

ETUDE COMPARATIVE EN FONCTION DE L'AGE DES CYTOKINES REGULATRICES IL-12 ET IL-4 SECRETEES PAR LA CELLULE DENDRITIQUE SPLENIQUE DU RAT SAIN

DASSE S. R.³, N'GUESSAN K.³, AKRE D.P.⁴, SOMBO M. F.¹, JAMAL K.²

RESUME

La cellule dendritique, clé de l'induction de l'immunité adaptative, est identifiée chez le rat par l' α - intégrine CD103 reconnu par l'anticorps OX62. Afin d'étudier le rôle de ces cellules dans le mécanisme d'induction de la susceptibilité ou de la résistance vis à vis du paludisme, nous avons comparé le niveau de sécrétion de base de l'IL-4 et l'IL-12 des cellules dendritiques issues du rat sain adulte et jeune.

De deux lots de 6 rats Fischer F344 repartis en deux groupes de trois rats jeunes (4 semaines), et trois rats adultes (8 semaines), les cellules dendritiques spléniques ont été extraites par la méthode de double sélection basée d'une part sur la densité, d'autre part sur l'expression de l' α - intégrine CD103.

Les cellules dendritiques extraites ont été mise en culture en milieu neutre (ML-10) pendant 24 heures. Puis les interleukines 12 et 4 ont été dosées dans les surnageant de culture par la méthode ELISA.

Après comparaison (grâce au test de l'écart réduit) des niveaux de sécrétion, les résultats montrent qu'aussi bien la cellule dendritique du rat jeune que celle du rat adulte sécrète les mêmes taux d'IL-4 et d'IL-12.

Ceci montre que l'induction de la susceptibilité ou de la résistance serait sous la dépendance du micro organisme mais aussi pourrait faire intervenir d'autres facteurs de régulation in vivo.

MOTS-CLÉS : CELLULES DENDRITIQUES, RAT SAIN, AGE, IL-12, IL-4.

SUMMARY

Dendritic cell, key of specific immunity is identified in rat by CD103 α integrin expression. In order to understand age-related susceptibility or resistance mechanism in malaria, we compared the age-related physiological level of IL-4 and IL-12 production by rat dendritic cells.

Spleen dendritic cells have been extracted from 6 F344 Fischer rats pooled into 2 groups of young and adult, by double selection method using DC specific OX62 mAb and magnetic beads. IL-4 and IL-12 were

measured by ELISA method in supernatant of overnight culture of dendritic cells.

According to the age, any difference was observed in the secretion of IL-4 and IL-12 by the dendritic cells from two rats and suppose that mechanism of susceptibility or resistance could require many others factors in vivo.

KEY WORDS : DENDRITIC CELLS, HEALTHY RAT, AGE, IL-4, IL-12

-
- 1- Chef de Service d'Immunologie et Hématologie, CHU de Cocody-Abidjan
 - 2- INSERM U547 Institut Pasteur de Lille, France
 - 3- Laboratoire d'Immunologie, CHU de Cocody-Abidjan.
 - 4- Laboratoire d'Immunologie, CHU de Bouaké

Correspondance : Mr DASSE Séry Romuald
CHU Cocody BP V13 Abidjan 01, Côte d'Ivoire
Tél : 00(225) 08 98 44 68
E-Mail : serydasse@yahoo.fr

INTRODUCTION

Les cellules dendritiques constituent la clé de l'induction de l'immunité adaptative. Au plan fonctionnel elles exprimeraient différents phénotypes qui lui permettent d'initier cette réponse adaptative en fonction du type d'agression (6). Entre autres marqueurs associés à la fonction, c'est le CD4 qui est souvent rapporté (4;2).

Pour tenter d'apporter un élément de réponse à la susceptibilité du sujet jeune ou à la résistance de l'adulte vis à vis du paludisme, nous avons précédemment (données non publiées) étudié le phénotype CD4 de la cellule dendritique splénique du rat en fonction de l'âge. Nous avons identifié que les 2/3 des cellules dendritiques du rat exprimaient le CD4 alors que les cellules OX62+CD4- constituent le 1/3 de ces cellules dendritiques. Cependant l'expression de ce marqueur n'étant pas liée à l'âge de l'animal,

l'étude de la sécrétion des cytokines par ces deux types cellulaires chez les deux rats sains et infectés par le Plasmodium berghei pourra permettre de comprendre les bases de la résistance ou de la susceptibilité au paludisme.

En effet la fonction de l'induction de l'immunité adaptative s'effectue à travers l'activation des cellules régulatrices et effectrices par les cytokines sécrétées par la cellule dendritique (3;6). La production des cytokines IL-12 ou IL-4 par la cellule dendritique induit la polarisation vers un profil Th1 ou Th2 associé respectivement à l'état de cytotoxicité ou de l'immunité humorale.

C'est pourquoi la présente étude se donne pour objectif de comparer la quantité de cytokines régulatrices IL-12 et IL-4 sécrétées par le rat sain en fonction de l'âge.

MATERIEL ET METHODES

Les animaux

Ce sont 6 rats Fischer F344 de 4 à 8 semaines repartis en deux groupes. Ils ont été achetés au centre d'élevage HARLAN en Hollande, transportés et élevés dans le service d'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille selon les modalités en la matière:

Un groupe de 3 rats jeunes âgés de 4 semaines.

Un groupe de 3 rats adultes âgés de 8 semaines.

Matériel et réactifs

Communs

Des boîtes de Pétri ; Une passoire à mailles de 100µ de diamètre ; La glace ; Des portoirs ; Des pipettes et micro pipettes graduées ; Des tubes coniques de 15 ml, 45 ml ; Des filtres Type Bultex ; Une centrifugeuse réfrigérée programmable avec frein = 0 ; Des lames de bistouri ; Des seringues de 2ml ; Du bleu Trypan ; Un agitateur à aimant ; Une chambre d'incubation à température réglable ; Une Cellule de MALASSEZ ; De l'Eosine-thiazine ; du méthanol ; Le PAF 4%. Un

dispositif MACS (Magnetic Cell Sorting) de tri cellulaire du laboratoire Miltenyi Biotec composé de:

Des colonnes : LS Columns d'une capacité de 108 cellules marquées maximum sur un total de 2 109 cellules pouvant contenir dans la colonne.

Un aimant : MidiMACS avec adaptateur de colonne Vario MACS.

Une solution de tampon composée de PBS (Phosphate Buffered Salin) enrichi au SVF (Sérum de Veau Fœtal) + EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid). Ce milieu complet (Tampon PBS/SVF/EDTA) est préparé en ajoutant à 1 litre de PBS, 20ml de SVF et 7ml d'EDTA 0,1 M. La solution est ramenée à un pH de 7,4, stérilisée et conservée à 4°C.

Pour le dosage des cytokines: IL-4, IL-12:

Une chaîne ELISA Pasteur et les Kits R&D (Réf C-im-0103) contenant: Capture antibody 360 µg/ml de Souris anti-rat IL-4, anti-rat IL-12. Detection Antibody 27 µg/ml de biotinylated goat anti-rat IL-4, anti-rat IL-12. Standard 100 ng/ml de recombinant rat anti-

rat IL-4, anti-rat IL-12. Streptavidin-HRP (1ml de streptavidine conjuguée à la peroxydase de cheval). TMB (Tétraméthylbenzidine Réf C-im-9002). Plaques ELISA 96 puits (Réf C-im-9010). PBS/Tween 0,05% (Solution de lavage). PBS/BSA 1% (Tampon diluant). HCl 2N (Ref TM-im-9905). Solution d'arrêt (2N H₂SO₄).

Pour l'isolement et l'activation de la cellule dendritique.

La Collagenase D (une clostridiopeptidase du laboratoire Roche).

100mg de Collagenase D lyophilisée ont été dissoutes dans 50ml de milieu complet stérile et filtrée à l'aide de la seringue sur membrane millipore puis conserver à 4°C.

La Solution de NYCODENZ 16%

Dans 100ml de milieu complet stérile, 16g de Nycodenz AG ont été dissous puis porter en agitation électromagnétique et conserver à 4°C.

L'Anti-Rat DC anti OX62 MicroBeads est un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope de la sous unité α E2 de l'intégrine CD103 caractéristique de la cellule dendritique du rat. Il est d'isotype IgG1et de clone OX62. Cet anticorps est fixé sur des microbilles magnétiques et gardé en suspension dans 0,1% de gélatine et 0,05% d'azide de sodium et conserver à 4°C.

Le Milieu de culture neutre ML-10 composé de: RPMI (45ml) ; SVF (5ml) ; Pyruvate de sodium (600 μ l) ; Glutamine (500ml) ; β mercaptopurinol 5.10⁻² M (50 μ l). Des plaques de 96 puits à fond rond.

Méthodologie

C'est une méthode expérimentale qui a permis d'extraire la cellule dendritique splénique du rat jeune et adulte après les étapes suivantes.

La digestion de la rate

Le rat a été endormi à l'éther puis sacrifié; a été conservée et transportée dans un tube de 10 ml sur glace en milieu complet PBS+SVF+EDTA. L'organe a été incubé dans une boîte de pétri contenant 4 ml de Collagenase D pendant 5 minutes. A l'aide de la seringue, l'injection lente de toute la rate avec 2 ml de Collagenase D a été effectuée.

Elle a été découpée en petits morceaux et incubée à 37°C à l'étuve pendant 25 minutes. Après avoir bien homogénéisé dans la Collagenase les morceaux, 400 μ l d'EDTA 0,1 M à pH 7,4 ont été ajoutés (soit 1/10 du volume de la Collagenase) et incubés pendant 5 mn à la température du laboratoire. Après écrasement la suspension obtenue a été lavée 2 fois en milieu complet à 200g pendant 10mn à 4°C puis les globules rouges du culot ont été lyse avec 10ml de solution de lyse. Reprises et homogénéisées dans 50ml de tampon PBS/SVF/EDTA, les cellules de lignée blanche ont subi l'étape suivante.

La sélection des cellules de basse densité

La suspension a été centrifugée à 4°C pendant 10mn à 200g et le culot repris en milieu complet (150.106 cellules pour 1 ml de tampon). Ensuite à raison de volume pour volume la suspension cellulaire a été délicatement versée sur le nycodenz le long de la paroi du tube et centrifugée pendant 15mn à 4°C à 1800g en programme sans frein La couche de cellules de basse densité comprend outre les dendritiques, les monocytes/macrophages et quelques lymphocytes activés de grande taille. Cette couche recueillie dans un tube conique en verre a été lavée une fois en PBS/SVF/EDTA pendant 5 mn à 4°C en programme sans frein. Le culot a été repris dans 20ml du tampon.

La sélection positive des cellules OX62+

La suspension cellulaire a été complétée à 50ml avec du tampon et centrifugée pendant 10mn à 200g à 4°C une fois. Le culot a été repris à raison de 80 μ l de tampon PBS/SVF/EDTA pour 107 de cellules. Puis ces cellules ont été incubées avec les microbilles marquées à l'anticorps OX62, à raison de 20 μ l de microbilles pour 107 de cellules pendant 15 mn sur la glace après avoir bien homogénéisé. Un lavage a été fait à 200g pendant 10 mn à 4°C après avoir complété la suspension à 10ml avec du tampon. Le culot a été ensuite repris dans 500 μ l de tampon et bien homogénéisé.

Le tri cellulaire au MACS

Après l'équilibrage de la colonne LS et sans attendre l'assèchement complet, les

500µl de suspension microbillesOX62/ cellulesCD103+ ont été versés dans le fond de la colonne. Après écoulement total, la colonne a été lavée 3 fois avec 500µl de tampon. La suspension cellulaire recueillie dans le tube est la Fraction OX62-. La colonne a été retirée du dispositif et montée sur un tube en verre puis 1ml de tampon y a été versé. A l'aide d'un coup de piston, le liquide chassé a permis de décrocher tous les complexes qui ont ainsi été recueillis dans le tube de verre. C'est la fraction de cellules OX62+ dont 5,5.10⁶ ont été comptées.

En milieu stérile sous hote à flux laminaire :

Les de cellules dendritiques ont été centrifugées pendant 5 mn à 4°c et à 1200t/

mn. Le culot cellulaire a été repris dans 27,5ml de milieu ML-10 (soit 200 000 cellules par ml). Dans les puits de la ligne C de deux plaques, nous avons distribué 1ml (soit 12 ml avec 200000 cellules/puits; 3 puits par stimulateur). A la suspension cellulaire de 15,5 ml restant (soit 3 100 000 cellules), nous avons ajouté 5,167ml de milieu pour donner un volume total de 20,667ml (soit 150000 cellules/ml). Dans les puits de ligne B des deux plaques, nous avons distribué 1ml (soit 12 ml avec 150 000cellules/puits; 3 puits par stimulateur). Aux 8,667ml restant (soit 1 300 000 cellules), nous avons ajouté 4,333 ml de milieu pour avoir un volume de 13ml de suspension cellulaire (soit 100 000 cellules/ml).

Tableau I: Schéma de distribution des cellules dendritiques dans le milieu neutre

100 000 cd/ml ML-10 1	100 000 cd/ml ML-10 2	100 000 cd/ml ML-10 3
150 000 cd/ml ML-10 4	150 000 cd/ml ML-10 5	150 000 cd/ml ML-10 6
200 000 cd/ml ML-10 7	200 000 cd/ml ML-10 8	200 000 cd/ml ML-10 9

Le dosage de l'IL-4 et l'IL-12 par la technique ELISA Sandwich a été fait dans le surnageant des cellules dendritiques des rats jeune et adulte après les 24 heures de culture en milieu neutre et stérile selon la procédure suivante: Après le «coating» qui a consisté en la fixation de 2 µg/ml (soit 100 µl) d'anticorps anti IL-12, anti IL-4 dans le fond de chaque puits, la plaque a été incubée en «overnight»

à la température de la paillasse. Puis elle a été lavée 5 fois en PBS/Tween 0,05% et bien séchée. Les surnageants de culture des cellules dendritiques ont été recueillis dans les puits d'une autre plaque et après centrifugation à 2000g à 4°c pendant 10 mn, le dosage de chaque cytokine (IL-12, IL-4) par rapport au standard (Std) a été fait en duplicate selon le schéma de la plaque suivant.

Tableau II : Schéma de dosage des cytokines IL-12, IL-4 dans le surnageant de culture des cellules dendritiques en milieu ML-10

A + 100 µl de A	Std 1 200µl de A	Std 1 200µl de A	ML-10 1	ML-10 1	ML-10 9	ML-10 9
B +100µl de Std	Std 2 100µl de tampon	Std 2 100µl de A	ML-10 2	ML-10 2		
C +100µl de Std	Std 3 100µl de tampon	Std 3 100µl de A	ML-10 3	ML-10 3		
D +100µl de Std	Std 4 100µl de tampon	Std 4 100µl de A	ML-10 4	ML-10 4		
E +100µl de Std	Std 5 100µl de tampon	Std 5 100µl de A	ML-10 5	ML-10 5		
F +100µl de Std	Std 6 100µl de tampon	Std 6 100µl de A	ML-10 6	ML-10 6		
G +100µl de Std	Std 7 100µl de tampon	Std 7 100µl de A	ML-10 7	ML-10 7		
H +100µl de Std	Std 8 100µl de tampon	Std 8 100µl de A	ML-10 8	ML-10 8		

«Ung» vãng <http://gaigoitanbinh.xlphp.net/>

Les standards (Std) sont à la concentration de 100 ng/ml ; ils sont reconstitués avec 500µl de diluant. La Solution standard de départ (Solution A) est faite de 570 µl de tampon PBS/BSA 1% ajouté à 30µl d'étalon reconstitué. Dans les 2 puits Std 1, 200µl de la solution A ont été déposés, ensuite dans les puits Std 2 jusqu'aux Std 8, 100µl de tampon PBS/BSA 1% ont été déposés par puits. En procédant par dilution de moitié, nous avons prélevé des puits Std 1, 100µl de la solution A pour les déposer dans les puits Std 2. De ce mélange, 100µl prélevés ont été transférés dans les puits Std 3, ainsi de suite jusqu'aux puits Std 8 d'où 100µl prélevés ont été rejetés. Quant au surnageant, 50µl ont été directement distribués sans dilution préalable. La plaque a été incubée pendant 2 heures à la température du laboratoire et

lavée 5 fois en PBS/ Tween 0,05%. L'anticorps biotinylé dilué au 1/180 a été ajouté à raison de 100µl par puits. Une incubation de 2 heures à la température du laboratoire et 5 lavages comme précédemment ont été réalisés. Il a été ajouté ensuite la streptavidine peroxydase à raison de 10µl/puits. La plaque a été incubée à la température du laboratoire et à l'obscurité pendant 20 minutes puis lavée 5 fois. La révélation a été faite après l'adjonction de 100µl/puits de TMB et une incubation de 5mn à la température du laboratoire et à l'obscurité. La réaction a été arrêtée par 50µl/puits de la solution d'arrêt. La lecture a été effectuée au lecteur ELISA entre 450 et 470 nm.

L'analyse comparative des cytokines a été effectuée grâce au test de l'écart réduit (ϵ) avec le seuil à 1,96.

RESUME

Tableau III : Concentration des cytokines sécrétées (en pg/ml) en fonction de la densité optique (DO) chez le jeune rat sain.

Cytokines	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Concentration fonction de DO moyenne
IL-4	DO : 0,25	DO : 0,30	DO : 0,41	DO : 0,32
				1000
IL-12	DO : 0,35	DO : 0,50	DO : 0,40	DO : 0,41
				820

Tableau IV : Concentration des cytokines sécrétées (en pg/ml) en fonction de la densité optique (DO) chez le rat adulte sain.

Cytokines	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Concentration fonction de DO moyenne
IL-4	DO : 0,25	DO : 0,35	DO : 0,45	DO : 0,36
				1200
IL-12	DO : 0,35	DO : 0,45	DO : 0,45	DO : 0,41
				820

$\epsilon_{IL-12} = 0,029$ et $\epsilon_{IL-4} = 0,060$

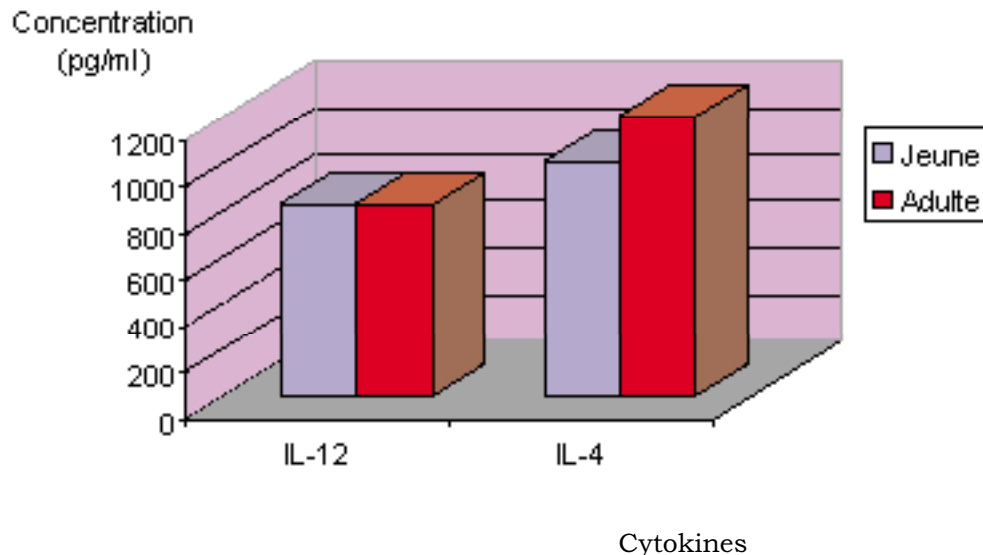


Figure 1 : Comparaison du niveau de sécrétion de l'IL-4 et l'IL-12 des cellules dendritiques spléniques du rat jeune et adulte

La comparaison du niveau de cytokines sécrétées du jeune faite par rapport à celui de l'adulte par le test de l'écart réduit (ϵ) montre qu'aucun écart réduit n'étant supérieur à 1,96, les différences observées ne sont pas significatives.

DISCUSSION

La compréhension des bases immunologiques de la susceptibilité ou de la résistance au paludisme a permis certains travaux dont celui d'Estelle Adam (9) où dans le paludisme expérimental, le rôle des réponses cellulaires TCD4+, TCD8+, B, NK dans le contrôle de l'infection a été démontré (8;16;17;18). Chez l'adulte résistant, on note une augmentation des TCD8+, NK (9). Ces modifications cellulaires qui soutiennent le processus de résistance sont sous la dépendance des cellules dendritiques qui initient la réponse cytotoxique Th1(14) par l'intermédiaire de l'IL-12 (1).

Quant à l'état de susceptibilité, il est associé au profil Th2 ou les facteurs humoraux prédominant (9). Ce profil est sous la régulation de l'IL-4 (13). Si ces données sont connues, ce qui reste à savoir le profil de cytokine qui est associé à l'adulte et au jeune.

C'est pourquoi dans cette étude les taux de base de l'IL-12 et de l'IL-4 ont été comparés chez les rats à ces âges différents. Les résultats de cette étude montrent que la quantité de base d'IL-12 est de 820 pg/ml (selon la densité optique moyenne) aussi bien chez le rat jeune que l'adulte sain. Quant à l'IL-4, les taux sont de 1000 pg/ml et 1200 pg/ml respectivement chez le jeune et l'adulte. Il n'y a pas de différence entre ces deux concentrations d'IL-4.

Ces résultats montrent que quelque soit l'âge de l'animal, la cellule dendritique qui en est issu est capable d'orienter les mécanismes de défense vers l'un ou l'autre des deux profils (Th1/Th2). Autrement dit, la cellule garde sa capacité à sécréter ces interleukines.

La prédominance de l'un ou l'autre des profils chez l'un ou l'autre des animaux doit certainement dépendre d'autres facteurs tel que la nature de l'antigène (7), sa dose, sa voie de pénétration, son affinité avec le récepteur de la cellule T pour l'antigène (TCR), de l'expression des molécules de co-stimulation (5).

A ce stade de notre étude, nos résultats actuels ne peuvent suffire pour expliquer la susceptibilité du sujet jeune à l'infection palustre. Par contre ils nous confirment la disponibilité des armes de sa défense. Les mécanismes de l'organisation de cette défense font intervenir la nature de la cellule dendritique que nous n'avons pas étudié. On sait par exemple que les cellules dendritiques dites plasmacytoïdes et les cellules dendritiques immatures induisent préférentiellement de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 qui entretiennent un environnement d'immunotolérance (11). Mais aussi la maturation et la polarisation de la cellule dendritique sont la conséquence de l'exposition de la cellule aux agents infectieux (12;15). C'est ainsi que la cellule dendritique oriente la réponse immune vers le profil Th1 quand cette cellule est face à la toxine de *Bordetella pertussis*, au LPS bactérien et certaines souches de *Candida albicans* (15). Par contre la toxine du choléra, *Schistosoma mansoni*, font activer le profil Th2 (12; 10). Ces données montrent que c'est la nature de l'antigène et de la cellule dendritique qui déterminent le phénotype résistant associé au profil Th1 (cellulaire). C'est pourquoi il paraît intéressant d'étudier en fonction de l'âge les modifications phénotypiques et de cytokines au cours de l'infection palustre.

CONCLUSION

Le dosage des cytokines effectué dans le surnageant de culture de la cellule dendritique issue du rat jeune et adulte montre qu'*in vitro* et en situation de non stimulation

spécifique (c'est à dire en l'absence d'antigène), cette cellule est capable d'orienter le mécanisme vers le profil cellulaire cytotoxique Th1 ou vers le profil Th2 humoral quelque soit l'âge du sujet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. ALISTAIR N., JAMIE A. LEGGAT and ELSE M. Inderberg CD8+ immunoregulatory cells in the graft-versus-host reaction: CD8 T cells activate dendritic cells to secrete interleukin-12/interleukin-18 and induce T helper 1 auto antibody. *Immunology* 2003 ; 109 : 476-486
2. ARDAVIN C., WU L., Li C.L., SHORTMAN K. Thymic dendritic cells and cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*. 1993 ; 362 : 761-763.
3. BAIRD J. K. Host age as a determinant of natural acquired immunity to plasmodium falciparum. *Parasitol. Today*. 1995 ; 11 : 105-111.
4. BAIRD J.K., JONES T.R., DANUDIRGO E.W., ANNIS B.A., BANGS M.J., BASRI H., Purnomo, MASBAR S. Age-dependent acquired protection against plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyper endemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991 ; 45 : 65-76.
5. BOYTON R J. and ALTMANN D M. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol* 2002 ; 23 : 526-9 10DAN.
6. BRENNAN M., and PUKLAVEC M. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J. Exp. Med.* 1992 ; 175 : 1457.
7. DANIEL M. ALTMANN and ROSEMARY J. Boyton Reciprocal conditioning : T cells as regulators of dendritic cell function. *Immunology* 2003 ; 109 : 473-475.
8. DOOLAN D. L. and HOFFMANN S.L. NK cell and IL12 are required for antigen-specific adaptative immunity against malaria initiated by CD8+ T cells. *J. Immunol.* 1999 ; 163 : 884.
9. ESTELLE A., CHRISTINE P., SOPHIA L., CLAUDE G., ABDELHADI S., MONIQUE C., JAMAL K. The age-related resistance of rats to plasmodium berghei infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. *International journal for parasitology*. 2003.
10. GAGLIARDI MC., SALLUSTO F MARINARO M LANGENKAMP A., LANZAVECCHIA A DE MAGISTRIS MT. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licences them for Th2 priming. *Eur J Immunol* 2000 ; 30 : 2394-403.
11. MALDONADO-LOPEZ R., De SMEDT T, MICHEL P, et al. CD8a+ and CD8a- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 1999 ; 283 : 587-92.
12. MANICKASINGHAM S.P., EDWARDS AD., SCHULZ O., REISE SOUSA C. The ability of murine DENDRITIC cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol* 2003 ; 33 : 101-7.
13. MARIA R. and PERSEPHONE B. The host-pathogen : News themes from dendritic cell biology. *Cell*. 2001 ; 106 : 267-270.
14. OSCAR BRUÑA-ROMERO and Ana RODRIGUEZ Dendritic cells can initiate immune responses against malaria. *Infection and immunity*. 2001 ; 69 (8) : 5173-5176.
15. PULENDRAN B., PALUKA K, BANCHEREAU J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 2001 ; 293 : 253-6
16. STEVENSON M. M., TAM M. F., WOLF S.F., SHER A. IL-12 induced protection against blood stage plasmodium chabaudi AS requires IFN gamma and TNF alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 1995 ; 155 : 2545-2556.
17. VON DER WEID T., HONARVAR N., LANGHORNE J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood-stage malaria infection. *J. Immunol.* 1996 ; 156 : 2510-2516.
18. WEISS W.R., SEDEGAH M, BERZOFSKY J.A., HOFFMANN S.L. The role of CD4+ T cells in immunity to malaria sporozoites *J. Immunol.* 1993 ; 151 : 2690-2698.