



Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (70)

L'actualité scientifique vue par
les étudiants du Master Infectiologie,
Immunité, Vaccinologie et Biomédicaments
(I²VB), Université de Tours



Responsables pédagogiques

Anne di Tommaso
Isabelle Dimier-Poisson

Série coordonnée par Claire Deligne

- Former des pharmaciens, médecins, vétérinaires, ingénieurs agronomes aux enjeux actuels de l'infectiologie à la fois dans les domaines fondamentaux et appliqués.
- Option Immunité et biomédicaments (I&B) : Anne di Tommaso et Laurie Lajoie
 - Former des scientifiques dotés d'une culture générale et technique spécialisée dans les biotechnologies, l'infectiologie ou la cancérologie, les biomédicaments dont les anticorps thérapeutiques et les vaccins contribuant à l'avancée des connaissances scientifiques et à ses applications industrielles, demandes sociétales en forte progression.
 - Former de jeunes scientifiques, pharmaciens, médecins, vétérinaires, ingénieurs agronomes aux enjeux actuels de l'infectiologie ou de la cancérologie et des biomédicaments à la fois dans les domaines fondamentaux et appliqués. ◀

NOUVELLE

Anticorps anti-CeTOS cross- spécifiques de différentes espèces de *Plasmodium* inhibant le stade hépatique et la transmission au vecteur

Alexine Varloteau¹, Lilou Fouquoire¹, Lucie Ravier¹

¹Master Infectiologie, Immunité,
Vaccinologie et Biomédicaments,
Université de Tours, Tours, France.
alexine.varloteau@outlook.fr
lucie.ravier12@gmail.com
liloufouquoire@gmail.com

► Le paludisme, causé par des parasites du genre *Plasmodium*, est un problème majeur de santé publique touchant 200 millions d'individus et causant 600 000 morts chaque année dans le

monde [1]. Les 5 espèces du parasite retrouvées chez l'humain, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* et *P. malariae*, coexistent dans les pays endémiques. Lors d'un repas sanguin,

le moustique *Anopheles* infecté libère des sporozoïtes. Ces formes infectantes migrent vers le foie de l'hôte pour infecter les hépatocytes. Après multiplication dans ces cellules, des mérozoïtes

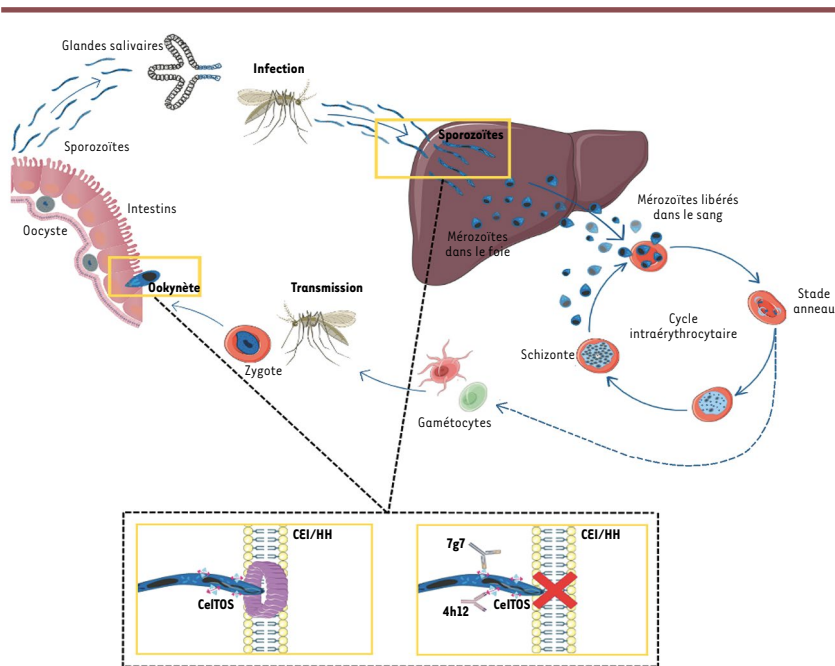


Figure 1. Mécanismes d'action des anticorps 7g7 et 4h12 sur le cycle parasitaire de Plasmodium. Les sporozoïtes mobiles inoculés dans le derme par l'anophèle, lors d'un repas sanguin, rejoignent le foie pour envahir les hépatocytes et s'y multiplier. Après multiplication, des mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine et vont envahir les érythrocytes. Le cycle intraérythrocytaire est composé de 3 stades différents : les anneaux, présents entre 0 et 20 heures post-invasion, les trophozoïtes et les schizontes. Selon les conditions environnementales des parasites, les formes anneaux peuvent s'engager dans la gamétocytogenèse et former les formes sexuées (gamétocytes) transmises au moustique. Les protéines de franchissement des membranes cellulaires CelTOS, produites par le parasite, permettent la formation de pores et l'entrée du parasite dans la cellule épithéliale intestinale (CEI) du vecteur et l'hépatocyte humain (HH). Les anticorps monoclonaux anti-CelTOS inhibent la perturbation des phospholipides membranaires, bloquant ainsi l'invasion cellulaire et la poursuite du cycle parasitaire [7]. Image adaptée de Servier Medical Art, sous licence CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

nouvellement produits sont libérés dans le sang et infectent les globules rouges. Le cycle intraérythrocytaire est responsable des symptômes de la maladie et de la production de formes sexuées, les gamétocytes. Ces derniers peuvent être ingérés par le moustique au cours d'un nouveau repas sanguin, ce qui permet la poursuite du cycle et assure la transmission du parasite entre les populations humaine et moustique [2]. Actuellement, le contrôle de cette maladie est compromis par l'augmentation de la résistance aux traitements et une action limitée des deux vaccins disponibles. Ces derniers ne ciblent que

la phase hépatique ainsi que l'espèce la plus mortelle, *P. falciparum*. Or, d'autres espèces comme *P. vivax* ont également un impact important sur la population humaine [3]. La protéine CelTOS (*cell traversal protein for ookinetes and sporozoites*) est conservée dans les différentes espèces de *Plasmodium* et plusieurs études ont démontré l'importance de celle-ci à différentes phases du cycle parasitaire. En effet, une forte similarité de la séquence de CelTOS est notée entre *P. vivax* et *P. falciparum*, les deux espèces les plus virulentes du parasite, ce qui en fait un antigène intéressant pour une protection

inter-espèces contre le paludisme [4]. De plus, elle intervient à différentes phases du cycle, bloquant notamment la transmission au moustique vecteur [5]. Dans l'optique d'un vaccin à plus large spectre et dirigé contre différentes phases du cycle de développement du parasite, l'équipe de Tang WK et al. a étudié et démontré l'efficacité de la protéine CelTOS comme potentiel antigène vaccinal [6].

Rôle de CelTOS dans l'infection parasitaire

CelTOS est une protéine présente à la surface du parasite. Elle joue un rôle majeur dans l'infection via son implication dans le franchissement des membranes cellulaires essentiel à plusieurs étapes du cycle parasitaire au sein des deux hôtes, le mammifère et le moustique [5]. En effet, CelTOS permet la formation de pores au niveau des membranes cytoplasmiques, permettant aux sporozoïtes et aux gamétocytes la traversée respective des hépatocytes humains et des entérocytes du moustique (Figure 1) [7]. Chez le mammifère, par exemple, cette invasion est primordiale pour la suite du cycle parasitaire afin de produire des mérozoïtes, responsables du cycle intraérythrocytaire et des formes graves de la maladie. Par conséquent, inhiber CelTOS représente une stratégie prometteuse pour bloquer à la fois le développement hépatique et la transmission vectorielle du parasite [8].

Lors de l'infection par le parasite ou d'une vaccination avec des sporozoïtes irradiés, l'antigène CelTOS est majoritairement reconnu par le système immunitaire, entraînant la production d'anticorps [9]. Ces anticorps polyclonaux, bien que présents en faible concentration lors des tests de vaccination, peuvent inhiber le cycle parasitaire et le développement au sein du vecteur. Afin de comprendre le mécanisme de l'immunité anti-CelTOS et d'optimiser cette stratégie vaccinale, des anticorps monoclonaux spécifiques de CelTOS ont été

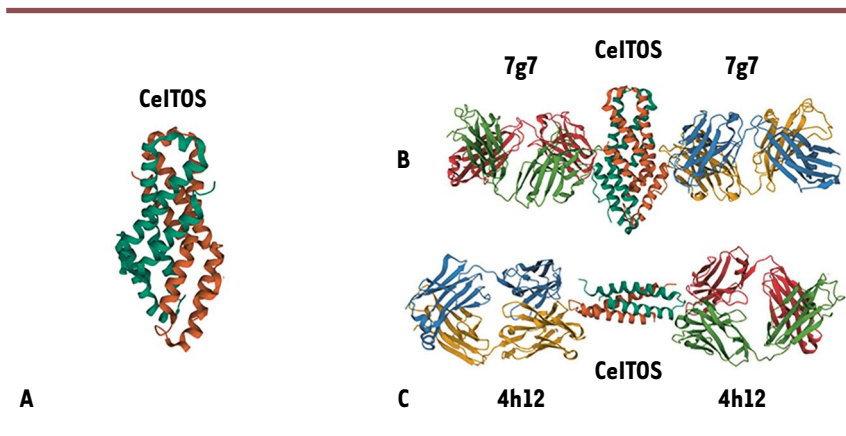


Figure 2. Site de fixation des anticorps 7g7 et 4h12 sur CelTOS. **A.** Structure de la protéine CelTOS composée de deux monomères identiques (vert et rouge) assemblés parallèlement en dimère (Protein Data Bank:5TSZ) [7]. **B.** Structure cristallisée de CelTOS de *P. vivax* en complexe avec l'anticorps monoclonal 7g7 qui se lie perpendiculairement à l'axe de la protéine et n'empêche pas sa dimérisation parallèle (Protein Data Bank:8ULF) [6]. **C.** Structure cristallisée de CelTOS de *P. falciparum* en complexe avec l'anticorps monoclonal 4h12 dont le site de fixation au centre du dimère de CelTOS empêche sa formation parallèle (Protein Data Bank:8UKH) [6].

développés et caractérisés par l'équipe de Tang WK *et al.* [6].

Production des anticorps monoclonaux

Pour initier l'étude, Tang *et al.* ont immunisé des souris avec la protéine CelTOS de *P. vivax* (PvCelTOS) ou celle de *P. falciparum* (PfCelTOS) afin d'induire la production d'anticorps. Les lymphocytes B de la rate des souris immunisées ont été prélevés et immortalisés sous forme d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux. Un test ELISA spécifique de la protéine CelTOS identique à celle d'immunisation a permis d'identifier les anticorps les plus réactifs pour les deux espèces de *Plasmodium*. L'anticorps 7g7 spécifique de *P. vivax* (PvCelTOS) et l'anticorps 4h12 spécifique de *P. falciparum* (PfCelTOS) ont montré les meilleures affinités.

CelTOS possède une conformation flexible nécessaire pour sa fonction

L'épitope des deux anticorps monoclonaux a été déterminé par cristallisation du complexe anticorps-antigène (Figure 2). CelTOS est une protéine dimérique formée de deux

monomères identiques arrangés de manière parallèle (Figure 2a). L'observation du dimère de CelTOS montre que les différentes conformations parallèles et antiparallèles des monomères nécessitent une plasticité et une flexibilité de la protéine. Alors que la liaison de 7g7 permet la formation du dimère de PvCelTOS et ne modifie pas sa structure (Figure 2b), 4h12 modifie l'orientation des deux monomères et ne permet qu'une orientation antiparallèle, inverse à l'assemblage normalement observé du dimère de PfCelTOS (Figure 2c). Dans les deux cas, la rigidification de la conformation par les anticorps bloque la fonction de la protéine en empêchant la mise en place de sa forme dimérique responsable de la formation des pores membranaires [10].

4h12 et 7g7 lient CelTOS provenant des deux espèces de *Plasmodium*

La forte conservation de séquence de CelTOS entre *P. vivax* et *P. falciparum* est corrélée avec un haut niveau de similitude entre les régions codant les épitopes des différents anticorps.

Ces régions ne présentent que peu ou pas de polymorphisme, permettant une reconnaissance croisée par 7g7 et 4h12 entre les différentes espèces du parasite.

La cinétique d'interaction entre les anticorps et CelTOS a été mise en évidence par *Bio-Layer Interferometry* (BLI) [11]. Cette technologie de biodétection optique permet l'analyse des interactions biomoléculaires sans marquage fluorescent préalable. Elle a permis de confirmer une liaison croisée des anticorps 7g7 et 4h12 avec CelTOS des deux espèces, bien que les affinités soient légèrement réduites par rapport à leur cible native. Cette réaction croisée a également été validée par immunofluorescence indirecte sur des sporozoïtes des deux espèces. Par conséquent, les anticorps décrits permettent de lier la protéine CelTOS des deux espèces majeures de *Plasmodium*.

4h12 et 7g7 inhibent l'invasion cellulaire par le sporozoïte

CelTOS étant impliquée dans la formation de pores dans les membranes cellulaires, l'action des anticorps a été étudiée par des tests *in vitro* de perturbation de liposomes, bicouches de phospholipides simples en solution, en présence des protéines CelTOS. Sans anticorps, PfCelTOS et PvCelTOS entraînent une perturbation des liposomes de 50 % et 35 % respectivement. En revanche, l'ajout d'7g7 et 4h12 inhibe la formation de pores membranaires de manière dose-dépendante.

De la même manière, les études menées *in vivo* dans un modèle murin ont abouti à des conclusions similaires. En effet, l'infectivité au stade hépatique a été évaluée par imagerie de l'expression de la luciférase, produite par des sporozoïtes de *P. berghei* transgéniques exprimant la protéine CelTOS de *P. vivax* ou de *P. falciparum* dans le foie. La charge parasitaire hépatique chez les souris, traitées avec 7g7 ou 4h12, était significativement plus faible que chez les souris n'ayant pas

reçu d'anticorps. De plus, cette inhibition du stade parasitaire a également été observée en réaction croisée validant ainsi une protection inter-espèce *in vivo*. L'inhibition du cycle parasitaire de *Plasmodium* a de surcroît été estimée par l'étude de la parasitémie au stade sanguin, où une protection complète des souris exposées à *P. berghei* transgénique de PfCelTOS en présence des anticorps 4h12 et 7g7 a été observée. Ainsi, les anticorps anti-CelTOS permettent une protection de l'hôte mammifère en inhibant l'infection du foie par les sporozoïtes.

4h12 et 7g7 bloquent la transmission de *P. falciparum* au moustique

L'impact des anticorps sur la capacité du parasite à infecter le vecteur du paludisme a été mis en évidence par un test standard d'alimentation par membrane (SMFA)¹. La charge parasitaire a été évaluée via l'expression de la luciférase par les parasites transgéniques de *P. falciparum* après repas sanguin du moustique sur membrane. L'autopsie des moustiques 8 jours après le repas sanguin a démontré une réduction de 66 % du nombre de parasites au sein du moustique lorsque le sang infecté était préalablement mis en contact avec les anticorps monoclonaux. Ainsi, ces derniers jouent également un rôle de blocage de la transmission des parasites aux moustiques et cela toujours de manière inter-espèce entre *P. vivax* et *P. falciparum*.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, l'équipe de Tang WK *et al.* a mis en évidence le mécanisme d'immunité lié à l'antigène CelTOS. Cette protéine impliquée dans le franchissement des membranes cellulaires à différentes phases du cycle parasitaire est conservée entre les espèces

du parasite du paludisme. Les anticorps anti-CelTOS sont naturellement produits en faible quantité lors d'une infection par *Plasmodium*. Comme CelTOS possède un faible taux de polymorphisme, ceci en fait une cible attrayante pour induire une protection croisée contre les différentes espèces infectant l'humain. Cette capacité à produire des anticorps reconnaissant différentes espèces de *Plasmodium* est une avancée en comparaison avec les vaccins actuels tels que le vaccin RTS,S puisque ce dernier est spécifique d'une unique espèce, *Plasmodium falciparum*, et n'induit pas d'immunisation croisée [12]. De plus, et de façon intéressante, là où les vaccins ciblent une unique étape du cycle, les anticorps monoclonaux anti-CelTOS 7g7 et 4h12 produits après immunisation de souris et étudiés par l'équipe, ciblent deux stades parasitaires au sein de l'hôte mammifère et du vecteur moustique. Ainsi, l'utilisation de cet antigène se révèle être une thérapie prometteuse inhibant le cycle hépatique et diminuant ainsi le nombre de mérozoïtes circulants, infectieux des érythrocytes. Par ailleurs, leur action contre la transmission au moustique vecteur permettrait un contrôle de la circulation du parasite et donc une baisse de l'incidence de la maladie [13]. S'il est tentant d'opposer ces deux types de vaccins, il ne faut cependant pas exclure la possibilité d'un effet synergique d'une vaccination cumulant les anti-CSP et les anti-CelTOS. Ainsi, le développement d'un vaccin CelTOS ou combiné CelTOS et CSP permettrait de faire un pas de plus vers l'objectif 2030 posé par l'OMS : réduire l'incidence des cas et la mortalité liée au paludisme de 90 % [14]. Toutefois, l'efficacité de cet antigène sur l'ensemble des espèces de *Plasmodium* reste à confirmer afin de protéger efficacement la population humaine à risque. ♦

Cross-specific anti-CelTOS antibodies for different *Plasmodium* species inhibiting the liver stage and transmission to the vector

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. OMS. *World malaria report 2024* ; 2024.
2. Maier AG, Matuschewski K, Zhang M, *et al.* *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 2019 ; 35 : 481–482.
3. Hammershaime EA, Berry AA. Pre-erythrocytic malaria vaccines: RTS,S, R21, and beyond. *Expert Review of Vaccines* 2024 ; 23 : 49–52.
4. Kariu T, Ishino T, Yano K, *et al.* CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular Microbiology* 2006 ; 59 : 1369–1379.
5. Steel RWJ, Pei Y, Camargo N, *et al.* *Plasmodium yoelii* S4/CelTOS is important for sporozoite gliding motility and cell traversal. *Cellular Microbiology* 2018 ; 20 : e12817.
6. Tang WK, Salinas ND, Kolli SK, *et al.* Multistage protective anti-CelTOS monoclonal antibodies with cross-species sterile protection against malaria. *Nat Commun* 2024 ; 15 : 7487.
7. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, *et al.* Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. *eLife* 2016 ; 5 : e20621.
8. Pirahmadi S, Zakeri S, A. Mehrizi A, *et al.* Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) formulated with potent TLR adjuvants induces high-affinity antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles stephensi*. *Malar J* 2019 ; 18 : 146.
9. Doolan DL, Southwood S, Freilich DA, *et al.* Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 ; 100 : 9952–9957.
10. Kumar H, Jimah JR, Misal SA, *et al.* Implications of conformational flexibility, lipid binding, and regulatory domains in cell-traversal protein CelTOS for apicomplexan migration. *Journal of Biological Chemistry* 2022 ; 298 : 102241.
11. Jug A, Bratkovič T, Ilaš J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2024 ; 176 : 117741.
12. Arora N, Anbalagan LC, Pannu AK. Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? *RMHP* 2021 ; Volume 14 : 1033–1039.
13. Coelho CH, Rappuoli R, Hotez PJ, *et al.* Transmission-Blocking Vaccines for Malaria: Time to Talk about Vaccine Introduction. *Trends in Parasitology* 2019 ; 35 : 483–486.
14. Geneva: World Health Organization. *Global Malaria Programme operational strategy 2024–2030* ; 2024.

¹ Le repas sanguin contient des gamétocytes préparés en culture parasitaire dans du sérum humain et les anticorps monoclonaux 7g7 et 4h12. Il est placé dans un réservoir à 37°C sur lequel une membrane permet aux moustiques de s'alimenter du mélange sans l'intermédiaire d'animaux.