

d'ordre : 496

50376  
1980  
180

50376  
1980  
180

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

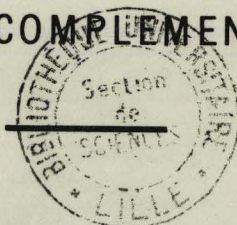
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

**M. ALI OUAISSI**

---

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES INTERACTIONS  
ENTRE SCHISTOSOMA MANSONI ET LE SYSTEME  
DU COMPLEMENT



présentée le 30.10.1980, devant la Commission d'Examen

JURY : M. E. VIVIER  
M. A. CAPRON  
M. A. SOBEL  
M. A. DHAINAUT  
M. A. BART  
M. S. DEBLOCK



SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION GENERALE .....	1
<b>CHAPITRE I : LE SYSTEME DU COMPLEMENT</b>	
INTRODUCTION .....	4
I-NOMENCLATURE	
1-Composants de la voie classique .....	5
2-Composants de la voie alterne .....	6
II-LA VOIE CLASSIQUE	
1-Mécanisme d'activation de la voie classique .....	6
a-Unité de reconnaissance .....	6
b-Unité d'activation .....	12
c-Unité d'attaque de la membrane .....	12
2-Régulation de la voie classique .....	13
a-Effet "Decay" .....	13
b-Relation récepteur-site actif .....	13
c-Inactivateurs des composés du complément .....	13
$\alpha$ -Inactivateur du C $\bar{1}$ .....	13
$\beta$ -Inactivateur du C3 .....	13
$\gamma$ -Autres types d'inactivateurs .....	14
III-LA VOIE ALTERNE	
1-Mécanismes d'activation de la voie alterne .....	14
a-Formation d'une convertase alterne initiale ..	14
b-Formation d'une convertase alterne amplificatrice	
2-Régulation de la voie alterne .....	17
a-Effet stabilisant de la properdine .....	17
b-Dissociation de la convertase amplificatrice ..	17
 <b>CHAPITRE II : NIVEAUX D'INTERACTION ENTRE <u>SCHISTOSOMA MANSONI</u></b>	
<b>ET LE SYSTEME DU COMPLEMENT.</b>	
 I-RAPPELS CONCERNANT LE CYCLE ET LES DIFFERENTS STADES EVOLUTIFS	
DE <u>S.MANSONI</u> .	
1-Cycle évolutif.....	18
2-Description des différents stades évolutifs	
de <u>S.mansoni</u> .....	18
a-Oeufs .....	21
b-Miracidium .....	21
c-Sporocystes .....	21

d-Cercaire .....	22
e-Schistosomule o-3h .....	24
f-Schistosomule poumon (5 jours) .....	24
g-Schistosome adulte .....	24
II-ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LE NIVEAU DES	
INTERACTIONS ENTRE <u>S.MANSONI</u> ET LE SYSTEME DU COMPLEMENT	
1-Cytotoxicité par anticorps et complément .....	25
2-Interactions avec la voie alterne .....	29
a-Rôle de la voie alterne dans la lyse des	
cercaires .....	29
b-Association entre le troisième composant	
du complément (C3) et le tégument des	
schistosomes .....	29
c-Rôle du complément dans les mécanismes	
d'adhérence cellulaire .....	30

### CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

#### I-MATERIELS

1-Souches .....	33
2-Obtention des parasites .....	33
a-Cercaires .....	33
b-Schistosomules "peau" .....	33
c-Schistosomules " artificiels" .....	33
d-Schistosomules " poumon" .....	35
e-Schistosomes adultes .....	36

#### II-METHODES

1-Préparation des antigènes de vers adultes .....	36
a-Antigènes métaboliques .....	36
b-Extrait total de schistosomes .....	36
2-Produits et réactifs .....	36
a-Collagène et albumine humaine .....	36
b-Immunoglobulines .....	36
c-Sources de complément .....	39

$\alpha$ -Purification du C <sub>1q</sub> .....	39
$\beta$ -Sérums .....	39
$\gamma$ -Préparation de R <sub>3</sub> ,R <sub>B</sub> ,R <sub>D</sub> et dosage du C <sub>4</sub> ..	39
1-Préparation des complexes EAC .....	40
2-Téchniques de marquage .....	41
a-Marquage à l' <sup>125</sup> I	
$\alpha$ - <sup>125</sup> I-C <sub>1q</sub> .....	41
$\beta$ - <sup>125</sup> I-IgG .....	41
b-Marquage à la fluorescéine .....	41
1-Test de liaison au <sup>125</sup> I-C <sub>1q</sub> .....	42
2-Téchniques de microscopie électronique .....	42
a-Microscopie électronique à transmission ....	42
b-Microscopie électronique à balayage .....	43

## TRAVAUX PERSONNELS

### 1re PARTIE : INTERACTIONS ENTRE S.MANSONI ET LA PREMIERE VOIE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT.

INTRODUCTION .....	44
I-MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR POUR LE FRAGMENT Fc DES IgG ET/OU DE LA $\beta$ 2-MICROGLOBULINE HUMAINE A LA SURFACE DES SCHISTOSOMULES.	
1-Test des rosettes EA .....	45
2-Expériences d'inhibition .....	49
3-Utilisation des IgG marquées à la fluorescéine ou à la peroxydase .....	56
a-Immunofluorescence .....	56
b-Microscopie électronique .....	57
4-Résumé .....	62
II-MISE EN EVIDENCE DE LA MODULATION DU RECEPTEUR Fc	
1-Disparition des fragments Fab des IgG fixées à la surface des schistosomules .....	63
a-Téchnique des rosettes .....	63
b-Immunofluorescence indirecte .....	65
2-Effet des inhibiteurs d'enzymes sur la formation de rosettes EA .....	65
3-Hydrolyse des IgG par les protéinases des schistosomules .....	68

a-Incubation des schistosomules avec des IgG marquées à l' $^{125}\text{I}$ .....	68
b-Incubation des IgG "froides" avec des produits d'incubation de schistosomules (PIS) ...	68
4-Etude de la spécificité enzymatique des produits d'un incubat de schistosomules .....	70
5-Discussion .....	72
III-INTERACTION ENTRE LES SCHISTOSOMULES ET LE PREMIER COMPOSANT DU COMPLEMENT	
1-Mise en évidence d'un récepteur $\text{C}_{1q}$ à la surface des schistosomules .....	73
a-Formation de rosettes $\text{EAC}_{1q}$ .....	73
b-Inhibition de formation de rosettes .....	76
c-Fixation de $\text{C}_{1q}$ marqué à la fluorescéine (FITC- $\text{C}_{1q}$ ) .....	76
d-Fixation du $\text{C}_{1q}$ marqué à l' $^{125}\text{I}$ ( $^{125}\text{I}-\text{C}_{1q}$ ) ...	78
- Schistosomules	
- Antigènes de schistosomes adultes.....	78
e-Résumé .....	82
2-Analyse du mécanisme d'activation de la voie classique du complément par les schistosomules: Rôle du récepteur $\text{F}_c$ .....	84
a-Fixation du $\text{C}_{1q}$ aux IgG présentes à la surface des schistosomules .....	84
b-Approche de l'activation séquentielle par le dosage de consommation du $\text{C}_4$ .....	87
-Sérum humain agammaglobulinique restauré avec des IgG humaines .....	87
-Sérum humain restauré avec des produits de l'hydrolyse des IgG humaines par l'incubation de schistosomules (PHIg) .....	87
-Sérum humain agammaglobulinique restauré avec des fragments $\text{F}_c$ ou $\text{F}_a$ d'IgG humaine .....	91
3-Résumé .....	93

2e PARTIE : INTERACTIONS ENTRE S.MANSONI ET LA VOIE ALTERNE  
D'ACTIVATION DU COMPLEMENT

I-ACTIVATION DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLEMENT PAR  
LES SCHISTOSOMULES : INDUCTION DE CHANGEMENTS  
MORPHOLOGIQUES.

1-Test de cytotoxicité .....	96
2-Microscopie optique .....	96
3-Microscopie électronique à transmission .....	96
4-Microscopie électronique à balayage .....	100
5-Résumé et discussion .....	100

II-MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR POUR LE C3b

A LA SURFACE DES SCHISTOSOMULES ET CERCAIRES.

1-Formation de rosettes EAC3b .....	106
2-Tests d'inhibition .....	108
3-Etude en immunofluorescence .....	109
4-Résumé .....	109

COMMENTAIRES GENERAUX .....	113
-----------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE .....	116
---------------------	-----

INTRODUCTION

GENERALE



Depuis le milieu du XXe siècle, une partie de l'humanité a pris conscience que bien des pays du Tiers-Monde vivent dans des conditions d'hygiène et de malnutrition précaires. Les affections parasitaires qui sévissent dans certains pays ont un retentissement économique très important.

Parmi ces parasitoses, la Schistosomiase (ou bilharziose) est une maladie très répandue. Schistosoma mansoni est l'agent de la schistosomiase intestinale, il est transmis par des mollusques aquatiques du genre Biomphalaria. Les vers adultes habitent généralement la veine mésentérique inférieure et ses tributaires, et pondent des oeufs ayant un éperon latéral. Dès que l'hôte intermédiaire est présent et que l'homme infeste l'eau par ses selles, le cycle est établi.

Cette affection touche plus de 200 millions d'individus dans le monde. Certes la thérapeutique médicamenteuse existe mais la possibilité d'une réinfection subsiste et ce problème se pose de façon cruciale dans les zones d'endémie. Il s'avère alors d'une importance capitale de mettre au point des méthodes d'immunoprévention et d'immunothérapie pour lutter efficacement contre la bilharziose. Cet objectif ne peut être atteint sans la compréhension des mécanismes qui régissent les relations hôte-parasite.

A l'exception de certaines espèces qui manifestent une résistance naturelle à l'infection telles que le chat et le pigeon qui présentent une résistance totale, le rat et le singe rhésus qui présentent une résistance partielle. Celle-ci est caractérisée par le fait que les larves infestantes deviennent des vers adultes mais sont éliminées après un délai de quelques semaines par un phénomène de "self-cure". D'une manière générale, l'organisme infesté développe une immunité à la réinfection en ce sens que les larves provenant de nouvelles infections sont détruites alors que les vers adultes de la première infection peuvent persister très longtemps dans l'organisme. Cet état de résistance se manifeste de façon plus ou moins intense suivant les espèces. Les mécanismes responsables de cette immunité à la réinfection ont fait l'objet de très nombreux travaux ces dernières années et peuvent être classés schématiquement en deux grands groupes :

- Le premier comporte des anticorps cytotoxiques qui agissent en présence de complément ; c'est ainsi qu'un anticorps cytotoxique, de classe IgG, actif en présence de complément a été détecté dans des sérums humains provenant de patients infectés et dans les sérums de certains animaux : Lapin, rat, cobaye et singe rhésus.
  
- Le deuxième englobe différentes populations cellulaires qui coopèrent avec des anticorps et/ou du complément. Cette association a pour conséquence la lyse de la forme larvaire précoce du parasite : Le schistosomule. C'est ainsi que des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, en présence d'anticorps et/ou de complément, sont capables d'induire des lésions importantes au niveau des schistosomules. De même, est à signaler une action conjointe des macrophages de rats normaux et d'anticorps de nature IgG1 contenus dans un sérum de rat infecté par S. mansoni. Deux mécanismes récents, comportant une interaction des anticorps de classe IgE spécifiques anti-S. mansoni avec des macrophages ou des éosinophiles de rat les rendant cytotoxiques vis-à-vis du schistosomule, ont été démontrés dans notre laboratoire. Malgré l'existence de ces divers mécanismes effecteurs, le parasite peut survivre dans l'organisme pendant de longues périodes.

L'étude des mécanismes de survie des parasites a suscité un grand intérêt dans de nombreux modèles parasitaires de façon générale. Il s'avère que les parasites possèdent des moyens qui leur sont propres pour échapper partiellement à la réponse immune de l'hôte. Ils peuvent varier l'expression de leurs antigènes de surface, ce qui leur permet d'échapper à l'effet des anticorps qu'ils ont suscités ; l'exemple est fourni par les plasmodium et les Babesia. Dans certains cas, le parasite s'isole du milieu environnant à l'intérieur de kystes, c'est le cas des trichines, cysticerques, hydatides.

Si l'on s'intéresse de façon particulière au cas de Schistosoma mansoni, l'une des caractéristiques les plus frappantes dans les relations de ce parasite avec son hôte est que les vers adultes continuent de vivre normalement pendant de longues périodes, alors que des jeunes schistosomules issus d'une nouvelle infection sont détruits par la réponse immune de l'hôte. L'immunité acquise est donc efficace contre une infection d'épreuve alors qu'elle n'affecte pas les vers adultes installés à la suite de l'infection initiale.

Ce concept d'"immunité concomitante" pose une question fondamentale qui est celle de savoir comment les schistosomes sont capables d'échapper à la réponse immune de l'hôte.

L'étude de l'interface hôte-parasite a démontré l'existence chez les schistosomes de déterminants antigéniques identiques à ceux de l'hôte vertébré. Ces antigènes sont absorbés passivement ou peut-être synthétisés par le parasite, et l'hypothèse formulée est que ces antigènes masqueraient ceux proprement parasitaires, de telle façon qu'ils réalisent une sorte de "déguisement" favorable au parasite. Le parasite peut ainsi agir au niveau central de la réponse immune de l'hôte en modifiant la réactivité des cellules immunocompétentes, entraînant ainsi un dysfonctionnement du système immunitaire.

Les travaux que nous avons réalisés montrent l'existence de nouvelles interactions entre les schistosomes et le système du complément ; or celui-ci représente un médiateur essentiel de certains mécanismes immunologiques fondamentaux tels que la cytotoxicité ou l'adhérence immune. Avant de procéder à l'examen de nos résultats, il est toutefois nécessaire de faire un bref rappel des données récentes concernant le complément sérique et les concepts relatifs à ses deux voies d'activation, et situer l'état actuel de nos connaissances sur le niveau des interactions entre Schistosoma mansoni et le système du complément.

CHAPITRE I

---

---

LE SYSTEME DU COMPLEMENT

---

---

## INTRODUCTION

Les propriétés bactéricides et hémolytiques de certains sérums furent connues depuis le XIXe siècle. BORDET en 1895 constatait qu'un sérum de chèvre immunisée avec des vibrions cholériques contenait une substance thermostable (58° C, 60 min.), qui peut être distinguée d'un facteur thermolabile présent dans le sérum de cobaye normal. La conjugaison de ces deux facteurs entraîne la lyse des bactéries. Ce même type d'expériences reproduites en substituant aux vibrions cholériques des érythrocytes d'une autre espèce, aboutissent à l'immunohémolyse BORDET, 1898. C'est l'étude des mécanismes de l'immunohémolyse qui apporta les plus importantes informations sur l'interaction entre le facteur thermostable : L'anticorps, et le facteur thermolabile : Le complément (BORSOS et RAPP, 1965 a, b ; HUMPHREY et DOURMASHKIN, 1965).

Actuellement, le terme complément regroupe un système de 11 protéines sériques qui constituent approximativement 10 % en poids de la fraction globulinique d'un sérum humain normal (MULLER-EBERHARD, 1969). Ces protéines existent dans le sérum généralement sous forme inactive ; en présence de certains composés, notamment des complexes antigènes-anticorps, des bactéries, des virus, ou certaines cellules de mammifères, on assiste à une activation séquentielle des différents composants du complément qui peut se faire par deux voies (classique ou alterne), soumises à des mécanismes de régulation.

Cette activation a pour conséquence la formation de complexes multimoléculaires à la surface des membranes biologiques pouvant, soit entraîner des modifications structurales et fonctionnelles aboutissant à la lyse cellulaire, soit activer des fonctions cellulaires spécialisées telles que l'immunoadhérence et la phagocytose, soit induire des processus inflammatoires tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la migration des leukocytes (chimiotactisme), la dégranulation des mastocytes et le relargage d'histamine.

.../...



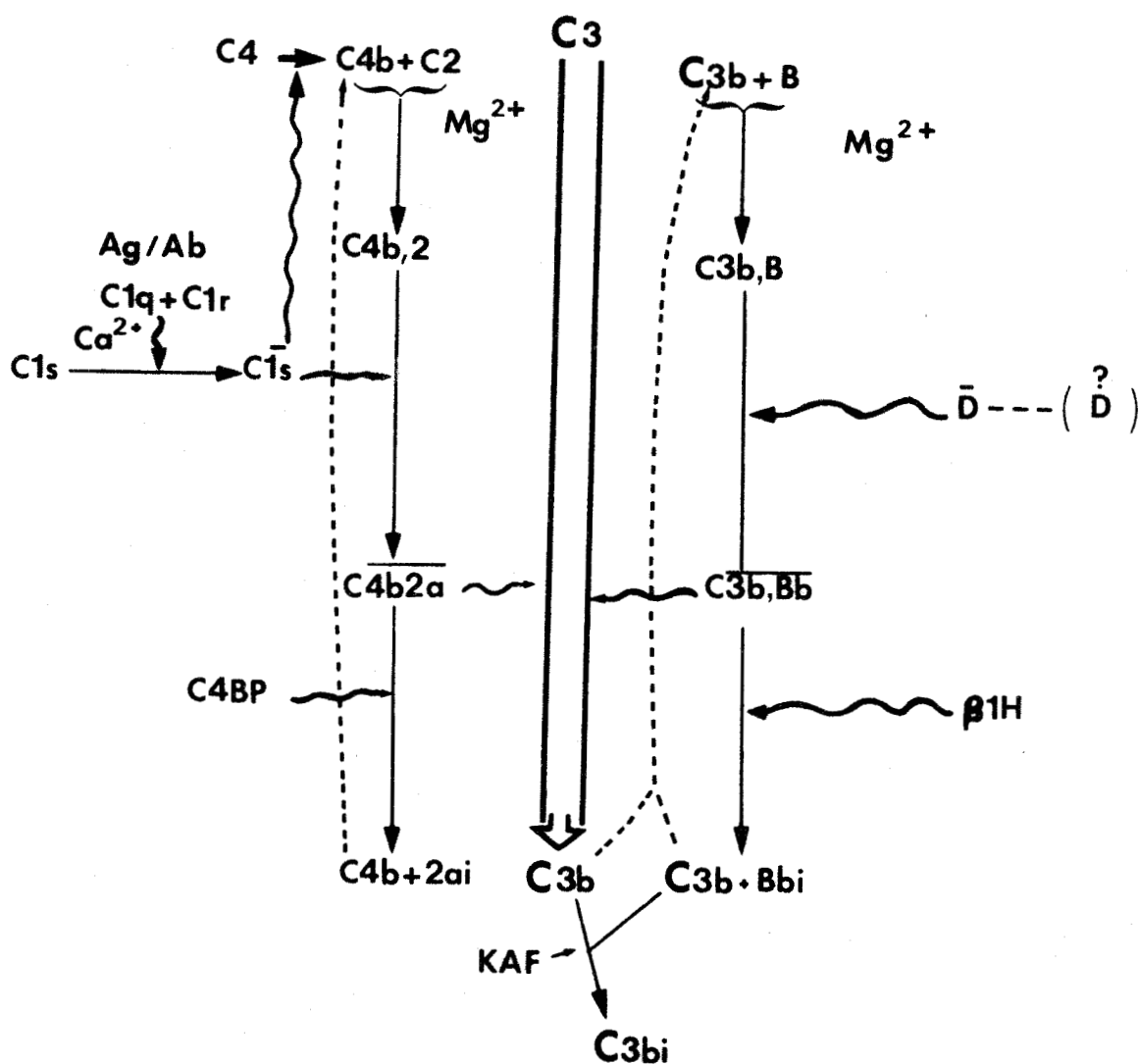
Deux séquences d'activation sont actuellement connues. La première intitulée "voie classique" débute par la fixation du premier composant du complément ( $C_1$ ), l'autre "alterne" impliquant le système de la properdine. Les deux voies d'activation se rejoignent au niveau du troisième composant du complément ( $C_3$ ) et empruntent une voie commune de  $C_5$  à  $C_9$ , aboutissant à l'insertion de ces composants dans les membranes cellulaires.

Sur le plan phylogénique, le  $C_3$  et le  $C_5$  semblent être les molécules clés à partir desquelles le système du complément a évolué. Elles présentent une analogie dans leur structure primaire, ce qui suggère que ces deux molécules ont dérivé d'une même molécule ancestrale.

L'élément le plus important qui représente la plaque tournante de l'activation du complément (schéma page 6 ) est la production d'enzymes  $C_3$ -convertases ( $C_{42}$  pour la voie classique et  $C_{3b, Bb}$  pour la voie alterne) qui agissent sur le  $C_3$ . La voie terminale du complément qui est commune aux deux voies d'activation se distingue par le fait qu'elle ne fait pas intervenir de système enzymatique. Elle consiste en un assemblage multimoléculaire des composés terminaux du complément qui s'insèrent au niveau des membranes biologiques.

Il nous a semblé intéressant pour les travaux que nous exposerons ultérieurement, de décrire les deux mécanismes d'activation du complément, même de façon schématique, en sachant que des revues très récentes ont fait le point des connaissances sur les diverses composantes de ce système, ses fonctions, ses mécanismes d'activation et de régulation (MULLER-EBERHARD, 1975 ; GOTZE et MULLER-EBERHARD, 1976 ; KAZATCHKINE et coll., 1979 ; DESSAINT et coll., 1979 ; LACHMANN, 1979).

.../...



Formation des C3 convertases de la voie classique et alterne.  
(LACHMANN, 1979).

## I - NOMENCLATURE

### 1 - VOIE CLASSIQUE ET COMPOSANTS TERMINAUX DE LA SEQUENCE D'ACTIVATION

(Tableau I)

Les composés individuels qui interviennent dans la voie classique sont numérotés  $C_1, C_4, C_2, C_3, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9$  dans l'ordre de leur interaction. Les neuf constituants comprennent en réalité 11 protéines. En effet le premier composant  $C_1$  est un complexe trimoléculaire formé de trois sous-unités :  $C_{1q}, C_{1r}$  et  $C_{1s}$ . L'existence d'une quatrième sous-unité  $C_{1t}$  a été suggérée récemment par ASSIMEH et PAINTER en 1975.

Lors du processus d'activation les composés du complément acquièrent des activités enzymatiques, celles-ci sont désignées en plaçant une barre au-dessus du numéro du composé activé ( $C_1 \rightarrow C_1$ ). Après la perte de cette activité le produit inactivé porte l'indice (i). Les produits de clivage des composés du complément sont affectés d'un indice (a, b, c...). Il est généralement admis que lorsqu'un composé est scindé en deux fragments, au petit fragment est affecté l'indice a, l'indice b au fragment de taille supérieure. Ainsi la  $C_3$  convertase clive le  $C_3$  en  $C_{3a}$  et  $C_{3b}$ , le  $C_{3a}$  étant le fragment de plus faible poids moléculaire. Les chaînes polypeptidiques sont désignées par les lettres grecques ( $C_{3\alpha}, C_{3\beta}$ ).

### 2 - VOIE ALTERNE (Tableau II)

Les éléments qui interviennent dans la voie alterne portent l'appellation de facteurs et sont désignés par des lettres capitales. Ainsi les lettres B, D et P désignent successivement : Le facteur B, le facteur D et la properdine. Le facteur d'initiation (SCHREIBER et coll., 1976) analogue au facteur néphritique ( $C_3$  NeF) est désigné par les lettres IF.

.../...

Tableau I - Propriétés physicochimiques des protéines humaines intervenant dans la séquence de la voie classique

	Constante de sédimentation	Mobilité électrophorétique	Poids moléculaire	Concentration sérique appr. $\mu$ g/ml	Nombre de chaînes	Thermolabilité
$\left\{ \begin{array}{l} C_{1q} \\ C_{1r} \\ C_{1s} \end{array} \right\}$	11,1 S	$\gamma 2$	400 000	180	6 x 3	++
$C_1$	7,5 S	$\beta$	180 000	100	1 x 2	++
	4,5 S	$\alpha$	86 000	110	1	-
$C_4$	10 S	$\beta 1$	206 000	640	3	-
$C_2$	4,5 S	$\beta 1$	117 000	25	1	++
$C_3$	9,5 S	$\beta 2$	180 000	1 600	2	-
$C_5$	8,7 S	$\beta 1$	180 000	80	2	-
$C_6$	5,5 S	$\beta 2$	130 000	75	-	+
$C_7$	7 S	$\beta 2$	110 000	55	-	-
$C_8$	8 S	$\gamma 2$	163 000	< 80	3	+
$C_9$	4,5 S	$\alpha$	79 000	< 230	-	-
$C_T$ inhibiteur ( $C_1$ -INH)	3,7 S	$\alpha 2$	105 000	180	1	-
$C_4$ BP (binding protein)	10,7 S	$\beta$	~ 550 000	-	8 ?	-

LACHMANN, 1979  
 The Antigens. Academic Press. New York. San Francisco. London. V, p. 289



Tableau II - Protéines de la voie alterne

Protéine	Symbole	Conc.sérique (Mg/ml)	Constante de sédimentation	Poids moléculaire	Nombre de chaînes constitutives	Mobilité électro- phorétique
Properdine	P	25	5,4	184 000	4	$\gamma$ 2
Facteur B	B	200	5-6	100 000	1	$\beta$
Facteur D	D	-	3	24 000	1	$\alpha$
C <sub>3b</sub> inactivateur	KAF	34	6	95 000	? 2	$\beta$ 1
$\beta$ 1H	$\beta$ 1H	516	7	150 000	1	$\beta$ 1
Facteur néphritique	Nef	0	7-8	155 000	2 x 2	$\delta$

LACHMANN, 1979

The Antigens. Academic Press. New York. San Francisco. London. V, p. 290





### 3 - COMPLEXES INTERMEDIAIRES

Lorsque l'activation du système du complément se produit à la surface d'un érythrocyte (E) recouvert d'anticorps (A), les complexes formés sont désignés par les lettres EAC suivies des composés du complément qui le composent. Ainsi l'abréviation EAC1-7 correspond aux complexes EAC 1423567.

### 4 - INHIBITEURS ET INACTIVATEURS

Une substance qui inhibe stœchiométriquement un composé du complément porte le nom de substance inhibitrice. Un enzyme qui détruit un composé activé est un inactivateur. Ainsi il existe un inhibiteur du  $C_1$ , des inactivateurs du  $C_{3b}$  (et  $C_{4b}$ ), du  $C_{3a}$  (et  $C_{5a}$ ).

## II - MÉCANISMES D'ACTIVATION DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT

Nous étudierons la formation de la  $C_3$  convertase lors de l'activation du complément soit par la voie classique, soit par la voie alterne. La voie effectrice commune conduisant à la cytolyse sera étudiée séparément.

### 1 - FORMATION DE LA $C_3$ CONVERTASE "CLASSIQUE"

La première étape est l'activation du  $C_1$  qui est l'unité de reconnaissance, par un certain nombre de substances (Tableau III), les plus importantes étant certains anticorps de classe IgG ou IgM complexés à l'antigène.

#### a - Activation du $C_1$ par les immunoglobulines

Les études effectuées chez diverses espèces ont montré que le pouvoir d'activer le complément par les immunoglobulines diffère d'une espèce à l'autre et au sein d'une même classe d'immunoglobulines (Tableau IV).

La fonction de reconnaissance est le  $C_{1q}$  (Fig. 1 a, Fig. 12) (MULLER-EBERHARD et coll., 1966). Les parties globulaires du  $C_{1q}$  se fixent

.../...



Tableau III - Activateurs de la voie classique

Fc des IgM 1 molécule IgM Fc des IgG 1, 2, 3	) ) ) ) ) ) ) ) ) ) )	Sous forme d'immuns complexes
DNA, IgG aggrégées		
Plasmine, Trypsine		
Certains virus, schistosomules en présence d'IgG (Fc)		
Conglutinine		
Protéine C, polysaccharides du pneumocoque		
Polyanions, héparine, protamine		

Tableau IV - Les immunoglobulines qui activent le système du complément

	Voie classique	Voie alterne
Anticorps de cobaye	IgG 2	IgG 1 F(ab)'2
Anticorps de ruminants	IgG 1	IgG 2 F(ab)'2
Anticorps de lapins	IgG, IgM	F(ab)'2
Anticorps de souris	IgG 2a, IgM	IgA
Protéines humaines myéломateuses agrégées	IgG 3 et IgG 1 > IgG 2	Activité variable
Anticorps humain	IgG, IgM (dans la plupart des cas)	Certains sérums anti-HLA

LACHMANN, 1979

The Antigens. Academic Press. New York. San Francisco. London. V, p. 300



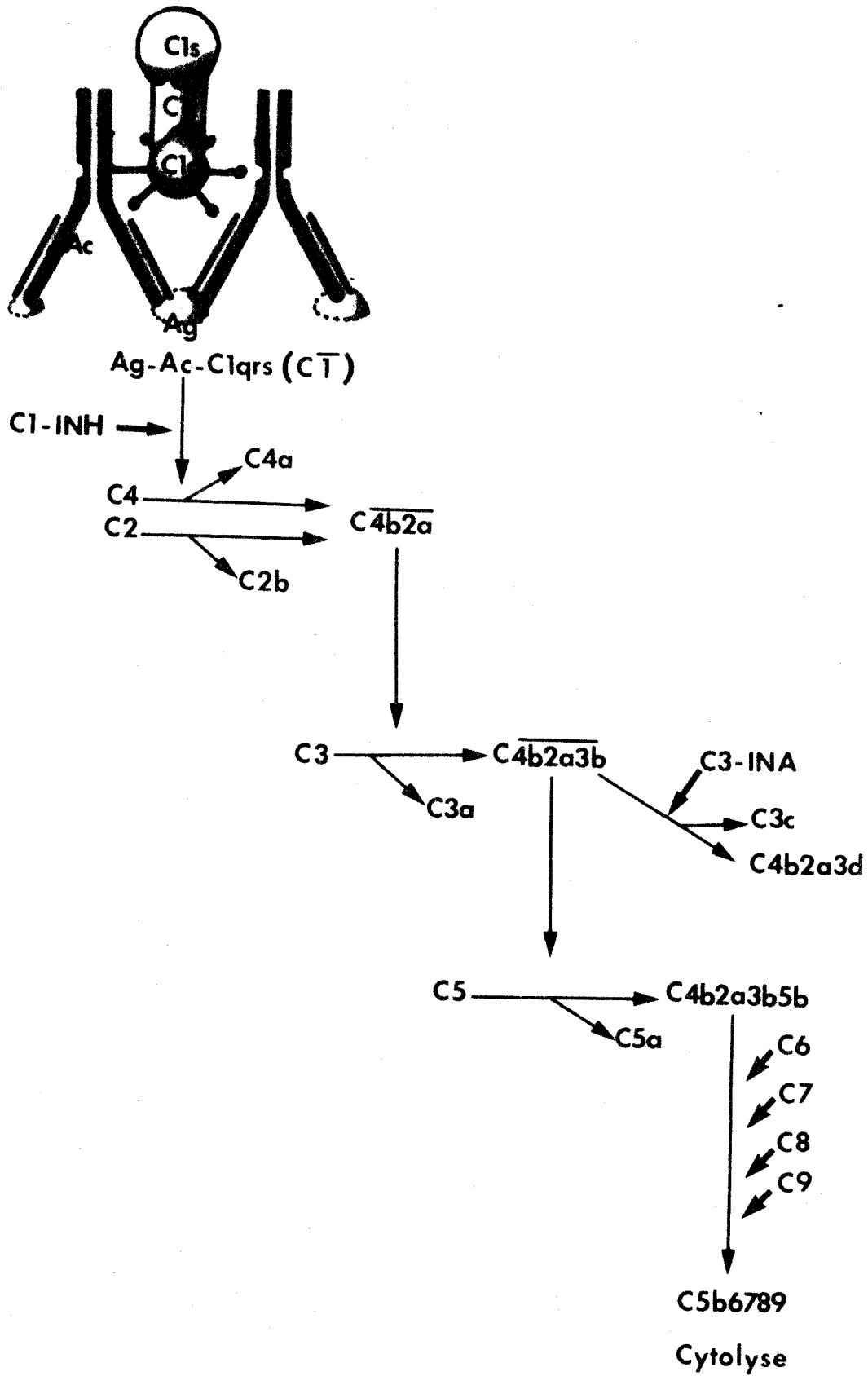


Fig 1a: LA VOIE CLASSIQUE



de façon réversible à la région Fc des immunoglobulines (domaine CH<sub>2</sub> des IgG, domaine CH<sub>4</sub> des IgM) préalablement complexées à l'antigène ou agrégées par la chaleur (TARANTA et FRANKLIN, 1961 ; KEHOE et FOUGEREAU, 1970 ; AUGENER et coll., 1971 ; ELLERSON et coll., 1972 ; HURST et coll., 1974 ; ALLAN et ISLIKER, 1974). Alors qu'une molécule d'IgM peut fixer le C<sub>1q</sub>, les IgG doivent former un doublet et les deux molécules adjacentes fixent le C<sub>1q</sub> au niveau de leur deuxième domaine (CH<sub>2</sub>).

La fixation du C<sub>1q</sub> induit des changements de conformation du C<sub>1r</sub> (VALET et COOPER, 1974) qui acquiert une activité enzymatique (C<sub>1r</sub>) et clive le C<sub>1s</sub> en deux peptides PM. 50 000 et 30 000 dalton. Le peptide de faible PM a une activité enzymatique de type sérine-estérase (C<sub>1s</sub>) (SAKAI et STROUD, 1973-74) qui à son tour agira sur le C<sub>4</sub> et le C<sub>2</sub>. Les chélateurs du calcium (EDTA, EGTA) qui dissocient le C<sub>1</sub> en ses constituants (C<sub>1q</sub>, C<sub>1r</sub> et C<sub>1s</sub>) empêchent l'initiation de la voie classique calcium dépendante. L'interaction du C<sub>1q</sub> et des Fc d'IgM ou d'IgG fixant le complément est réversible. Le C<sub>1q</sub> ayant donné naissance à une C<sub>1</sub> estérase peut gagner un autre site de fixation et reformer une nouvelle C<sub>1</sub> estérase (fixation et transfert du C<sub>1q</sub>).

La fixation du C<sub>1</sub> par les immunoglobulines a été souvent associée à l'activation du système du complément. Cependant il a été démontré récemment (FUST et coll., 1976) que certaines IgM monoclonales fixent le complément sans qu'il y ait activation.

b - Activation du C<sub>1</sub> par d'autres substances autres que les immunoglobulines

De nombreuses substances autres que les immunoglobulines peuvent interagir avec le C<sub>1q</sub> et activer le complément par la voie classique (voir revue LACHMANN, 1979). Ceci est observé dans le cas de certains polymères acides (héparine, DNA, mucopolysaccharides), certaines endotoxines bactériennes et des agrégats d'héparine et de protamine.

.../...



L'activation du complément par la voie classique, dépendante de la présence d'ions calciques, peut aussi se produire lors de l'interaction de la protéine C avec les polysaccharides du pneumocoque ou des "immunoconglutinines" avec le  $C_3$ .

Indépendamment de la fixation du  $C_{1q}$ , le  $C_1$  peut être activé par des enzymes (trypsine, plasmine, Kallicrème). Ceci est probablement le résultat soit d'une activation indirecte par le biais du  $C_{1r}$ , soit d'une activation directe du  $C_{1s}$ . L'ensemble de ces mécanismes aboutissent à la formation d'une  $C_1$  estérase fonctionnelle ( $C_1$ ) qui est en réalité la première étape de la séquence d'activation de la voie classique.

c - Formation de la  $C_3$  convertase de la voie classique  
(Fig. 1 a)

Cette unité est initiée par la  $C_1$  estérase qui clive le  $C_4$  en  $C_{4a}$ ,  $C_{4b}$  et le  $C_2$  en  $C_{2a}$ ,  $C_{2b}$ . Les fragments majeurs  $C_{4b}$  et  $C_{2a}$  fusionnent (MULLER-EBERHARD et coll., 1967) se fixent à la membrane de la cellule-cible (dans le cas de l'immunohémolyse, c'est la membrane erythrocytaire). Le complexe  $C_{4b, 2a}$  constitue la  $C_3$  convertase de la voie classique, elle peut agir sur plusieurs molécules de  $C_3$  en les scindant en deux fragments  $C_{3a}$  et  $C_{3b}$ . L'activité  $C_3$  convertase réside dans la sous-unité  $C_{2a}$ , le  $C_{4b}$  agissant comme stabilisateur et probablement modulateur du  $C_{2a}$ . Le fragment majeur  $C_{3b}$  s'associe avec le  $C_{4b, 2a}$  pour former un complexe trimoléculaire  $C_{4b, 2a, 3b}$  ayant une activité enzymatique dont le substrat est le  $C_5$ .

2 - REGULATION DE LA VOIE CLASSIQUE

La séquence d'activation de la voie classique est soumise à des facteurs de régulation qui tendent à freiner l'emballement du système.

.../...

a - Effet "Decay"

La dissociation du fragment  $C_{2a}$  des complexes  $C_{4b, 2a}$  tend à limiter le phénomène d'activation (LACHMANN et THOMPSON, 1970 ; MAYER, 1970).

En effet, l'enzyme  $C_{4b, 2a}$  est instable, sa demie-vie est d'environ 5 min. à 37° C. Le fragment  $C_{2a}$  est libéré dans le milieu sous forme inactive, alors que le  $C_{4b}$  peut interagir avec d'autres molécules de  $C_2$ .

b - Relation récepteur-site actif

Alors qu'une molécule de  $C_1$  fixée par cellule-cible suffit à lyser 63 % de la population cellulaire (fixation et transfert du  $C_{1q}$ ), 400 molécules de  $C_4$  donnent 20 molécules de  $C_4$  liée dont une seule est effective.

c - Inhibiteurs et inactivateurs des composants du complément

$\alpha$  - Inhibiteur du  $C_1$

Le sérum normal contient un facteur ( $C_1$ -INH) qui inhibe l'activité enzymatique de  $C_T$  (RATNOFF et LEPOW, 1957 ; LEPOW et coll., 1958 ; LEVY et LEPOW, 1959 ; GIGLI, 1974). Cet inhibiteur est une  $\alpha_2$  neuraminoglycoprotéine ; elle bloque stoechiométriquement le  $C_{Ts}$ , le  $C_{Tr}$  et inactive d'autres sérums estérases comme la plasmine et la kallikréine, ainsi que les facteurs XII a et XI a du système de la coagulation (RATNOFF et coll., 1969 ; FORBES et coll., 1970). Dans le cas du  $C_T$ , le  $C_1$ -INH agit comme un substrat compétitif, et est consommé durant la réaction d'inhibition. Le déficit héréditaire en  $C_1$ -INH entraîne une consommation du complément par perte de l'homéostasie de l'activation du  $C_1$  et des troubles de la coagulation et vasomoteurs par le biais des kinines.

.../...

### $\beta$ - Autres types d'inactivateurs

Il a été démontré que le  $C_3$ -inactivateur (KAF) peut jouer un rôle dans le clivage du  $C_{4b}$  (COOPER, 1975), cette réaction nécessite la présence d'un cofacteur analogue à la BIH : La  $C_4$ BP ( $C_4$  Binding Protein). (FUJITA et coll., 1978). L'action de la  $C_4$ BP tendrait donc à déstabiliser le complexe  $C_42$ .

Une autre substance qui inactive le  $C_4$  et est sans action sur le  $C_2$  a été retrouvée dans les englobulines de cobaye (OPFERKUCH et coll., 1968). L'identité possible entre cette substance et la  $C_4$ BP n'est pas encore établie.

### 3 - FORMATION DE LA $C_3$ CONVERTASE ALTERNE (Fig. 1b)

Elle peut être initiée par une grande variété de substances (Tableau V), de particules ou cellules dont la surface est pauvre en acide sialique.

#### a - Convertase alterne initiale

Dans un système in vitro utilisant des protéines purifiées, l'obtention d'une convertase alterne initiale fait intervenir à la fois le  $C_3$ , le facteur B, le facteur D (sous forme active  $\bar{D}$ ), la properdine et du magnésium (FEARON et AUSTEN, 1975 a). La convertase alterne initiale se caractérise par le fait qu'elle contient du  $C_3$  natif et non du  $C_{3b}$ , de même qu'elle nécessite davantage de facteur B et  $\bar{D}$  pour sa formation. De l'activité de cette convertase résulte le clivage du  $C_3$  en  $C_{3a}$  et  $C_{3b}$ .

#### b - Convertase alterne amplificatrice $C_{3b}$ -dépendante

Le  $C_{3b}$  peut se combiner au facteur B pour former dans une succession de réactions une convertase  $C_{3b}$ -dépendante (MULLER-EBERHARD, et GOTZE, 1972 ; FEARON et coll., 1973 ; NICHOLSON et coll., 1975 ; VOGT et coll., 1977). Le facteur D clive le facteur B lié au  $C_{3b}$  en deux fragments Ba et Bb. Le fragment Bb reste lié au  $C_{3b}$  pour former un complexe  $C_{3b}$ , Bb qui

.../...

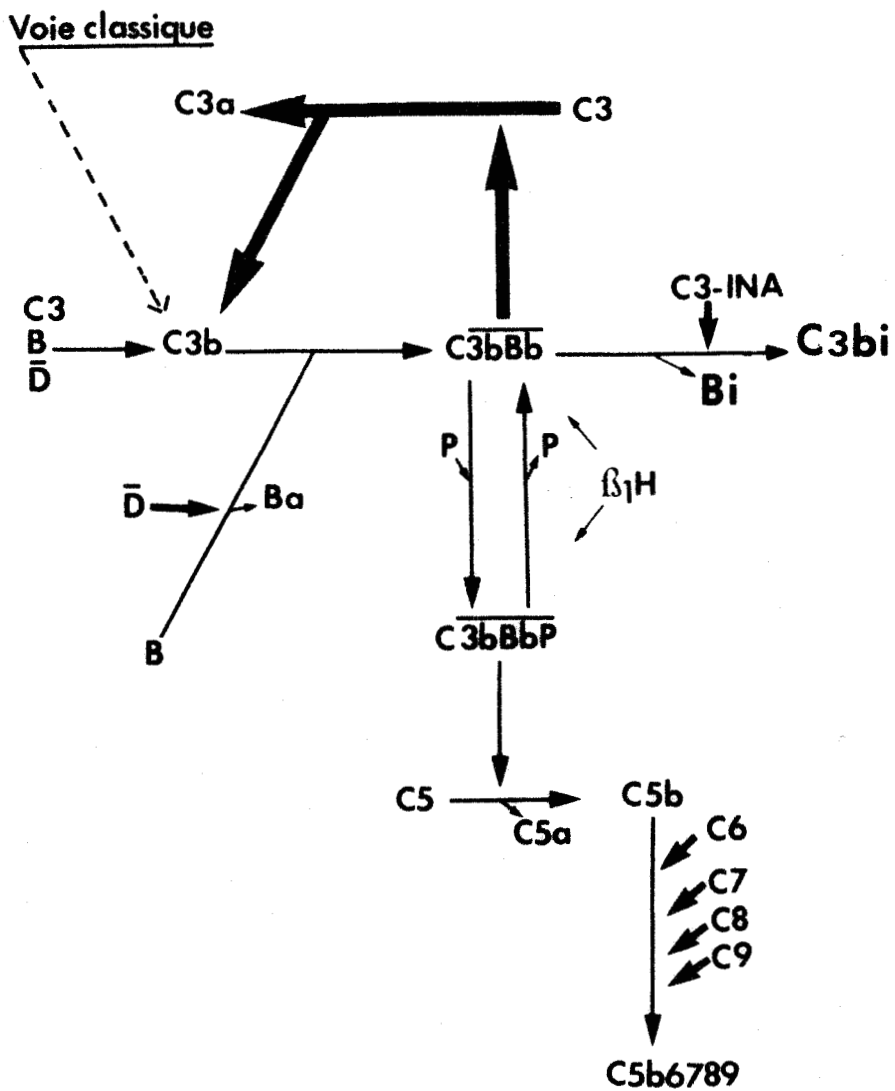


Fig1b: LA VOIE ALTERNE



Tableau V - Activateurs de la voie alterne

Bactéries à gram négatif

Pneumocoques

Levures

Certaines cellules : Lymphocytes circulant de lapin

Lymphocytes T de rat et de souris et certaines cellules

Lymphoblastoïdes humaines

IgA agrégées ou complexées } F(ab)'2  
IgG .....

Polyosides (Zymosan, endotoxines bactériennes, inuline)

Polyanions (Polyoside de pneumocoque III, levane, flagelline)

Certains parasites (Schistosomules, trypanosomes...)

DESSAINT et coll., 1979

KAZATCHKINE et coll., 1979

SANTORO et coll., 1979

.../...

constitue la  $C_3$  convertase de la voie alterne, enzyme analogue à la  $C_3$  convertase de la voie classique  $C_{4b,2a}$ . Dans ce cas la  $C_3$  convertase de la voie alterne est dénommée convertase amplificatrice. En effet elle augmente le clivage initial du  $C_3$  natif et amplifie la formation de  $C_{3b}$ . Elle réalise donc un feed-back positif qui amplifie la formation de la  $C_3$  convertase alterne.

#### c - Initiation de la voie alterne

Elle peut être induite par les F(ab)'2 d'immunoglobulines aggrégées ou complexées (Tableau IV), de nombreuses autres particules telles que l'inuline, le zymosan, l'agar et certaines endotoxines bactériennes. De même l'augmentation de la concentration en ions magnésium d'un sérum légèrement acide peut induire l'activation de la voie alterne (LAMBERT et coll., 1973). Il en va de même pour certains parasites et cellules de mammifères (voir revues SANTORO et coll., 1979 ; LACHMANN, 1979 ; KAZATCHKINE et coll., 1979). L'un des éléments qui semble caractériser ces surfaces "activatrices" est leur pauvreté en acide sialique. Lorsque du  $C_{3b}$  est déposé à leur surface, elles apportent un microenvironnement qui favorise l'assemblage de la convertase amplificatrice, protègent cette dernière contre la dissociation par la BIH et le  $C_{3b}$  contre l'inactivation par le  $C_{3b}$ -INA (FEARON & AUSTEN, 1977 a, 1977 b). L'activation de la voie alterne par des parasites ou des cellules de mammifères joue probablement un rôle très important dans les phénomènes d'immunité non spécifique. Un cas particulier est celui du venin de cobra dont le facteur actif (CVF) est en réalité le  $C_{3b}$  de serpent (ALPER et BALAVITCH, 1976). Ce facteur s'associe aux facteurs B et  $\bar{D}$  pour former une " $C_3$  convertase" qui exerce une activité anti-complémentaire.

#### 4 - REGULATION DE LA VOIE ALTERNE

##### a - Effet stabilisant de la properdine (P)

La properdine peut se fixer au  $C_{3b}$  formant un complexe  $C_{3b}$ -Bb-P qui stabilise la convertase amplificatrice, en freinant la dissociation du Bb du complexe  $C_{3b}$ -Bb qui donnerait un facteur inactivé Bi (FEARON et AUSTEN, 1975 b).

.../...

b - Dissociation de la convertase amplificatrice

Il existe trois mécanismes qui tendent à freiner une consommation excessive de  $C_3$  par le biais de la boucle d'amplification :

- Une dissociation spontanée de Bb du complexe  $C_{3b}$ -Bb donnant un produit inactif Bi,
- La BIH dissocie Bb du complexe  $C_{3b}$ -Bb stabilisé ou non par la properdine (P) (VEILER et coll., 1976),
- Le  $C_{3b}$  inactivateur :  $C_{3b}$ -INA clive irréversiblement le  $C_{3b}$  aboutissant à la formation d'un fragment inactif :  $C_{3bi}$ .

c - Rôle du facteur néphritique ( $C_3$  NeF)

Le facteur  $C_3$  NeF pourrait jouer un rôle important dans certains cas d'anomalies de la voie alterne. Ce facteur a été identifié comme étant un auto anticorps IgG dirigé contre la convertase alterne amplificatrice  $C_{3b}$ , Bb (DAHA et coll., 1977, 1978). La fixation du  $C_3$  NeF à la  $C_3$  convertase amplificatrice protège cette dernière contre l'action de la BIH et de ce fait empêche sa dissociation.

5 - SEQUENCE TERMINALE DE L'ACTIVATION DU COMPLEMENT

La première étape dans cette séquence terminale est le clivage du  $C_5$  par la  $C_5$  convertase classique ( $C_{4b, 2a, 3b}$ ) ou alterne ( $C_{3b, Bb, P} \times C_{3b}$ ) en  $C_{5a}$  et  $C_{5b}$  ce dernier se fixe sur la membrane cellulaire. Les composants  $C_6$  et  $C_7$  se fixent au  $C_{5b}$  (LACHMANN et THOMPSON, 1970 ; ARROYAVE et MULLER-EBERHARD, 1973). Ce complexe trimoléculaire  $C_{5b, 6, 7}$  permet ensuite la fixation du  $C_8$  et  $C_9$  aboutissant à l'unité finale d'attaque de la membrane (KOLB et coll., 1972). La microscopie électronique a révélé les caractéristiques des lésions membranaires dues au complément (HUMPHREY et DOURMASHKIN, 1969) ; il semblerait que les composés du complément formant l'unité finale d'attaque s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane formant ainsi des "channels" qui aboutissent à la sortie  $K^+$  et la rentrée de  $Na^+$  dans la cellule (GREEN et coll., 1959).

.../...

### III - ACTIONS BIOLOGIQUES DU COMPLÉMENT

Le système du complément intervient au niveau d'au moins trois phénomènes biologiques : 1° Induction de lésions au niveau des membranes biologiques par les composés terminaux du complément ; 2° Les réactions d'adhérence immune ; 3° Production de fragments qui ont une activité biologique.

#### 1 - ACTIVITE CYTOLYTIQUE

Elle a pour modèle l'immuno-hémolyse, mais s'étend à de nombreuses cellules ou organismes : Cellules infectées par certains virus, bactéries, certains parasites. L'effet cytolytique est le résultat de la formation de lésions au niveau des membranes biologiques suite à l'insertion des complexes  $C_{5b-9}$  au niveau de leur région hydrophobe.

#### 2 - REACTIONS D'ADHERENCE

Le  $C_{3b}$  semble jouer un rôle important dans les phénomènes d'adhérence, d'opsonisation et de phagocytose. En effet des complexes antigènes-anticorps contenant du  $C_{3b}$  peuvent se fixer à des sites récepteurs au niveau des érythrocytes ou d'autres particules (NELSON, 1953) ; celles-ci sont alors plus facilement phagocytées.

Diverses populations cellulaires possèdent un récepteur pour le  $C_{3b}$  (voir revue Mc CONNELL et LACHMANN, 1977). La fixation du  $C_{3b}$  au récepteur des phagocytes polynucléaires ou mononucléaires augmente la phase d'adhérence de la phagocytose. La présence à la surface de ces cellules de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines en plus du récepteur pour le  $C_{3b}$ , permet, lorsqu'une particule est recouverte d'anticorps et de complément, d'aboutir à une action synergique de ces deux composantes dans la promotion de la phagocytose. Ainsi une telle synergie peut amplifier la phagocytose de microorganismes ou de particules.

.../...



### 3 - ROLE DES FRAGMENTS DE CLIVAGE

L'activation du système du complément a pour conséquence la libération de certains produits de clivage qui ont une activité biologique très importante (voir revue HUGLI et MULLER-EBERHARD, 1978). Parmi ces activités nous pouvons citer que les complexes  $C_5$ , 6, 7 et les fragments  $C_{5a}$  et  $C_{3a}$  peuvent exercer un effet chimiotactique sur certaines cellulés (EIBL, 1976). Le  $C_{5a}$  entraîne une libération par les neutrophiles d'enzymes et de protéines basiques (HENSON, 1971 ; HENSON et COCHRANE, 1971). Par leur activité anaphylactique, le  $C_{3a}$  et  $C_{5a}$  peuvent induire la libération d'amines vasoactives et d'histamine par des basophiles (EIBL, 1976 ; COCHRANE et MULLER-EBERHARD, 1968). In vitro, l'induction de la dégranulation par les anaphylatoxines semble dépendre de la présence d'ions  $Ca^{++}$  et de la température (PETERSON et coll., 1975). L'importance de ce phénomène in vivo reste encore à établir, ceci tenant compte du fait qu'il existe dans le sérum un inactivateur des anaphylatoxines (BOKISH et MULLER-EBERHARD, 1970).

### 4 - ROLE DU COMPLEMENT DANS L'INDUCTION DE LA REPOSE HUMORALE

De nombreuses observations suggèrent que le complément peut participer à l'induction de la réponse humorale (voir revue LACHMANN, 1979). En effet il semblerait que le complément soit impliqué dans le développement du centre germinal et des cellules B mémoire. En effet, les complexes immuns fixés aux cellules dendritiques des follicules lymphoïdes peuvent en présence de  $C_3$  augmenter leur liaison avec les cellules B spécifiques de l'antigène (KLAUS, 1979), ceci peut favoriser le développement de cellules B mémoires.

La participation du complément dans la coopération entre les T et B lymphocytes a aussi été suggérée. En effet l'injection de venin de cobra à des souris (décomplémentation in vivo) supprime la réponse (IgG) vis-à-vis d'antigènes thymodépendants. De même l'utilisation d'anticorps anti- $C_3$  peuvent induire un effet immunosuppresseur in vitro, dans ce cas cet effet semblerait s'exercer plutôt sur la réponse IgM que la réponse IgG. Par contre il existe une controverse sur cet effet immunosuppresseur lorsqu'on utilise des fragments  $F(ab)'_2$  anti- $C_3$ .

.../...

## CONCLUSION

Le système du complément représente un ensemble de protéines plasmatiques qui peuvent jouer un rôle important dans la phase effectrice de la réponse immune, et permettent la reconnaissance de certaines substances étrangères par un hôte non immun. Les  $C_3$  et  $C_5$  convertases apparaissent comme les enzymes clé du système. Leur substrat  $C_3$  et  $C_5$  expriment après l'activation les trois fonctions majeures du système du complément : a) Opsonisation ( $C_{3b}$ ) ; b) Cytolyse ( $C_{5b}$ ) ; c) Inflammation ( $C_{3a}$ ,  $C_{5a}$ ).

.../...

CHAPITRE II

---

---

NIVEAUX D'INTERACTION ENTRE

---

---

SCHISTOSOMA MANSONI ET LE

---

---

SYSTEME DU COMPLEMENT

---

---

## I - RAPPELS CONCERNANT LE CYCLE ET LES DIFFÉRENTS STADES ÉVOLUTIFS DE S. MANSONI

### 1 - CYCLE EVOLUTIF

Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907), agent de la bilharziose intestinale est un trématode digénétique appartenant à la famille des schistosomidés.

L'évolution de ce parasite se fait par des stades successifs (Fig.2). Chez l'hôte vertébré les femelles pondent des oeufs soit dans les veinules, soit directement dans les tissus. Les oeufs qui atteignent la muqueuse intestinale peuvent être rejetés dans les matières fécales. Au contact de l'eau, l'oeuf éclot et donne naissance à une forme dont la vie est relativement brève : Le miracidium qui nage avec rapidité. Le développement ne peut s'effectuer que si ces embryons rencontrent certaines espèces de mollusques pulmonés de la famille des Planorbis. Dans le mollusque approprié, le miracidium devient un sporocyste primaire, qui donne naissance à des sporocystes fils dits sporocystes secondaires, lesquels produisent de nombreuses cercaires infectantes pour l'hôte vertébré.

La pénétration des cercaires se fait habituellement par voie transcutanée, elles perdent leur partie caudale et se transforment en schistosomules qui migrent vers les poumons où on les retrouve au bout de cinq jours environ ; puis dans le foie et les veines mésentériques où ils accomplissent leur maturation pour se transformer en vers adultes : Les schistosomes.

### 2 - DESCRIPTION DES DIFFÉRENTS STADES EVOLUTIFS DE S. MANSONI

Le tableau VI regroupe les divers stades du cycle évolutif de S. mansoni dont nous donnerons successivement une brève description.

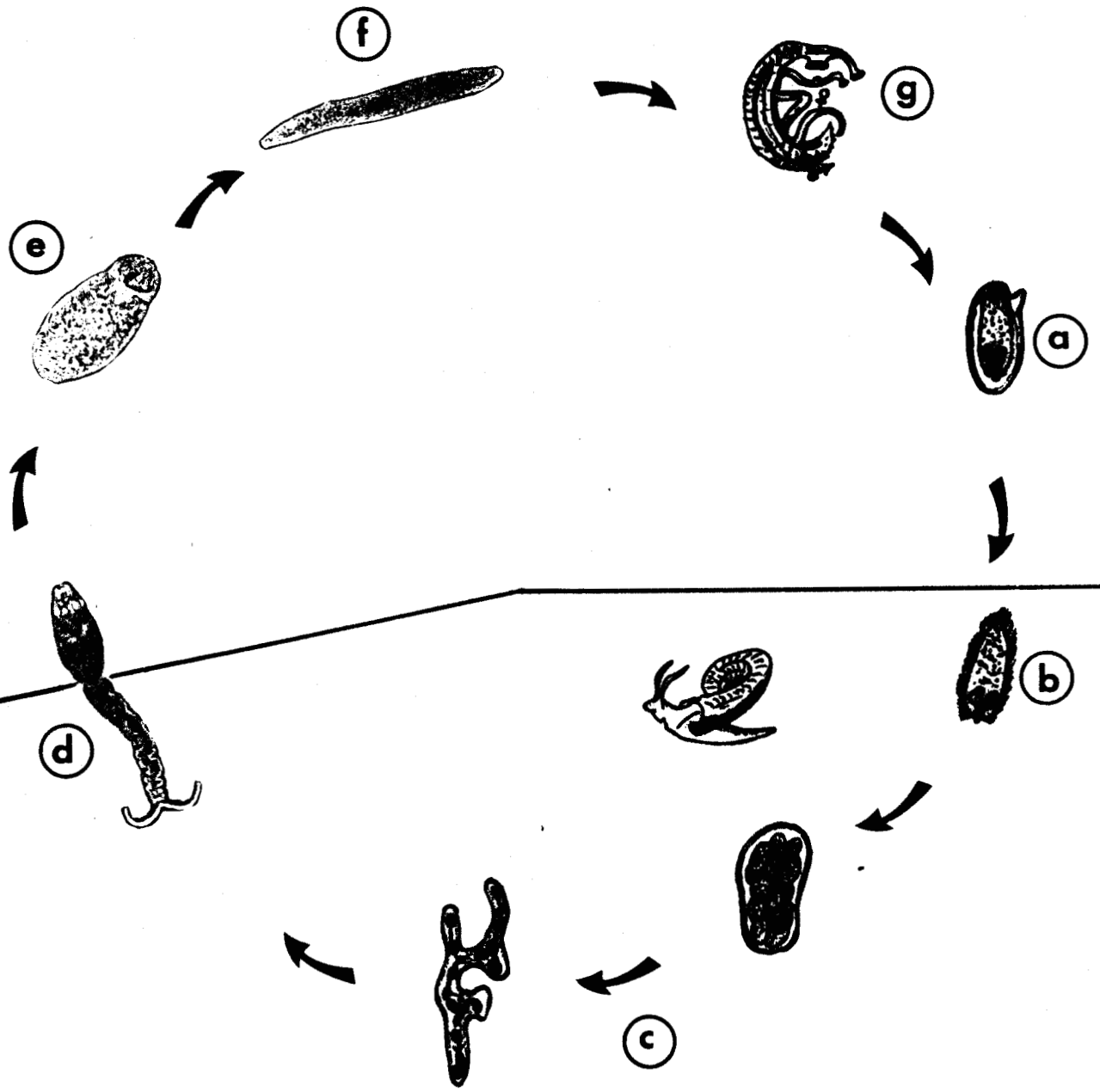


Fig 2: CYCLE EVOLUTIF DE SCHISTOSOMA MANSONI.



Tableau VI - Stades évolutifs de *S. mansoni*

Mâle adulte

. Longueur (mm)	6-12
. Largeur (mm)	2
. Nombre de testicules	4-13
. Cuticle	Munie de testicules
. Jonction postérieure du caecum	Antérieure au milieu du corps

Femelle adulte

. Longueur (mm)	7-17
. Largeur (mm)	1
. Nombre d'oeufs dans l'utérus	Généralement 1
. Position de l'ovaire	Antérieure au milieu du corps

Oeuf

. Longueur (mm)	0,112-0,175
. Largeur (mm)	0,045-0,070
. Eperon	Grand, latéral
. Evacué dans	Les selles

Miracidium

. Longueur (mm)	0,16
. Largeur (mm)	0,062

Cercaire

. Longueur de la tête (mm)	0,1-0,15
. Largeur de la tête (mm)	0,03-0,06
. Longueur de la queue (mm)	Environ 0,3
. Nombre de paires de cellules à flammes	4

Schistosomule

. Dimensions au moment de la pénétration (mm)	Environ 0,1-0,12 x 0,03
. Dimensions dans les poumons (mm)	Environ 0,12-0,18 x 0,029-0,037
. Dimensions à l'arrivée dans le foie (mm)	Environ 0,16-0,2 x 0,023-0,04



#### a - Oeufs

De teinte jaunâtre, ils possèdent un éperon latéral qui les aide probablement à résister au courant sanguin lorsqu'ils y sont lâchés (ANSARI, 1973). Les pores superficiels permettent le passage de matériel enzymatique qui est probablement responsable du passage des oeufs des veines dans les tissus (RACE et coll., 1971). Un grand nombre d'oeufs sont emprisonnés dans les tissus. Ceux qui sont destinés à jouer un rôle important dans le cycle du parasite contiennent des miracidies parfaites. L'éclosion de l'oeuf se fait dans l'eau (10 à 30°), le miracidium émerge par une fente de l'enveloppe et se propulse librement dans l'eau.

#### b - Miracidium

L'appareil locomoteur comprend des muscles et des cils implantés sur quatre rangées de plaques épidermiques. L'appareil digestif est formé d'un intestin bilobé ou sacculaire non fonctionnel. L'appareil excréteur est constitué de quatre cellules à flammes.

Une partie de glandes saillantes s'ouvrent à la base de la papille apicale. Les sécrétions glandulaires permettent l'adhésion du miracidium au mollusque hôte intermédiaire, et sa pénétration est amorcée par la papille (ANSARI, 1973).

#### c - Sporocystes

La première génération de sporocystes est formée de sacs dont la longueur est de plusieurs centaines de microns, privés de mobilité, et comportant des cellules germinales disposées en rangées le long de leur paroi (OLIVIER et MAO, 1949). Les cellules germinales donnent naissance à une seconde génération de sporocystes qui sont mobiles et passent dans les glandes digestives et l'ovotestis du mollusque. Les cercaires sont alors reconnaissables dans la cavité centrale du sporocyste, elles migrent à travers les tissus du mollusque et émergent.

#### d - Cercaire

Elle est formée d'une partie antérieure (le futur schistosomule) à laquelle est fixée une queue bifide qui représente un organe locomoteur (HOCKLEY, 1968 ; RACE et coll., 1971). Elle possède deux ventouses l'une orale l'autre ventrale ; deux couches musculaires, l'une circulaire l'autre longitudinale ; trois ou quatre paires de glandes post et pré-acétabulaires (STIREWALT et KRUIDENIER, 1961).

Les glandes pré-acétabulaires se vident pendant la pénétration dans l'hôte vertébré. Par un mécanisme enzymatique, les sécrétions rompent le ciment acellulaire et les substances fondamentales de l'épiderme afin de faciliter la pénétration (LEWERT et LEE, 1954 ; STIREWALT, 1966) ; au cours de celle-ci, la cercaire se défait de la partie caudale donnant naissance à un schistosomule.

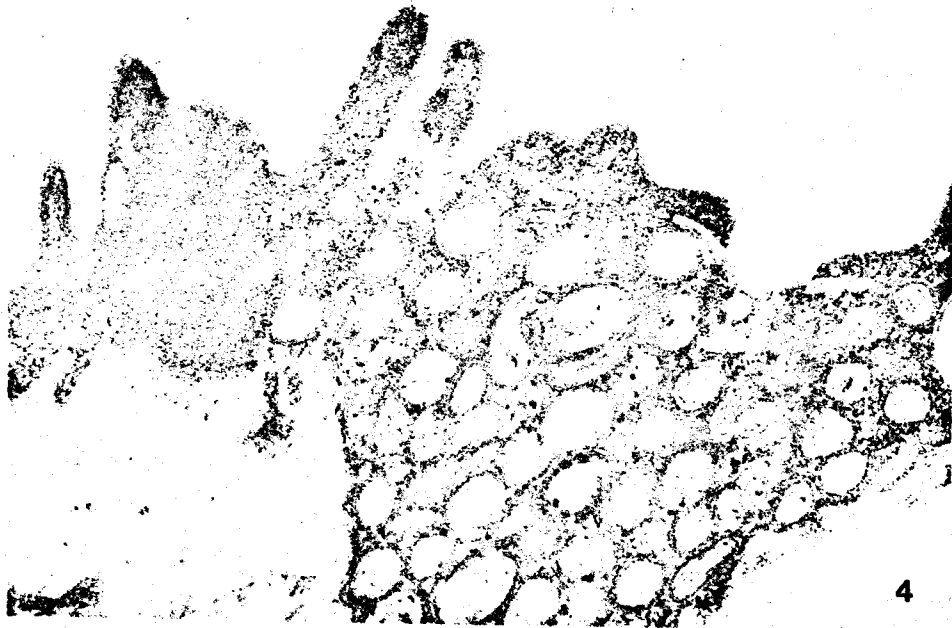
La cercaire est limitée par une membrane unitaire classique d'environ 8,5 mm d'épaisseur (Planche I) (HOCKELY et Mc LAREN, 1973), recouverte d'un cell coat de 0,5 mm d'épaisseur. Le cytoplasme tegmentaire dense et granulaire limité par la membrane basale fait suite à la membrane de la cercaire. Il contient de nombreuses inclusions : Des corps denses sphériques de 120 nm de diamètre limités par une membrane unitaire et une zone claire périphérique, le contenu de ces granules est excrété après leur fusion avec la membrane cercarienne (Planche I).

L'étude des faces de fracture de la membrane de la cercaire montre une grande densité de particules intramembranaires au sein du feuillet protoplasmique (TORPIER et coll. 1977 ; Mc LAREN et coll., 1978).

Deux catégories de particules peuvent être distinguées : Les unes sphériques dont le diamètre varie entre 45 et 100 Å, d'autres allongées de 220 Å de longueur qui en réalité sont formées d'une association de 4 particules chacune ayant 55 Å de diamètre environ (TORPIER et coll., 1977).

Le passage de la barrière transcutanée est associé à une métamorphose de la cercaire en schistosomule.





RUS  
FILE

e - Schistosomule o-3h

La transformation de la cercaire s'accompagne de grandes modifications morphologiques et physiologiques : Perte de la partie caudale, du cell coat, et une intense sécrétion glandulaire. Les produits des glandes céphaliques semblent jouer un rôle important dans l'évolution membranaire.

Des granules de sécrétion contenant de nombreuses membranes disposées en cercles concentriques migrent vers le tégument, fusionnent avec ses invaginations (Planche I) (DORSEY, 1976; HOCKLEY et Mc LAREN, 1973 ; TORPIER et coll., 1977), leur contenu multilamellaire s'étend à la surface du parasite pour former la seconde membrane du schistosomule, Ceci aboutit à la constitution d'un complexe heptalaminé comprenant deux membranes séparées par un espace clair visible seulement par endroits. Ce complexe heptalaminé est un des éléments qui caractérise les stades post-infectants.

f - Schistosomule poumon (5 jours)

A ce stade la structure du tégument est proche de celle du schistosome adulte. Le cytoplasme tégumentaire est granuleux et contient des corps denses allongés limités par une membrane unitaire et des granules de sécrétion contenant des membranes disposées en cercles concentriques (HOCKLEY et Mc LAREN, 1973 ; WILSON et BARNES, 1974).

La distribution des protéines intramembranaires semble assez homogène dans les feuillettes E1 et P1 (l'indice 1 étant relatif à la première membrane, l'indice 2 à la membrane nouvellement formée); par contre E2 montre une nette richesse par rapport à P2 (TORPIER et coll., 1977).

g - Schistosome adulte

Le tégument contient les mêmes inclusions que précédemment ; par contre il existe une réelle asymétrie dans la répartition des protéines intramembranaires; leur densité diminue dans les feuillettes

des possibilités nouvelles d'étude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase. C'est ainsi que de nombreuses recherches prospectives ont été réalisées dans les sérums de patients atteints de schistosomiase, et des sérums d'animaux infestés par S. mansoni. Ces études ont permis de détecter la présence dans ces sérums de facteur cytotoxique pour le schistosomule : L'anticorps léthal.

Dans un système in vitro, CLEGG et SMITHERS (1970, 1972) ont démontré qu'au bout de quatre jours de culture en présence d'un sérum de singe Rhésus hyperimmunisé par de multiples infestations cercariennes, 95 à 100 % des schistosomules sont détruits. CAPRON et coll., (1972, 1973, 1974) mettent en évidence dans les sérums de malades atteints de bilharziose, une activité létale qui affecte plus de 70 % des schistosomules ; cette même activité est retrouvée dans les sérums de rats et de lapins infectés. D'autres auteurs (MURRELL et CLAY, 1972) rapportent des observations analogues en travaillant avec des sérums de rats, de lapins et de singes infectés par S. mansoni.

Ce facteur létal a été identifié comme étant une immunoglobuline G qui agit en présence de complément (CLEGG et SMITHERS, 1972 ; CAPRON et coll., 1974) et qui provoque une désorganisation totale du tégument des schistosomules.

L'anticorps létal est spécifique d'espèce, puisque les sérums d'animaux infectés par S. japonicum ou S. hématobium n'ont pas d'effet sur les schistosomules de S. mansoni (CAPRON et coll., 1973). De même les sérums de malades atteints de bilharziose urinaire à S. haematobium sont sans effet sur les formes immatures de S. mansoni (CAPRON et coll., 1974).

L'anticorps létal est spécifique de stade : En effet des schistosomules récupérés au niveau du poumon chez un hamster, ou une souris après quelques jours d'évolution ne sont pas détruits par ce facteur. De même des schistosomules cultivés in vitro dans un sérum normal deviennent rapidement réfractaires à cette activité lytique (CLEGG et SMITHERS, 1972).

L'apparition chez ces vers d'antigènes identiques à ceux de l'hôte pourrait expliquer cette insensibilité (CLEGG et SMITHERS, 1972 ; CLEGG et coll., 1971) et plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les mécanismes par lesquels s'opère l'identité antigénique entre les schistosomes et leur hôte (Fig. 3).

L'immunisation de certains animaux de laboratoires tel le lapin ou le rat par un extrait d'antigène totale ou de fractions membranaires de S. mansoni permet d'obtenir des sérums contenant l'anticorps létal, et qui par conséquent sont très actifs sur les schistosomules (CAPRON et coll., 1974 ; SHER et coll., 1974).

Le transfert passif de sérums d'animaux infestés à des animaux sains permet d'obtenir une protection assez importante (CAPRON, 1974 ; PEREZ, 1974 ; PHILLIPS et coll., 1975). L'effet protecteur est localisé dans la fraction IgG du sérum transféré.

De même des sérums de lapins hyperimmunisés par injections d'extraits antigéniques lyophilisés de S. mansoni contiennent des anticorps toxiques in vitro pour le ver adulte, alors qu'ils sont sans effet sur les schistosomules (CAPRON et coll., 1974). Ces anticorps sont localisés dans la fraction IgG des Immunoglobulines fractionnées sur Sephadex G200, leur activité lytique nécessite la présence de complément, elle s'exerce essentiellement contre les structures internes des vers adultes.

La présence de complément semble indispensable pour que les immunoglobulines G, identifiées dans la schistosomiase puissent exprimer leur activité cytotoxique in vitro pour le parasite. L'activation du complément dans ce système se fait probablement par la voie classique.

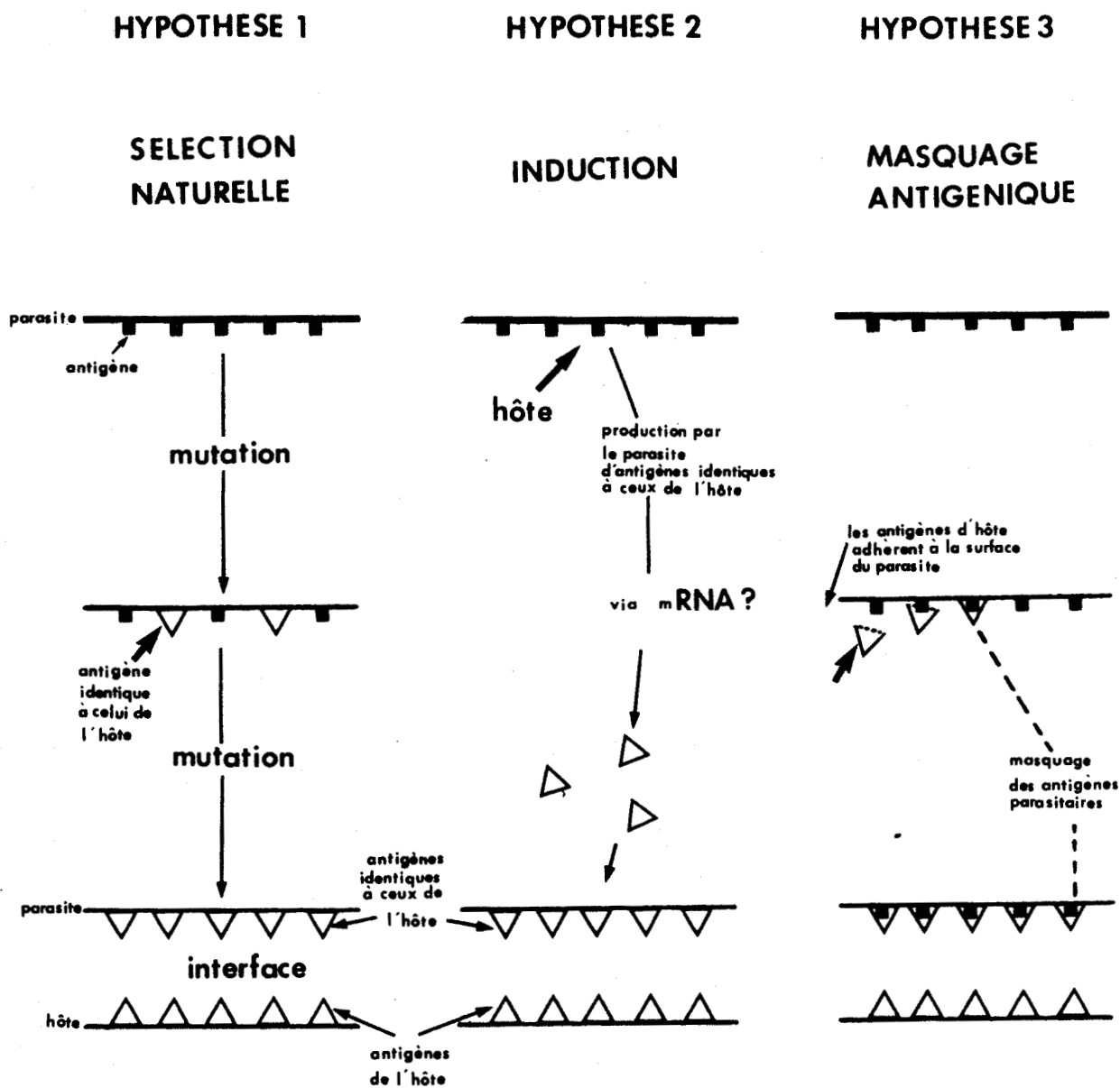


Fig 3

Schéma représentant les diverses hypothèses relatives aux mécanismes par lesquels s'opère l'identité antigénique entre les parasites et leur hôte ( SMYTH, 1973 ).

HYPOTHESE 1 : SPENT, 1959.

HYPOTHESE 2 : DAMIAN, 1964, 1967; CAPRON et coll., 1965, 1968.

HYPOTHESE 3 : SMITHERS et coll., 1969; CLEGG et coll., 1971b; CLEGG, 1972; SELL et DEAN, 1972; DEAN et SELL, 1972; DEAN, 1974.

BHS  
LILLE

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

## I - MATÉRIELS

### 1 - SOUCHES

La souche de S. mansoni utilisée dans notre laboratoire est d'origine sud-américaine (souche du Surinam). Le mollusque, hôte intermédiaire est Biomphalaria glabrata, variété albinos. L'hôte définitif utilisé dans le laboratoire pour le maintien du cycle est le hamster doré Mesocricetus auratus.

### 2 - OBTENTION DES PARASITES

#### a - Cercaires

Les cercaires sont obtenues après exposition d'un lot de mollusques infectés, à la lumière pendant 2 h.

#### b - Schistosomules "peau"

Les schistosomules sont préparés suivant la technique de CLEGG et SMITHERS, 1972, par passage de cercaires de Schistosoma mansoni à travers une peau abdominale de souris tendue sur un milieu de culture H.L.E.G. (voir composition des milieux, page 33 ) maintenu à 37° C pendant 3 h.

#### c - Schistosomules "artificiels"

Les schistosomules artificiels sont préparés suivant la technique décrite par RAMALHO-PINTO et coll., 1974 : Une suspension de cercaires est répartie dans des veinotubes et placée dans de la glace afin de réduire leur motilité. Après 10 min. le surnageant est éliminé, le culot riche en cercaires est remis en suspension dans 2 ml de milieu (H.L.E.G.). Les tubes sont alors agités au vortex pendant 45 sec., et la suspension est alors transférée sur une pipette contenant 8 ml de milieu. Les schistosomules décantent, alors que les parties caudales restent en suspension. Après 20 min., le culot contenant plus de 95 % de schistosomules est recueilli.

Composition des milieuxH.L.E.G. (Solution A + solution B)

<u>Solution A</u>			<u>Solution B</u>		
PO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub>	0,1125	g	NaHCO <sub>3</sub>	3,33	g
MgSO <sub>4</sub>	1,8	g	Yestolate Difco	0,9	g
CaCl <sub>2</sub>	2,385	g	Hydrolysate de lactalbumine	4,5	g
K cl	3,6	g	Rouge de phénol à 1 %	0,9	ml
Glucose	40,5	g	Pénicilline	100 000	UI
Nacl	61,2	g	Streptomycine	0,05	g
H <sub>2</sub> O	qsp	500 ml	H <sub>2</sub> O	qsp	500 ml

M.E.M.

Mgcl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,2	g	NaHCO <sub>3</sub>	2,	g
Dextrose	1,	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	1,5	g
Kcl	0,4	g	Rouge de phénol	0,017	g
Nacl	6,8	g	H <sub>2</sub> O	qsp	1 000 ml



d - Schistosomules "poumon"

La technique décrite par CLEGG, 1965, et adaptée par SHER et coll., 1974, a été utilisée. Des souris swiss mâles âgées d'environ trois mois sont infestées par 500 cercaires par voie transabdominale. Au 5e jour de l'infection, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale d'une solution de Hanks contenant 10 unités d'héparine/ml et sont sacrifiées. Leur cavité thoracique est incisée, les poumons sont prélevés, lavés au Hanks hépariné, et placés dans un tube conique où ils sont découpés avec de fins ciseaux en petits morceaux (1,5 à 2 mm<sup>3</sup>). Ces derniers sont remis en suspension dans 10 ml de H.L.E.G. et incubés pendant 3 h à 37° C pour qu'il y ait libération du maximum de schistosomules. Après ce traitement, ils sont alors filtrés sur 3 épaisseurs de gaze, le filtrat contenant les schistosomules est récupéré et centrifugé à 800 t/min. pendant 5 min. Les schistosomules sont alors lavés trois fois en milieu H.L.E.G..

### e - Schistosomes adultes

Ils sont récoltés stérilement par ponction directe de la veine porte de souris 40 jours après l'infestation, suivant la technique décrite par SMITHERS et THERRY, 1965.

## II - MÉTHODES

### 1 - PRÉPARATION DES ANTIGÈNES DE VERS ADULTES

#### a - Antigènes métaboliques

Environ 1 000 schistosomes sont incubés à 37° C pendant 3 h dans 10 ml de PBS. Cette solution est alors filtrée sur millipore 0,22 $\mu$  et lyophilisée

#### b - Extrait total de schistosomes

Il est obtenu suivant la méthode de CAPRON et coll., 1965, 1968. Les schistosomes adultes récoltés après perfusion de hamsters infestés depuis 45 jours par 1 000 cercaires, sont rincés dans une solution de Hanks puis dans du sérum physiologique, et broyés dans un mortier. Un échantillon de 50 mg de cet extrait total dans 5 ml d'un tampon Tris-HCl (0,05 M; PH 7,4) est fractionné sur une colonne ACA 34 équilibrée avec le même tampon (Voir figure 11 )

### 2 - PRODUITS ET REACTIFS

#### a - Collagène et albumine humaine

Le collagène humain de type I isolé à partir de foie de patients atteints d'une cirrhose, nous a été aimablement fourni par le Dr J.A. GRIMAUD, de l'Institut Pasteur de Lyon. L'albumine provient de (Nordic Laboratories, Tilburg, The Netherlands).

#### b - Immunoglobulines

Dans la première partie de ce travail (récepteur F<sub>c</sub>), les IgM et IgA nous ont été aimablement fournies par les Docteurs M. SELIGMANN et

F. DANON ; les fragments  $F(ab)'_2$  et  $F_c$  d'IgG, par les Docteurs C. ROPARTZ et D. RIVAT, les fractions IgG, IgM et  $F(ab)'_2$  d'IgG anti-globules rouges de boeuf par le Dr REVILLARD. Les IgE (Pharmacia) proviennent du commerce. Pour le reste de notre travail les anticorps IgM anti-globules rouges de poumon ont été isolés à partir d'un sérum de lapin immunisé par des hématies de mouton selon la technique de LACHMANN et HOBART, 1978.

- 5 ml de sérum de lapin sont dialysés contre un tampon phosphate pH 7,6 0,01 M et sont appliqués sur une colonne de 2,5 x 40 cm contenant de la DEAE cellulose (DEAE séphadex A-50-Pharmacia, Uppsala Suède) préalablement équilibrée avec le même tampon. L'élution est réalisée avec un gradient discontinu de phosphate de potassium allant de 0,01 M à 0,25 M, pH 7,6. Le premier pic d'élution correspondant aux IgG est concentré ; le deuxième pic contenant les IgM est concentré et refractionné sur une colonne de Sephadex G-200. Le premier pic obtenu contenant les IgM est concentré (Membrane DIAFLO XM 100).
- Les  $F(ab)'_2$  anti- $F_c$  d'IgG de lapin proviennent des laboratoires DAKO (Denmark).
- Les  $F(ab)'_2$  anti- $C_3$  humain, ainsi que le "PAP" (Peroxydase-IgG de lapin-anti-Peroxydase) proviennent des laboratoires CAPPEL (Cochranville, P.A., U.S.A.).
- Les IgG anti-SAB nous ont été aimablement fournies par le Dr J. PESTEL.
- Les IgG de chèvre proviennent des laboratoires MILES, les IgG humaines de (Nordic Laboratories, Tilburg, The Netherlands).
- L'agrégation des IgG est obtenue par chauffage à 63° C pendant 20 min.
- Les sérums anti- $C_{1q}$  anti-IgM, anti-IgG et anti-sérum humain normal proviennent des laboratoires BEHRING (Marburg, West Germany).

### c - Sources de complément

#### $\alpha$ Purification du C<sub>1q</sub>

Dans une première étape le C<sub>1q</sub> est isolé à partir d'un sérum humain normal par la méthode de précipitation à faible force ionique décrite par YONEMASU et STROUD, 1971, et modifiée par ZUBLER et LAMBERT, 1976. Le précipité final est dissous dans 5 ml de tampon EDTA 0,01 M NaCl 0,3 M, pH 7,5. Cette préparation est alors fractionnée sur une colonne de Sephadex G-200 équilibrée avec le même tampon. Le pic correspondant au C<sub>1q</sub> est concentré sur Amicon XM 100 à 1,5 mg/ml. La pureté du C<sub>1q</sub> obtenu est contrôlée par deux méthodes :

- 1° La technique d'immunodiffusion en gel (agarose à 1 % dans un tampon véronal pH 7,2, force ionique 0,1) nous a permis de tester le produit obtenu vis-à-vis des anti-sérums (anti-C<sub>1q</sub>, anti-IgG, anti-IgM et anti-sérum humain normal). Aucun arc de précipitation n'est observé avec les anti-IgG ou IgM. Par contre l'anti-C<sub>1q</sub> donne un seul arc qui présente une identité totale avec celui obtenu avec un anti-sérum humain normal.
- 2° L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (sodium dodecyl sulfate 0,1 %) en présence de dithiothréitol 0,1 M révèle 3 bandes (Fig. 3B) dont le poids moléculaire est comparable à celui des trois chaînes polypeptidiques décrites pour le C<sub>1q</sub> réduit (ARLAUD et coll., 1979).

#### $\beta$ Sérums

Les sérums de cobayes normaux sont obtenus à partir d'animaux sains provenant du Centre d'Élevage Janvier, Le Genest, France. Les sérums de cobayes déficients en C<sub>4</sub> et les sérums de souris déficientes en C<sub>5</sub> proviennent d'animaux maintenus dans notre laboratoire. Les prélèvements sanguins sont décantés pendant 3 h à la température du laboratoire, les sérums sont centrifugés et utilisés immédiatement ou stockés à -70° C.

#### $\gamma$ Préparation de R<sub>3</sub>, RB, RD et dosage du C<sub>4</sub>

- La déplétion en C<sub>3</sub> des sérums de cobayes normaux est réalisée suivant la technique de LACHMANN et HOBART, 1978. Le sérum est traité avec du Zymosan A

(polysaccharide isolé de la paroi d'une levure) (Sigma, St Louis, M.O., U.S.A.) à raison de 15 mg/ml à 37° C pendant 45 min. Le Zymosan est alors éliminé par centrifugation. Le surnageant qui conserve les composants C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, et C<sub>2</sub> constituera le R<sub>3</sub>.

- Le RB est obtenu par chauffage d'un sérum humain normal à 50° C pendant 20 min. afin d'inactiver le facteur B.
- Le RD est un sérum déplété en facteur D. Il est préparé suivant la méthode de MARTIN et coll., 1976. Le sérum humain normal est passé à 4° C sur une colonne Sephadex G 75 de 350 ml (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) en tampon PBS PH 7,2. Le pic d'exclusion ne contenant pas le facteur D est recueilli et concentré, il sera utilisé comme RD.
- Le dosage du C<sub>4</sub> est réalisé sur des plaques hémolytiques suivant la technique décrite par LACHMANN et HOBART, 1978,

### 3 - PREPARATION DES COMPLEXES EAC (hématies-anticorps-complément)

- EA : Incubation des hématies E avec des anticorps IgM anti-E à une dose subagglutinante (LACHMANN et HOBART, 1978).
- EAC1 : Traitement des EA avec un sérum de cobaye déficient en C<sub>4</sub> (MACHADO et coll., 1975).
- EAC142 : Obtenus après incubation des EA avec du R<sub>3</sub>. Au préalable le R<sub>3</sub> est titré suivant le procédé décrit par LACHMANN et HOBART, 1978 : Le R<sub>3</sub> est dilué au 1/10, 1/20, 1/40, ... 1/2560 ... 1/5120, en tampon véronal pH 7,2 contenant une concentration optimale de Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup> ("Complement Fixation Test Diluent Tablets", Oxoid Limited, London, U.K.) Deux séries de tubes sont préparés pour chaque dilution avec 0,2 ml de R<sub>3</sub>/tube. 50 µl d'EA à 1 % est rajouté à chaque tube. Ceux de la première série sont incubés à 37° C pendant 30 min., ceux de la seconde sont mis à 37° C pendant 30 min. ; ils reçoivent alors chacun 0,2 ml d'un sérum de cobaye normal traité à l'EDTA et sont réincubés à 37° C pendant 30 min. Tous les tubes sont alors centrifugés à 3 000 t/min. pendant 10 min., la lecture de la densité du surnageant à 540 nm permet d'apprécier le taux d'hémolyse.

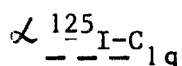
La concentration de  $R_3$  choisie pour préparer des EAC142 ne doit pas donner de lyse dans la première série de tubes, et être à  $\pm 8$  doses hémolytiques dans la deuxième série de tubes. Si le point de 50 % d'hémolyse dans la deuxième série est à 1/640 et 1/80 est négatif dans la première série, la quantité optimale de  $R_3$  pour 5 ml de EA à 1 % serait de 0,25 ml.

- EAC4 : Pour obtenir ce type de complexes les EAC 142 sont soumis à l'effet decay LACHMANN et HOBART, 1978 par incubation dans l'EDTA salin pendant 90 min. à 37° C.
- EAC 1423b : Ces complexes sont préparés en incubant des EA avec un sérum de souris déficient en  $C_5$  pendant 5 min. à 37° C suivant le procédé décrit par Mc CONNELL et HURD, 1976.

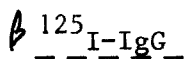
Dans certaines expériences des composés purifiés :  $C_1$ ,  $C_4$ ,  $C_2$  et  $C_3$  (Cordis Laboratories, Miami, U.S.A.) ont été utilisés pour préparer les complexes EAC suivant la technique décrite par ROSS et POLLEY, 1975.

#### 4 - TECHNIQUES DE MARQUAGE

##### a - Marquage à l' $^{125}I$



Le  $C_{1q}$  est marqué à l' $^{125}I$  suivant la technique décrite par HEUSSER et coll., 1973. Le contrôle de la pureté et de la qualité du marquage est effectué par estimation du taux de  $^{125}I-C_{1q}$  précipité par les IgG agrégées (6 mg/ml). Environ 97 % du  $^{125}I-C_{1q}$  est précipité par ces immunoglobulines.



La méthode à la chloramine T (BYRT et ADA, 1969), a été utilisée pour le marquage des IgG de chèvre.

##### b - Marquage à la fluorescéine

La méthode décrite par CLARK et SHEPART, 1963, a été utilisée avec quelques modifications. Les protéines à marquer sont dissoutes dans du PBS PH 7,2 à raison de 1 mg/ml. 1 ml de cette solution est mise en dialyse

contre 10 ml d'une solution de PBS contenant 0,1 mg/ml d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Après 18 h de dialyse à 4° C sous agitation, la solution marquée est de nouveau dialysée contre du PBS seul avec de fréquents changements de bains jusqu'à ce que la fluorescence ne soit plus décelable dans le dialysat.

#### 5 - TEST DE LIAISON AU $^{125}\text{I-C}_{1q}$

Le procédé rapporté par ZUBLER et LAMBERT, 1976, a été utilisé avec quelques modifications. 50  $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I-C}_{1q}$  (0,25  $\mu\text{g}$ ) sont incubés avec un nombre variable de parasites ou une quantité croissante d'antigènes de schistosomes, dans un volume final de 0,15 ml de H.L.E.G. contenant 30 % (v/v) de sérum humain normal inactivé (chauffé 56° C, 30 min.). Après 15 min. d'incubation à la température du laboratoire, le mélange est transféré à d'autres tubes contenant 2 ml de polyéthylène glycol (PEG 6 000) à 3 % (w/v dans un tampon borate 0,1 M pH 8,4). L'incubation est prolongée pendant 15 min. à T° du laboratoire, les tubes sont alors centrifugés à 2 000 t/min. pendant 20 min. La radioactivité présente dans le précipité et le surnageant est déterminé séparément. Les résultats sont exprimés en pourcentage de  $^{125}\text{I-C}_{1q}$  précipité.

#### 6 - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

##### a - Microscopie électronique à transmission

Les échantillons sont fixés successivement dans :

- a) la glutaraldéhyde à 1 % dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 pendant 1 h à 4° C, suivie de 3 lavages dans le même tampon,
- b) Une solution de tetroxide d'osmium à 1 % pendant 1 h à 4° C, suivie de trois lavages en eau distillée,
- c) Une solution d'acétate d'uranyl pH 5 contenant 50 mg/ml de succrose, pendant 1 h à 4° C, avec un lavage final en eau distillée.

Les échantillons sont alors déshydratés dans l'acétone et inclus dans l'araldite. Les blocs sont coupés sur Porter Blum MTI avec un couteau de diamant. Les coupes sont recueillies sur grilles nues et colorées à l'acétage d'uranyl et au citrate de plomb et examinées au microscope électronique HU-12.

Les échantillons incubés dans l'IgG "marqué" à la peroxydase, pendant 45 min. à 37° C, sont lavés en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 et subissent les traitements suivants :

- a) Préfixation : Glutaraldéhyde 1 % en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2, 1 h à 4° C,
- b) Lavages en tampon cacodylate 0,1 M,
- c) Révélation de la peroxydase par la diaminobenzidine (5 mg/10 ml de tampon Tris 0,05 M, pH 7,4 + 0,003 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 5 min. à la température ambiante et à l'abri de la lumière,
- d) Lavages en tampon Tris 0,05 M,
- e) Fixation : Tetroxide d'osmium 1 % en tampon cacodylate pendant 1 h à 4° C,
- f) Déshydratation dans un gradient d'acétone,
- g) Inclusion dans l'araldite (coupes sur Porter Blum MTL couteau de diamant, montage sur grilles nues et observation au microscope électronique HU-12.

#### b - Microscopie électronique à balayage

Les schistosomules préalablement fixés sont déshydratés dans un gradient d'alcool, séchés (point critique, utilisation du CO<sub>2</sub> liquide), recouverts d'un mélange or-palladium (60-40 %) et examinés dans un microscope type Cambridge Stereoscan MK11a.



*TRAVAUX PERSONNELS*

## INTRODUCTION

---

L'acquisition d'antigènes d'hôte par les schistosomes est généralement considérée comme un mécanisme leur permettant de masquer leurs propres antigènes et par conséquent d'échapper à la réponse immune de l'hôte. L'étude de leur nature et du mécanisme de leur incorporation à la surface du parasite a fait l'objet de nombreux travaux (SMITHERS et TERRY, 1976). Certains auteurs ont démontré que les schistosomes acquièrent de manière passive des molécules d'hôte sous forme de glycolipides d'origine érythrocytaire (GOLDRING et coll., 1977) et peuvent incorporer le complexe majeur d'histocompatibilité à leur surface (SHER et coll., 1978). D'autres suggèrent que le parasite pourrait synthétiser des antigènes identiques à ceux de l'hôte (DAMIAN, 1964 ; CAPRON et coll., 1965, 1968 ; BOUT et coll., 1974).

L'association d'immunoglobulines d'hôte avec la surface du schistosome fut démontrée chez divers animaux de laboratoire (DAMIAN et coll., 1973 ; KEMP et coll., 1976-1978). Certains auteurs leur attribuent un rôle d'anticorps bloquants ou incomplets qui ne fixeraient pas le complément et seraient alors dépourvus d'activité cytotoxique vis-à-vis des schistosomes (SOGANDARES-BERNAL, 1976 ; LEWERT et coll., 1977).

Cependant de récents travaux ont montré que les immunoglobulines fixées à la surface des schistosomes n'ont pas exclusivement une spécificité parasitaire.

En effet KEMP et coll., 1977-1980, en utilisant un système d'immunisation et d'infestation simultanées ont montré que des schistosomes provenant de souris au préalable immunisées avec un antigène donné portaient à leur surface des immunoglobulines spécifiques de l'antigène qui a servi à l'immunisation. Ces observations ont conduit les auteurs à suggérer la présence à la surface de schistosomes adultes d'un récepteur

pour le fragment Fc des immunoglobulines. Les résultats que nous exposerons dans la première partie de ce chapitre sont relatifs à la mise en évidence d'un récepteur pour le fragment Fc des IgG et/ou la  $\beta$ 2 microglobuline humaine à la surface des schistosomules.

I - MISE EN ÉVIDENCE D'UN RÉCEPTEUR POUR LE FRAGMENT Fc  
DES IgG ET/OU DE LA  $\beta$ 2 MICROGLOBULINE HUMAINE À LA SURFACE  
DES SCHISTOSOMULES



1 - TEST DES ROSETTES EA

Des hématies de mouton  $E_M$  en solution d'Alsever sont lavées trois fois avec du NaCl 0,15 M et remises en suspension dans un tampon phosphate pH 7,2 à la concentration de  $3 \times 10^8$  cellules/ml. Un sérum de souris anti- $E_M$  dont le titre est de 1/128 est dilué au 1/1000e, 1 ml de cette dilution est additionné à 1 ml de la suspension d'hématies et mis en incubation à 37° C pendant 60 min., les  $E_M$  ainsi sensibilisées (complexe  $E_M A$ ) sont lavées trois fois dans du tampon phosphate et utilisées pour le test des rosettes EA.

Dans une première série d'expériences, 50 larves ou 10 schistosomes adultes sont placés en contact avec  $5 \cdot 10^4$   $E_M$  sensibilisées ( $E_M A$ ) dans un volume final de 1 ml de milieu HLEG à 37° pendant 30 min. Dans une deuxième série d'expériences les larves et les schistosomes sont traités par le sérum de souris anti- $E_M$  dilué au 1/1000e pendant 30 min. à 37° C lavés et remis en contact avec des  $E_M$  normales. Dans ces deux conditions expérimentales les schistosomules peau (SP) obtenus in vitro par la technique de CLEGG et SMITHERS, 1972, deviennent complètement couverts d'hématies, alors que les schistosomules artificiels (SA) obtenus par la technique de RAMALHO-PINTO et coll., 1974 présentent un enrobage partiel qui débute à la partie antérieure des parasites. ceux-ci deviennent complètement recouverts au bout d'une heure de contact. Par contre les cercaires, les schistosomules de 5 jours récupérés au niveau des poumons ainsi que les schistosomes adultes traités dans les mêmes conditions ne forment pas de rosettes EA (Tableau VIII).

TABEAU VIII Formation de rosettes EA à la surface des schistosomules de S. mansoni.



STADES TRAITEMENTS	Cercaires	Schistosomules "artificiels"	Schistosomules "peau"	Schistosomules "poumon"	Schistosomes adultes
EM	-	-	-	-	-
EM <sup>A</sup>	-			-	-
anti-EM + EM	-	-	-	-	-

Afin de déterminer la classe et le fragment d'immunoglobuline qui est impliqué dans l'adhérence des globules rouges sensibilisés aux schistosomules, nous avons réalisé l'expérience suivante :

- Des hématies de boeuf  $E_B$  en solution d'Alsever sont lavées trois fois dans une solution de Hanks Wallas et remises en suspension à  $2 \times 10^8$  cellules/ml dans la même solution ; elles seront utilisées pour la préparation de trois lots d'hématies sensibilisées :

1er lot :  $E_B$  sensibilisées par un anticorps IgG de lapin anti- $E_B$  isolé par chromatographie sur DEAE Sephadex A-50.

2e lot :  $E_B$  sensibilisées par un anticorps IgM de lapin anti- $E_B$  isolé sur une colonne de séphadèse G-200.

3° lot :  $E_B$  sensibilisées par des  $F(ab)'_2$  obtenus après cleavage enzymatique des IgG de lapin anti- $E_B$  par la pepsine. Cinquante schistosomules sont alors placés en contact avec  $5.10^4$  globules rouges du 1er, 2e ou 3e lot, dans un volume final de 1 ml de milieu MEM à 37° C pendant 30 min. Dans ces conditions la formation de rosette est obtenue uniquement avec les hématies sensibilisées par les anticorps de classe IgG (Tableau IX).

Ces premières observations nous ont amené à penser à l'existence d'un site de fixation pour les immunoglobulines de classe IgG. Nous avons alors tenté d'apprécier la spécificité de cette liaison en procédant à des tests d'inhibition.

Tableau IX - Formation de rosette à la surface des schistosomules peau.  
Système utilisant des hématies de boeuf ( $E_B$ ) recouvertes  
d'anticorps de lapin anti- $E_B$

$E_B$ sensibilisées par :	Rosetting
IgG de lapin anti- $E_B$	+++
IgM de lapin anti- $E_B$	-
F(ab)'2 des IgG de lapin anti- $E_B$	-

## 2 - EXPERIENCES D'INHIBITION

Des schistosomules sont incubés dans un premier temps avec des IgG de diverses espèces (homme, lapin, souris, rat) pendant 30 min. à 37° C. Dans un second temps, les larves sont lavées en MEM et remises en contact avec des complexes EA. Dans ces conditions nous obtenons une inhibition complète de rosette ; par contre une préincubation des schistosomules avec des IgM, des IgE ou des F(ab)'<sub>2</sub> ne semble pas affecter la formation de rosettes EA (Tableau X).

Ces observations ainsi que l'inhibition obtenue avec les fragments Fc des IgG humaines (tableau X) constituent des arguments en faveur de l'existence d'un récepteur Fc  $\gamma$  hétérospécifique à la surface des schistosomules de S. mansoni.

Ce récepteur semble résistant à un traitement par la trypsine, alors qu'il est sensible à l'action de la pronase. En effet la préincubation des schistosomules pendant 30 min. à 37° C dans 1 ml de MEM contenant 0,5 mg de trypsine (TRTPCK, Worthington) n'affecte pas la formation de rosettes EA alors qu'un traitement par la pronase (Calbiochem) dans les mêmes conditions abolit complètement le rosetting (Tableau XI).

Ces caractéristiques sont analogues à celles déjà décrites pour les récepteurs Fc des cellules eukaryotes. En effet la fixation des IgG aux récepteurs Fc de macrophages (LOBUGLIO et coll., 1976; HUBER et coll., 1968; KOSSARD et NELSON, 1968 ; WALKER et DEMUS, 1975 ; DIAMOND et coll., 1978), ou de lymphocytes (BASTEN et coll., 1976 ; DICKLER, 1974) n'est pas modifiée lorsque ces cellules ont été traitées à la trypsine. Par contre un traitement à la pronase semble inhiber la fixation des IgG aux récepteurs Fc des lymphocytes B de souris (BASTEN et coll., 1976) et des lymphocytes humains (DICKLER, 1974).

Tableau X - Inhibition spécifique de la formation des rosettes EA à la surface des schistosomules peau par les IgG ou leur fragment Fc

Schistosomules	EA
Non traités	+++
Traités par :	
. IgG (humaines, lapin, rat, souris) 100 $\mu$ g/ml	-
. IgM, IgA, IgE (humaines), 50 $\mu$ g/ml	+++
. Fragments Fc des IgG humaines (40 $\mu$ g/ml)	-
. F(ab)'2 des IgG de lapin (10 $\mu$ g/ml)	

Tableau XI - Formation de rosettes EA à la surface des schistosomules peau ayant au préalable subi un traitement enzymatique

Schistosomules	EA
Non traités	+++
Traités :	
Trypsine (0,5 mg/ml)	+++
Papaïne (0,5 mg/ml)	-



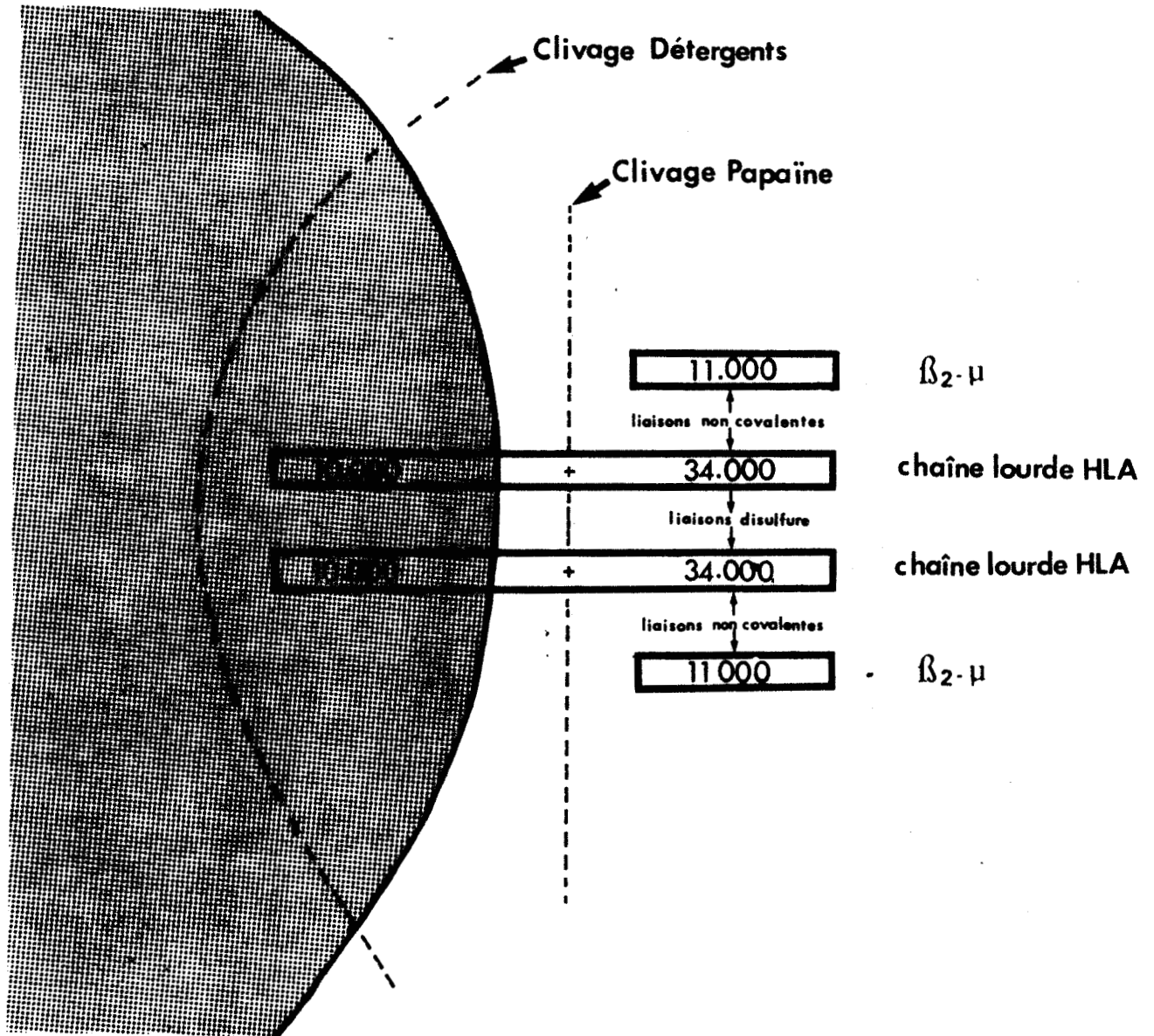
La fixation d'IgG au récepteur Fc des cellules eucaryotes n'est pas inhibée par la  $\beta$ 2-microglobuline humaine. Ce polypeptide de 100 acides aminés (11 800 daltons) a d'abord été isolé de l'urine de patients atteints de tubulopathie (BERGGARD et BEARN 1968). La séquence des acides aminés de la  $\beta$ 2-microglobuline présente un haut degré de similitude avec celle du troisième domaine constant des chaînes lourdes des immunoglobulines humaines (SMITHIES et POLIK 1972).

Elle est présente à la surface des lymphocytes (Figure 4) (NILSSON, K. et coll., 1973) où elle est associée pour sa majeure partie à tous les antigènes du système d'histocompatibilité humain HL-A (BISMUTH et coll., 1973 ; OSTBERG et coll., 1974 ; POULIK et coll., 1973 ; SOLHEIM et THORSBY, E., 1974).

La  $\beta$ 2-microglobuline est retrouvée liée de façon non covalente aux antigènes HL-A issus d'extraits membranaires (CRESSWELL et coll., 1973 ; NAKAMURO et coll., 1973 ; PETERSON et coll., 1974), de l'urine (ROBERT et coll., 1974) ou du sérum (MIYAKAWA et coll., 1973).

La récente mise en évidence par SHER et coll., 1978 de l'acquisition des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de la souris (H2) par les schistosomules, nous a incité à rechercher dans quelle mesure la  $\beta$ 2-microglobuline peut interférer avec la formation des rosettes EA à la surface des schistosomules.

Cinquante schistosomules peau sont lavés trois fois et remis en suspension dans 1 ml de MEM contenant différentes quantités de  $\beta$ 2-microglobuline humaine (Pharmacia), après 30 min. d'incubation les larves sont lavées en MEM et remises en contact avec les complexes EA. Dans ces conditions expérimentales, nous obtenons une inhibition de rosette qui peut atteindre 80 % avec une concentration de  $\beta$ 2-microglobuline proche de 8  $\mu$ g/ml (Figure 5)



**Fig 4 :** Disposition possible des antigènes HL-A à la surface cellulaire  
(d'après RASK, 1974, Dans *Immunologie*, BACH, Flammarion Médecine Sciences,  
p. 621.)

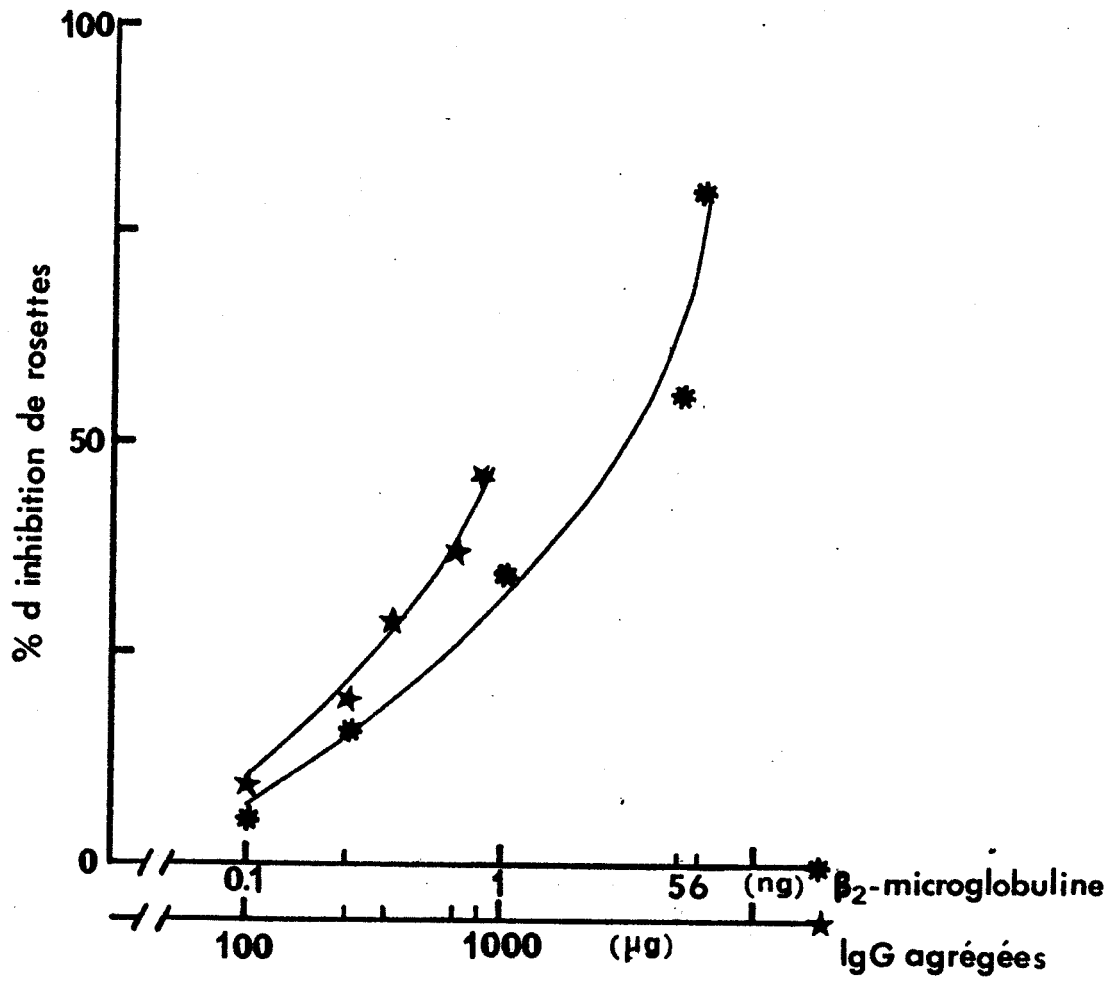


Fig 5

Parallèlement l'effet inhibiteur des IgG agrégées a été apprécié. C'est ainsi que des IgG humaines (fraction II de Cohn, Miles Laboratories, Inc., Kankakee, III) ont été agrégées par la chaleur à 63° pendant 20 min. suivant la technique décrite par DICKLER.H.B., 1976 ; la préparation est centrifugée à 140 000 g pendant 1 h à 4° C et le surnageant est éliminé. Le culot est dissous dans un tampon phosphate pH 7,2. Des schistosomules peau sont incubés pendant 30 min. à 37° C avec des concentrations croissantes en IgG agrégées, après trois lavages en milieu MEM les larves sont mises en contact avec des complexes EA. Les schistosomules portant moins de cinq hématies sensibilisées sont considérés comme négatifs et leur pourcentage est calculé sur au moins 30 schistosomules. Les résultats obtenus sont représentés sur la Fig. 5 ; on peut constater qu'il existe un effet dose réponse, en effet le pourcentage d'inhibition augmente en fonction de la concentration en IgG agrégées. Cependant on peut noter que l'inhibition par la  $\beta$ 2-microglobuline nécessite de faibles doses par rapport aux IgG agrégées.

Un éventuel effet inhibiteur de quelques protéines ayant un poids moléculaire voisin de la  $\beta$ 2-microglobuline a été recherché en pré-incubant les schistosomules à 37° C pendant 30 min., soit avec du cytochrome c (type VI, Sigma), du lysozyme (grade I, sigma), ou de la ribonucléase I (Worthington). Dans ces conditions on constate que la formation de rosettes n'est pas affectée (Tableau XII).

L'ensemble de ces résultats nous suggèrent l'existence d'un récepteur hétérospécifique pour le fragment Fc des IgG, ce récepteur pouvant être bloqué par la  $\beta$ 2-microglobuline. L'aspect concernant l'interaction entre la  $\beta$ 2-microglobuline et le récepteur Fc sera repris dans notre discussion (Page 62)

Nous avons essayé de compléter cette étude en recherchant par d'autres techniques, à mettre en évidence la fixation des IgG à la surface des schistosomules.

Tableau XII - Formation de rosettes EA à la surface des schistosomules ayant au préalable été incubés avec diverses protéines de poids moléculaire voisin de celui de la  $\beta$ 2-microglobuline

Schistosomules	EA
Non incubés	+++
Incubés avec	
$\beta$ 2-microglobuline humaine (8 Mg/ml, PM : 11 800)	-
Ribonucléase I (1 mg/ml, PM : 11 100)	+++
Cytochrome c (1 mg/ml, PM : 12 384)	+++
Lysozyme (1 mg/ml, PM : 11 500)	+++



### 3 - UTILISATION DES IgG MARQUEES A LA FLUORESCENCE OU A LA PEROXYDASE

#### a - Immunofluorescence

La méthode directe décrite par GOLDRING et coll., 1976, fut utilisée avec quelques modifications. Cinquante larves : Schistosomules ou cercaires ; 8 à 10 schistosomules poumons ou vers adultes sont lavés en MEM et mis en contact avec des IgG de lapin pendant 30 min. à 37° C. Après trois lavages en tampon (PSB), les parasites sont remis en incubation avec des anticorps F(ab)'<sub>2</sub> de monton anti-IgG de lapin dilués au 1/40e pendant 30 min. à 37° C, après 3 lavages en tampon PBS, ils sont examinés au microscope à fluorescence. Les résultats obtenus figurent au tableau XIII.

Tableau XIII - Mise en évidence des IgG à la surface des schistosomules peau par la technique d'immunofluorescence indirecte

Stades Traitements	Cercaires	Schistosomules poumon	Schistosomules peau	Schistosomes adultes
IgG de lapin (1 mg/ml)	*	*	*	*
F(ab)' <sub>2</sub> anti-IgG de lapin	*	*	*	*
Résultats	-	-	+	-

L'utilisation de complexes antigène-anticorps préformés in vitro et marqués à la fluorescéine nous ont permis d'obtenir le même type de résultats.

Des anticorps IgG de rat anti-sérumalbumine sont isolés à partir d'un immunsérum total (PESTEL, 1977-1980). La sérumalbumine de boeuf a été marquée à la fluorescéine suivant la technique décrite par CLARK et SHEPARD, 1963 (voir matériels et méthodes).

Des schistosomules sont au préalable incubés : Soit avec des IgG de rat anti-SAB dans un tampon PBS à 37° C pendant 30 min., lavés et remis en contact avec la SAB-FITC (fluorescente), soit avec des complexes IgG anti-SAB-SAB-FITC préformés in vitro. Dans ces deux conditions expérimentales, les schistosomules présentent une nette fluorescence jaune verdâtre en surface. Les contrôles comportant l'incubation des larves avec la SAB fluorescente, la SAB "froide" ou des IgG de rat sain sont pratiquement éteints ou présentent un léger bruit de fond (tableau XIV).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons tenté de reproduire ces observations en associant à la fois une technique directe utilisant des IgG marquées à la fluorescéine (voir matériels et méthodes) et un test d'inhibition. Les résultats (tableau XV) sont similaires à ceux obtenus par la technique indirecte.

#### b - Microscopie électronique

Cette technique nous a permis de confirmer les observations que nous venons de décrire. En effet, en utilisant un complexe peroxydase-IgG de lapin anti-péroxydase, nous avons pu mettre en évidence la fixation des IgG à la surface des schistosomules. Les résultats que nous avons obtenus sont résumés au tableau XVI. (Planche II)

Tableau XIV - Mise en évidence des IgG à la surface des schistosomules peau par la technique d'immunofluorescence indirecte utilisant des complexes Ag-Ac marqués

Traitements					
IgG anti-SAB	*	*			
IgG de rat sain			*		
SAB	*				
SAB-FITC	*	*	*	*	
IgG anti-SAB-SAB-FITC					*
Fluorescence	+	+++	( <sup>+</sup> <sub>-</sub> )	( <sup>+</sup> <sub>-</sub> )	+++

Les schistosomules vivants montrant une fluorescence de membrane sont notés de + à +++, les négatifs ne montrent pas de fluorescence jaune verdâtre en surface mais une autofluorescence bleue généralisée.



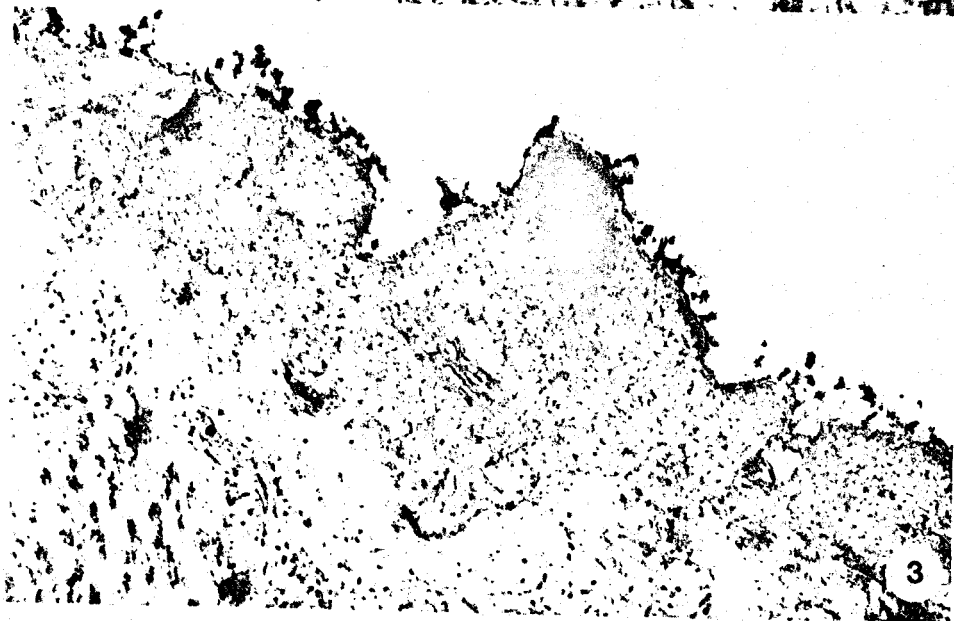
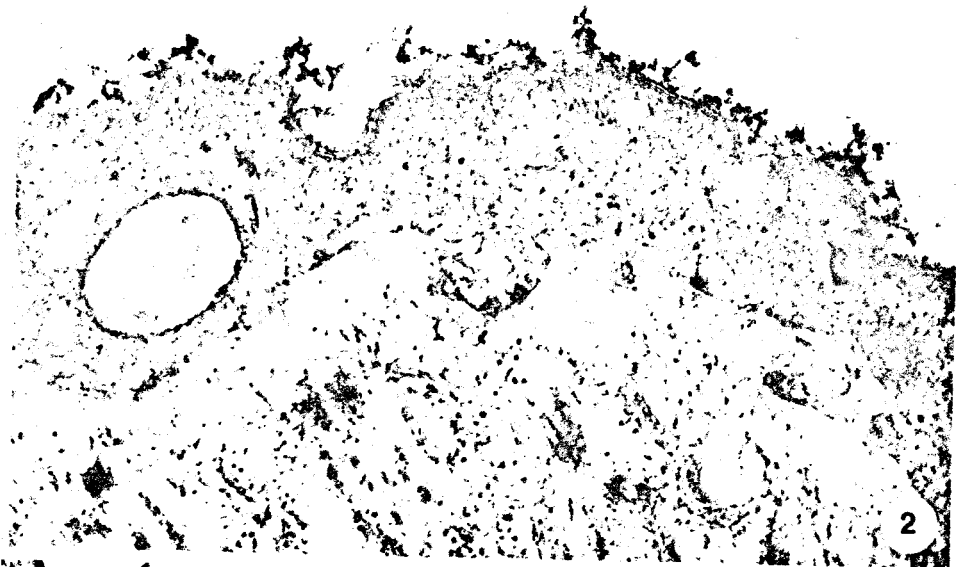


Tableau XV - Mise en évidence des IgG à la surface des schistosomules peau par la technique d'immunofluorescence directe

Traitements		
IgG de rat	*	
FITC-IgG de rat	*	*
Fluorescence	( <sup>+</sup> -)	+++

Tableau XVI

STADES TRAITEMENTS	Cercaires		Schistosomules peau		Schistosomules poumon (5j)		Schistosomes Adultes	
Peroxydase-anti-Peroxydase (Igc de lapin)	*		*		*		*	
Peroxydase		*		*		*		*
Diaminobinzidine/ eau oxygénée	*	*	*	*	*	*	*	*
Resultat	—	—	+	—	—	—	—	—



BUS  
LILLE

4 - RESUME

Les expériences que nous avons réalisées indiquent l'existence à la surface des schistosomules de sites de liaison spécifiques pour les fragments Fc des IgG. Ce site possède les caractéristiques décrites pour les récepteurs Fc $\gamma$  des cellules Eucaryotes (LOBUGLIO et coll., 1976 ; WALKER et DEMUS, 1975 ; DIAMOND et coll., 1978 ; BASTEN et coll., 1976 ; DICKLER 1974).

L'apparition de ce récepteur se fait au premier stade post-infectant. En effet, alors que les cercaires ne semblent pas exprimer ce récepteur, les schistosomules peau montrent un maximum d'enrobage par la technique des rosettes EA.

Les schistosomules artificiels montrent une apparition progressive de ce récepteur ; en effet l'enrobage débute à la partie antérieure du parasite, qui devient complètement couvert au bout d'une heure de culture in vitro. Ce processus dynamique pourrait être éventuellement lié à l'intense sécrétion glandulaire qui se produit au niveau de la partie antérieure du parasite durant la métamorphose de la cercaire en schistosomule (STIREWALT et DORSEY, 1974).

L'absence de fixation des IgG à la surface des schistosomules poumon et des schistosomes adultes soulève la question de savoir le devenir du récepteur au cours du développement du parasite.

Deux hypothèses peuvent être formulées à ce sujet : La première serait la disparition du récepteur au cours du développement du parasite ; la seconde consisterait en un blocage du récepteur par les IgG de l'hôte chez lequel le parasite a été prélevé. Les travaux de KEMP et coll., 1977-1980 montrant la présence d'immunoglobulines fixées par leurs fragments Fc au tégument des schistosomes de souris, sont en faveur de la seconde hypothèse.

L'affinité du récepteur pour la  $\beta$  2-microglobuline suggère deux possibilités :

- 1° Un récepteur pour les IgG qui, du fait de l'éloignement phylogénique entre les trématodes et les mammifères, présenterait une structure particulière adaptée principalement au domaine CH<sub>3</sub> des IgG,
- 2° Ou un récepteur pour la  $\beta$  2-microglobuline qui fixerait les IgG par leur domaine CH<sub>3</sub>.

Dans l'une ou l'autre des deux hypothèses, le récepteur pourrait être impliqué dans la fixation spécifique des antigènes d'histocompatibilité murins à la surface des schistosomules (SHER, 1978) en plus de la fixation des IgG.

## II - MISE EN ÉVIDENCE DE LA MODULATION DU RÉCEPTEUR Fc $\gamma$

### 1 - DISPARITION DES FRAGMENTS Fab DES IgG FIXEES A LA SURFACE DES SCHISTOSOMULES

#### a - Technique des rosettes

Cinquante schistosomules (3h) dans 0,1 ml de milieu (MEM) sont incubés à 37° C pendant 30 min. dans un égal volume de sérum de lapin anti-E<sub>M</sub> ou dans la fraction IgG de ce même sérum à une concentration de 1 mg/ml. Après trois lavages en tampon PBS pH 7,2 ils sont remis soit directement en contact avec 2 x 10<sup>6</sup> E<sub>M</sub> dans un volume final de 1 ml de MEM, soit mis en culture en MEM pendant 1 h, 2 h ou 3 h et remis en contact avec 2 x 10<sup>6</sup> E<sub>M</sub>. Après 30 min. de contact les larves sont examinées au microscope pour déterminer le pourcentage de rosettes.

Dans ces conditions expérimentales on constate que le pourcentage de rosettes baisse en fonction du temps d'incubation dans le milieu de culture (tableau XVII).

Tableau XVII - Formation de rosettes à la surface des schistosomules après divers temps d'incubation dans le milieu de culture (MEM)

Larves	$E_M$			
	Temps d'incubation dans le milieu de culture			
	1/2 h	1 h	2 h	3 h
Schistosomules	-	-	-	-
Schistosomules préincubés dans le sérum de lapin anti- $E_M$ ou sa fraction IgG)	++++	+++	+	(+)

Chaque + représente 20 % de parasites formant des rosettes (enrobage :  $>10 E_M$ /schistosomule), (+)  $< 20$  %.



Après 3 h de culture dans le MEM, les IgG anti- $E_M$  fixés à la surface des schistosomules semblent avoir perdu la possibilité de fixer l'antigène ( $E_M$ ). Ceci suggère deux hypothèses :

- 1° La perte des fragments Fab après cleavage enzymatique,
- 2° Ou un shedding des molécules IgG et/ou du récepteur Fc.

Les résultats que nous avons obtenus par la technique d'immunofluorescence indirecte nous ont apporté des informations supplémentaires.

#### b - Immunofluorescence indirecte

Les schistosomules préincubés dans le sérum de lapin anti- $E_M$  ou la fraction IgG de ce même sérum montrent une nette fluorescence de membrane lorsqu'ils sont remis en contact avec des FITC-F(ab)'<sub>2</sub> de mouton anti-IgG de lapin (spécifique des fragments Fc). Cette fluorescence de membrane diminue en fonction du temps mais peut encore être détectée à la surface des larves, après trois heures de culture dans du MEM (tableau XVIII). Ceci semble indiquer que les schistosomules portent à leur surface des petits fragments d'immunoglobulines ayant des déterminants Fc.

## 2 - EFFET DES INHIBITEURS D'ENZYMES SUR LA FORMATION DE ROSETTES EA

Des inhibiteurs d'enzymes : Ortho-phénañtrole et le phényl méthylsulfonide fluoride (PMSF) sont solubilisés en méthanol et utilisés à une concentration finale de  $10^{-4}$  M. Des schistosomules préincubés dans une fraction IgG d'un sérum de lapin anti- $E_M$  pendant 30 min. à 37° C, sont lavés et remis en culture dans du MEM contenant l'inhibiteur d'enzyme (O-phénañtrole ou PMSF). Les larves sont prélevées à 4 h de culture et remises en contact avec des  $E_M$ . Dans ces conditions, on constate que seul le PMSF restaure de façon significative la formation de rosettes à la surface des schistosomules. (Tableau XIX)

Ces observations sont en faveur de la première hypothèse, à savoir une hydrolyse enzymatique qui pourrait libérer les fragments Fab des IgG fixées à la surface des schistosomules. Pour pouvoir vérifier cette hypothèse nous avons réalisé d'autres expériences supplémentaires.

Tableau XVIII - Mise en évidence de la présence de fragments Fc des IgG à la surface des schistosomules après différents temps d'incubation dans le milieu de culture

Larves	FITC-F(ab)' <sub>2</sub> anti-IgG de lapin (spécifique anti-Fc)			
	Temps d'incubation dans le milieu de culture			
	1/2 h	1 h	2 h	3 h
Schistosomules	-	-	-	-
Schistosomules préincubés dans le sérum de lapin anti-E <sub>M</sub> ou sa fraction IgG	+++	++	++	++



Tableau XIX - Pourcentage de formation de rosettes EA à la surface des schistosomules après action des inhibiteurs d'enzymes

Larves	$E_M$	
	Temps d'incubation dans le milieu de culture contenant l'inhibiteur d'enzymes	
	1/2 h	4 h
Schistosomules incubés avec des IgG anti- $E_M$ + 5 Ml méthanol	79,6 %	13,6 %
Schistosomules incubés avec des IgG anti- $E_M$ + PMSF à $10^{-4}$ M	-	39,4 %
Schistosomules incubés avec des IgG anti- $E_M$ + O-phénantroline $10^{-4}$ M	-	19,6 %



### 3 - HYDROLYSE DES IgG PAR LES PROTEASES DES SCHISTOSOMULES

#### a - Incubation des schistosomules avec des IgG marquées à $1^{125}\text{I}$

Environ 30 000 schistosomules artificiels maintenus en culture pendant 3 h en MEM et lavés 6 fois, sont mis en incubation à 37° C dans 1 ml de milieu MEM contenant 50  $\mu\text{g}$  d'immunoglobulines G de chèvre marquées à  $1^{125}\text{I}$  par la méthode de la chloramine T (BYRT et ADA, 1969).

Deux échantillons de 0,1 ml sont prélevés après 1 h, 3 h, 7 h et 16 h d'incubation. Des contrôles contenant des IgG marquées seules sans schistosomules sont prélevés aux mêmes périodes. Un ml de sérum-albumine bovine à 1 % est ajouté à chaque échantillon ; on réalise alors une précipitation par addition d'un ml de TCA à 20 % et une filtration sur papier watman n° 542. Le filtrat contenant des petits peptides TCA solubles est passé au compteur pour mesurer la radioactivité.

La figure 6 montre une apparition précoce de petits peptides (10 %) TCA solubles dans le milieu de culture. Le matériel enzymatique des schistosomules est donc capable d'hydrolyser les IgG en petits fragments peptidiques puisqu'aucune dégradation spontanée des IgG n'est observée en absence des schistosomules. Cependant une hydrolyse complète des IgG n'est jamais observée même après 16 h d'incubation avec les larves.

#### b - Incubation des IgG froides avec des produits d'incubat de schistosomules (PIS)

Environ 30 000 schistosomules artificiels sont maintenus en PBS contenant du glucose à 1 % pendant 4 h pour éliminer les enzymes cercariennes qui pourraient éventuellement contaminer la préparation. Après 6 lavages en tampon PBS stérile les schistosomules sont mis en incubation à 37° C dans le même tampon pendant 16 h ; l'absence de contaminants bactériens a été contrôlée. Le surnageant de cette préparation sera noté PIS (produits d'un incubat de schistosomules).

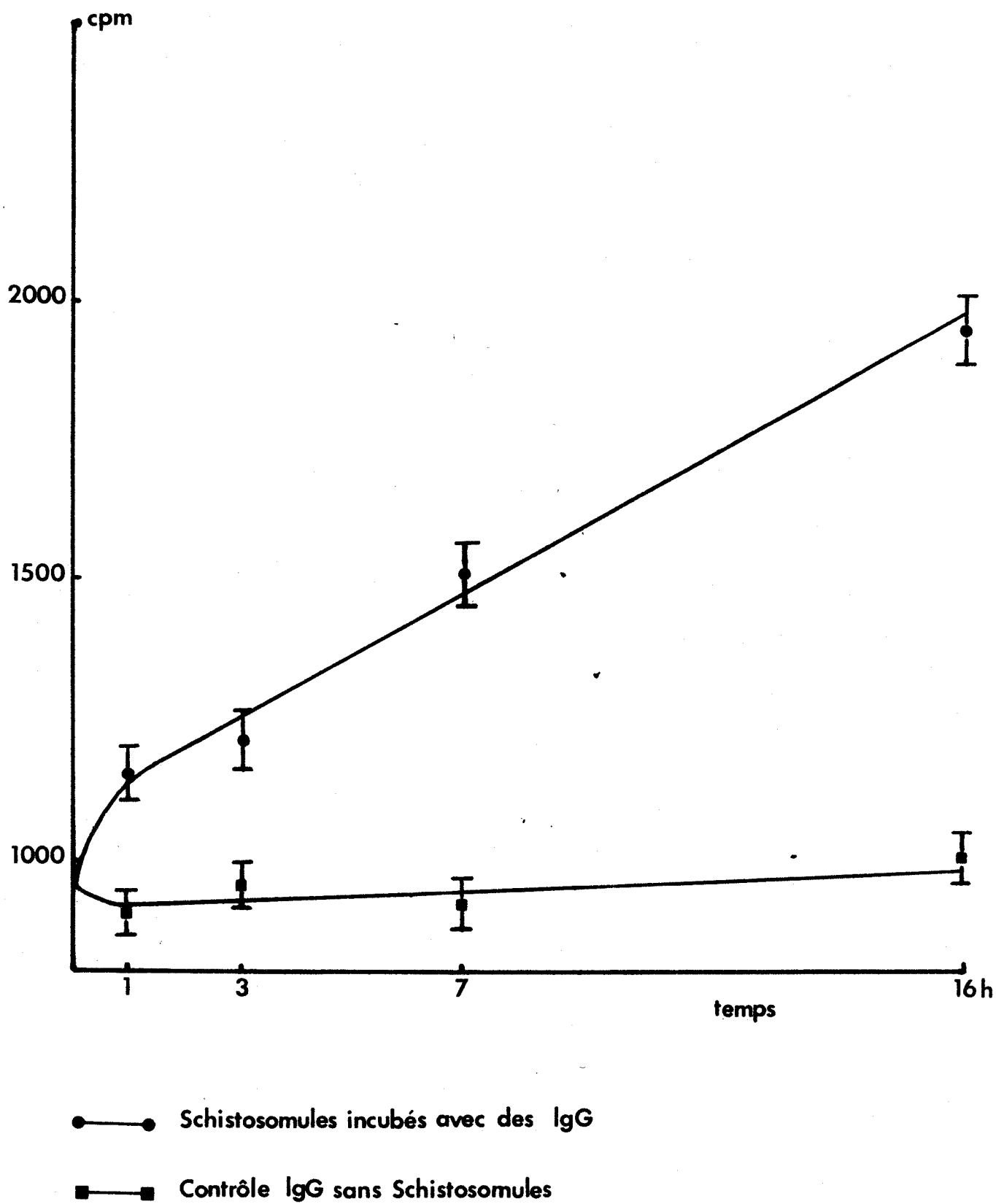


Fig 6



Des IgG incubées pendant 16 h avec des PIS sont filtrées sur colonne ACA 34, après réaction à la ninhydrine et mesure de la transmission à 280 nm (voir matériels et méthodes), on constate que la majeure partie des produits de clivage sont élus en fin de filtration, leur poids moléculaire est inférieur à 12 000 daltons (figure 7).

#### 4 - ETUDE DE LA SPECIFICITE ENZYMATIQUE DES PRODUITS D'IN INCUBAT DE SCHISTOSOMULES (PIS)

Des peptides synthétiques (mono ou bi-substitués) ont été utilisés pour apprécier la spécificité des enzymes parasitaires (tableau XX). Les substrats sont solubilisés dans du méthanol (6 µg/ml) et dilués au 1/20e dans du tampon phosphate stérile 0,2 M pH 7,2 ; 2 ml de substrat sont mis en incubation avec 50 µl de PIS à 37° C pendant 4 h. La coloration jaune libérée est mesurée à 410 nm. Dans les contrôles les 50 µl de PIS sont remplacés par 50 µl d'eau distillée stérile.

Tableau XX - Action des produits d'incubat de schistosomules sur certains peptides synthétiques mono ou bi-substitués

<u>SUBSTRATS BISUBSTITUES</u>	
Gluraryl-L-phe-ala 4NA	-
Benzoil-L-Arg-4NA	+
<u>SUBSTRATS MONOSUBSTITUES</u>	
L-tyr 4NA	-
L-pro 4NA	-
L-lys 4NA	+
L-ala 4NA	+
L-leu 4NA	+
Leu-4NA (LNA)	+
Gly-L-phe-L-Ala 4NA	-

+ Substrat hydrolysé

- Substrat non hydrolysé

LNA : Leucine-para-nitroanilide

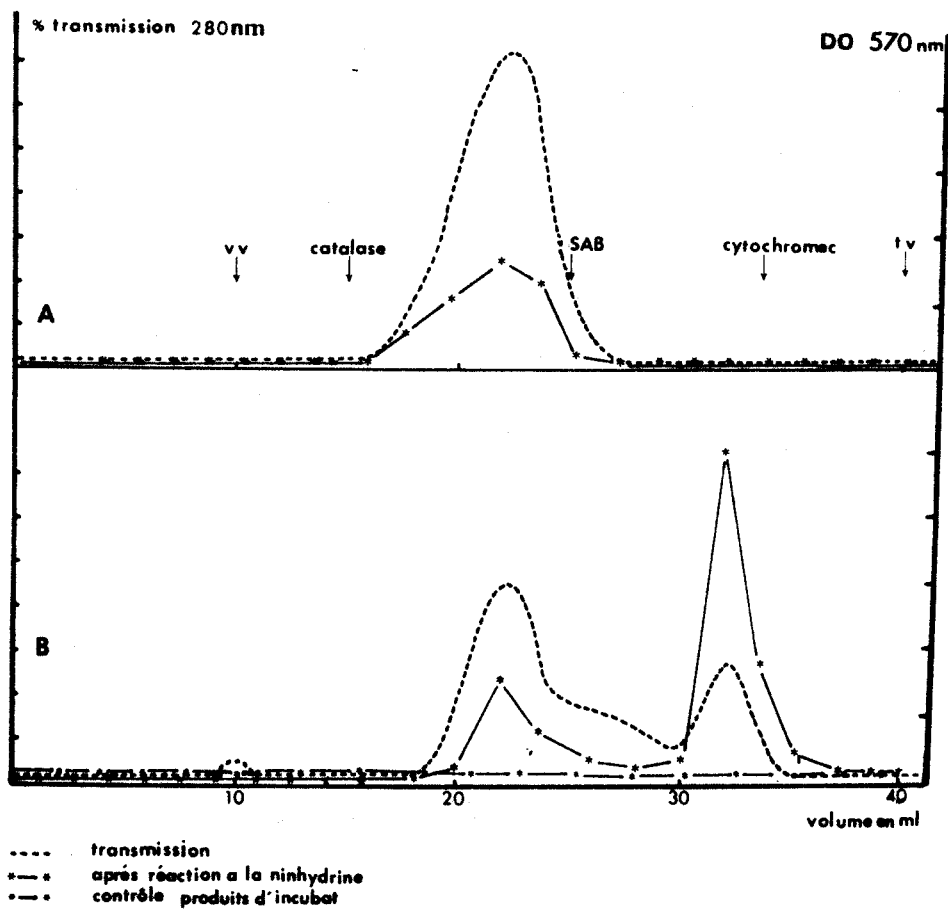


Fig 7

Alors que les peptides : Glutaryl-L-phe-L-ala-4NA, gly-L-phe-L-ala-4 NA et L-tyr-4NA qui sont des substrats de la chymotrypsine ne sont pas dégradés par les PIS ; ceux contenant des acides aminés basiques mono ou bi-substitués (Benzoil-L-arg 4LNA, L-lys-4NA) sont hydrolysés ; ceci semble indiquer que les PIS ont une activité endoprotéasique de type trypsine. L'hydrolyse de la LNA et L-leu 4NA suggère une activité aminopeptidasique qui agirait au niveau du groupe  $\text{NH}_2$  libre. Cependant cette activité n'est pas exclusivement de type leucine-aminopeptidase, en effet d'autres peptides sont hydrolysés (L-ala-4NA, L-Lys-4NA).

## DISCUSSION

Les résultats que nous venons d'exposer indiquent que les IgG fixées à la surface du schistosomule sont hydrolysées en petits fragments peptidiques. Cette hydrolyse est probablement le résultat d'une action conjointe d'une ou plusieurs endoprotéases et d'aminopeptidasés. Dans un premier temps les IgG, sous l'effet des endoprotéases seraient scindées en de larges fragments qui seraient à leur tour hydrolysés en petits peptides à la fois sous l'action des aminopeptidasés et des endoprotéases.

Un mécanisme protéolytique similaire à ce que nous avons observé dans le cas des schistosomules a été décrit pour Tetrahymena pyriformis (EISEN et TALLAN, 1977). En effet ce protozoaire est capable d'hydrolyser les IgG anticorps (anti-Tetrahymena), libres ou fixées par leur fragment Fab aux antigènes de surface du parasite. Cette hydrolyse est due à des enzymes protéolytiques d'origine parasitaire qui scindent les IgG en deux fragments Fab et  $F_c$  ; les  $F_c$  sont libérés dans le milieu, les Fab restent fixés aux antigènes de surface du parasite le protégeant contre l'action d'autres anticorps. Ce processus a été dénommé "fabulation".

Les produits de l'hydrolyse des IgG (PHIg) par les produits d'incubation de schistosomules (IS) semblent jouer un rôle régulateur de l'activation des macrophages (AURIAULT et coll., 1980). En effet ces auteurs ont démontré que le mécanisme de cystotoxicité in vitro vis-à-vis des schistosomules décrit par CAPRON et coll., 1975, et qui fait intervenir des macrophages de rat et des anticorps IgE de rat spécifiques anti-S. mansoni, est inhibé

par les PHlg. D'autre part les fragments Fc des IgG qui restent fixés à la surface des schistosomules (mis en évidence par la technique d'immunofluorescence) semblent être à l'origine de l'activation du complément par la voie classique.

### III - INTERACTION ENTRE LES SCHISTOSOMULES ET LE PREMIER COMPOSANT DU COMPLÉMENT

Nous avons mis en évidence deux possibilités de fixation du  $C_{1q}$  à la surface des schistosomules :

- 1 - Par le récepteur  $C_{1q}$  existant à la surface des parasites.
- 2 - Par les fragments Fc des IgG présents à la surface des schistosomules.

Seul le deuxième mécanisme de fixation du  $C_{1q}$  semble intervenir dans l'activation du complément par la voie classique.

#### 1 - MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR $C_{1q}$ A LA SURFACE DES SCHISTOSOMULES

##### a - Formation de rosettes $EAC_{1q}$

Nous avons montré (1<sup>re</sup> partie-I) que les schistosomules ne forment pas de rosettes lorsque les complexes EA sont obtenus avec des anticorps de classe IgM (voir tableau IX) .

Dans une première série d'expériences, environ 50 parasites pris à divers stades évolutifs de S. mansoni sont mis en contact avec  $2 \times 10^6$  E, EA,  $EAC_{1q}$  ou EACI dans un volume final de 150  $\mu$ l de milieu. Après 20 min. d'incubation à 37° C, le pourcentage de formation de rosettes est déterminé par une observation directe au microscope. Dans un autre type d'expérience, les parasites sont mis en incubation avec 0,1 mg de  $C_{1q}$  dans 150  $\mu$ l de milieu, après 20 min. à 37° C, trois lavages sont effectués et les parasites sont de nouveau mis en contact avec des complexes EA.

Dans ces conditions expérimentales seuls les schistosomules SA et SP forment des rosettes  $EAC_{1q}$  (Tableau XXI). Fig. 8A

Tableau XXI - Formation de rosettes EAC<sub>1q</sub> à la surface des schistosomules de S. mansoni

Stade évolutif de <u>S. mansoni</u>	Type de complexe			
	E	EA	EAC <sub>1q</sub>	EAC <sub>1</sub>
Cercaires	-d	-	-	-
SA <sup>a</sup>	-	-	++ <sup>e</sup>	-
SP <sup>b</sup>	-	-	+++	-
S. poumon <sup>c</sup>	-	-	-	-
Vers adultes	-	-	-	-

a-SA = Schistosomules artificiels

b-SP = Schistosomules peau

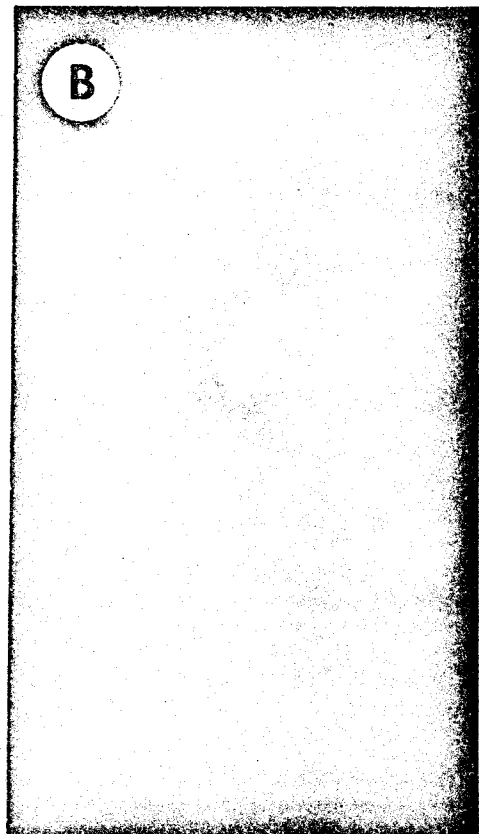
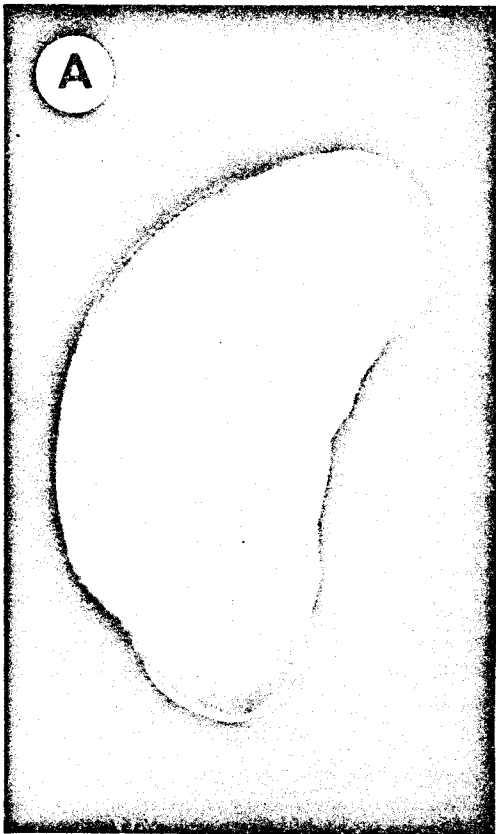
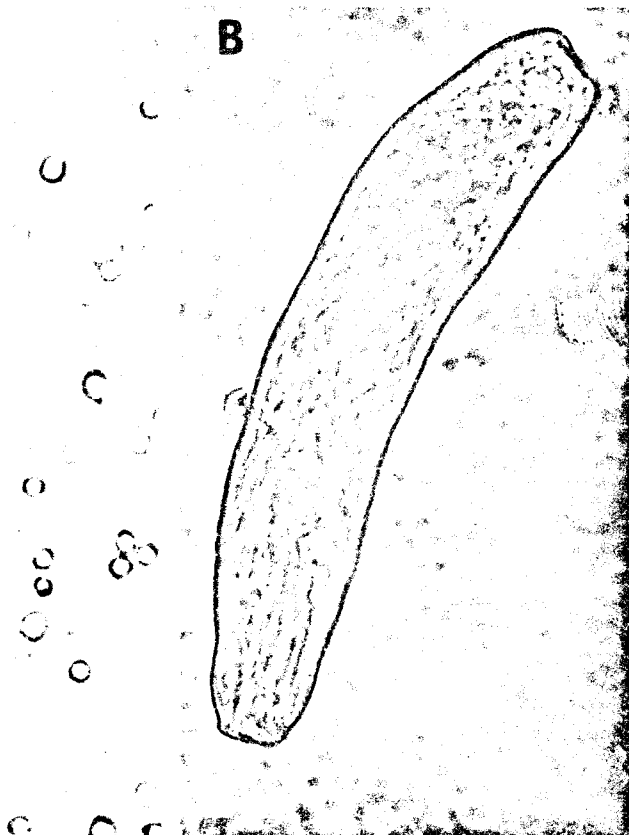
c-S poumon = Schistosomules poumon (5j)

d = Pas de formation de rosette

e = Chaque + représente 10 % de parasites formant des rosettes







FIS  
25/12

La fixation des complexes  $EAC_{1q}$  et non des  $EACI$  suggère la présence à la surface des schistosomules d'un récepteur pour le  $C_{1q}$ . Nous avons procédé à des tests d'inhibition pour vérifier cette hypothèse.

b - Inhibition de formation de rosettes

- Lorsque les schistosomules sont mis en incubation avec du  $C_{1q}$  au préalable chauffé à  $56^{\circ}C$  pendant 30 min. ou traités à l'EDTA 0,1 M, aucune formation de rosette n'est observée (Tableau XXII). ( Fig.8B )
- L'incubation des schistosomules avec du  $C_{1q}$  suivi de lavages et d'un traitement avec un sérum anti- $C_{1q}$  inhibe la formation de rosettes.
- Le traitement des schistosomules avec du collagène type I avant l'incubation avec du  $C_{1q}$  inhibe partiellement la formation de rosettes.
- Par contre un prétraitement des schistosomules avec de l'albumine ou un sérum de lapin normal inactivé (chauffé  $56^{\circ}C$ , 30 min) avant le  $C_{1q}$  n'affecte pas le rosetting.

L'ensemble de ces résultats sont en faveur de l'existence d'un récepteur spécifique du  $C_{1q}$  à la surface des schistosomules.

c - Fixation de  $C_{1q}$  marqué à la fluorescéine (FITC- $C_{1q}$ )

En utilisant la technique d'immunofluorescence directe nous avons pu confirmer la fixation du  $C_{1q}$  à la surface des schistosomules. Lorsque les différents stades évolutifs sont mis en contact avec du FITC- $C_{1q}$  seuls les schistosomules (SP et SA) montrent une fluorescence de membrane Fig. 8A. Dans nos conditions expérimentales aucune fixation du FITC- $C_{1q}$  n'est observée avec les cercaires, schistosomules poumon ou schistosomes adultes. Cependant certains traitements du FITC- $C_{1q}$  (chauffage à  $56^{\circ}C$  pendant 30 min. ou EDTA 0.1 M) ou la préincubation des larves dans du  $C_{1q}$  non marqué, inhibent la fixation du FITC- $C_{1q}$  et par conséquent de la fluorescence précédemment observée à la surface des schistosomules (Fig.8B). Par contre la préincubation des schistosomules avec l'albumine humaine n'affecte pas la fixation du FITC- $C_{1q}$ .

Tableau XXII - Formation de rosettes EAC<sub>1q</sub> à la surface des schistosomules :  
Effets de divers traitements qui inactivent le C<sub>1q</sub>

Matériel	Traitements	Addition de complex EA Formation de rosett
C <sub>1q</sub>	-	+++
C <sub>1q</sub>	56° C, 30 min.	-
C <sub>1q</sub>	EDTA 0.1 M	-
C <sub>1q</sub>	Sérum de lapin anti-C <sub>1q</sub> (inactivé)	-
C <sub>1q</sub>	Sérum de lapin sain (inactivé)	+++
Collagen (0,2 mg)	C <sub>1q</sub>	+
Albumin (0,2 mg)	C <sub>1q</sub>	+++

d - Fixation du C<sub>1q</sub> marqué à l'<sup>125</sup>I (<sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub>)

### α Schistosomules

Cette approche supplémentaire a été utilisée afin de confirmer éventuellement les résultats précédents.

Des schistosomules sont incubés avec du <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> pendant 30 min. à 37° C lavés, le pourcentage de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> fixé est déterminé après précipitation au polyéthylène glycol (voir matériel et méthodes).

Nous pouvons constater que d'une part, il existe une relation étroite entre le pourcentage de fixation de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> et le nombre de schistosomules (Fig.9). D'autre part la préincubation des schistosomules dans du C<sub>1q</sub> froid inhibe une fixation ultérieure de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> alors que l'albumine n'a aucun effet (Fig. 9).

### β Antigènes de schistosomes adultes

La difficulté d'obtention d'antigènes de schistosomules en quantité suffisante nous a amené à utiliser des extraits d'antigènes de vers adultes de S. mansoni (méthode d'obtention : Voir matériel et méthodes).

Une bonne corrélation est observée entre la quantité d'antigène et le pourcentage de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> précipité (Fig. 10). Cependant les antigènes métaboliques à de fortes concentrations (> 0,5 mg) semblent fixer plus de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> que les antigènes bruts de S. mansoni.

Pour éliminer la possibilité d'une fixation de C<sub>1q</sub> par les complexes immuns qui pourraient être présents dans l'extrait antigénique de S. mansoni, nous l'avons fractionné par gel filtration sur une colonne ACA 34. Le pouvoir de fixation du <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> a été déterminé pour les diverses fractions obtenues. Le taux maximum de fixation du <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> est obtenu pour des fractions de faible poids moléculaire (PM < 20 000) (Fig. 11).

Ces résultats suggèrent que la majeure partie des substances fixant le C<sub>1q</sub> présentes dans l'extrait de schistosomes pourraient être d'origine parasitaire.

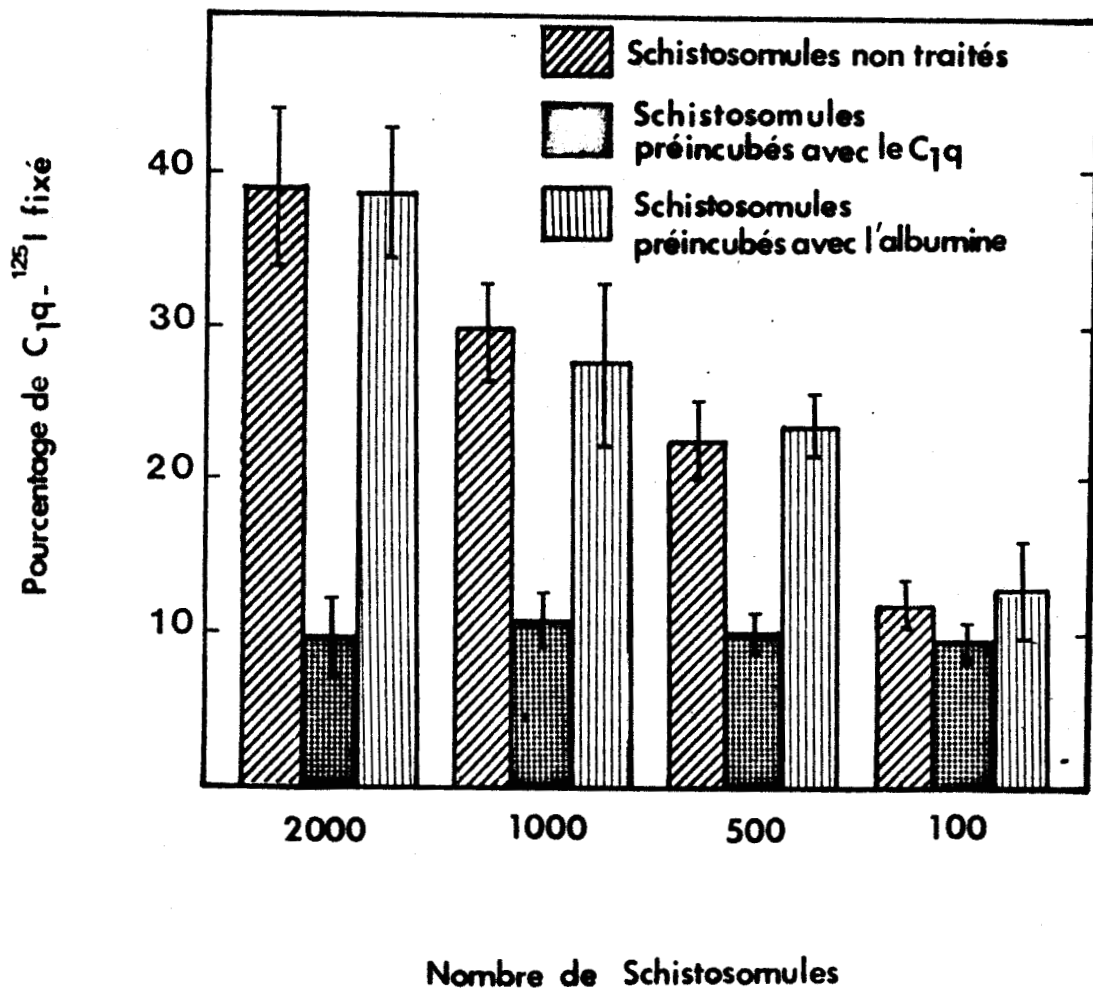


Fig 9



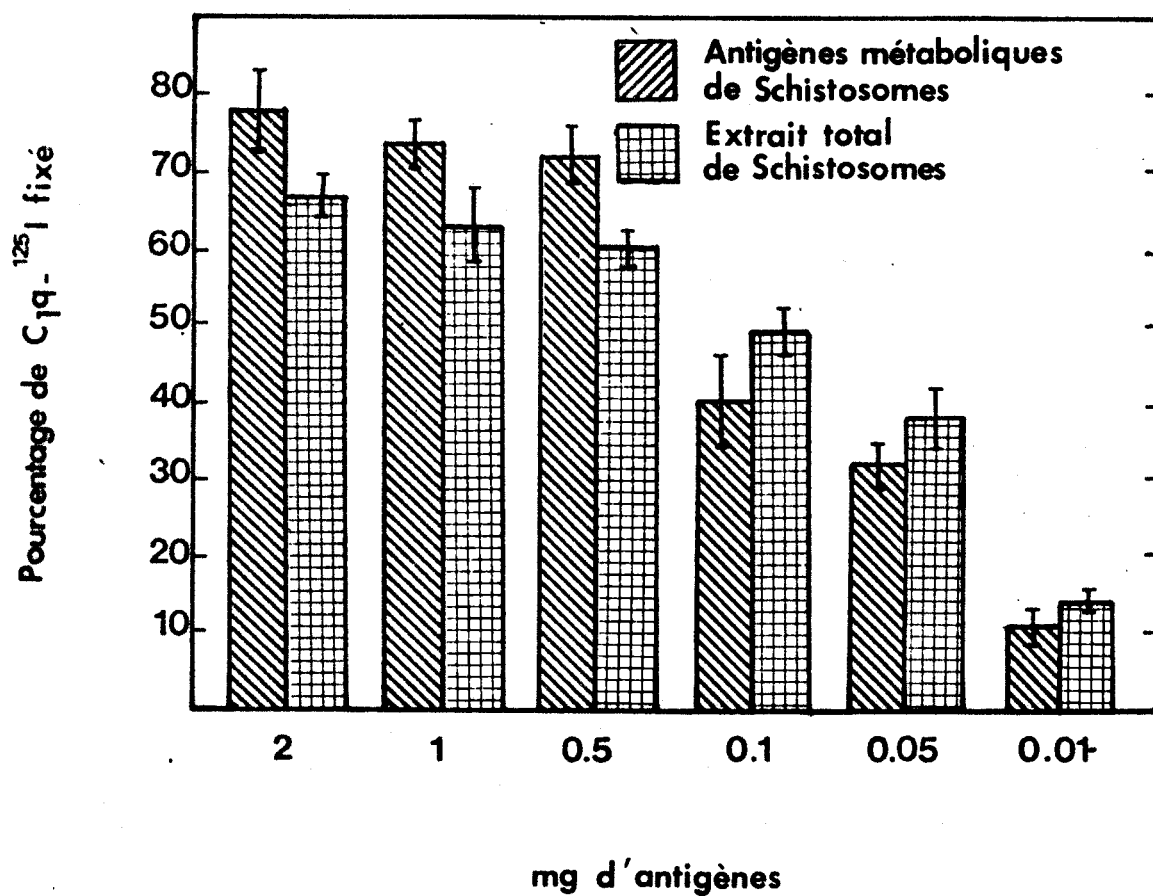


Fig 10

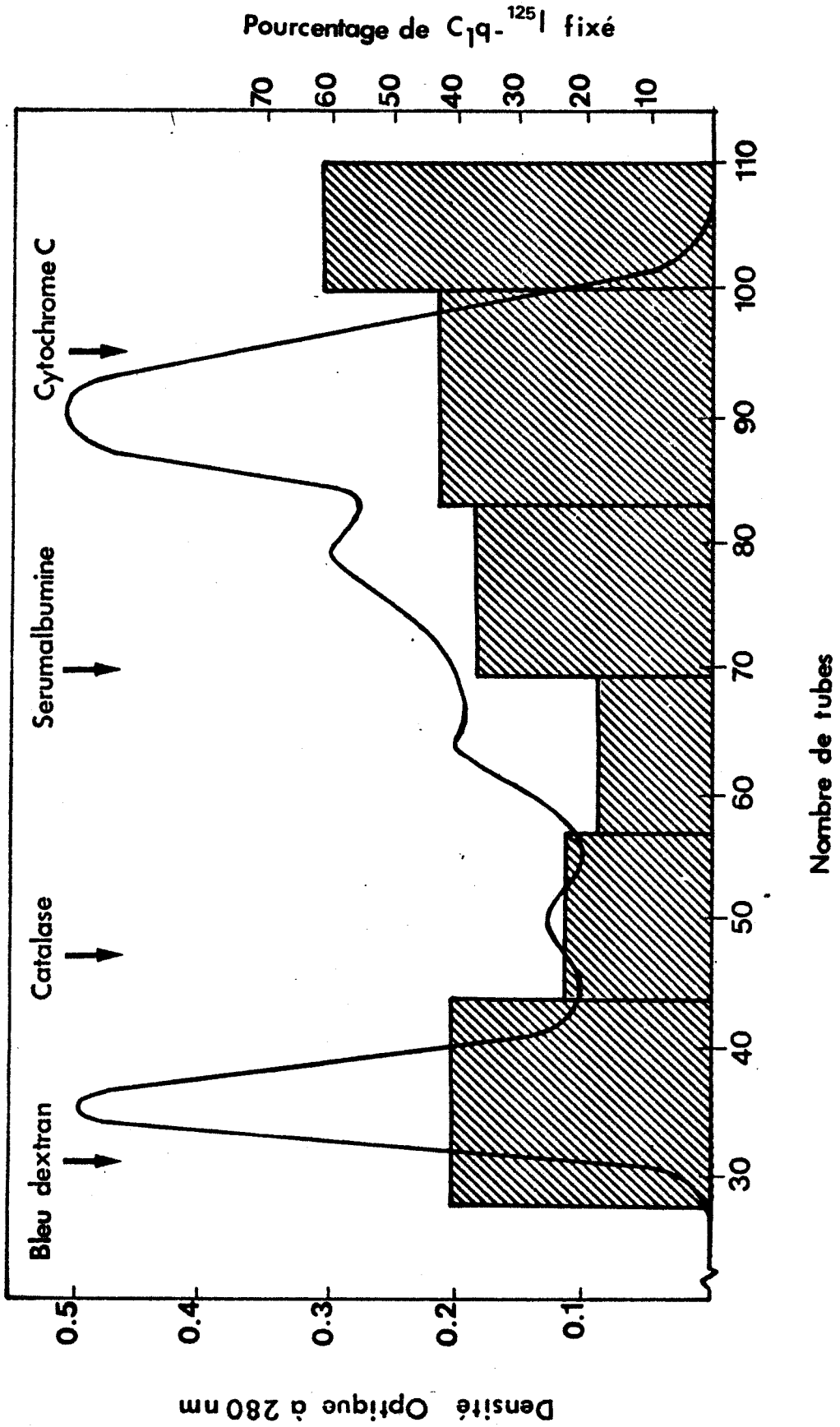


Fig 11



e - Résumé

L'étude que nous venons d'exposer montre la présence d'un récepteur  $C_{1q}$  à la surface des schistosomules. En effet il n'y a pas de fixation de complexes  $EAC_{19}$  à la surface des autres stades évolutifs de S. mansoni. En utilisant le FITC- $C_{1q}$  et le  $^{125}I$ - $C_{1q}$  nous avons clairement confirmé la fixation de la première sous-unité du premier composant du complément à la surface des schistosomules. Cette fixation est calcium dépendante puisque le  $C_{1q}$  traité à l'EDTA 0,1 M n'est pas rélevé à la surface du schistosomule. Ces observations sont analogues à celles décrites pour la fixation du  $C_{1q}$  aux plaquettes (WAUTIER et coll., 1974).

De nombreux travaux ont montré l'existence d'analogies entre la structure chimique du  $C_{1q}$  et celle du collagène (MULLER-EBERHARD, 1968, REID et coll., 1972 ; REID, 1974). L'inhibition de formation de rosettes  $EAC_{1q}$  par le collagène, suggère fortement la présence à la surface des schistosomules d'un récepteur pour la moitié "collagen-like" du  $C_{1q}$  (Fig. 12). La compétition entre le  $C_{1q}$  et le collagène pour le même site de fixation a été signalée dans le cas des plaquettes ; en effet leur aggrégation par le collagène peut être inhibé par le  $C_{1q}$  (SUBA et CASKO, 1976).

Certains antigènes de schistosomes adultes peuvent fixer le  $C_{1q}$ . Les taux de fixation les plus élevés sont obtenus avec des fractions de faible poids moléculaire. Cette observation pourrait être rapprochée des résultats récents de SANTORO et coll., 1980 concernant l'activation du complément par certains antigènes de schistosomes. Dans ce cas la fixation du  $C_{1q}$  par ces antigènes pourrait être la première étape de l'activation.

Contrairement à certains virus qui possèdent à leur surface un récepteur pour le C1 qui est l'initiateur de l'activation de la voie classique du complément par ces virus (COOPER et coll., 1976 ; BARTHOLOMEW et coll., 1978), la fixation du  $C_{1q}$  au récepteur des schistosomules n'est pas l'étape initiale de l'activation de la voie classique. En effet, celle-ci nécessite la présence, à la surface des schistosomules, de fragments  $F_c$  des IgG liés aux récepteurs  $F_c\gamma$  ; ceci fera l'objet de la suite de cette étude.



C1q

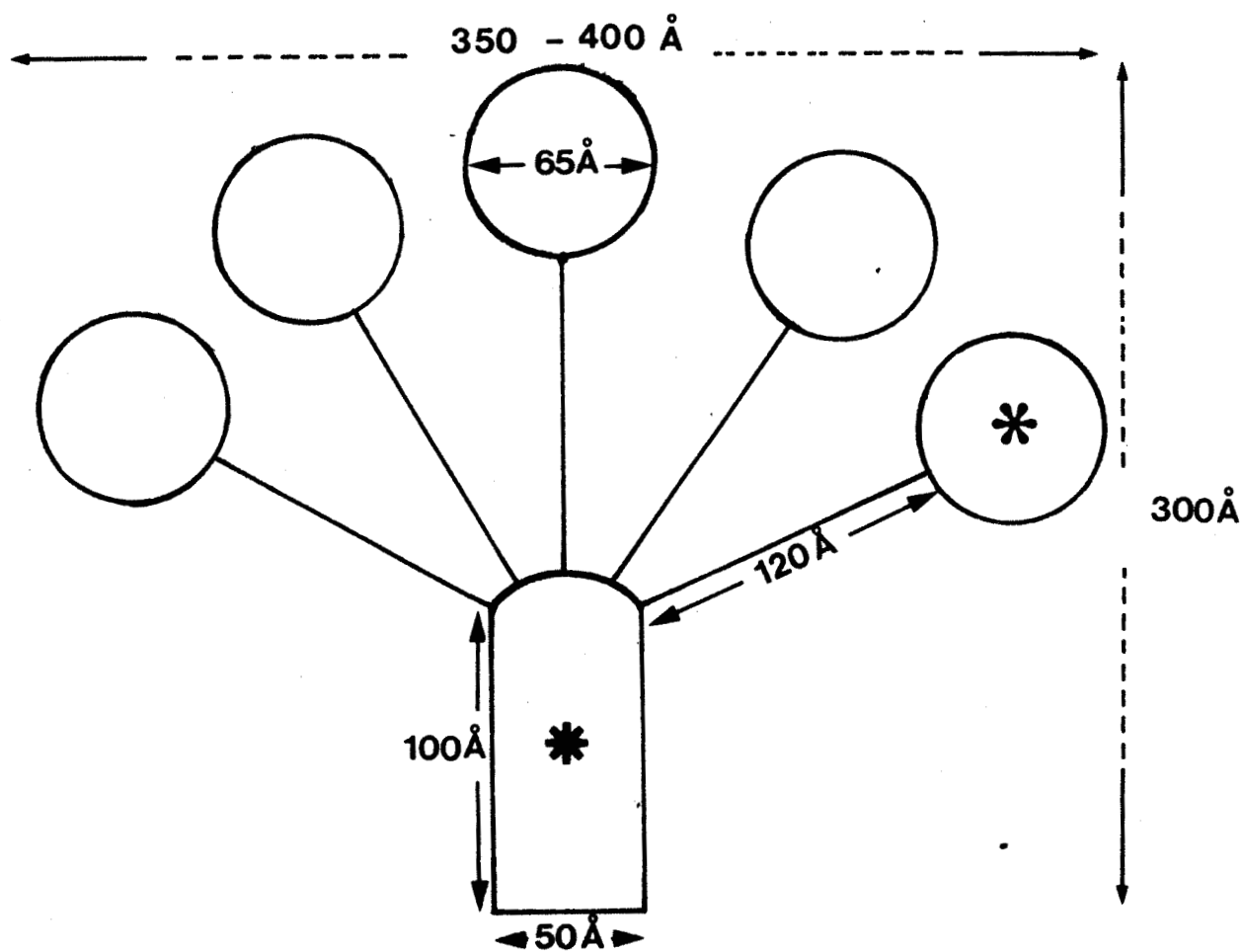


Fig 12

Représentation schématique de la molécule de C1q.

\*

Sous unités périphériques globulaires qui se fixent aux Fc.

\*

Sous unité centrale "Collagen-like" qui interagit avec le C1r et C1s.

2 - ANALYSE DU MECANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE CLASSIQUE DU COMPLEMENT  
PAR LES SCHISTOSOMULES : ROLE DU RECEPTEUR Fc  $\gamma$

a - Fixation du C<sub>1q</sub> aux IgG présentes à la surface des schistosomules

Les travaux de SANTORO et coll., 1979 suggèrent l'activation de la voie classique du complément par les schistosomules ; celle-ci dépend de la présence des IgG.

Il nous a semblé intéressant d'aborder l'étude du mécanisme de cette activation. En effet la présence d'un récepteur pour le fragment Fc des IgG à la surface des schistosomules, et la participation de ces immunoglobulines dans l'activation de la voie classique du complément, suggère que la fixation du C<sub>1q</sub> aux IgG présentes à la surface des larves pourrait être la première étape de cette activation. Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué les expériences suivantes :

- Des schistosomules (2 000, 1 000, 500 et 100) dans 100  $\mu$ l de milieu (HLEG) sont incubés à 37° C pendant 30 min. avec des IgG humaines (300  $\mu$ g/ml) ou de l'albumine à la même concentration, dans un volume final de 400  $\mu$ l. Après deux lavages dans le milieu, les schistosomules sont mis en contact avec du <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub>. Dans ces conditions un fort pourcentage de fixation de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> est observé pour des larves préincubées avec des IgG (Fig. 13).
- De même un traitement préalable des parasites avec du C<sub>1q</sub> non marqué avant l'incubation avec les IgG n'affecte que partiellement la fixation ultérieure de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> (Fig. 14). Par contre lorsque les schistosomules sont traités avec du C<sub>1q</sub> froid et l'albumine humaine, aucune fixation appréciable de <sup>125</sup>I-C<sub>1q</sub> n'est observée (Fig. 14).

L'ensemble de ces résultats indiquent l'existence de deux modes de fixation du C<sub>1q</sub> à la surface des schistosomules :

- 1° Par les récepteurs spécifiques du C<sub>1q</sub>,
- 2° Ou par les IgG fixées aux récepteurs Fc des schistosomules ; seule cette deuxième possibilité permet l'activation du complément par la voie classique.

b - Approche de l'activation séquentielle par le dosage de consommation du C<sub>4</sub>

α - Sérum humain agammaglobulinique restauré avec des IgG humaines

Des schistosomules sont incubés en présence d'un sérum humain déficient en IgG (200  $\mu$ l) ou un sérum humain normal (200  $\mu$ l), dans un volume final de 400  $\mu$ l (200  $\mu$ l de milieu). Après 45 min. à 37° C les larves sont centrifugées, le dosage du C<sub>4</sub> (voir matériels et méthodes) est effectué sur une aliquote du surnageant, et le pourcentage de consommation est déterminé. Dans ces conditions seul le sérum humain normal donne une consommation appréciable de C<sub>4</sub>. L'addition des IgG au sérum agammaglobulinique restaure la consommation du C<sub>4</sub> (Fig. 15). D'autre part une bonne corrélation est observée entre le nombre de schistosomules et le pourcentage de consommation.

Une éventuelle activation par des IgG agrégées est à exclure. En effet aucune consommation de C<sub>4</sub> n'est observée dans un sérum agammaglobulinique restauré en IgG et incubé à 37° C pendant 45 min. sans schistosomules.

β - Sérum humain agammaglobulinique restauré avec des produits de l'hydrolyse des IgG humaines par l'incubation de schistosomules (PHIg)

Une consommation appréciable de C<sub>4</sub> est observée avec des schistosomules incubés en présence d'un sérum agammaglobulinique restauré avec des PHIg (Fig. 16 a) ; elle semble augmenter en fonction du temps de l'hydrolyse (Fig. 17). Le chauffage à 60° pendant 1 h ne semble pas affecter l'activité des PHIg (Fig. 16 a).

Afin de bien cerner la part réelle de consommation de C<sub>4</sub> due aux produits d'hydrolyse de l'IgG (les PHIg contiennent en réalité à la fois des fragments d'immunoglobulines G hydrolysées et des enzymes et autres substances d'origine parasitaires que nous avons dénommés incubat de Schistosomules : IS), nous avons testé l'action propre d'un incubat de schistosomules sur le C<sub>4</sub>. Les résultats obtenus semblent (Fig. 16 b) indiquer

que l'incubat de schistosomules n'a aucun effet sur le  $C_4$ ; par contre l'incubat des cercaires consomme le  $C_4$  de manière appréciable. Cette observation a déjà été rapportée par MACHADO et coll., 1975. En effet ces auteurs ont montré que des cercaires incubées dans un sérum humain normal activent le complément par la voie alterne. Cependant ils constatent que le  $C_4$  est dégradé alors que le  $C_1$  et  $C_2$  sont intacts. Les auteurs suggèrent une simple dégradation du  $C_4$  par les enzymes cercariennes. Nos observations sont en accord avec ces résultats mais apportent des informations supplémentaires :

- L'absence de dégradation du  $C_4$  par les enzymes des schistosomules indique qu'il y a probablement un "switch" enzymatique au moment de la transformation des cercaires en schistosomules. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que les enzymes cercariennes ont surtout été décrites comme ayant une activité chymotrypsique (GAZZINELLI et coll., 1966-1972) et nos résultats montrent l'absence de ce type d'activité dans un incubat de schistosomules (1re partie, II-4).
- La consommation du  $C_4$  suite à l'activation de la voie classique du complément par les schistosomules est étroitement liée aux IgG ou leurs produits d'hydrolyse.

#### Y Sérum humain agammaglobulinique restauré avec des fragments Fc ou Fab des IgG humaines

Dans le but d'apporter des précisions supplémentaires sur la nature des fragments d'immunoglobulines G qui interviennent dans l'activation de la voie classique, nous avons effectué l'expérience suivante :

Des schistosomules sont incubés à 37° C pendant 45 min. en présence d'un sérum déficient en IgG restauré avec des IgG ou leur fragment Fc ou Fab séparément. Après centrifugation le  $C_4$  est dosé dans une aliquote du surnageant.

Les résultats obtenus montrent que seuls les sérums restaurés en IgG ou leur fragment Fc permettent d'obtenir une consommation de  $C_4$  (Fig. 18) ; Les Fc à la même concentration semblent plus efficaces que les immunoglobulines entières.

- 1° Le clivage des IgG libère le site de fixation du  $C_{1q}$  (Fig. 19) situé sur les fragments Fc qui sont retenus à la surface des larves. Deux molécules Fc adjacentes peuvent alors fixer le  $C_{1q}$  ce qui aboutirait au schéma classique d'activation. Cependant il est à noter que ce cas conserverait son originalité, dans le sens que ce sont des fragments Fc liés aux récepteurs qui fixent le  $C_{1q}$  et non des complexes antigènes-anticorps.
- 2° Un changement de conformation des IgG liées aux schistosomules exposerait le site de fixation du  $C_{1q}$ .

La première hypothèse est peut-être la plus probable, cependant elle n'exclut pas la deuxième.

Un des éléments importants qu'il faut noter dans cette étude est que l'activation du complément par les fragments Fc liés aux schistosomules n'aboutit pas à la lyse du parasite. Cette observation serait peut-être à rapprocher des travaux relatifs aux lymphocytes (PLATTS-MILLS et ISHIZAKA, 1974 ; BUDZKO et coll., 1976 ; WILSON et coll., 1979). En effet, les lymphocytes humains ou de lapin peuvent activer le complément sans que cela puisse induire une lyse des cellules.

Si l'activation de la voie classique du complément n'a pas pour conséquence la lyse des schistosomules, il n'en est pas de même pour la voie alterne. C'est ce que nous développerons dans la deuxième partie de cette étude.

L'activation du complément par des parasites vivants ou leurs antigènes purifiés a été décrite dans de nombreux modèles parasitaires (voir revue SANTORO et coll., 1979). Dans plusieurs expériences in vitro, l'activation du complément, par la voie classique ou alterne, est létale pour les parasites (ANZIANO et coll., 1972 ; KASSIS et TANNER, 1976, 1977).

Dans le cas de Schistosoma mansoni plusieurs mécanismes de cytotoxicité in vitro vis-à-vis de stades larvaires ont été décrits (CLEGG et SMITHERS, 1972 ; CAPRON et coll., 1974, 1975, 1978 ; DEAN et coll., 1974 ; MACHADO et coll., 1975 ; TAVARES et coll., 1978 ; RAMALHO-PINTO et coll., 1978). Trois de ces mécanismes dépendent du complément : Le premier fait intervenir des anticorps spécifiques anti-S. mansoni et du complément, ce dernier est activé par la voie classique (CLEGG et SMITHERS, 1972 ; CAPRON et coll., 1974 ; TAVARES et coll., 1978) ; le deuxième est l'activité cercaricide des sérums normaux, dans ce cas le complément est activé par la voie alterne (MACHADO et coll., 1975) ; le troisième est la cytotoxicité complément-dépendante, des éosinophiles de rats normaux vis-à-vis des schistosomules de S. mansoni (RAMALHO-PINTO et coll., 1978).

Récemment SANTORO et coll., 1979, ont montré que les deux voies du complément peuvent être activées in vitro par les schistosomules ; cependant seule la voie alterne est cytotoxique pour les parasites.

Dans la présente étude les altérations produites sur les schistosomules, par les composés terminaux du complément après son activation par la voie alterne sont examinées en microscopie électronique à transmission et à balayage.

# I - ACTIVATION DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLÉMENT PAR LES SCHISTOSOMULES IN VITRO : INDUCTION DE CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES

## 1 - TEST DE CYTOTOXICITE

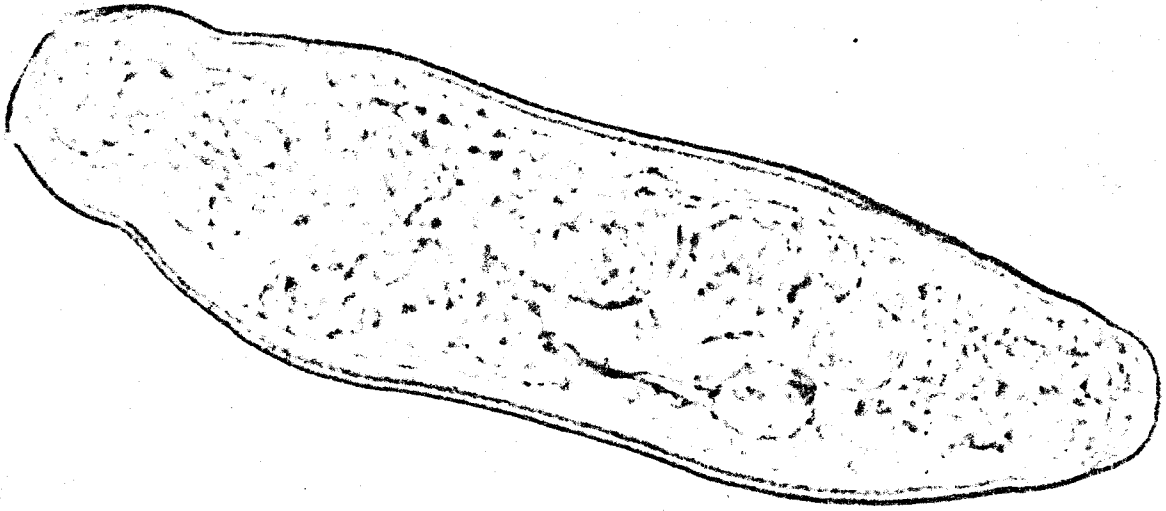
Environ 500 à 800 schistosomules artificiels suspendus dans 100  $\mu$ l de milieu sont mélangés avec 1 ml de sérum de cobaye frais ou de sérum de cobaye déficient en  $C_4$  et incubés à 37° C dans une atmosphère de  $CO_2$  à 5 % pendant 15 min., 30 min. 3 h et 4 h. Les sérums de cobaye inactivés (chauffés à 56° pendant 30 min.) sont utilisés comme témoins. Après incubation les larves sont lavées et traitées par les techniques classiques pour l'examen en microscopie électronique (voir matériels et méthodes).

## 2 - MICROSCOPIE OPTIQUE

Par un examen visuel direct en microscopie optique, les schistosomules incubés à 37° C pendant 4 h avec du sérum de cobaye inactivé conservent la transparence et les mouvements observés habituellement avec des schistosomules non traités (Planche III.1). Par contre les schistosomules traités avec du sérum de cobaye frais ou déficient en  $C_4$  perdent progressivement leurs mouvements, présentent des "bulles" à leur surface, et après 4 h d'incubation, ils deviennent complètement immobiles et montrent un aspect granulaire (Planche III.2).

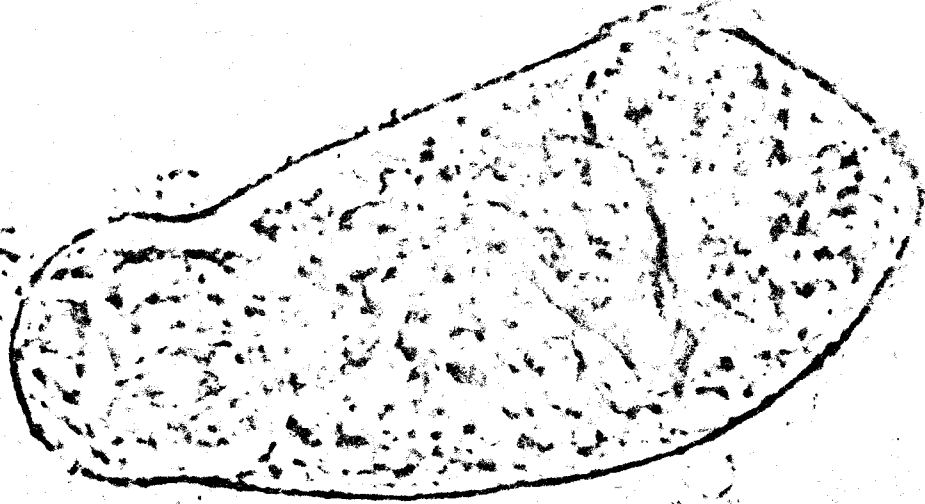
## 3 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

L'aspect ultrastructural des schistosomules incubés pendant 4 h avec du sérum de cobaye inactivé (Planche IV.3) est similaire à celui des schistosomules non traités ; dans ce cas les schistosomules sont intacts. Après 15 min. d'incubation dans du sérum de cobaye frais, la plupart des schistosomules ont un aspect normal. Cependant dans certains échantillons on peut noter un début d'altération des membranes des schistosomules (Planche IV.4). Après 30 min., environ la moitié des parasites examinés présentent des lésions importantes de la membrane qui est interrompue par endroits (Planche IV.5). A cette période nous n'avons pas observé d'altérations dans le cytoplasme tégumentaire. Néanmoins après 3 h de culture avec du sérum de cobaye frais, la majorité des schistosomules perdent complètement leur membrane ainsi que du matériel intracellulaire (Planche



12 u

1



12 u

2

BUS  
LILLE



0.4 u



3

0.4 u



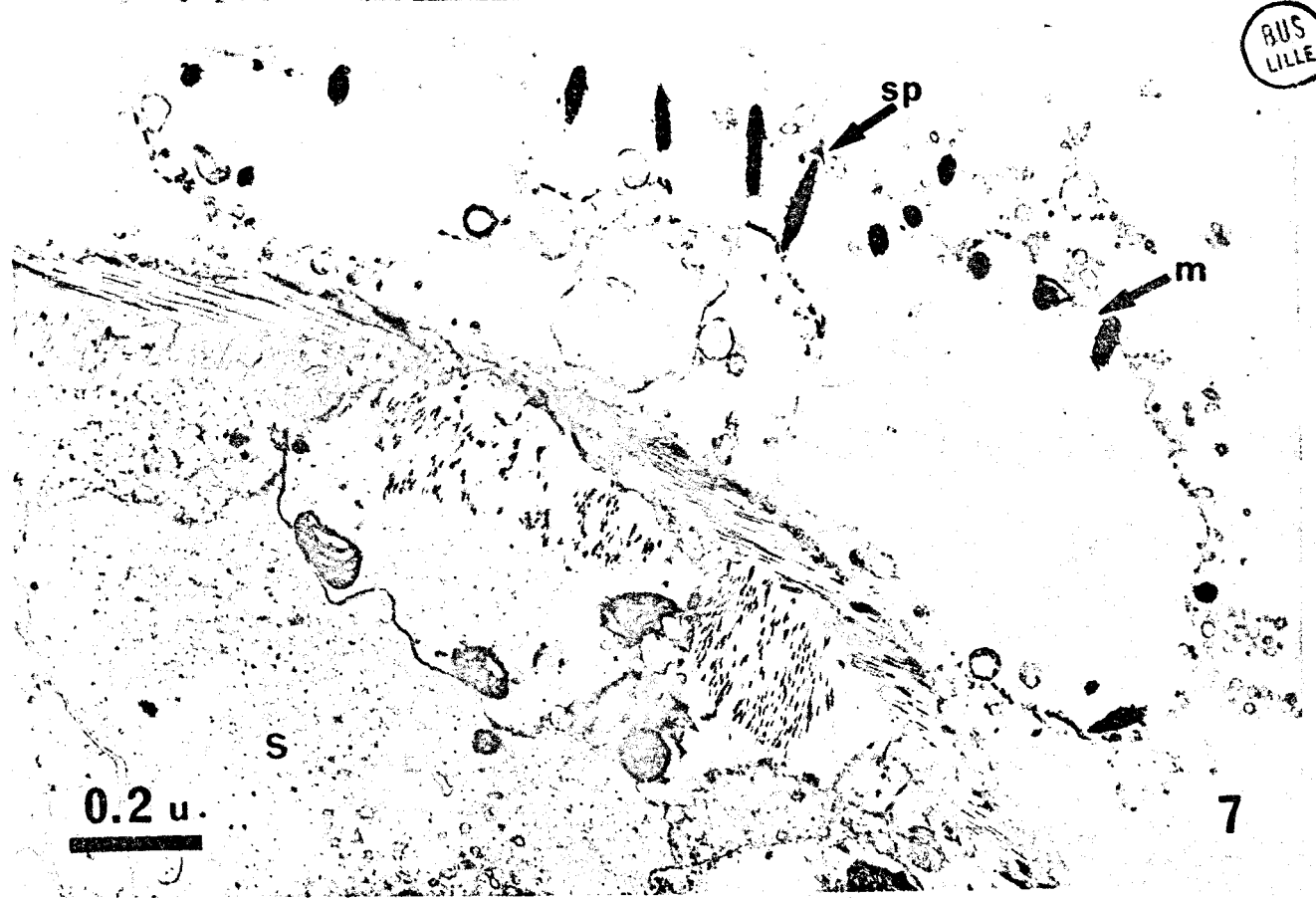
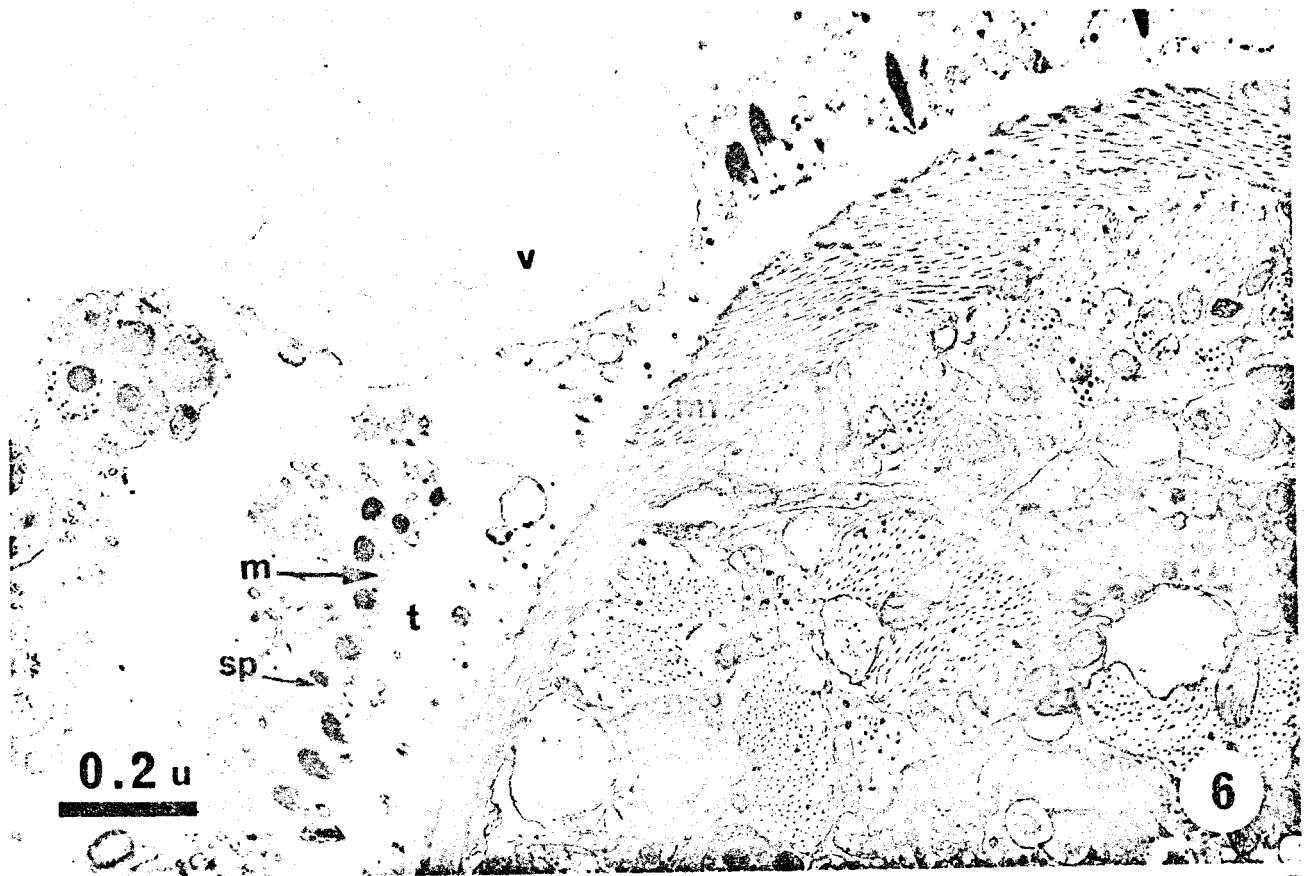
4

0.4 u



5





BUS  
LILLE

IV.6). A ce stade le cytoplasme tégumentaire montre de grands signes de dégénérescence. Après 4 h de culture le syncytium est complètement détruit exposant les couches musculaires (Planche V.7) ; les nombreuses vacuoles observées à la surface des parasites correspondent probablement aux "bulles" notées en microscopie optique.

L'ensemble des altérations obtenues en utilisant un sérum de cobaye frais sont aussi observées avec le sérum de cobaye déficient en  $C_4$ .

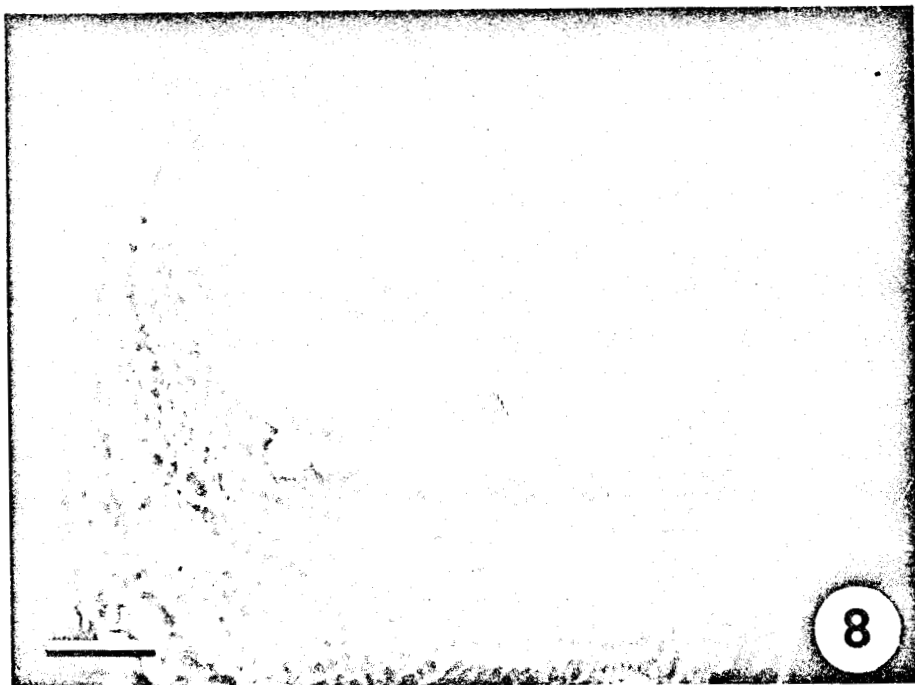
#### 4 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Les schistosomules incubés pendant 4 h avec du sérum de cobaye inactivé conservent leur aspect rugueux typique (Planche VI.8), avec de nombreuses épines couvrant leur surface (Planche VI.9). Par contre après 30 min. d'incubation avec un sérum de cobaye frais des altérations débutent à la partie antérieure de quelques schistosomules (Planche VI.10). Après 3 à 4 h de contact d'importantes altérations sont observées telle une rupture complète du tégument (Planche VI.11). Dans des cas extrêmes les schistosomules perdent complètement leur tégument exposant ainsi leurs couches musculaires (Planche VII.12).

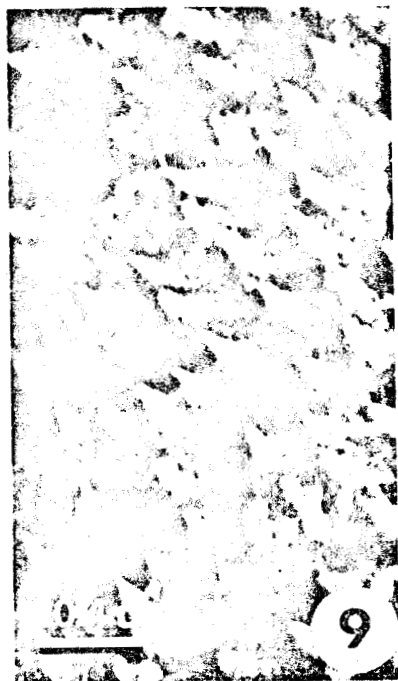
#### 5 - RESUME ET DISCUSSION

Des études ultérieures ont montré que les schistosomules de S. mansoni obtenus de façon artificielle ou après passage à travers une peau abdominale de souris, activent le complément par les deux voies : classique et alterne (SANTORO et coll., 1979). Cependant il fut observé que la voie alterne induit la lyse des schistosomules préparés artificiellement, alors que les schistosomules "peau" sont beaucoup plus résistants ; seule l'utilisation de concentrations très élevées en complément (sérum de poulet) peut induire la lyse de ces derniers. La présente étude montre clairement au niveau ultrastructural les altérations progressives induites par le complément à la surface des schistosomules artificiels.

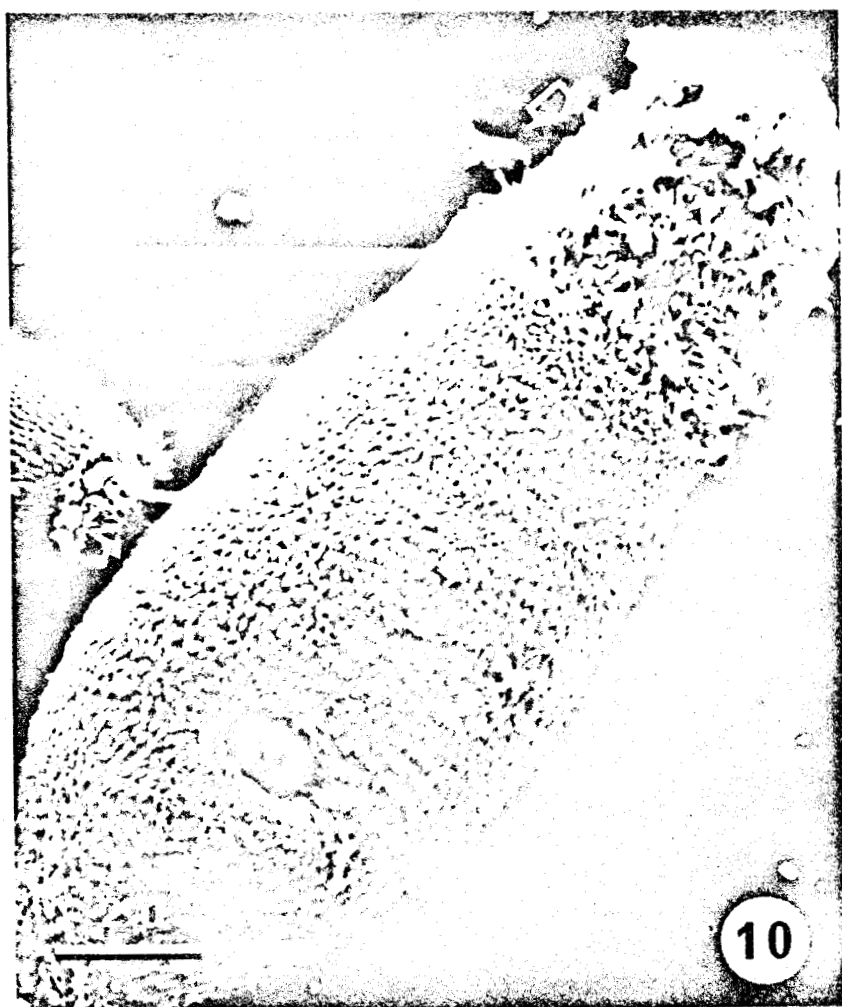
Les premiers signes d'altération sont observés à la partie antérieure du parasite (Planche VI.10) après 15 à 30 min. d'incubation avec du sérum de cobaye frais. A cette période environ 50 % des larves examinées montrent



8



9

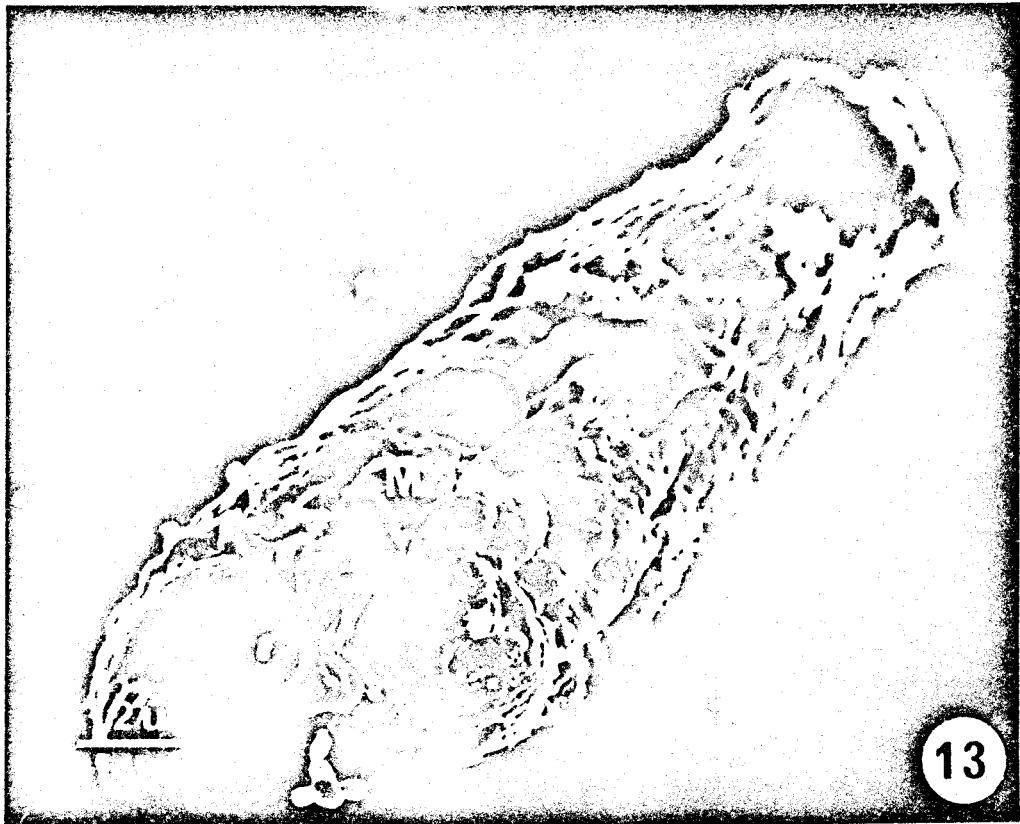


10



11

SHS  
LILLE



BUS  
LILLE

des lésions situées au niveau de leur membrane (Planche IV.4-5). Ces lésions progressent simultanément dans deux directions :

- a) De la partie antérieure vers la partie postérieure, et :
- b) De la membrane externe aux couches musculaires des parasites.

Après 3 à 4 h de contact avec du sérum de cobaye frais, la majorité des schistosomules perdent leur tégument, exposant ainsi les couches musculaires (Planches V.6-7 ; VI.11 ; VII.12).

Certaines des altérations induites par le sérum de cobaye frais à la surface des schistosomules pourraient être, en partie, comparées à celles observées par d'autres chercheurs lors de la lyse complément-dépendante des hématies, bactéries et virus (HUMPHREY et DOURAMSHKIN, 1969). Cependant il est assez difficile de pouvoir établir une comparaison étroite entre des schistosomules et des hématies ou microorganismes. Néanmoins avec un autre métazoaire, les protoscolex d'Echinococcus multilocularis, KASSIS et coll., 1976, ont décrit des altérations induites par le complément, qui sont similaires à celles que nous avons rapportées dans ce travail.

L'un des premiers changements morphologiques observés à la surface du parasite, en microscopie optique (Planche III.2), et en microscopie électronique (Planches V.7 ; VI.10) est l'apparition de "bulles". Ces mêmes "bulles" qui peuvent correspondre à une augmentation de la porosité membranaire induite par les composés terminaux du complément, ont été aussi observées à la surface des protoscolex (KASSIS et TANNER, 1976 ; KASSIS et coll., 1976). L'augmentation de la perméabilité des membranes des schistosomules pourrait favoriser l'action lytique des composés du complément en facilitant leur pénétration dans le syncytium tégumentaire. Des études complémentaires sur les mécanismes d'action des composés terminaux du complément (complexes C5b-9) sont cependant nécessaires pour clarifier ce point.

Dans une étude ultrastructurale récente Mc LAREN et coll., 1978, ont décrit des altérations à la surface des schistosomules dans un système de cytotoxicité in vitro comprenant des éosinophiles et du sérum de rat comme source de complément (RAMALHO-PINTO et coll., 1978). La majorité des lésions rapportées par ces auteurs ressemblent fortement à celles que nous

avons décrites dans cette étude. En utilisant un sérum de rat normal sans eosinophiles, Mc LAREN et coll., 1978 n'ont pas observé de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules. En effet SANTORO et coll., 1979, ont montré qu'un sérum de rat normal non dilué n'a qu'une faible action lytique sur les schistosomules (30 % de mortalité) comparé à un sérum de cobaye normal (80 % de mortalité). Cependant les 30 % de schistosomules tués par le complément de rat montrent en microscopie optique des altérations similaires à celles obtenues avec un sérum de cobaye normal. Ainsi les lésions<sup>n</sup> que nous avons décrites en microscopie électronique en utilisant un sérum de cobaye pourraient être identiques à celles qu'on aurait pu obtenir avec un sérum de rat normal. La dilution du sérum de rat dans le système de cytotoxicité eosinophile-complément dépendant (RAMALHO-PINTO et coll., 1978) pourrait expliquer éventuellement l'absence de mortalité des schistosomules avec le complément seul (Mc LAREN et coll., 1978). Néanmoins, la similitude des altérations induites par le complément, seul, ou, par les eosinophiles en présence de complément, suggère la participation des composés terminaux du complément dans les deux mécanismes de lyse des parasites. Par contre dans le cas de la lyse par un anticorps spécifique en présence de complément (CAPRON et coll., 1978), les lésions semblent limitées aux membranes du parasite qui sont rompues à plusieurs endroits, mais aucune altération du syncytium tégumentaire n'a été observée. Dans ce cas, l'action du complément qui est activé par la voie classique semble moins forte que celle qui résulte de l'activation de la voie alterne.

Toutes les modifications ultrastructurales induites par un sérum de cobaye frais, à la surface des schistosomules de S. mansoni, ont été également obtenues avec un sérum de cobaye déficient en C<sub>4</sub> (ce qui exclut toute intervention de la voie classique dans ce système). Cependant lorsque les sérums sont inactivés (56° C, 30 min.) aucune destruction des parasites n'a été observée. Ces résultats associés à ceux obtenus antérieurement (SANTORO et coll., 1979) suggèrent fortement que l'activation de la voie alterne et les composants terminaux du complément sont suffisants, sans la participation d'anticorps ou de cellules, pour avoir une cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules in vitro.

Ce mécanisme de cytotoxicité pourrait constituer un premier moyen de défense de l'hôte vis-à-vis d'une primo-infection. Cependant malgré cette première barrière, 20 à 40 % de la charge parasitaire initiale évoluent normalement pour arriver au stade adulte. Cette observation pourrait être rapprochée du fait que 20 % des schistosomules possèdent un récepteur pour le  $C_{3b}$ , et la fixation de cette molécule à son récepteur pourrait agir sur l'activation de la voie alterne en inhibant la boucle d'amplification. Ceci fera l'objet de la suite de cette étude.

## II - MISE EN ÉVIDENCE D'UN RÉCEPTEUR POUR LE $C_{3B}$ À LA SURFACE DES SCHISTOSOMULES ET DES CERCAIRES

La présence du troisième composant du complément à la surface des cercaires et schistosomules a été détectée par la technique d'immunofluorescence après activation du complément par ces parasites (MACHADO et coll., 1975 ; RAMALHO-PINTO et coll., 1978 ; SHER, 1976).

Dans cette étude nous avons démontré qu'en absence d'activation du complément la fixation du  $C_3$  à la surface des cercaires et schistosomules peut aussi avoir lieu, par le biais des récepteurs  $C_{3b}$  présents à la surface des parasites.

### 1 - FORMATION DES ROSETTES EAC1-3b

Dans une première série d'expériences, 50 parasites (cercaires, schistosomules artificiels (SA), peau (SP), poumon et vers adultes) sont mis séparément dans 0,1 ml de milieu avec  $2 \cdot 10^6$  cellules de divers types de complexes EAC (pour la préparation : Voir matériels et méthodes). Après 20 min. d'incubation à  $37^\circ C$ , le pourcentage de parasites formant des rosettes EAC ( $> 10$  cellules/parasite) est déterminé par un examen direct au microscope. Les résultats sont exprimés dans un système de croix où chacune représente environ 10 % de parasites formant des rosettes.

Dans ces conditions (Tableau XXIII) la formation de rosette est uniquement observée entre les complexes EAC1-3b et les deux stades : Cercaires et schistosomules (Fig. 20). Par contre les schistosomules poumons et les vers adultes ne forment pas de rosettes. En outre il n'y a pas d'adhérence des autres types de complexes EAC.



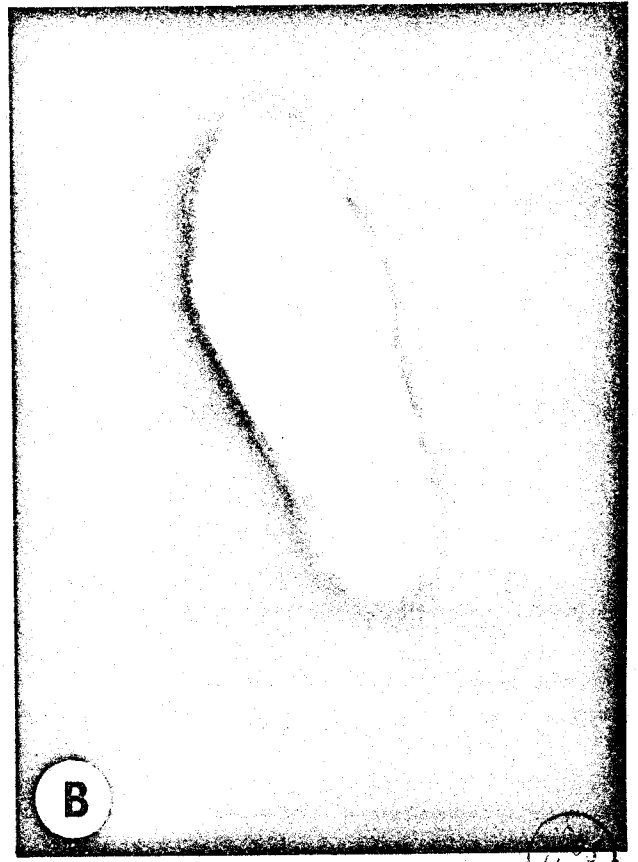
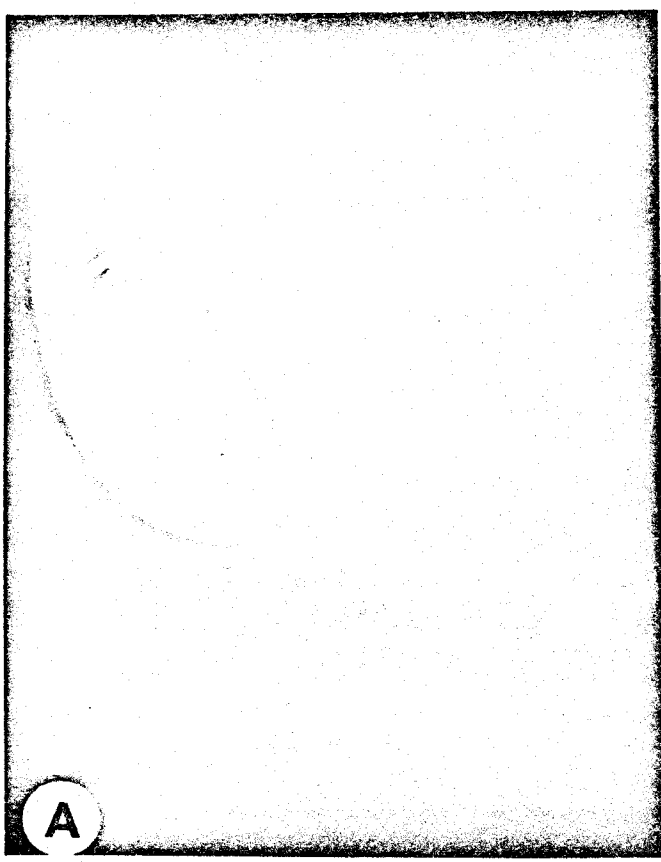
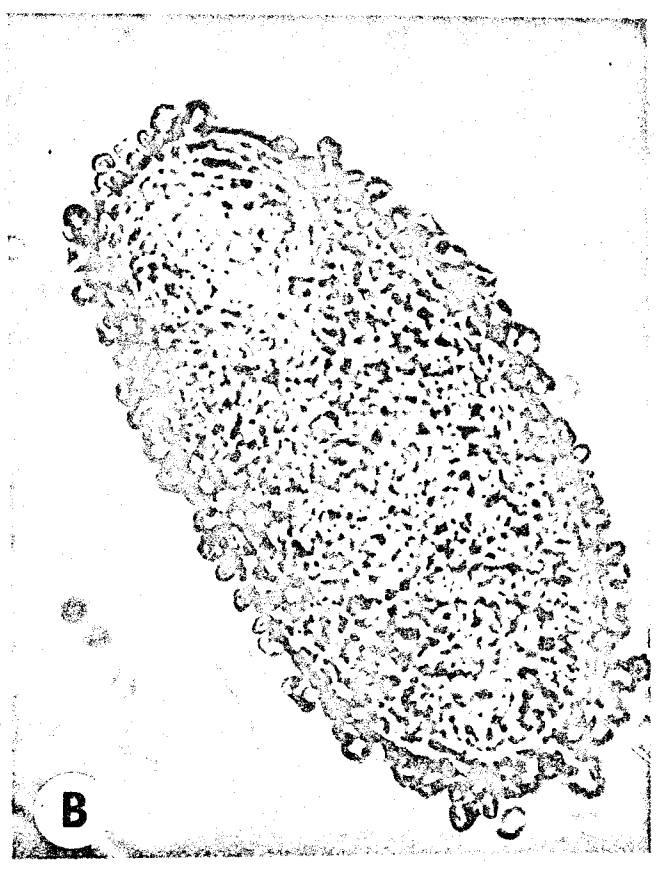
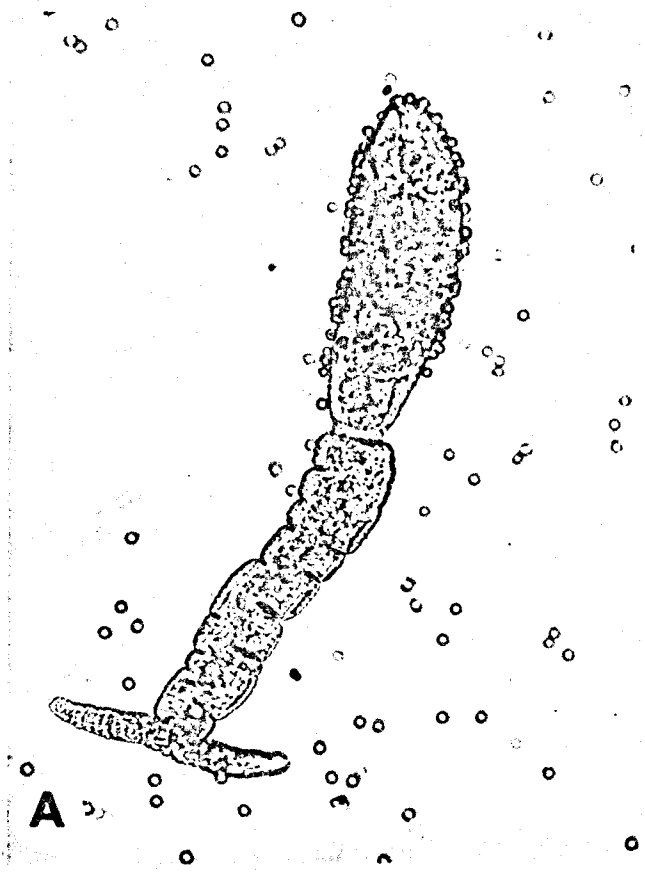


Tableau XXIII - Adhérence de complexe EAC<sub>3b</sub>   la surface des stades larvaires de S. mansoni

Stade	Types de complexes					
	E	EA	EAC1	EAC4	EAC142	EAC142:
Cercaires	-	-	-	-	-	++
SA	-	-	-	-	-	++
SP	-	-	-	-	-	+++
S poumon	-	-	-	-	-	-
Schistosomes adultes	-	-	-	-	-	-

## 2 - TESTS D'INHIBITION

Les observations précédentes suggèrent la présence d'un récepteur à la surface de certains stades larvaires de S. mansoni. Cette hypothèse est corroborée par les résultats obtenus par les tests d'inhibition. En effet les cercaires et les schistosomules incubés pendant 30 min.   37  C avec du C<sub>3</sub> humain purifié (200 unités hémolytiques dans un volume final de 300  l) puis remis en contact avec les complexes EAC1-3b ne forment pas de rosettes (Tableau XXIV). Par contre l'incubation avec de l'albumine humaine, du C<sub>1q</sub> ou des IgG n'affecte pas l'adhérence des complexes EAC1-3b aux parasites.

Tableau XXIV - Inhibition de formation de rosettes EAC<sub>3b</sub>   la surface des schistosomules et cercaires par du C<sub>3</sub> humain purifié

	Formation de rosettes EAC1-3b
Parasites non traités	+
Parasites préincubés avec	
IgG (1mg/ml)	+
C <sub>1q</sub> (""""""""")	+
Albumine (1 mg/ml)	+
C <sub>3</sub> humain (200 UI)	-

+ Présence de rosettes  
- Absence de rosettes



### 3 - ETUDE EN IMMUNOFLUORESCENCE

Nous avons réalisé cette étude dans le but de confirmer par une autre technique la fixation du  $C_3$  à la surface des stades schistosomules et cercaires. Lorsque les différents stades évolutifs de S. mansoni préalablement incubés avec du  $C_3$  humain purifié (200 UI) ou 200  $\mu$ l de RB ou RD humain (pour la préparation voir matériels et méthodes) dans un volume final de 300  $\mu$ l et lavés, sont remis en contact avec des FITC-F(ab)'<sub>2</sub> anti- $C_3$ , seules les cercaires et schistosomules montrent une fluorescence positive en surface (Fig. 20). Dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas obtenu de fluorescence à la surface des schistosomules poumons et vers adultes. D'autre part aucune fluorescence n'est observée à la surface des larves traitées avec le conjugué seul (FITC-F(ab)'<sub>2</sub> anti- $C_3$ ). De même lorsque les parasites incubés avec du  $C_3$  humain sont mis en contact dans un premier temps avec des F(ab)'<sub>2</sub> anti- $C_3$  non marqués ensuite avec des FITC-F(ab)'<sub>2</sub> anti- $C_3$ , la fluorescence diminue de façon significative. (Tableau XXV)

### RÉSUMÉ

L'activation de la voie alterne du complément par les cercaires a été signalée par MACHADO et coll., 1975. Plus récemment il fut démontré que les schistosomules sont capables d'activer le complément par la voie classique et alterne (SANTORO et coll., 1979). L'activation de la voie alterne semble jouer un rôle important dans deux mécanismes de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules : Le premier est l'activité lytique des composés terminaux du complément qui nécessite l'utilisation d'un sérum non dilué, le second est la lyse des schistosomules par les éosinophiles. Dans ce dernier cas la présence d'un sérum dilué comme source de complément est nécessaire (RAMALHO-PINTO et coll., 1978). L'adhérence des mastocytes aux schistosomules semble aussi dépendre de l'activation de la voie alterne du complément par les parasites et de la présence du  $C_3$  à leur surface (SHER, 1976).

Tableau XXV - Mise en évidence du C<sub>3</sub> humain à la surface des schistosomules et cercaires

	FITC-F(ab)' <sub>2</sub> anti-C <sub>3</sub> humain
Parasites non traités	-
Parasites traités avec	
RB humain	+
RD humain	+
C <sub>3</sub> humain purifié	++
C <sub>3</sub> humain + F(ab)' <sub>2</sub> anti-C <sub>3</sub>	( <sup>+</sup> <sub>-</sub> )

RB : Sérum humain chauffé à 50° C pendant 20 min. pour inactiver le facteur B  
RD : Sérum humain sans facteur D (voir matériels et méthodes).



Dans la présente étude, nous avons démontré, en l'absence de toute activation du complément, que le  $C_3$  peut se fixer à la surface des cercaires et schistosomules. En effet seuls ces stades larvaires peuvent former des rosettes EAC3b. Cette observation, associée aux résultats obtenus en immunofluorescence, suggère fortement la présence de récepteurs pour le troisième composant du complément à la surface des cercaires et schistosomules. L'absence de ces récepteurs chez les stades schistosomules poumons et adultes rejoint nos résultats à propos des récepteurs pour les IgG et le  $C_{1q}$ . Les hypothèses que nous avons formulées peuvent être invoquées pour le récepteur  $C_{3b}$ , à savoir une disparition du récepteur au cours du développement du parasite ; ou son blocage par les molécules  $C_3$  de l'hôte. Les résultats de KABIL, 1976, sont en faveur de la seconde hypothèse. En effet cet auteur a mis en évidence par la technique d'immunofluorescence du  $C_3$  à la surface des schistosomes adultes, il émit l'hypothèse d'un récepteur pour le 3e composant du complément.

Dans une étude récente Mc GUINNESS et KEMP, 1980, ont mis en évidence un récepteur pour le complément à la surface des schistosomes adultes mâles. La discordance avec nos résultats concernant l'adulte pourrait éventuellement être recherchée au niveau de la modulation des antigènes de surface des schistosomes. Ces derniers peuvent dans un laps de temps très court, modifier leur structure de surface en éliminant des déterminants antigéniques liés ou non, à un ligand (KEMP et coll., 1977, 1980 ; TORPIER et coll., 1979). Il est alors possible d'envisager une perte des molécules  $C_3$  par les schistosomes ce qui exposerait de nouveau des récepteurs complément. Ceci rejoindrait notre seconde hypothèse, à savoir le blocage des récepteurs par des molécules  $C_3$  de l'hôte. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable étant donné que les vers sont prélevés au niveau de la veine porte dans un microenvironnement sanguin qui est une source de complément.

Le récepteur  $C_{3b}$  pourrait jouer un rôle déterminant dans la survie du parasite chez son hôte. En effet le  $C_{3b}$  généré lors de l'activation du complément par les schistosomules ou lors d'une réaction antigène

parasitaire-anticorps-spécifique peut se fixer au récepteur. Cette liaison pourrait ainsi protéger le parasite contre la formation des complexes  $C_{5b-9}$  qui constituent l'unité d'attaque de la membrane. Le récepteur  $C_{3b}$  pourrait aussi avoir un rôle similaire à celui suggéré par STACKPOLE et coll., 1978 à propos des cellules tumorales. En effet cet auteur pense que le  $C_{3b}$  présent à la surface des cellules tumorales empêcherait la juxtaposition des molécules d'IgG anticorps, nécessaire à l'activation de la voie classique. Ce phénomène contribuerait à la protection de la tumeur.

## DISCUSSION

Le développement des connaissances en immunologie fait apparaître de plus en plus que le système du complément a un rôle biologique très important. De nombreux auteurs s'accordent pour lui attribuer un rôle potentiel dans la régulation des relations hôte-parasite (HEYNEMANS et WELSH, 1959 ; JONES et OGILVIE, 1971 ; MURREL, 1971 ; BERENBERG et coll., 1972 ; CLEGG et SMITHERS, 1972 ; MURREL et CLAY, 1972 ; DEAN et coll., 1974 ; CAPRON et coll., 1974).

Le but de notre travail consistait dans l'étude des interactions entre S. mansoni et le système du complément. Ainsi nous avons pu montrer l'existence de structures de liaison spécifiques pour les immunoglobulines et les composants du complément au niveau des surfaces parasitaires. Ces données ainsi que l'étude des mécanismes d'activation du complément par les schistosomules sont nouvelles en soi et suggèrent l'existence au niveau des surfaces parasitaires de nouveaux mécanismes de régulation des relations hôte-parasite. (Fig. 21)

Nous discuterons dans ce chapitre, d'une part les observations relatives aux récepteurs de surface, d'autre part les mécanismes d'activation du complément par les schistosomules et leur rôle probable dans la régulation des relations hôte-parasite.

.. La première observation nouvelle que nous avons rapportée est l'existence à la surface des schistosomules de récepteurs spécifiques pour les fragments Fc des IgG.

L'apparition de ce récepteur se fait au premier stade post-infectant. En effet, alors que les cercaires ne semblent pas exprimer ce récepteur, les schistosomules, obtenus après passage de cercaires à travers une peau abdominale de souris montrent un maximum d'enrobage par la technique des rosettes EA.

.../...

Les schistosomules artificiels montrent une apparition progressive de ce récepteur ; en effet l'enrobage débute à la partie antérieure du parasite, qui devient complètement couvert au bout d'une heure de culture in vitro. Ce processus dynamique pourrait être éventuellement lié à l'intense sécrétion glandulaire qui se produit au niveau de la partie antérieure du parasite durant la métamorphose de la cercaire en schistosomule (STIREWALT et DORSEY, 1974).

L'absence de fixation des IgG à la surface des schistosomules prélevés au niveau des poumons de souris infestées par S. mansoni et des schistosomes adultes soulève la question de savoir le devenir du récepteur au cours du développement du parasite.

Deux hypothèses peuvent être formulées à ce sujet : La première serait la disparition du récepteur au cours du développement du parasite ; la seconde consisterait en un blocage du récepteur par les IgG de l'hôte chez lequel le parasite a été prélevé. Les travaux de KEMP et coll., 1977-1980 montrant la présence d'immunoglobulines fixées par leurs fragments Fc au tégument des schistosomes de souris, sont en faveur de la seconde hypothèse.

Ce récepteur possède les caractéristiques décrites pour les récepteurs Fc  $\gamma$  des cellules Eucaryotes (LOBUGLIO et coll., 1976 ; WALKER et DEMUS, 1975 ; DIAMOND et coll., 1978 ; BASTEN et coll., 1976 ; DICKLER, 1974). Cependant il s'en distingue par une particularité qui lui est propre. En effet son affinité pour la  $\beta_2$ -microglobuline suggère deux possibilités :

- 1° Un récepteur pour les IgG qui, du fait de l'éloignement phylogénique entre les trématodes et les mammifères, présenterait une structure particulière adaptée principalement au domaine CH<sub>3</sub> des IgG.
- 2° Ou un récepteur pour la  $\beta_2$ -microglobuline qui fixerait les IgG par leur domaine CH<sub>3</sub>.

Dans l'une ou l'autre des deux hypothèses, le récepteur pourrait être impliqué dans la fixation spécifique des antigènes d'histocompatibilité murins à la surface des schistosomules (SHER, 1978) en plus de la fixation des IgG.



Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) jouent un rôle central dans la reconnaissance immunitaire et la coopération cellulaire (PAUL et BENACERRAF, 1977). L'acquisition de ces antigènes par les schistosomules pose une question fondamentale : Est-ce que ces antigènes facilitent la reconnaissance et par la suite la destruction des larves par les mécanismes de défense de l'hôte ou leur survie en masquant les antigènes proprement parasitaires ? De nombreux travaux ont montré qu'au stade schistosomule "poumon" les parasites deviennent résistants aux divers mécanismes de cytotoxicité (SHER et coll., 1974 ; VON LICHTENBERG et coll., 1976 ; SHER, 1977). Il semble que cet état de résistance se développe en fonction de l'acquisition d'antigènes d'hôte qui paraît maximale au stade schistosomule "poumon" (CLEGG et SMITHERS, 1972 ; GOLDRING et coll., 1977). Il est donc probable que les antigènes du CMH puissent contribuer à la protection de la surface parasitaire. En effet de récents travaux ont montré que les lymphocytes T cytolytiques adhèrent aux schistosomules qui portent à leur surface des antigènes appropriés du CMH (BUTTERWORTH et coll., 1979 ; VADAS et coll., 1979). Cependant aucune altération des schistosomules n'a été observée (BUTTERWORTH et coll., 1979).

Le récepteur pour les fragments Fc des IgG et/ou la  $\beta_2$ -microglobuline pourrait jouer un rôle important dans l'acquisition des antigènes du CMH. L'association de la  $\beta_2$ -microglobuline avec la membrane des schistosomules pourrait stabiliser les glycoprotéines de surface en les rendant plus résistantes à une dégradation protéolytique (ceci rejoindrait les observations de BISMUTH et coll., 1974, relatifs à l'association de la  $\beta_2$ -microglobuline avec certaines surfaces cellulaires).

.. La deuxième observation que nous avons rapportée dans ce travail est la présence d'un récepteur pour le  $C_{1q}$ . La fixation du  $C_{1q}$  au schistosomule est calcium dépendante puisque le  $C_{1q}$  traité à l'EDTA 0,1M n'est pas révélé à la surface du schistosomule. Ces observations sont analogues à celles décrites pour la fixation du  $C_{1q}$  aux plaquettes (WAUTIER et coll., 1974).

.../...

De nombreux travaux ont montré l'existence d'analogies entre la structure chimique du  $C_{1q}$  et celle du collagène (MULLER-EBERHARD, 1968 ; REID et coll., 1972 ; REID, 1974). L'inhibition de formation de rosettes  $EAC_{1q}$  par le collagène, suggère que le récepteur est adapté pour la moitié "collagen-like" du  $C_{1q}$  (Fig. 12). La compétition entre le  $C_{1q}$  et le collagène pour le même site de fixation a déjà été signalée dans le cas des plaquettes ; en effet leur aggrégation par le collagène peut être inhibée par le  $C_{1q}$  (SUBA et CASKO, 1976).

Contrairement à certains virus qui possèdent à leur surface un récepteur pour le  $C_1$  qui est l'initiateur de l'activation de la voie classique du complément par ces virus (COOPER et coll., 1976 ; BARTHOLOMEW et coll., 1978), la fixation du  $C_{1q}$  au récepteur des schistosomules n'est pas l'étape initiale de l'activation de la voie classique. En effet, celle-ci nécessite la présence, à la surface des schistosomules, de fragments Fc des IgG liés aux récepteurs  $Fc\gamma$ .

Le rôle exact du récepteur  $C_{1q}$  des schistosomules reste encore à définir. Cependant, certaines hypothèses peuvent être formulées à ce sujet. En effet, lors de l'activation du complément le  $C_1$  est dissocié : Le  $C_{1q}$  reste fixé au complexe activant ou est éliminé dans le milieu, le  $C_{1r}$  et  $C_{1s}$  forment un complexe macromoléculaire avec le  $C_1$ -INH (LAURELL et coll., 1978). La présence d'un récepteur pour le  $C_{1q}$  à la surface du schistosomule peut interférer avec ces phénomènes de fixation et transfert du  $C_{1q}$  en ce sens que, le  $C_{1q}$ , libre ou fixé au complexe peut être reconnu facilement par le récepteur  $C_{1q}$  des schistosomules. La fixation des complexes immuns contenant le  $C_{1q}$  pourrait donc être l'un des rôles biologiques du récepteur  $C_{1q}$  des schistosomules. L'acquisition d'antigènes d'hôte sous forme de gros agrégats peut constituer un déguisement pour le parasite et par conséquent diminuer son antigénicité.

.. Le troisième récepteur que nous avons décrit dans cette étude concerne le composant  $C_3$ . Nous avons montré qu'en l'absence de toute activation du complément, le  $C_3$  peut se fixer à la surface des schistosomules par le biais d'un récepteur de surface.

.../...

L'absence de ces récepteurs chez les stades schistosomules "poumons" et adultes rejoint nos résultats à propos des récepteurs pour les IgG et le  $C_{1q}$ . Les hypothèses que nous avons formulées peuvent être invoquées pour le récepteur  $C_{3b}$ , à savoir une disparition du récepteur au cours du développement du parasite ; ou son blocage par les molécules  $C_3$  de l'hôte. Les résultats de KABIL, 1976, sont en faveur de la seconde hypothèse. En effet cet auteur a mis en évidence par la technique d'immunofluorescence du  $C_3$  à la surface des schistosomes adultes, il émet l'hypothèse d'un récepteur pour le 3e composant du complément.

Dans une étude récente Mc GUINNESS et KEMP, 1980, ont mis en évidence un récepteur pour le complément à la surface des schistosomes adultes mâles. La discordance avec nos résultats concernant l'adulte pourrait éventuellement être recherchée au niveau de la modulation des antigènes de surface des schistosomes. Ces derniers peuvent dans un laps de temps très court, modifier leur structure de surface en éliminant des déterminants antigéniques liés ou non, à un ligand (KEMP et coll., 1977, 1980 ; TORPIER et coll., 1979). Il est alors possible d'envisager une perte des molécules  $C_3$  par les schistosomes ce qui exposerait de nouveau des récepteurs complément. Ceci rejoindrait notre seconde hypothèse, à savoir le blocage des récepteurs par des molécules  $C_3$  de l'hôte. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable étant donné que les vers sont prélevés au niveau de la veine porte dans un microenvironnement sanguin qui est une source de complément.

Les résultats que nous avons rapportés peuvent être rapprochés de certaines observations faites dans d'autres systèmes parasitaires. En effet, en 1977, LEVENTHAL et SOULSBY en utilisant la technique d'immunofluorescence ont pu mettre en évidence la présence du  $C_3$  à la surface des larves d'Ascaris suum. Ces derniers auteurs ont obtenu une fixation directe de  $C_3$  radiomarké ( $^{125}I$ ) sur la membrane des larves. Cette liaison ne semble pas dépendre de l'activation du complément mais pourrait se faire par l'intermédiaire d'un récepteur pour le  $C_3$  se trouvant sur la membrane des parasites. Le composant  $C_3$  a également été mis en évidence à la surface du ver Hymenolepis diminuta par la technique d'immunofluorescence (BEFUS, 1977), et en microscopie électronique en utilisant des anticorps marqués à la peroxydase (THREADGOLD et BEFUS, 1977).

Le récepteur  $C_{3b}$  pourrait jouer un rôle déterminant dans la survie du parasite chez son hôte. En effet le  $C_{3b}$  généré lors de l'activation du complément par les schistosomules ou lors d'une réaction antigène parasitaire-anticorps-spécifique peut se fixer au récepteur. Cette liaison pourrait ainsi protéger le parasite contre la formation des complexes  $C_{5b-9}$  qui constituent l'unité d'attaque de la membrane. Le récepteur  $C_{3b}$  pourrait aussi avoir un rôle similaire à celui suggéré par STACKPOLE et coll., 1978 à propos des cellules tumorales. En effet cet auteur pense que le  $C_{3b}$  présent à la surface des cellules tumorales empêcherait la juxtaposition des molécules d'IgG anticorps, nécessaire à l'activation de la voie classique. Ce phénomène contribuerait à la protection de la tumeur.

Ces divers récepteurs pour l'IgG, le  $C_{1q}$ , le  $C_{3b}$  existent aussi à la surface de diverses populations cellulaires de mammifères (NUSSENZWEIG, 1974 ; SOBEL et BOKISCH, 1975 ; Mc CONNELL et LACHMANN, 1977 ; GUPTA et coll., 1978 ; GABAY et coll., 1979). De même, la  $\beta_2$ -microglobuline montre une large distribution. Elle est présente à la surface de diverses populations cellulaires en particulier les lymphocytes (NILSSON et coll., 1973 ; BISMUTH et coll., 1973 ; OSTBERG et coll., 1974 ; POULIK et coll., 1973 ; SOLHEIM et THORSBY, 1974). Elle peut être associée à d'autres populations non lymphoïdes, c'est ainsi que les spermatozoïdes humains expriment la  $\beta_2$ -microglobuline à leur surface (FELLOUS et coll., 1976). Il est donc possible que le schistosomule dès les premières heures de l'infection, par le biais de ses récepteurs de surface, acquiert diverses protéines de l'hôte vertébré. Il pourrait alors se comporter comme une cellule d'hôte ce qui lui permettrait de ne pas être reconnu comme non self. La fixation des diverses protéines d'hôte sous forme de complexes aux récepteurs de surface des schistosomules pourrait également être l'origine d'un signal d'activation analogue à ce qui est observé lors de l'interaction des récepteurs de surface de certaines populations cellulaires avec leurs ligands respectifs (METZGER, 1976 ; DESSAINT et coll., 1979, 1980). Si l'acquisition de protéines d'hôte peut être le premier rôle biologique des récepteurs de surface des schistosomules, le récepteur  $Fc\gamma$  semble avoir un autre rôle particulier, en ce sens qu'il intervient de façon directe dans l'activation de la voie classique du complément par les schistosomules (Fig. 19).

.../...

Classiquement l'initiation de l'activation de la voie classique débute par la fixation du  $C_1$  qui est rendue possible par les remaniements de la partie Fc des immunoglobulines consécutifs soit à leur combinaison à l'antigène, formant ainsi des complexes immuns (circulants, ou à la surface d'une particule ou d'une cellule), soit à leur aggrégation par la chaleur ou par d'autres traitements. Ces changements conformationnels libèrent le site de fixation des parties globulaires périphériques du  $C_{1q}$  (situé au niveau du domaine  $CH_2$  de la molécule IgG), qui réagit avec le  $C_{1r}$  et le  $C_{1s}$  pour former une  $C_1$  estérase fonctionnelle ( $C_1$ ) qui agira sur le  $C_4$  et  $C_2$ .

A notre connaissance aucun travail n'a encore décrit un mécanisme d'activation analogue à celui que nous avons observé dans le cas des schistosomules. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette activation :

- 1° Le clivage des IgG libère le site de fixation du  $C_{1q}$  (Fig. 19) situé sur les fragments Fc qui sont retenus à la surface des larves. Deux molécules Fc adjacentes peuvent alors fixer le  $C_{1q}$  ce qui aboutirait au schéma classique d'activation. Cependant il est à noter que ce cas conserverait son originalité, dans le sens que ce sont des fragments Fc liés aux récepteurs qui fixent le  $C_{1q}$  et non des complexes antigènes-anticorps.
- 2° Un changement de conformation des IgG liées aux schistosomules exposerait le site de fixation du  $C_{1q}$ .

La première hypothèse est peut-être la plus probable, cependant elle n'exclut pas la deuxième.

Cette activation pourrait avoir une relevance in vivo, en ce sens que la consommation du complément dans le microenvironnement parasitaire le rendrait indisponible pour des mécanismes de défense spécifiques ou non spécifiques. Ceci rejoindrait l'hypothèse déjà formulée par HAMMERBERG et WILLIAMS, 1978 b, à propos de Taenia taeniaeformis.

.../...

Si l'activation du complément par des parasites vivants ou leurs extraits antigéniques a été décrite dans de nombreux modèles parasitaires à Helminthes (KASSIS et TANNER, 1976 ; KASSIS et coll., 1976 ; HERD, 1976 ; RICKARD et coll., 1977 ; STANKIEWICZ, 1975 ; HAMMERBERG et coll., 1977 ; HAMMERBERG et WILLIAMS, 1978 a), dans le cas de S. mansoni, la participation du complément a surtout été située au niveau des mécanismes immunologiques de la réponse immune de l'hôte vis-à-vis du parasite (CLEGG et SMITHERS, 1970, 1972 ; CAPRON et coll., 1972, 1973, 1974 ; MURRELL et CLAY, 1972 ; RAMALHO-PINTO et coll., 1978 ; ANWAR et coll., 1979). En 1979 SANTORO et coll. apportèrent des preuves directes de l'activation du complément par les deux voies : Classique et alterne. Si l'activation de la voie classique du complément par le biais des IgG ou de leurs fragments Fc liés au récepteur Fc $\gamma$  des schistosomules ne semble pas cytotoxique, il n'en est pas de même pour la voie alterne. En effet, les altérations produites sur les schistosomules par les composés terminaux du complément après son activation par la voie alterne ont été examinées en microscopie électronique. La majorité des lésions que nous avons décrites dans cette étude ressemblent fortement à celles rapportées par Mc LAREN et coll., 1978. Ces auteurs ont décrit des altérations à la surface des schistosomules dans un système de cytotoxicité in vitro comprenant des éosinophiles et du sérum de rat comme source de complément (RAMALHO-PINTO et coll., 1978). En utilisant un sérum de rat normal sans éosinophiles, Mc LAREN et coll., 1978 n'ont pas observé de cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules. En effet SANTORO et coll., 1979, ont montré qu'un sérum de rat normal non dilué n'a qu'une faible action lytique sur les schistosomules (30 % de mortalité) comparé à un sérum de cobaye normal (80 % de mortalité). Cependant les 30 % de schistosomules tués par le complément de rat montrent en microscopie optique des altérations similaires à celles obtenues avec un sérum de cobaye normal. Ainsi les lésions que nous avons décrites en microscopie électronique en utilisant un sérum de cobaye pourraient être identiques à celles qu'on aurait pu obtenir avec un sérum de rat normal. La dilution du sérum de rat dans le système de cytotoxicité éosinophile-complément dépendant (RAMALHO-PINTO et coll., 1978) pourrait expliquer éventuellement l'absence de mortalité des schistosomules avec le complément seul (Mc LAREN et coll., 1978). Néanmoins, la similitude des altérations induites par le complément, seul, ou, par les éosinophiles en présence de complément, suggère la participation

.../...

des composants terminaux du complément dans les deux mécanismes de lyse des parasites. Par contre dans le cas de la lyse par un anticorps spécifique en présence de complément (CAPRON et coll., 1978), les lésions semblent limitées aux membranes du parasite qui sont rompues à plusieurs endroits, mais aucune altération du syncytium tégumentaire n'a été observée. Dans ce cas, l'action du complément qui est activé par la voie classique semble moins forte que celle qui résulte de l'activation de la voie alterne.

Les travaux de SANTORO et coll., 1979, ont montré que seuls les sérums à forte concentration en complément tels le sérum de cobaye ou le sérum de poulet, peuvent induire une cytotoxicité importante vis-à-vis des schistosomules. Or le cobaye et le poulet sont des animaux réfractaires à l'infection par S. mansoni, il est donc possible dans ce cas particulier d'envisager une relevance in vivo de l'activité lytique de la voie alterne et des composés terminaux du complément. Ce mécanisme de cytotoxicité pourrait constituer un premier moyen de défense de l'hôte vis-à-vis d'une primo-infection. Cependant malgré cette première barrière, certaines larves peuvent évoluer normalement pour arriver au stade adulte. Cette observation pourrait être rapprochée du fait que 20 % des schistosomules possèdent un récepteur pour le C<sub>3b</sub>, et la fixation de cette molécule à son récepteur pourrait agir sur l'activation de la voie alterne en inhibant la boucle d'amplification.

Le rôle du complément dans des mécanismes de défense non spécifique chez des hôtes permissifs (homme, souris, hamster, etc...) reste encore à définir. SANTORO et coll., 1980, ont montré que lors d'une primo-infection, le nombre de vers adultes provenant de souris déficientes en C<sub>5</sub> est identique à celui que l'on observe chez des souris non déficientes. Ceci suggère que l'activité lytique des composés terminaux du complément ne jouent pas un rôle essentiel dans le contrôle d'une primo-infection. Cependant ces auteurs ont observé que des souris normales injectées avec du venin de cobra (décomplémentation in vivo) 24 h avant une primo-infection développent une charge parasitaire significativement plus importante que dans le cas de souris normales non traitées par le venin de cobra.

L'injection de C<sub>3</sub> purifié à des souris traitées par le venin de cobra permet la diminution de la charge parasitaire. Ces auteurs suggèrent

.../...

que le composant  $C_3$  en association avec des cellules effectrices pourrait jouer un rôle important dans l'immunité non spécifique lors d'une primo-infection par S. mansoni. Cette hypothèse peut être rapprochée des observations préliminaires que nous avons réalisées en utilisant des chambres à diffusion contenant des schistosomules et implantées dans la cavité péritonéale de cobayes normaux, normaux injectés avec du venin de cobra, ou déficients en  $C_4$ . En effet, dans ce cas, nous avons constaté que des neutrophiles adhèrent aux schistosomules chez des cobayes normaux et déficient en  $C_4$ . Le traitement des cobayes avec du venin de cobra supprime cette adhérence. Il semblerait donc que l'interaction des neutrophiles avec les schistosomules dans nos conditions expérimentales soit dépendante du complément. Le développement futur de ce genre d'étude pourrait dans l'avenir d'une part établir de façon claire le rôle du complément dans les mécanismes de défense non spécifiques vis-à-vis d'une primo-infection par S. mansoni, d'autre part d'apporter des éléments de réponse sur le rôle que peuvent jouer les mécanismes d'activation du complément dans le microenvironnement parasitaire.



## CONCLUSION

Le travail que nous avons réalisé s'insère dans le cadre des recherches qui sont menées dans notre laboratoire et qui visent à cerner les phénomènes immunologiques intervenant au cours de la bilharziose à S. mansoni. Le but que nous nous sommes fixé était d'explorer dans ce modèle les divers mécanismes permettant l'activation du complément soit par la voie classique, soit par la voie alterne. A l'aide de techniques appropriées, nous avons pu mettre en évidence l'existence à la surface de la forme larvaire précoce du parasite : Le schistosomule, de sites de liaisons spécifiques pour l'IgG et/ou la  $\beta_2$ -microglobuline, pour le  $C_{1q}$  et le  $C_{3b}$ . Il est à noter que ces récepteurs sont détectables essentiellement sur le premier stade post infectant de S. mansoni c'est-à-dire juste après le passage de la barrière trans-cutanée. Dans les premières heures de leur pénétration chez l'hôte vertébré, les schistosomules peuvent acquérir diverses protéines libres ou sous forme de complexes par le biais de leurs récepteurs de surface. Ce mécanisme pourrait constituer un premier moyen "d'évasion" qui permettrait aux parasites de réduire leur antigénicité.

L'étude des mécanismes d'activation du complément a permis de dégager deux points essentiels :

- 1° Le schistosomule, par le biais du récepteur  $Fc\gamma$  présent à sa surface, peut fixer des immunoglobulines G. Celles-ci peuvent être hydrolysées par les protéases du schistosomule. Ce processus de clivage libère probablement le site de fixation du  $C_{1q}$  et permet l'activation du complément par la voie classique. La présence d'un récepteur pour le  $C_{1q}$  à la surface du schistosomule peut interférer avec les phénomènes de fixation et transfert du  $C_{1q}$  qui s'opèrent lors de l'activation de la voie classique. Cette activation pourrait avoir une relevance in vivo, en ce sens que la consommation du complément dans le microenvironnement parasitaire le rendrait indisponible pour des mécanismes de défense spécifiques ou non spécifiques.

.../...

2° Le schistosomule peut activer le complément par la voie alterne, cette activation peut induire une lyse des parasites in vitro. Cependant, la présence d'un récepteur pour le  $C_{3b}$  à la surface pourrait favoriser sa survie, en ce sens qu'elle peut inhiber la formation des complexes  $C_{5b-9}$  qui constituent l'unité d'attaque de la membrane.

L'activation du complément dans ce modèle parasitaire semble donc emprunter les deux voies : Classique dépendante d'IgG (Fc) et alterne. Si la voie classique ne semble pas cytotoxique pour les schistosomules il n'en est pas de même pour la voie alterne. Le rôle possible de la voie alterne dans des mécanismes de défense non spécifique vis-à-vis d'une primo-infection par S. mansoni nécessite encore d'autres explorations. Cependant, certaines évidences obtenues dans notre laboratoire suggèrent que le  $C_3$  et peut-être certains composants de la voie alterne, en association avec des cellules effectrices peuvent intervenir dans le contrôle d'une primo-infection.

En résumé, l'étude que nous venons d'exposer démontre l'existence chez les schistosomes d'une part, de structures de liaison spécifiques pour les immunoglobulines et les composants du complément, d'autre part de mécanismes d'activation du système du complément au niveau des surfaces parasitaires. L'ensemble de ces résultats apportent des données nouvelles qui permettent de reconsidérer certains mécanismes de relation de l'interface hôte-parasite.

ALLAN, R. and ISLIKER, H. (1974)

Studies on the complement-binding site of rabbit immunoglobulin G-II.  
The reaction of rabbit IgG and its fragments with Clq.  
Immunochemistry. 11, 243.

ANSARI, N. (1973)

Epidemiology and control of schistosomiasis (Bilharziasis).  
Bsel, S. Karger.

ANWAR, A.R.E., SMITHERS, S.R. and KAY, A.B. (1979)

Killing of schistosomula of Schistosoma mansoni coated with antibody  
and/or complement in vitro : Requirement for complement in preferential  
killing by eosinophils.  
J. Immunol. 122, 628.

ANWAR, A.R.E., SMITHERS, S.R. and KAY, A.B. (1979)

Killing of schistosomula of Schistosoma mansoni coated with antibody and/  
or complement by human leukocytes in vitro : requirement for complement  
in preferential killing by eosinophils.  
J. Immunol. 122, 628.

ARLAUD, G.J., SIM, R.B., DUPLAA, A.M. and COLOMB, M.G. (1979)

Differential elution of Clq,  $\overline{C1r}$  and  $\overline{C1s}$  from human  $\overline{C1}$  bound to  
immune aggregates. Use in the rapid purification of  $\overline{C1}$  sub-components.  
Mol. Immunol. 16, 445.

ARROYAVE, C.M. and MULLER-EBERHARD, H.J. (1973)

Interactions between human C5, C6 and C7 and their functional significance  
in complement-Dependent cytolysis.  
J. Immunol. 111, 536.

AURIAULT, C., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. and CAPRON, A. (1980)

Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage  
of IgG by Schistosoma larvae proteases.  
Immunol. Letters. (sous presse).

BASTEN, A., MILLER, J.F.A.P., ABRAHAM, R., GAMBLE, J. and CHIA, E. (1976)  
A receptor for antibody on B-lymphocytes. III. Relationship of the  
receptor to immunoglobulin and Ia determinants.

Int. Arch. Allergy. 50, 309.

BARTHOLOMEW, R.M., ESSER, A.F., and MULLER-EBERHARD, H.J. (1978)  
Lysis of oncornaviruses by human serum. Isolation of the viral  
complement (C1) receptor and identification as PI5 E.  
J. Exp. Med. 147, 844.

BEFUS, A.D. (1977)

Hymenolepis diminuta and H. microstoma : Mouse immunoglobulins binding  
to the tegumental surface.

Exp. parasitol. 41, 242.

BERENBERG, J.L., WARD, P.A. and SONENSHINE, D.E. (1972)

Tick-bite injury : Mediated by a complement-derived chemotactic factor.

J. Immunol. 109, 451.

BISMUTH, A., NEUPORT-SAUTES, C., KOURILSKY, F.M., MANUEL, Y. et  
GREENLAND, T. (1973)

Association entre les antigènes HL-A et la  $\beta$ 2-microglobuline détectée  
par immunofluorescence sur la membrane des lymphocytes humains.

C.R. Acad. Sci. (Paris). 227, 2845.

BERGGARD, J. and BEARN, A.G. (1968)

Isolation and properties of a low molecular weight  $\beta$ 2-globulin occurring  
in human biological fluids.

J. Biol. Chem. 243, 4095.

BORDET, J. (1898)

Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum  
d'animaux injectés de sang défibriné.

Ann. Inst. Pasteur. 12, 688.



BORDET, J. (1895)

Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccinés.  
Ann. Inst. Pasteur. 9, 462.

BORSOS, T. and RAPP, H.J. (1965a)

Hemolysin titration based on fixation of the activated first component of complement : Evidence that one molecule of hemolysin suffices to sensitize an erythrocyte.

J. Immunol. 95, 559.

BORSOS, T. and RAPP, H.J. (1965b)

Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies.  
Science. 150, 505.

BOUT, D., CAPRON, A., DUPAS, H., and CAPRON, M. (1974)

Characterization of Schistosoma mansoni antigens.

Proc. 3rd Int. Congr. Parasitol. 2, 1146.

BUDZKO DELIA, B., LACHMANN, P.J. and McCONNELL, I. (1976)

Activation of the alternative complement pathway by lymphoblastoid cell lines derived from patients with Burkitt's lymphoma and infectious mononucleosis.

Cell. Immunol. 22, 98.

BURT, C.P. and ADA, G.L. (1969)

An in vitro reaction between labelled flagel or haemocyanin and lymphocyte-like cells from normal animals.

Immunol. 17, 503.

CAPRON, A., BIGUET, J., ROSE, F. et VERNES, A. (1965)

Les antigènes de Schistosoma mansoni. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes.

Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de S. mansoni.

Ann. Inst. Pasteur. 109, 798.

CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. et AFCHAIN, D. (1968)

Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite.

Pathol. Biol. 16, 121.

CAPRON-DUPONT, M. (1974)

Les mécanismes de cytotoxicité dans la bilharziose humaine et expérimentale. Rapports avec l'immunité.

Thèse Pharmacie, Lille.

CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. et PETITPREZ, A. (1974)

Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative in vitro de l'activité létale d'immun-sérums sur les formes immatures et sur les adultes de Schistosoma mansoni.

Intern. J. Parasitol. 4, 613.

CAPRON, A., CAPRON, M., CAMUS, D., et VERNES, A. (1973)

Les phénomènes d'hypersensibilité au cours des schistosomioses humaines à Schistosoma mansoni et Schistosoma haematobium. II. Etude in vitro de l'activité létale des sérums de malades pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapports avec les tests d'hypersensibilité.

Path. Biol. 21, 1079.

CAPRON, A., CAPRON-DUPONT, M., CAMUS, D., et VERNES, A. (1972)

Les phénomènes d'hypersensibilité dans les bilharzioses humaines. II. Etude in vitro de l'activité létale des sérums de malades pour les schistosomules de Schistosoma mansoni. Rapports avec les tests d'hypersensibilité.

Soc. Franç. Immunol. Paris (13).

CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A., et AFCHAIN, D. (1968)

Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite.

Pathol. Biol. 16, 121.

.../...

CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D., and JOSEPH, M. (1978)

Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells.  
Europ. J. Immunol. 8, 127.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. and BAZIN, H. (1975)

Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules.  
Nature (London). 253, 474.

CAPRON, M., ROUSSEAU, J., MAZINGUE, C., BAZIN, H. and CAPRON, A. (1978)

Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to Schistosoma mansoni schistosomula.  
J. Immunol. 121, 2518.

CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D. and JOSEPH, M. (1978)

Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells.  
Eur. J. Immunol. 8, 127.

CLARK, H.F. and SHEPPARD, C.C. (1963)

A dialysis technique for preparing fluorescent antibody.  
Virology. 20, 642.

CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1970)

The use of in vitro cultivation in study of immunity against schistosomes.  
J. Parasitol. 56, 56.

CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1972)

The effect of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of S. mansoni during cultivation in vitro.  
Int. J. Parasitol. 2, 79.

CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1971)

Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis.  
Int. J. Parasitol. 1, 43.

CLEGG, J.A. (1965)

In vitro cultivation of Schistosoma mansoni.  
Exp. Parasitol. 16, 133.

CLEGG, J.A. (1972)

The schistosome surface in relation to parasitism.  
Symp. Br. Soc. Parasitol. 10, 23.

CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1971b)

Acquisition of human antigens by Schistosoma mansoni during cultivation  
in vitro.  
Nature, 232, 653.

COOPER, N.R., JENSEN, F.C., WELSH, R.W. and OLDSTONE, M.B.A. (1976)

Lysis of RNA tumor viruses by human serum : Direct antibody-independent  
triggering of the classical complement pathway.  
J. Exp. Med. 144, 970.

CRESSWELL, P., TURNER, M.J. and STROMINGER, J.L. (1973)

Papain solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain  
two peptide fragments.  
Proc. Nat. Acad. Sci (Wash). 70, 1603.

CULBERSTON, J.T. (1936)

The cercaricidal action of normal serum.  
J. Parasitol. 22, 111.



DAMIAN, R.T. (1964)

Molecular mimicry : Antigen sharing by parasite and host and its consequences.

Amer. Naturalist. 98, 129.

DAMIAN, R.T. (1967)

Common antigens between adult Schistosoma mansoni and the laboratory mouse.

J. Parasitol. 53, 60.

DEAN, A.D. (1974)

Schistosoma mansoni : Adsorption of human blood group A and B antigens by schistosomula.

J. Parasitol. 60, 260.

DEAN, D.A. and SELL, K.W. (1972)

Surface antigens on Schistosoma mansoni. II. Adsorption of Forssman-like host antigen by schistosomula.

Clin. Exp. Immunol. 12, 525.

DEAN, D.A., WISTAR, R. and CHEN, P. (1975)

Immune response of guinea pigs to Schistosoma mansoni. I. In vitro effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula.

Amer. J. Trop. Med. Hyg. 24, 74.

DEAN, D.A., WISTAR, R. et MURRELL, K.D. (1974)

Combined in vitro effects of rat antibody and neutrophilic leucocytes on Schistosomula of S. mansoni.

Amer. J. Trop. Med. Hyg. 23, 420.

- DESSAINT, J.P., WATTRE, P., SANTORO, F. et CAPRON, A. (1979)  
Le complément, mécanismes d'activation, fonctions, exploration.  
Lille. Med. 24, 551.
- DIAMOND, B., BLOOM, B.R. and SCHARFF, M.D. (1978)  
The Fc receptors of primary and cultured phagocytic cells studied with  
homogeneous antibodies.  
J. Immunol. 121, 1329.
- DICKLER, H.B. (1976)  
Lymphocyte binding of aggregated immunoglobulin.  
Scand. J. Immunol. 5 suppl. 5, 91.
- DICKLER, H.B. (1974)  
Studies of the human lymphocyte receptor for heat-aggregated or antigen-  
complexed immunoglobulin.  
J. Exp. Med. 140, 508.
- DORSEY, C.H. (1976)  
Schistosoma mansoni : Description of the head gland of cercariae and  
schistosomules at the ultrastructural level.  
Exp. Parasitol. 39, 444.
- EISEN, H. and TALLAN, I. (1977)  
Tetrahymena pyriformis recovers from antibody immobilisation producing  
univalent antibody fragments.  
Nature. 270, 514.
- ELLNER, J.J. and MAHMOUD, A.F. (1979)  
Killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by normal human monocytes.  
J. Immunol. 123, 949.
- FEARON, D.T. and AUSTEN, K.F. (1975)  
Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway.  
J. Immunol. 115, 1357.

FEARON, D.T. and AUSTEN, K.F. (1975)

Properdin : Binding to C3b and stabilisation of the C3-dependent C3 convertase.

J. Exp. Med. 142, 856.

GABAY, Y., PERLMANN, H., PERLMANN, P. and SOBEL, A. (1979)

A rosette assay for the determination of Clq receptor bearing cells.

Eur. J. Immunol. 120, 27.

GAZZINELLI, G., RAMALHO-PINTO, F.J. and PELLEGRINO, J. (1966)

Purification and characterization of the proteolytic enzyme complex of cercarial extract.

Comp. Biochem. Physiol. 18, 689.

GAZZINELLI, G., DE OLIVEIRA, C.C., FEGUEIREDO, E.A., PEREIRA, L.H., COELHO, P.M.Z. and PELLEGRINO, J. (1973)

Schistosoma mansoni : Biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule.

Exp. Parasitol. 34, 181.

GERZEN, S.E., KAWAZOE, U., PELLEGRINO, J. and YAMAZOTO, T. (1973)

Scanning electron microscopy in schistosomiasis mansoni. I-Morphological aspects related to the cercaricidal activity of guinea pig serum.

Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 15, 212.

GIGLI, I. and NELSON, R.A. (1968)

Complement-dependent immune phagocytosis. I. Requirement for C1, C4, C2, C3.

Exp. Cell. Res. 51, 45.

GOLDRING, O.L., KUSEL, J.R. and SMITHERS, S.R. (1977)

Schistosoma mansoni : Origin in vitro of host-like surface antigens.

Exp. Parasitol. 43, 82.

GOLDRING, O.L., CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1976)

Acquisition of human blood group antigens by Schistosoma mansoni.

Clin. Exp. Immunol. 26. 181.

GOTZE, O. and MULLER-EBERHARD, H.J. (1976)

The alternative pathway of complement activation.

Adv. Immunol. 24, 1.

GREENBLATT, H.C., EVELAND, L.K. and MORSE, S.I. (1979)

Schistosoma mansoni : Complement and cercarial tail loss during in vitro transformation.

Exp. Parasitol. 48, 100.

GREEN, H., BARROW, P., and GOLDBERG, B. (1959)

Effect of antibody and complement on permeability control in ascites tumor cells and erythrocytes.

J. Exp. Med. 110, 699.

GUPTA, R.C., McDUFFIE, F.C., TAPPEINER, G. and JORDON, R.E. (1978)

Binding of soluble immune complexes to raji lymphocytes. Role of receptors for complement components, Clq and C3-C3b.

Immunol. 34, 751.

HAMMERBERG, B. and WILLIAMS, J.F. (1978a)

Interaction between Taenia taeniformis and the complement system.

J. Immunol. 120, 1033.

HAMMERBERG, B., MUSOKE, A.J. and WILLIAMS, J.F. (1977)

Activation of complement by hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus.

J. Parasitol. 63, 327.

HAMMERBERG, B. and WILLIAMS, J.F. (1978b)

Phisicochemical characterization of complement-interacting factors from Taenia taeniaeformis.

J. Immunol. 120, 1039.

.../...

- HEUSSER, C., BOESMAN, M., NORDIN, J.H. and ISLIKER, H. (1973)  
Effect of chemical and enzymatic radioiodination on in vitro human  
Clq activities.  
J. Immunol. 110, 820.
- HEYNEMAN, D., and WELSH, J.F. (1959)  
Action of homologous anti-serum in vitro against life cycle stages of  
Hymenolepis nana, the dwarf mouse tapeworm.  
Exp. Parasitol. 8, 119.
- HOCKLEY, D.J. (1970)  
Ultrastructure of the outer membrane of Schistosoma mansoni.  
J. Parasitol. 56, 151.
- HOCKLEY, D.J. and McLAREN, D.J. (1971)  
The outer membrane of Schistosoma mansoni.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 432.
- HOCKLEY, D.J., McLAREN, D.J., WARD, B.J. and NERMUT, M.V. (1975)  
A freeze-fracture study of the tegumental membrane of Schistosoma mansoni  
(Platyhelminthes : Trematoda).  
Tissue and Cell. 7, 485.
- HOCKLEY, D.J., and Mc LAREN, D.J. (1973)  
Schistosoma mansoni : Changes in the outer membrane of the tegument  
during developement from cercaria to adult worm.  
Int. J. Parasitol. 3, 13.
- HOCKLEY, D.J. (1968)  
Scanning electron microscopy of Schistosoma mansoni cercariae.  
J. Parasitol. 54, 1241.
- HUMPHREY, J.H. and DOUMASHKIN, R.R. (1969)  
The lesions in cell membranes caused by complement.  
Adv. Immunol. 11, 75.

- HUMPHREY, J.H. and DOUMASHKIN, R.R. (1965)  
Electron microscope studies of immune cell lysis.  
In Wolstenholme and Knight complement Ciba Foundation symp. p. 175.
- HURST, M.M., VOLANAKIS, J., BENNETT, G.C. and STROUD, R.M. (1974)  
C fixation by IgM and its fragments.  
Fed. Proc. 33, 759.
- JOHNSTON, R.B., KLEMPERER, M.R., ALPER, C.A. and ROSEN, F.S. (1969)  
The enhancement of bacterial phagocytosis by serum. The role of  
complement components and two cofactors.  
J. Exp. Med. 129, 1275.
- JONES, V.E. and OGILVIE, B.M. (1971)  
Protective immunity to Nippostrongylus brasiliensis. The sequence of  
events which expels worms from the rat intestine.  
Immunol. 20, 549.
- KABIL, S.M. (1976)  
Host complement in the schistosomal tegument.  
J. Trop. Med. Hyg. 79, 205.
- KASSIS, A.I. and TANNER, C.E. (1976)  
The role of complement in hydatid disease : In vitro studies.  
Int. J. Parasitol. 6, 25.
- KASSIS, A.I., GOH., S. L. and TANNER, C.E. (1976)  
Lesions induced by complement in vitro of the protoscoleces of  
Echinococcus multilocularis : A study by electron microscopy.  
Int. J. Parasitol. 6, 199.
- KAZATCHKINE, M., NYDEGGER, U. et FEARON, D.T. (1979)  
La voie alterne du complément.  
Nouv. Presse. Med. 8, 2187.

KEHOE, J.M. and FOUGEREAU, M. (1970)

Immunoglobulin peptide with complement fixing activity.

Nature. 224, 1212.

KEMP, W.M., MERRITT, S.C. and ROSIER, J.G. (1978)

Schistosoma mansoni : Identification of immunoglobuline associated with the tegument of adulte parasites from mice.

Exp. Parasitol. 45, 81.

KEMP, W.M. and DAMIAN, R.T. (1976)

Immunocytochemical localization of IgG on adult Schistosoma mansoni tegumental surfaces.

J. Parasitol. 62, 830.

KEMP, W.M, MERRITT, S.C., BOGUCKI, M.S., ROSIER, J.G. and SEED, J.R. (1977)

Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of Schistosoma mansoni.

J. Immunol. 119, 1849.

KEMP, W.M., BROWN, P.R., MERRITT, S.R. and MILLER, R.E. (1980)

Tegument-associated antigen modulation by adult male Schistosoma mansoni.

J. Immunol. 124, 806.

KOLB, W.P., HAXBY, J.A., ARROYAVE, C.M., and MULLER-EBERHARD, H.J. (1972)

Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement.

J. Exp. Med. 135, 549.

KOSSARD, S. and NELSON, D.S. (1968)

Studies on cytophilic antibodies. IV. The effects of proteolytic enzymes (trypsin and papain) on the attachment to macrophages of cytophilic antibodies.

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46, 63.

.../...

LACHMANN, P.J. and HOBART, M.J. (1978)

Complement technology.

In Handbook of Experimental Immunology, 3rd Ed. Chap. 5A. Edited by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

LACHMANN, P.J. and THOMPSON, R.A. (1970)

Reactive lysis : The complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as  $\overline{C56}$  and the participation of C8 and C9.

J. Exp. Med. 131, 643.

LEPOW, I.H., RATNOFF, O.D. and LEVY, L.R. (1958)

Studies on the activation of a proesterase associated with partially purified first component of human complement.

J. Exp. Med. 107, 451.

LEVY, L.R. and LEPOW, I.H. (1959)

Assay and properties of serum inhibitor of C1-esterase.

Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 101, 608.

LOBUGLIO, A.F., COTRAN, R.S. and JANDL, J.H. (1967)

Red cells coated with immunoglobulin G : Binding and sphering by mononuclear cells in man.

Science. 158, 1582.

LEWERT, R.M., YOGORE, M.G., PARA, J.M. and OZCEL, M.A. (1977)

Rejection of mouse-derived Schistosoma japonicum and serum lethality of hosts immunized with mouse globulin or mouse erythrocytes.

J. Parasitol. 63, 825.

LEWERT, R.M. and LEE, C.L. (1954)

Studies on the passage of helminth larvae through tissues. I. Histochemical studies of extracellular changes caused by penetrating larvae. II.

Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo.

J. Infect. Dis. 95, 13.

.../...



MACHADO, A.J., GAZZINELLI, G., PELLEGRINO, J. and DIAS DA SILVA, W. (1975)  
Schistosoma mansoni : The role of the complement C3 activating system  
in the cercaricidal action of normal serum.  
Exp. Parasitol. 38, 20.

MACKENZIE, C.D., RAMALHO-PINTO, F.J., McLAREN, D.J. and SMITHERS, S.R. (1977)  
Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of  
Schistosoma mansoni in vitro.  
Clin. Exp. Immunol. 30, 97.

MARTIN, A., LACHMANN, P.J., HALBWACHS, L. and HOBART, M.J. (1976)  
Haemolytic diffusion plate assays for factors B and D of the alternative  
pathway of complement activation.  
Immunochem. 13, 317.

McCONNELL, I. and LACHMANN, P.J. (1977)  
Complement receptors and cell associated complement components.  
Immunol. Commun. 6, 111.

McCONNELL, I. and HURD, C.M. (1976)  
Lymphocyte receptors. I. Receptors for Fc of IgG and complement (C3b)  
on immunoglobulin-bearing, antigen-binding and antibody-secreting cells.  
Immunol. 30, 825.

McGUINNESS, B. and KEMP, W.M. (1980)  
Schistosoma mansoni : Evidence for complement-dependent receptor on  
adult male parasites.  
Exp. Parasitol. (soumis à publication).

McLAREN, D.J. and RAMALHO-PINTO, F.J. (1979)  
Eosinophil-mediated killing of schistosomula of Schistosoma mansoni  
in vitro : synergistic effect of antibody and complement.  
J. Immunol. 123, 1431.

McLAREN, D.J., RAMALHO-PINTO, F.J. and SMITHERS, S.R. (1978)  
Ultrastructural evidence for complement and antibody-dependent damage  
to schistosomula of Schistosoma mansoni by rat eosinophils in vitro.  
Parasitol. 77, 313.

McLAREN, D.J., HOCKLEY, D.J., GOLDRING, O.L. and HAMMONDS, B.J. (1978)  
 A freeze fracture study of the developing tegumental outer membrane  
 of Schistosoma mansoni.  
 Parasitol. 76, 327.

MIYAKAWA, Y., TANIGAKI, N., KREITER, V.P., MOORE, G.E. and PRESSMAN, P. (1973)  
 Characterization of soluble substances in the plasma carrying HL-A  
 allo-antigenic activity and HL-A common antigenic activity.  
 Transpl. 15, 312.

MURREL, K.D. and CLAY, B. (1972)  
In vitro detection of cytotoxic antibodies to Schistosoma mansoni  
 schistosomules.  
 Amer. J. Trop. Med. Hyg. 21, 569.

MURREL, K.D. (1971)  
 The effects of antibody on the permeability control of larval Taenia  
taeniaformis.  
 J. Parasitol. 57, 875.

MULLER-EBERHARD, H.J., DALMASSO, A.P. and CALCOTT, M.A. (1966)  
 The reaction mechanism of  $\beta$ 1C-globulin (C'3) in immune hemolysis.  
 J. Exp. Med. 123, 33.

MULLER-EBERHARD, H.J. (1968)  
 Chemistry and reaction mechanisms of complement.  
 Adv. Immunol. 8, 1.

MULLER-EBERHARD, H.J. (1968)  
 Human monocytes : Distinct receptor sites for the third component of  
 complement and for immunoglobulin G.  
 Science. 162, 1281.

MULLER-EBERHARD, H.J. <sup>and GÖTZE, O</sup> (1972)  
 C3 proactivator convertase and its mode of action.  
 J. Exp. Med. 135, 1003.

MULLER-EBERHARD, H.J., POLLEY, M.J. and CALCOTT, M.A. (1967)  
Formation and functional significance of a molecular complex derived  
from the second and the fourth component of human complement.

J. Exp. Med. 125, 359.

MULLER-EBERHARD, H.J. (1969)

Complement.

Ann. Rev. Biochem. 38, 389.

NAFF, G.B., PENSKY, J. and LEPOW, I.H. (1964)

The macromolecular nature of the first component of human complement.

J. Exp. Med. 119, 593.

NAKAMURO, K., TANIGAKI, N. and PRESSMAN, P. (1973)

Multiple common properties of human  $\beta$ 2-microglobulin and the common  
portion fragment derived from HL-A antigen molecules.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.). 70, 2863.

NELSON, R.A. (1953)

The immune adherence phenomenon. An immunologically specific reaction  
between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis.

Science. 118, 733.

NILSSON, K., EVRIN, P.E., BERGGARD, I. and PONTEN, J. (1973)

Involvement of lymphoid and non-lymphoid cells in the production of  
 $\beta$ 2-microglobulin ; a homologue of the constant domains of IgG.

Nat. New. Biol. 244, 44.

NUSSENZWEIG, V. (1974)

Receptors for immune complexes on lymphocytes.

Adv. Immunol. 19, 217.

.../...

OLIVIER, L. and MAO, C.P. (1949)

The early larval stages of Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) in the snail host, Australorbis elabratus (SAY, 1818).

J. Parasitol. 35, 267.

OPFERKUCH, W., RINGELMANN, R. and KLEIN, P.G. (1968)

Characterization of a C4 inactivator and its generation from guinea pig euglobulin.

J. Immunol. 101, 815.

OSTBERG, L., LINDBLOM, J.B. and PETERSON, P.A. (1974)

Subunit structure of HL-A antigens on cell surface.

Nature. 249, 463.

PESTEL, J. (1977)

Réponse immune chez le rat vis-à-vis d'immuns complexes formés in vitro.  
D.E.A., Biochimie Appliquée, Lille.

PESTEL, J. (1980)

Influence de la nature et de la composition des complexes immuns sur l'activation du macrophage.

Thèse 3e cycle, Biochimie Appliquée, Lille.

PEREZ, H., CLEGG, J.A., and SMITHERS, S.R. (1974)

Acquired immunity to Schistosoma mansoni in the rat : Measurement of immunity by the lung recovery technique.

Parasitol. 69, 349.

PETERSON, P.A., RASK, L. and LINDBLOM, J.B. (1974)

Highly purified papain-solubilized HL-A antigens contain  $\beta$ 2-microglobulin.  
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.). 71, 35.

.../...

PHILIPS, S.M., REID, W.A., BRUCE, J.I., HEDLUND, K., COLVIN, R.C., CAMPBELL, R., DIGGS, C.L. and SADUN, E.H. (1975)  
The cellular and humoral response to Schistosoma mansoni infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure.  
Cell. Immunol. 19, 99.

PILLEMER, L., BLUM, L., LEPOW, I.H., ROSS, O.A., TODD, E.W., and WARDLAW, A.C. (1954)  
The properdin system and immunity : I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena.  
Science. 120, 279.

PLATTS-MILLS, T.A.E. and ISHISAKA, K. (1974)  
Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells.  
J. Immunol. 113, 348.

POULIK, M.D., BERNOCO, M., BERNOCO, D. and CEPPELLINI, R. (1973)  
Aggregation of HL-A antigens at the lymphocyte surface induced by antiserum to  $\beta$  2-microglobulin.  
Science. 182, 1352.

RACE, G.J., MARTIN, J.H., MOORE, D.V. and LARSH, J.E. (1971)  
Scanning and transmission electron microscopy of Schistosoma mansoni eggs, cercariae and adults.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 20, 914.

RAMALHO-PINTO, F.J., McLAREN, D.J. and SMITHERS, S.R. (1978)  
Complement-mediated killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by rat eosinophils in vitro.  
J. Exp. Med. 147, 147.

.../...

RAMALHO-PINTO, F.J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIRERO, E.A. and PELLEGRINO, J. (1974)

Schistosoma mansoni : Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro.

Exp. Parasitol. 36, 360.

RATNOFF, O.D. and LEPOW, I.H. (1957)

Some properties of an-esterase derived from preparations of the first component of complement.

J. Exp. Med. 106, 327.

REID, K.B.M., LOWE, D.M. and POTER, R.R. (1972)

Isolation and characterization of Clq, a subcomponent of the first component of complement from human and rabbit sera.

Biochem. J. 130, 749.

REID, K.B.M. (1974)

A collagen-like aminoacid sequence in a polypeptide chain of human Clq (a subcomponent of the first component of complement).

Biochem. J. 141, 189.

ROBERT, M., VINCENT, C. and RIVILLARD, J.P. (1974)

Presence of HL-A antigens and  $\beta$ 2-microglobulin in tubular proteinuria. Transp. 18, 89.

ROSS, G.D., and POLLEY, M.J. (1975)

Specificity of human lymphocyte complement receptors.

J. Exp. Med. 141, 1163.

RUDDY, S. and AUSTEN, K.F. (1971)

C3b Inactivator of man. II. Fragments produced by C3b Inactivator cleavage of cell-bound or fluid phase C3b.

J. Immunol. 107, 742.

.../...

SAKAI, K. and STROUD, R.M. (1974)

The activation of Cls with purified Clr.

Immunochem. 11, 191.

SAKAI, K. and STROUD, R.M. (1973)

Purification, molecular properties and activation of Cl proesterase, Cls.

J. Immunol. 110, 1010.

SANTORO, F., LACHMANN, P.J., CAPRON, A. and CAPRON, M. (1979)

Activation of complement by Schistosoma mansoni schistosomula : Killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation.

J. Immunol. 123, 1551.

SANTORO, F., BERNAL, J. and CAPRON, A. (1979)

Complement activation by parasites. A review.

Acta. Tropica. 36, 5.

SEBEL, A.T. and BOKISCH, V.A. (1975)

Receptors for C4b and Clq on human peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cells.

In Membrane Receptors of Lymphocytes. Edited by M. Seligmann, J.L.

Preud'Homme, and F.M. Kourilsky. North Holland Publishing Co.,

Amsterdam. P. 151.

SELL, K.W. and DEAN, D.A. (1972)

Surface antigens on Schistosoma mansoni. I. Demonstration of host antigens on schistosomula and adult worms using the mixed antiglobulin test.

Clin. Exp. Immunol. 12, 315.

SHER, A. (1976)

Complement-dependent adherence of mast cells to schistosomula.

Nature (Lond.). 263, 334.

- SHER, A., KUSEL, J.R., PEREZ, H. and CLEGG, J.A. (1974)  
Partial isolation of a membrane antigen which induces the formation of antibodies lethal to schistosomes cultured in vitro.  
Clin. Exp. Immunol. 18, 357.
- SHER, A., HALL, B.F. and VADAS, M.A. (1978)  
Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistomula of Schistosoma mansoni.  
J. Exp. Med. 148, 46.
- SHER, A. MACKENZIE, P. and SMITHERS, S.R. (1974)  
Decreased recovery of invading parasites from the lung as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the mouse.  
J. Infect. Dis. 130, 626.
- SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1976)  
The immunology of schistosomiasis.  
Advc. Parasitol. 14, 399.
- SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1965)  
The infection of labotary hosts with cercariae of S. mansoni and the recovery of the adult worms.  
Parasitol. 55, 695.
- SMITHERS, O. and POULIK, M.D. (1972)  
Initiation of protein synthesis at an unusual position in an immunoglobulin gene.  
Science. 175, 187.
- SMITHERS, S.R., TERRY, R.J. and HOCKLEY, D.J. (1969)  
Host antigens in schistosomiasis.  
Proc, R, Soc, Ser, B, Biol, Sci, 171, 483.



SMYTH, J.D. (1973)

Some interface phenomena in parasitic protozoa and platyhelminths.  
Canad. J. Zool. 51, 367.

SOGANDARES-BERNAL, F. (1976)

Immunoglobulins attached to and in the integument of adult Schistosoma mansoni Sambon 1907, from first infection of CF mice.  
J. Parasitol. 62, 222.

SOLHEIM, B.G. and THORSBY, E. (1974)

$\beta$ 2-microglobulin is part of the HL-A molecule in the lymphocyte membrane.  
Nature (Lond.). 249, 36.

STACKPOLE, C.M., JACOBSON, J.B. and GALUSKA, S. (1978)

Antigenic modulation in vitro. II. Modulation of Thymus-Leukemia (TL) antigenicity requires complement component C3.  
J. Immunol. 120, 188.

STANDEN, O.D. (1952)

The in vitro effect of normal and immune serum upon cercariae of Schistosoma mansoni.  
J. Helminthol. 26, 25.

STANKIEWICZ, M. (1975)

The participation of C3 and Mg<sup>++</sup> in the mediation of cell adherence reactions (CRA) to Trichinella spiralis in normal non-immune sera.  
Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 23, 87.

STIREWALT, M.A. and KRUIDENIER, F.J. (1961)

Activity of the actabular secretory apparatus of cercariae of Schistosoma mansoni under experimental conditions.  
Exp. Parasitol. 11, 191.

STIREWALT, M.A. (1966)

Skin penetration mechanisms of helminths.

In Soulsby Biology of Parasites. P. 41 (Academic Press, New York. London).

STIREWALT, M.A. and DORSEY, C.H. (1974)

Schistosoma mansoni : Cercarial penetration of host epidermis on the ultrastructural level.

Exp. Parasitol. 35, 1.

SUBA, E.A. and CSAKO, G. (1976)

Clq (C1) Receptor on human platelets : Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Clq (C1) molecules.

J. Immunol. 117, 304.

TAMURA, N. and NELSON, R.A. (1967)

Three naturally occurring inhibitors of components of complement in guinea pig and rabbit serum.

J. Immunol. 99, 582.

TARANTA, A. and FRANKLIN, E.C. (1961)

Complement fixation by antibody fragments.

Science. 134, 1981.

TAVARES, C.A.P., GAZZINELLI, G., MOTA-SANTOS, T.A. and DIAS DA SILVA, W. (1979)

Schistosoma mansoni : Complement mediated cytotoxic activity in vitro and effect of decompensation on acquired immunity in mice.

Exp. Parasitol. 46, 145.

THREADGOLD, L.T. and BEFUS, A.D. (1977)

Hymenolepis diminuta : Ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument.

Exp. Parasitol. 43, 169

TORPIER, G., CAPRON, M. and CAPRON, A. (1977)

Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to development stages of Schistosoma mansoni (Platyhelminthes : Trematoda).

J. Ultrast. Res. 61, 309.

TORPIER, G., OUAISSI, M.A. and CAPRON, A. (1979)

Freeze-fracture study of immune-induced Schistosoma mansoni membrane alterations. I. Complement-dependent damage in the presence of antisera to host antigenic determinants.

J. Ultrast. Res. 67, 276.

VADAS, M.A., DAVID, J.R., BUTTERWORTH, A., PISANI, N.T. and SIONGOK, T.A. (1979)

A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of Schistosoma mansoni .

J. Immunol. 122, 1228.

VALET, G. and COOPER, N.R. (1974)

Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1r subunit of the first complement component.

J. Immunol. 112, 1667.

WALKER, W.S., and DEMUS, A. (1975)

Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro established line of mouse peritoneal macrophages.

J. Immunol. 114, 765.

WAUTIER, J.L., TOBELEM, G.M., PELTIER, A.P. and CAEN, J.P. (1974)

Evidence for C1 on human platelets.

Haemostasis. 2, 281.

WEILER, J.M., DAHA, M.R., AUSTEN, K.F. and FEARON, D.T. (1976)

Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein H.

Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.). 73, 3268.

WILSON, A.B., LACHMANN, P.J. and COOMBS, R.R.A. (1979)

In vitro complement activation by rabbit lymphocytes and thymocytes in autologous serum.

Immunol. 37, 25.

WILSON, R.A. and BARNES, P.E. (1977)

The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of Schistosoma mansoni.

Parasitol. 74, 61.

WILSON, R.A., and BARNES, P.E. (1974)

The tegument of Schistosoma mansoni : Observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function.

Parasitol. 68, 239.

YONEMASU, K. and STROUD, R.M. (1971)

Clq : Rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies.

J. Immunol. 106, 304.

ZUBLER, R.H. and LAMBERT, P.H. (1976)

The  $^{125}\text{I}$ -Clq binding test for the detection of soluble immune complexes.

In In vitro Methods in cell-Mediated and Tumor Immunity. Edited by

B.R. Bloon and J.R. David. Academic Press, New York, P. 565.

