dans la réponse immunitaire muqueuse à l'infection par *C. parvum* chez la souris.

La cryptosporidiose est une zoonose dont l'agent étiologique est le protozoaire *Cryptosporidium parvum*. Ce parasite à tropisme intestinal est responsable de diarrhées chez tous les mammifères dont l'homme. La cryptosporidiose des animaux de rente a de fortes répercussions économiques et environnementales. A l'heure actuelle, aucun vaccin n'a été mis au point pour enrayer cette maladie, seul l'Halocur® a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour traiter les veaux en 1999, mais il ne parvient pas à éradiquer complètement l'infection. Un préalable nécessaire au développement d'une prophylaxie adéquate serait une meilleure connaissance des effecteurs de l'immunité protectrice.

La réponse immunitaire à l'infection par *C. parvum* a été étudiée par RT-PCR quantitative au niveau de l'iléon de souris infectées, qui parviennent spontanément à éliminer le parasite en trois semaines. Afin de mettre en évidence des mécanismes protecteurs dépendants de l'IFN γ , cette réponse immunitaire a été comparée à celle des souris C57BL/6J knock-out pour l'IFN γ (GKO) qui restent chroniquement infectées. Par ailleurs, la contribution des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire à l'infection a également été étudiée après infection *in vitro* de lignées de cellules épithéliales murines. *In vitro*, les cellules épithéliales répondent à l'infection par *C. parvum* en augmentant l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 et le GM-CSF. Chez les souris infectées par *C. parvum*, l'expression iléale des gènes de l'IL1 β , de l'IL6 et du TNF α est augmentée par rapport aux souris non infectées. Parmi ces cytokines pro-inflammatoires, le TNF α est la plus surexprimée. Au contraire, chez les souris déficientes en IFN γ , cette surexpression est absente alors que celle des autres gènes de cytokines pro-inflammatoires est accrue. Ces résultats suggèrent une production de TNF α dépendante de l'IFN γ dans l'iléon des souris infectées ainsi qu'un effet protecteur du TNF α vis-à-vis de la cryptosporidiose. Des injections répétées de TNF α exogène aux souris déficientes en IFN γ ont réduit significativement l'excrétion parasitaire des souris infectées. Par ailleurs, nous avons montré que les souris knock-out pour le TNF α et la lymphotoxine- α étaient plus sensibles à l'infection que les souris normales. Tous ces résultats sont en faveur d'un rôle du TNF α dans la réponse immunitaire protectrice contre *C. parvum*.

Nous avons dans un second temps étudié l'expression locale d'autres médiateurs de l'inflammation que sont les chimiokines. *In vitro*, les cellules épithéliales répondent à l'infection par *C. parvum* en augmentant l'expression des chimiokines comme IP-10, KC, MIP-2 α , MCP-1 et Rantes. *In vivo*, l'infection par *C. parvum* induit une forte surexpression des gènes des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, MIP-1 β et Rantes chez les souris. Ces résultats sont associés à un fort recrutement de lymphocytes T et de macrophages dans la lamina propria de l'intestin des souris. Chez les souris déficientes en IFN γ , la surexpression des gènes de chimiokines citées précédemment est plus faible voire absente, au contraire l'expression des gènes des CXC chimiokines LIX, KC et MIP-2 α est fortement augmentée. L'infiltration massive par les neutrophiles de la lamina propria et l'absence de recrutement de lymphocytes T et de macrophages observées chez les souris GKO peuvent être corrélées au profil d'expression de chimiokines décrit.

Enfin, l'analyse de la réponse en cytokines de type Th1 et Th2 montre que l'infection par *C. parvum* est caractérisée par une forte augmentation précoce de l'expression de l'IFN γ et d'iNOS. Au pic d'infection, une réponse concomitante des cytokines caractérisant une réponse de type Th1 (IFN γ , iNOS, IL12) et dans une moindre mesure des cytokines de type Th2 (IL4 et IL10) a été observée dans l'iléon des souris infectées. Nous avons également montré que la production de NO par les cellules épithéliales, observée dans l'iléon des souris infectées, n'est pas dépendante de l'infection par *C. parvum*, mais de l'environnement inflammatoire et notamment de l'IFN γ . Par immunofluorescence, nous avons montré que la localisation des cellules productrices d'IFN γ chez les souris infectées pendant 9 jours était intra-épithéliale ou sub-épithéliale, suggérant une participation des lymphocytes intra-épithéliaux ou des lymphocytes de la lamina propria sous-jacents à l'épithélium dans la production de cette cytokine. Chez les souris GKO infectées, l'expression d'iNOS et de l'IL12 est très faiblement augmentée, voire absente. Enfin, l'augmentation de l'expression des cytokines de type Th2 observée chez les souris GKO infectées qui ne se protègent pas, suggère que ces cytokines ne jouent pas un rôle suffisant pour permettre la protection des souris C57BL/6J.

Mots-clés : *Cryptosporidium parvum*, IFN γ , immunité intestinale, modèle souris, chimiokines, cytokines pro-inflammatoires, cytokines Th1/Th2, IEL, RT-PCR quantitative.

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Adresse du laboratoire :

Unité de Pathologie Aviaire et de Parasitologie

Laboratoire de Protozoologie

INRA, Centre de recherche de Tours, 37380 Nouzilly

Role of IFN γ in the mucosal immune response to *Cryptosporidium parvum* infection in mouse.

Cryptosporidiosis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Cryptosporidium parvum*. This intestinal parasite causes diarrhea in mammals, including humans. Cryptosporidiosis in young cattle results in serious economic and environmental consequences. No vaccine is currently available for the control of this disease. One drug, halofuginone lactate, has recently been licensed for use by the French authorities (AMM), but this drug does not completely clear the infection of calves. Better understanding of the immune response of *C. parvum* is necessary for the development of an adapted prevention strategy.

We used quantitative RT-PCR to study the immune response to *C. parvum* infection in the ilea of infected neonate mice, which can spontaneously clear the infection with three weeks. To improve our understanding of the mechanisms used by IFN γ to confer protection against *C. parvum*, the immune response of these mice was compared to that of IFN γ knock-out mice (GKO), which cannot clear the infection and remain chronically infected. We also investigated the role of intestinal epithelial cells in the local immune response by infecting a murine epithelial cell line *in vitro*. The infection of epithelial cells by *C. parvum* induces an increase in IL6 and GM-CSF mRNA expression. The amount of IL1 β , IL6 and TNF α mRNA is higher in the ilea of infected neonate mice than in uninfected neonates. Among these pro-inflammatory cytokines, TNF α mRNA is the most over-expressed. In contrast, the over-expression of TNF α mRNA is not present in the ilea of infected GKO mice, whereas the other pro-inflammatory cytokines are highly over-expressed. These results suggest that the production of TNF α is IFN γ -dependent in the ilea of mice and that this cytokine plays a role in the resolution of infection. If GKO mice repeatedly injected with exogenous TNF α , they shed significantly less oocysts. Moreover, we showed that neonate mice deficient in both TNF α and Lymphotoxin- α are more sensitive to infection than wild-type neonates. Taken together, these results suggest that TNF α is involved in the control of *C. parvum* infection.

We also studied the chemokine response during *C. parvum* infection. The expression of IP-10, KC, MIP-2 α and MCP-1 mRNA is higher in epithelial cells infected *in vitro* by *C. parvum*. In the ilea of infected neonates, IP-10, MIG, i-TAC, Rantes and MIP-1 β genes are strongly over-expressed. These results are associated with a large infiltration of the lamina propria by T lymphocytes and macrophages. In GKO mice, these chemokines are only weakly overproduced or are not overproduced at all whereas the expression of CXC chemokines LIX, KC and MIP-2 α is strongly increased after *C. parvum* infection. The large infiltration of neutrophils and the absence of T cell and macrophage recruitment in the lamina propria of infected GKO mice are correlated to the chemokine response.

The analysis of Th1- and Th2-type cytokine responses showed that *C. parvum* infection induces a strong and rapid over-expression of IFN γ and iNOS mRNA in the ilea of infected neonates. When infection is maximal, Th1-type cytokines (IFN γ , iNOS and IL12) and in a lesser extent Th2-type cytokines (IL4 and IL10) are concomitantly over-expressed. In this study, we showed that the overproduction of iNOS mRNA by epithelial cells in the ilea of infected neonates is not dependent on *C. parvum* infection and that it is induced by environmental cytokines such as IFN γ . We used immunofluorescence staining to show that the IFN γ -producing cells are localized in or just beneath the epithelium. This suggests that intra-epithelial lymphocytes or the lymphocytes of the lamina propria just below the epithelium are involved in the production of IFN γ . In GKO mice infected *with C. parvum*, little or no iNOS and IL12 mRNA is produced. Moreover, the increased expression of Th2-type cytokines observed in chronically infected GKO mice suggests that these cytokines are not sufficient to confer protection in C57BL/6J mice.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, IFN γ , intestinal immunity, neonate mouse model, chemokines, pro-inflammatory cytokines, Th1/Th2-type cytokines, IEL, quantitative RT-PCR.

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Adresse du laboratoire :

Unité de Pathologie Aviaire et de Parasitologie
Laboratoire de Protozoologie
INRA, Centre de recherche de Tours
37380 Nouzilly