

50376
1983
83

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1983
83

N° d'ordre 1092

THESE

présentée pour l'obtention du titre
de Docteur de 3e cycle en
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

par



El Hassane HIMMI

MODULATION DE LA FORMATION DU
GRANULOME BILHARZIEN IN VITRO
PAR UN TRIPEPTIDE PROVENANT
DES IMMUNOGLOBULINES G :
ROLE DES MACROPHAGES.

JURY : PRÉSIDENT : M. DURCHON, Professeur Lille I
EXAMINATEUR : A. DHAINAUT, Professeur Lille I
RAPORTEURS : C. AURIAULT, Chargé de Recherche CNRS
D. AFCHAIN, Maître-Assistant Lille II

SOUTENUE LE : 26 SEPTEMBRE 1983

Ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, à l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur André CAPRON.

Monsieur le Professeur M. DURCHON,

Monsieur le Professeur A. CAPRON,

Permettez-moi de vous exprimer ici mes sentiments de gratitude
et mon profond respect.

Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,

Monsieur le Docteur D. AFCHAIN,

Je suis très honoré de votre présence dans ce Jury et vous prie
de croire en mes sentiments déferents.

Je remercie tout particulièrement Messieurs les Docteurs C. AURIAULT
et R. PIERCE qui m'ont transmis leur savoir pour mener à bien ce travail.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire
d'Immunologie et de Biologie Parasitaire qui ont participé, de près ou
de loin, à l'accomplissement de la présente étude.

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME.....	2
INTRODUCTION.....	3
 <u>Chapitre I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	
1.1. Bilharzioses.....	6
1.1.1. Généralités.....	6
1.1.2. Cycle évolutif.....	7
1.1.3. Ponte et maturation des oeufs.....	9
1.1.4. Quelques aspects cliniques et pathologiques.....	10
1.2. Granulomes.....	11
1.2.1. Etude des granulomes <u>in vivo</u>	11
1.2.1.1. Formation des granulomes.....	11
1.2.1.1.1. Spécificité antigénique...	12
1.2.1.1.2. Type de réaction cellulaire.....	13
1.2.1.1.3. Forme d'hypersensibilité retardée.....	15
1.2.1.2. Régulation de la réponse granulomateuse.....	15
1.2.1.2.1. Etude cellulaire.....	16
1.2.1.2.2. Etude humorale.....	17
1.2.2. Etude des granulomes <u>in vitro</u>	17
1.2.2.1. Formation des granulomes <u>in vitro</u>	18
1.2.2.2. Modulation de la réaction granulomateuse <u>in vitro</u>	18

	Page
1.3. Le macrophage.....	20
1.3.1. Origine.....	20
1.3.2. Caractéristiques.....	21
1.3.2.1. Morphologie.....	21
1.3.2.2. L'adhérence et la migration.....	22
1.3.2.3. La phagocytose.....	22
1.3.3. Les macrophages, cellules effectrices..	23
1.3.4. Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro sur les différentes fonctions du macrophage.....	24

Chapitre 2. MATERIEL et METHODES

2.1. Bilharziose expérimentale à <u>Schistosoma</u> <u>mansoni</u> chez la souris.....	28
2.1.1. Souches de souris utilisées.....	28
2.1.2. Maintien du cycle parasitaire au laboratoire.....	28
2.1.3. Infestation des souris.....	29
2.2. Préparation de l'antigène soluble des oeufs de <u>S. mansoni</u>	29
2.2.1. Obtention des oeufs.....	29
2.2.2. Préparation de l'antigène soluble des oeufs.....	30
2.3. Technique de migration cellulaire.....	30
2.3.1. Récupération des macrophages péritonéaux.....	30
2.3.2. Facteurs chimiotactiques.....	31
2.3.3. Description des chambres de migration..	32
2.3.4. Test de migration cellulaire.....	32

	Page
2.4. Méthodologie de la formation des granulomes <u>in vitro</u>	33
2.4.1. Milieu de culture.....	33
2.4.2. Préparation des globules rouges.....	34
2.4.3. Culture de vers adultes.....	34
2.4.4. Suspensions cellulaires.....	35
2.4.4.1. Cellules spléniques totales.....	35
2.4.4.2. Prélèvement des macrophages de la suspension de cellules spléniques.....	35
2.4.4.3. Récupération des macrophages péritonéaux ou spléniques.....	35
2.4.5. Evaluation de la formation des granulomes <u>in vitro</u>	36
2.4.6. Analyse des données.....	37
2.5. La synthèse biochimique des peptides.....	37

Chapitre 3. RESULTATS et DISCUSSIONS

3.1. Mise au point de la technique de formation des granulomes <u>in vitro</u>	39
3.1.1. La ponte des oeufs <u>in vitro</u> par les schistosomes adultes (<u>Schistosoma mansoni</u>).....	39
3.1.1.1. Cinétique de l'oviposition.....	39
3.1.1.2. Effet des vers et des globules rouges sur l'oviposition.....	41
3.1.1.2.1. Intérêt des globules rouges pour les cultures de schistosomes.....	41
3.1.1.2.2. Effet des vers sur l'oviposition et la maturation des oeufs.....	43
3.1.1.3. Discussion et conclusion.....	45
3.1.2. Formation des granulomes <u>in vitro</u>	46

	Page
3.1.2.1. Description de la séquence des réactions cellulaires vis-à-vis des oeufs.....	47
3.1.2.2. Distribution des réactions granulomateuses à différents moments de la culture	48
3.1.2.3. Cinétique de formation des granulomes <u>in vitro</u> au cours de l'infection <u>des souris</u> par <u>S. mansoni</u>	48
3.1.2.4. Discussion et conclusion.....	50
3.2. Modulation de la formation des granulomes <u>in vitro</u> par le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP).....	54
3.2.1. Effet de différents peptides provenant du second domaine constant de la molécule d'IgG sur la formation des granulomes <u>in vitro</u>	54
3.2.2. Effet inhibiteur du tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) sur la formation des granulomes <u>in vitro</u> , en fonction du moment et de la fréquence du traitement des cultures.....	56
3.2.3. Effet inhibiteur du TKP sur la formation des granulomes <u>in vitro</u> en fonction de la concentration.....	58
3.2.4. Etape de la formation des granulomes <u>in vitro</u> affectée par le tripeptide TKP....	60
3.2.5. Populations cellulaires affectées par le tripeptide TKP au cours de la formation des granulomes <u>in vitro</u>	63
3.2.6. Effet du TKP sur la migration des macrophages péritonéaux vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs (SEA).....	68
3.2.6.1. Migration des macrophages péritonéaux vis-à-vis du SEA.....	70
3.2.6.2. Effet du TKP sur la migration des macrophages.....	70

3.2.7. Formation des granulomes <u>in vitro</u> en utilisant des cellules spléniques totales de souris CBA/J infectées par <u>S. mansoni</u> ayant subi un traitement <u>in vivo</u> par le TKP.....	72
3.2.8. Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro et de ces analogues protégés sur les groupements amine et carboxylique (Acétyl-Thr-Lys-Pro et Thr-Lys-Pro-amide) sur la formation des granulomes <u>in vitro</u>	74
3.2.9. Discussion et conclusion.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	81

Modulation de la formation du granulome bilharzien
in vitro par un tripeptide provenant des immunoglobulines
G.: Rôle du macrophage.

RÉSUMÉ

Nous avons testé l'effet de certains peptides appartenant au second domaine constant de la molécule d'IgG, sur la formation des granulomes in vitro autour des oeufs de Schistosoma mansoni par les cellules spléniques de souris infectées par le parasite.

Dans un premier temps, nous avons cherché les conditions de culture de schistosomes adultes offrant le meilleur rendement concernant la ponte et la maturation des oeufs. Puis, nous avons mis en évidence des conditions optimales de la réponse granulomateuse in vitro. Cette réaction est maximale, après 8 semaines d'infection, avec les cellules spléniques de souris CBA/J.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de quelques peptides d'IgG sur la formation des granulomes. Parmi ceux-ci, le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) présente une action inhibitrice significative sur les granulomes. L'inhibition a lieu aux premières étapes du développement de cette réaction et fait intervenir uniquement les cellules adhérentes aux supports solides. Ces dernières sont essentiellement constituées de macrophages, dont divers travaux antérieurs ont montré l'importance pour la réponse granulomateuse. Nous avons aussi démontré que le TKP réduit la migration des macrophages vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs de S. mansoni (SEA). Le TKP inhiberait donc la formation des granulomes par le biais des macrophages.

Ces résultats doivent être vérifiés in vivo. Comme première approche, nous avons infecté les souris par S. mansoni, puis nous les avons traitées par le TKP. Leurs cellules spléniques présentent une réponse granulomateuse réduite in vitro.

Pour les expériences in vivo, il est préférable d'utiliser des analogues protégés du TKP pour éviter une éventuelle dégradation du produit testé. L'acétyl-TKP et le TKP-amide, qui ont la même activité in vitro que le TKP, sont donc à retenir.

INTRODUCTION

Chez les animaux infectés par Schistosoma mansoni, la formation des granulomes autour des oeufs du parasite, au niveau de divers organes (foie, intestin), constitue l'aspect pathologique majeur de la maladie. C'est une réaction immunitaire spécifique aux sécrétions antigéniques des oeufs et à médiation cellulaire. Elle fait intervenir des macrophages, des lymphocytes, des éosinophiles et des fibroblastes. Divers travaux tant in vivo qu'in vitro, sur les mécanismes inducteurs des granulomes, montrent que les macrophages sont des cellules importantes principalement dans les premières phases de leur formation : en effet, ce sont en général, les premières cellules venant au contact des oeufs et elles pourraient jouer un rôle primordial dans le processus d'induction de la coopération entre les différents composants cellulaires du granulome. Les cellules phagocytaires associées aux granulomes synthétisent des substances solubles (Monokines) stimulatrices des lymphocytes T et des fibroblastes. Elles dégradent partiellement l'antigène, par phagocytose, qui devient facilement reconnaissable par les lymphocytes.

AURIAULT et coll. en 1983 ont montré que certains peptides appartenant au second domaine constant de la molécule d'IgG, en particulier le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP), sont capables d'inhiber les fonctions effectrices du macrophage. La migration cellulaire et les processus impliqués dans la phagocytose (synthèse d'enzymes lysosomiales) sont également inhibés.

A partir de ces différentes données, nous avons été amenés à étudier, dans le présent travail, l'effet du TKP sur la formation des granulomes.

Les tests ont été réalisés in vitro selon la technique définie par Doughty et Phillips en 1982a.

Nous avons pris comme modèle expérimental des souris infectées par S. mansoni.

CHAPITRE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. BILHARZIOSES

1.1.1. GENERALITES

La schistosomiase ou bilharziose est une maladie parasitaire due à des vers (helminthes, distomiens). Elle affecte plus de 200 millions d'individus dans le monde, surtout en Afrique, Amérique du Sud et Asie (Mahmoud, 1977). Les atteintes hors des zones endémiques (Amérique du Nord ou Europe) se rencontrent parmi les touristes et les missionnaires.

L'infection de l'homme se fait par voie transcutanée au cours des baignades, des traversées de rivières et marécages, ou à l'occasion de travaux agricoles ou de constructions nécessitant un contact assez long avec l'eau.

Les parasites vivent dans le système circulatoire de l'hôte et se nourrissent essentiellement de globules rouges. Des travaux réalisés tant in vivo (Zussman et coll., 1970) qu' in vitro (Bogitsh, 1981) ont montré l'intérêt nutritif de l'hémoglobine pour le parasite.

Trois types de schistosomiasés sont considérées comme majeures : à S. haematobium, à S. mansoni et à S. japonicum.

	<u>S. haematobium</u>	<u>S. mansoni</u>	<u>S. japonicum</u>
Oeuf	Ellipsoïde, à éperon terminal	Ellipsoïde, à éperon latéral	Sphéroïde avec un petit bourgeon latéral
Mollusque hôte inter- médiaire	<u>Bulinus</u> (pulmoné)	<u>Planorbis</u> (pulmoné)	<u>Onchomelania</u> (prosobranche)
Hôtes définitifs	Homme (surtout)	Homme et rongeurs	Homme, animaux domestiques, (rongeurs)
Zone du corps atteinte	Système urogénital	Région intestinale	Système artério-veineux
Distribution géographique	Afrique et Moyen-Orient	Afrique et Amérique inter-tropicales	Chine, Japon et Asie du Sud-Ouest

Parmi les 3 espèces, S. mansoni se prête le mieux aux expérimentations du fait que c'est un parasite facile à faire évoluer chez les rongeurs.

1.1.2. CYCLE EVOLUTIF

Les 3 espèces de schistosomes présentent des cycles d'évolution identiques ; seule l'espèce mollusque, hôte intermédiaire, change pour les 3 espèces de schistosomes.

Le cycle peut être résumé comme suit : Après fécondation, les femelles pondent leurs oeufs dans les capillaires sanguins. Plusieurs d'entre eux passent dans la lumière de l'organe creux (vessie ou intestin) et seront éliminés par les urines (S. haematobium) ou les selles (S. mansoni et S. japonicum). Dans l'eau, lorsque les conditions favorables de température, de pH et de concentrations saline et de matière organique se trouvent réunies, l'oeuf éclot et donne naissance à une larve ciliée : le miracidium. Celui-ci va nager vers son hôte intermédiaire et l'infecter. L'infection du mollusque est maximale à 25°C (Anderson et coll., 1982). A la température optimale de 30°C, le parasite passe par plusieurs formes larvaires (sporocyste Iaire et IIaire) pour se transformer en cercaire.

Il existe une multiplication considérable au niveau de chacun des stades larvaires. C'est ainsi que plusieurs milliers de cercaires naissent à partir de chaque mollusque infecté.

Après 20 à 25 jours, les cercaires sont libérées, vont nager à l'aide de leur appendice caudal vers leur hôte définitif par chimiotactisme et vont l'infecter par passage transcutané. Au cours de la pénétration, les larves perdent leur appendice caudal et vont devenir des schistosomules qui seront entraînés dans la circulation sanguine et lymphatique. En l'espace de 3 à 6 jours, les schistosomules arrivent au niveau des poumons, puis gagnent le coeur par les veines pulmonaires. Les parasites vont gagner le foie par l'artère hépatique. C'est dans les plexus veineux hépatiques et mésentériques que se termine la maturation des vers. Selon les espèces de schistosomes, chaque femelle produit 300 à 3500 oeufs par jour (Moore et Sandground, 1956), pendant une durée allant de 5 à 10 ans.

Seul un nombre très réduit de larves (miracidia, cercaires), réussissent à boucler le cycle. La pérennité de l'espèce est assurée par un triple mécanisme compensatoire :

- longévité des vers adultes ;
- fécondité des femelles ;
- multiplication considérable des parasites chez l'hôte intermédiaire.

1.1.3. PONTE ET MATURATION DES OEUFS


Chez les animaux infectés par S. mansoni la ponte commence vers le 30ème jour de l'infection. Les oeufs sont pondus à leur stade immature. Une période de 6 jours est nécessaire pour que l'embryon se développe en miracidium.

Selon leur aspect évolutif et morphologique, les éléments de la ponte sont classés comme suit :

- a) Les oeufs non fertiles, de petite taille, généralement déformés et n'aboutissant pas à la maturation ;
- b) Les oeufs viables peuvent être matures ou immatures. Le processus de maturation a été découpé en 5 stades (Vogel, cité par Pellegrino et coll., 1962). Les oeufs montrant un embryon en évolution sont appelés immatures et correspondent aux 4 premiers stades.

Au stade 1, l'embryon est petit et occupe environ le tiers du diamètre transversal de l'oeuf (PL.A1). Au stade 2, l'embryon dépasse légèrement la moitié de ce diamètre. Au stade 3, l'embryon correspond à environ les deux tiers du diamètre longitudinal. Au stade 4, l'embryon occupe pratiquement la totalité de l'oeuf.

PLANCHE A : Les deux stades extrêmes de la maturation des oeufs

 de S. mansoni.

1 - Un oeuf immature (stade 1) montrant un embryon en développement
(flèche) Gr : 20 x 12,5.

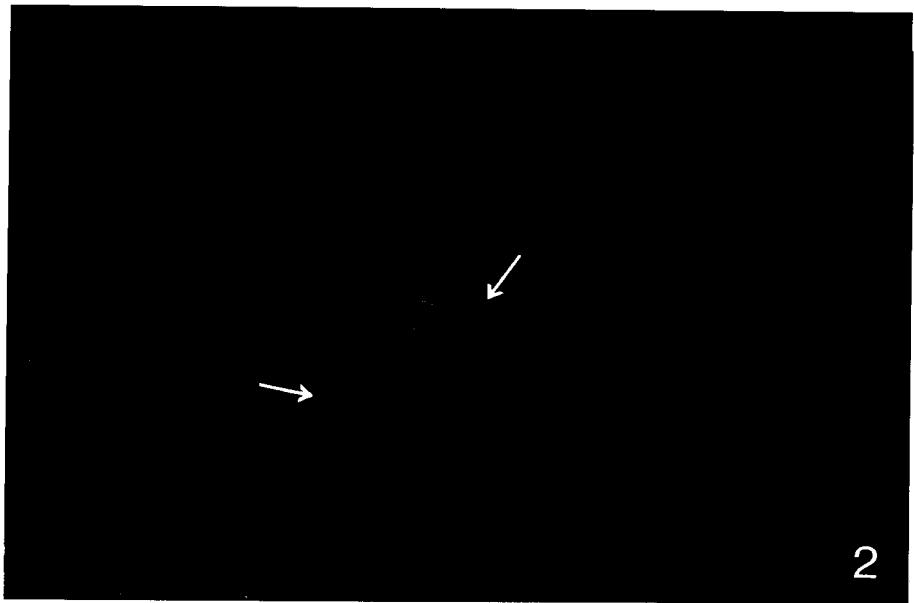
2 - Deux oeufs complètement matures (stade 5) présentant des miracidia
(flèches). Gr : 32 x 12,5.





1

LILLE



2

LILLE

Au terme de leur maturation (stade 5), les miracidia sont complètement développés (PL.A2). Les contractions du miracidium ainsi que les mouvements de ses cils constituent des signes de viabilité de l'oeuf.

c) Les oeufs morts. La mort de l'embryon peut survenir à tous les stades de son développement. Les oeufs deviennent sombres, semi-transparents ou granuleux et l'embryon devenu immobile se rétracte à l'intérieur de la coque.

1.1.4. QUELQUES ASPECTS CLINIQUES ET PATHOLOGIQUES

Au début de la maladie, la pénétration transcutanée des cercaires provoque occasionnellement une dermatite chez les individus infectés.

Plus tard, les parasites (Olveda et coll., 1981) ainsi que leurs oeufs disséminés dans divers organes (foie, intestins et tractus urinaire), induisent par leurs sécrétions des lésions inflammatoires au niveau des sites affectés.

La formation de granulomes autour des oeufs, obture le système porte (Joky et coll., 1977) et le foie se trouve alors mal irrigué. Il en résulte une hypertension portale, conséquence des hépato et spléno-mégalies. Le foie est l'organe le plus atteint par les structures granulomateuses (Weinstock et Boros, 1981).

1.2 .. GRANULOMES

Etant donné l'aspect pathologique majeur de la schistosomiase (Warren, 1982), la formation de granulomes autour des oeufs de schistosomes a été largement étudiée, tant in vivo qu'in vitro.

1.2.1. ETUDE DES GRANULOMES IN VIVO

L'infection des animaux par S. mansoni est caractérisée par une première phase dite aiguë, correspondant à l'individuation complète des granulomes et une deuxième phase chronique au cours de laquelle la structure granulomateuse se désagrège.

1.2.1.1. Formation des granulomes

Ces formations sont le résultat d'une interaction entre différents types de cellules immunocompétentes et les oeufs de schistosomes (Warren et coll., 1967). Le miracidium (embryon développé dans l'oeuf) sécrète des substances antigéniques (Von Lichtenberg et Raslavicius, 1967) dont plusieurs possèdent des propriétés enzymatiques (Kloetzel, 1968). C'est à travers des pores ultramicroscopiques que les produits de sécrétion quittent l'oeuf (Stenger et coll., 1967 ; Race et coll., 1969). Il en résulte un afflux cellulaire vers le lieu de production de l'antigène soluble (SEA). Ceci est le point de départ de la formation des granulomes.

1.2.1.1.1. Spécificité antigénique

Les oeufs matures de S. mansoni injectés par voie intra-veineuse au niveau des poumons de souris, sont seuls capables d'induire une réponse granulomateuse importante en comparaison avec les oeufs d'*Ascaris*, les billes plastiques (Von Lichtenberg, 1962) ou les oeufs de schistosomes immatures (Hang et coll., 1974).

Ces auteurs mettent en évidence l'importance de l'activité sécrétrice des oeufs dans la formation de granulomes. En effet, Boros et coll. en 1970 ont obtenu des structures granulomateuses comparables à celles des oeufs, avec des billes de bentonite préalablement traitées par le SEA.

Brown et coll. en 1977, ont démontré que le produit de sécrétion des oeufs de S. mansoni (SEA) contient au moins 3 antigènes capables d'induire une réponse cellulaire d'hypersensibilité retardée. Auparavant, Pelley et coll. en 1976, en utilisant des techniques radioimmunologiques et de double diffusion d'Ouchterlony, ont détecté 3 fractions antigéniques majeures dans le SEA, sérologiquement actives vis-à-vis des sérums de souris infectées par S. mansoni (MSA₁, MSA₂ et MSA₃). La fraction MSA₂, non retenue par la ConA-Sépharose, serait protéique et les fractions MSA₁ et MSA₃, retenues par la ConA-Sépharose, seraient des glycoprotéines.

Boros et coll. en 1977, se basant sur des techniques de fractionnement du SEA par électrophorèse, isoélectrofocalisation et chromatographie ont montré que les fractions capables d'induire une réponse granulomateuse sont chargées négativement et sont de nature glycoprotéique.

1.2.1.1.2. Type de réaction cellulaire

Oberlin et Weiss en 1977 ont constaté chez les hamsters bilharziens, que le maximum de développement des granulomes au niveau du foie se fait vers la 6ème semaine d'infection. La synthèse accrue des anticorps (anti-SEA) n'apparaît que plus tard (10ème semaine). La formation des granulomes autour des oeufs de schistosomes est donc une réaction cellulaire indépendante des anticorps.

Cellules impliquées

Le traitement de souris par un sérum hétérologue anti-lymphocytaire inhibe la réponse granulomateuse suscitée par la présence des oeufs dans leurs poumons (Domingo et Warren, 1968). Auparavant, en 1967 ces mêmes auteurs ont montré que la thymectomie néonatale réduit considérablement la taille des granulomes dus aux oeufs injectés dans les poumons de souris. Cette opération n'affecte pas la synthèse d'anticorps.

On en conclut donc que les lymphocytes T sont impliqués dans la formation des granulomes.

En effet, les lymphocytes T activés élaborent des molécules biologiquement actives (lymphokines) qui peuvent induire la migration des éosinophiles (James et Colley, 1975) et des cellules phagocytaires. Les macrophages isolés de granulomes formés par des oeufs de S. mansoni expriment le phénotype de surface Ia (Stadecker et coll., 1982) et sont capables de présenter l'antigène à des lymphocytes T (Yamashita et coll., 1977 ; Robinson et coll., 1983).

Les macrophages associés aux granulomes élaborent un facteur (Fibronectine-like) chimiotactique pour les fibroblastes

(Wylter et Postlethwaite, 1983). Wylter et Rosenwasser en 1982 avaient identifié une substance, synthétisée au niveau du granulome, similaire à l'interleukine I (IL1) qui est une monokine dont on connaît la capacité de stimuler la prolifération des fibroblastes et des lymphocytes T (Oppenheim et coll., 1976 ; Gilman et coll., 1983).

Les fibroblastes sont les producteurs du collagène qui confère au granulome une structure compacte (Van Marck et coll., 1980).

Séquence cellulaire

Moore et coll. en 1976, en isolant et dissociant les granulomes de S. mansoni par la pronase et la collagénase, ont constaté que les macrophages, les lymphocytes et les éosinophiles sont les cellules les plus représentées autour des oeufs. Les premières cellules apparaissant autour de l'oeuf sont les macrophages et les lymphocytes.

En 1962, Von Lichtenberg a suivi la progression de la réaction granulomateuse chez des souris saines pendant 256 jours succédant à l'injection des oeufs (S. mansoni) au niveau de leurs poumons. Au 1er jour, il n'observe pas de réaction. Vers le 4ème jour, les macrophages et des lymphocytes viennent adhérer à l'oeuf. A partir du 8ème jour, la réaction cellulaire s'amplifie en faisant intervenir des cellules épithélioïdes, des éosinophiles et occasionnellement des cellules multinucléaires géantes. La réaction granulomateuse atteint son maximum de développement au 16ème jour et diminue d'importance par la suite.

1.2.1.1.3. Forme d'hypersensibilité retardée

Nous avons vu précédemment que la formation de granulomes autour des oeufs de S. mansoni est une réaction inflammatoire :

- spécifique de l'antigène (SEA) ;
- à médiation cellulaire indépendante de l'anticorps ;
- dont le maximum de développement survient après une durée supérieure à 12 heures.

D'autre part, le transfert de sensibilité des souris infectées (8ème semaine) aux souris saines traitées par les oeufs, est réalisable par les cellules issues de la rate ou des ganglions lymphatiques, et non par les sérums (Warren et coll., 1967).

La réaction granulomateuse est donc une forme d'hypersensibilité retardée.

1.2.1.2. Régulation de la réponse granulomateuse

Au cours de l'infection des animaux par les schistosomes, nous assistons à une modulation spontanée de la formation des granulomes qui survient lors de la phase chronique de la maladie (Boros et coll., 1975). Des travaux relatifs à la régulation de la réponse granulomateuse ont montré qu'elle est gouvernée essentiellement par une activité suppressive des lymphocytes T (Colley, 1976 ; Chensue et coll., 1980 ; Colley, 1981) et aussi par la synthèse d'anticorps (Pelley et Warren, 1978).

1.2.1.2.1. Etude cellulaire

Le transfert passif de cellules de la rate ou du thymus de souris infectées par S. mansoni depuis 20 semaines à des animaux syngéniques à leur 8ème semaine d'infection, provoque une diminution importante de la taille des granulomes chez les individus receveurs (Chensue et Boros, 1979). Il s'est avéré d'après ces mêmes auteurs, que le transfert de l'immunomodulation est spécifique à l'antigène soluble des oeufs de S. mansoni. C'est la fraction protéique de l'antigène (non retenue par la ConA-Sépharose) qui induit cette activité cellulaire immunomodulatrice (Rocklin et coll., 1981).

Le traitement préalable des cellules transférées par un anticorps dirigé contre les lymphocytes T en présence du complément inverse l'immunomodulation (Weinstock et Boros, 1981). D'autre part, l'utilisation des lymphocytes T et B lors des expériences de transfert, prouve que seuls les lymphocytes T exercent un effet modulateur sur les granulomes (Chensue et Boros, 1979).

Des analyses plus détaillées du phénomène attribuent l'activité immunomodulatrice des lymphocytes T suppresseurs (TS) à la production de molécules solubles (El Naggar et Colley, 1982), capables d'inhiber la synthèse de lymphokines (macrophage-inhibiting factor, MIF) dont on a montré le rôle activateur de la formation des granulomes (Chensue et coll., 1983).

Les lymphocytes T dotés de capacités immunorégulatrices (TS) expriment le phénotype de surface Ia⁺ (Chensue et Boros, 1979), IJ⁺ (Green et Colley, 1981). Ils sont sensibles à la cyclophosphamide (Colley et coll., 1979) considérée comme un inhibiteur des lymphocytes T suppresseurs.

1.2.1.2.2. Etude humorale

Les granulomes formés autour des oeufs de S. mansoni au niveau du foie de souris, isolés à différents moments de leur infection, puis cultivés in vitro, produisent des immunoglobulines, en particulier celles appartenant à la classe des IgG (Boros et coll., 1982). La production maximale des IgG se situe vers la 20ème semaine d'infection. Elles semblent donc être impliquées dans la modulation de la réponse granulomateuse par complexation des antigènes de l'oeuf.

Chez S. japonicum, Old et coll. en 1982 ont réussi à réduire la réponse granulomateuse chez des souris infectées depuis 8 semaines en leur injectant par voie intraveineuse des sérums de souris syngéniques qui ont atteint le stade chronique de la maladie. L'effet modulateur observé est dû à la présence de la molécule d'IgG₁ dans le sérum sans qu'une explication de leur activité soit apportée avec précision. Néanmoins, la complexation des antigènes par les anticorps au voisinage des oeufs (Von Lichtenberg et coll., 1966) pourrait être une explication de ce phénomène immunomodulateur.

1.2.2. ETUDE DES GRANULOMES IN VITRO

L'étude de la réaction granulomateuse in vitro permet d'étendre les connaissances acquises in vivo sur les processus d'induction et de modulation des granulomes (Phillips et coll., 1980).

1.2.2.1. Formation des granulomes in vitro

La formation de granulomes in vitro a été définie par Doughty et Phillips en 1982a. Les cellules spléniques de souris infectées par S. mansoni sont mises en présence d'oeufs pondus par les vers adultes dans le milieu de culture. On peut quantifier la réaction granulomateuse par le calcul de l'indice granulométrique (IG), tenant compte de l'intensité de la réaction des cellules vis-à-vis des oeufs. L'évolution de l'IG au cours de l'infection est en corrélation étroite avec le développement des granulomes au niveau du foie.

Bently et coll. en 1982 décrivent la séquence cellulaire au cours de la formation des granulomes in vitro. Les premières cellules venant adhérer aux oeufs sont des macrophages qui seraient suivis par les lymphocytes. Ensuite la réaction cellulaire s'amplifie en faisant intervenir en plus des neutrophiles, des éosinophiles et des fibroblastes.

1.2.2.2. Modulation de la réaction granulomateuse in vitro

Le mélange, dans les cultures de cellules spléniques de souris syngéniques, en phase chronique (50 %) et phase aiguë (50 %) de la maladie, réduit l'IG comparativement aux cultures utilisant uniquement des cellules spléniques des animaux en phase aiguë. Il est donc possible de transférer la modulation des granulomes in vitro par les cellules de la rate prélevées plus tard au cours de l'infection. Par sélection négative des

différentes populations de lymphocytes T, en utilisant des anticorps spécifiques et du complément, Doughty et Phillips en 1982b ont montré que le processus de modulation de la réaction granulomateuse in vitro fait intervenir deux sous-populations de lymphocytes T suppresseurs :

- une première exprimant le phénotype de surface Lyt-1⁻2⁺ agissant directement ;
- une deuxième Lyt-1⁺2⁻, Qa-1⁺ exerçant son activité en retour.

1.3. LE MACROPHAGE

L'importance des macrophages dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire a surtout été démontrée in vitro (Pierce, 1969).

In vivo, les cellules de type macrophagique sont généralement associées aux processus inflammatoires (type granulome) en réponse à des invasions étrangères à l'organisme. Ils sont indispensables au développement de la réaction granulomateuse (Boros et Warren, 1971).

Vue l'importance des macrophages pour la réaction immunitaire qui fait l'objet de notre étude (granulome), nous allons rappeler quelques caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de cette cellule.

1.3.1. ORIGINE

Les cellules macrophagiques impliquées dans la réponse immunitaire appartiennent à la lignée monocyttaire d'origine médullaire (Van Furth, 1982). Selon cet auteur, les cellules souches, dans la moëlle osseuse, se transforment en monoblastes et promonocytes ; ceux-ci se divisent et donnent naissance à des monocytes. Le circuit sanguin transporte les monocytes qui vont migrer vers les divers tissus et cavités du corps. Dans les tissus ils se différencient en macrophages, qui sont les cellules fonctionnelles de la lignée :

- Histiocytes du tissu conjonctif ;
- Macrophages alvéolaires des poumons ;
- Macrophages des séreuses ;
- Macrophages fixes et mobiles, spléniques et ganglionnaires ;
- Macrophages de la moëlle osseuse.

La maintenance de la population macrophagique dépend surtout du flux monocyttaire et, en faibles proportions, de la production locale.

1.3.2. CARACTERISTIQUES

1.3.2.1. Morphologie

Les macrophages présentent un gros noyau réniforme (rapport nucléocytoplasmique < 1). Ils développent d'importants prolongements cytoplasmiques (voile hyaloplasmique). Le cytoplasme est riche en mitochondries, ribosomes et lysosomes (vacuoles d'endocytose) contenant des enzymes lytiques (hydrolases acides, protéases, peroxydases et catalases).

La présence de microfilaments et de microtubules près de la membrane, facilite la mobilité des cellules et aussi la captation des particules étrangères.

1.3.2.2. L'adhérence et la migration

Les macrophages ont la propriété de se fixer aux supports solides. Ils sont dotés de grandes capacités de déplacement.

L'adhérence et la migration sont deux propriétés associées en ce sens qu'elles sont le résultat du phénomène d'étalement des macrophages. La mobilité des macrophages est en relation avec la forme en voile du hyaloplasme et aussi avec la présence de microfilaments et de microtubules.

1.3.2.3. La phagocytose

La fonction de phagocytose est indispensable au rôle immunologique des macrophages. La membrane du macrophage possède des sites récepteurs intervenant dans l'induction de ses activités métaboliques :

- sites récepteurs du composant C3b du complément ;
- sites récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines (IgG₁ et 3' et IgE) ;
- sites récepteurs des lymphokines (MIF, MAF) ;
- sites récepteurs pour les produits des gènes de la région I .

La phagocytose est précédée par une fixation membranaire à un ou plusieurs de ces sites. La partie de la membrane en contact avec la particule s'invagine en une vésicule endocytaire qui s'unit à un lysosome. La destruction de la particule se fait sous l'action des enzymes et la vacuole s'ouvre à la membrane pour déverser son contenu.

1.3.3. LES MACROPHAGES, CELLULES EFFECTRICES

Les fonctions de phagocytose et de cytotoxicité développées par les macrophages leur permettent de contribuer pour une bonne part à l'immunité naturelle.

Les macrophages ont spontanément la capacité de détruire un certain nombre de microorganismes, essentiellement bactériens ou fongiques. Cependant, dans la plupart des cas faisant intervenir des agents infectieux ou pathogènes (parasites endocellulaires, etc...), l'efficacité du macrophage nécessite son activation. Celle-ci se fait par le biais des récepteurs de surface, en réponse aux sécrétions des lymphocytes (lymphokines) (Fidler et coll., 1976) ou aux anticorps (Capron A. et coll., 1975 ; Dessaint et Capron A., 1980).

Les macrophages péritonéaux de souris saines, incubés en présence des produits de sécrétion des lymphocytes stimulés par la ConA (macrophage-activating factor, MAF), deviennent cytotoxiques pour les schistosomules (Bout et coll., 1981).

Les macrophages peuvent détruire certaines cibles (parasites entre autres) en présence d'anticorps anti-cellules-cibles ; c'est le système de cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC). La destruction des cellules cibles est réalisée par contact direct avec celles-ci ou par la libération de substances cytolytiques. Le mécanisme ADCC fait intervenir des anticorps appartenant à la classe IgG qui se fixent sur la cible (opsonisants) ou bien à la classe IgE qui s'accrochent sur la cellule effectrice (cytophiles).

En effet, les travaux de Capron et coll. (1977) et Joseph et coll. (1978) ont montré que les macrophages péritonéaux de rats ou du babouin et les monocytes humains ou du babouin, incubés avec du sérum d'individus infestés par S. mansoni, deviennent cytotoxiques pour la larve du parasite (schistosomule).

L'activation du macrophage par l'IgE se produit dans d'autres situations pathologiques que les parasitoses : il a été démontré (Joseph et Tonnel, 1980) que les macrophages alvéolaires humains réagissent rapidement à la présence de l'allergène spécifique des IgE qu'ils portent à leur surface, en sécrétant des médiateurs chimiques dont certains jouent un rôle dans la modulation des processus allergiques.

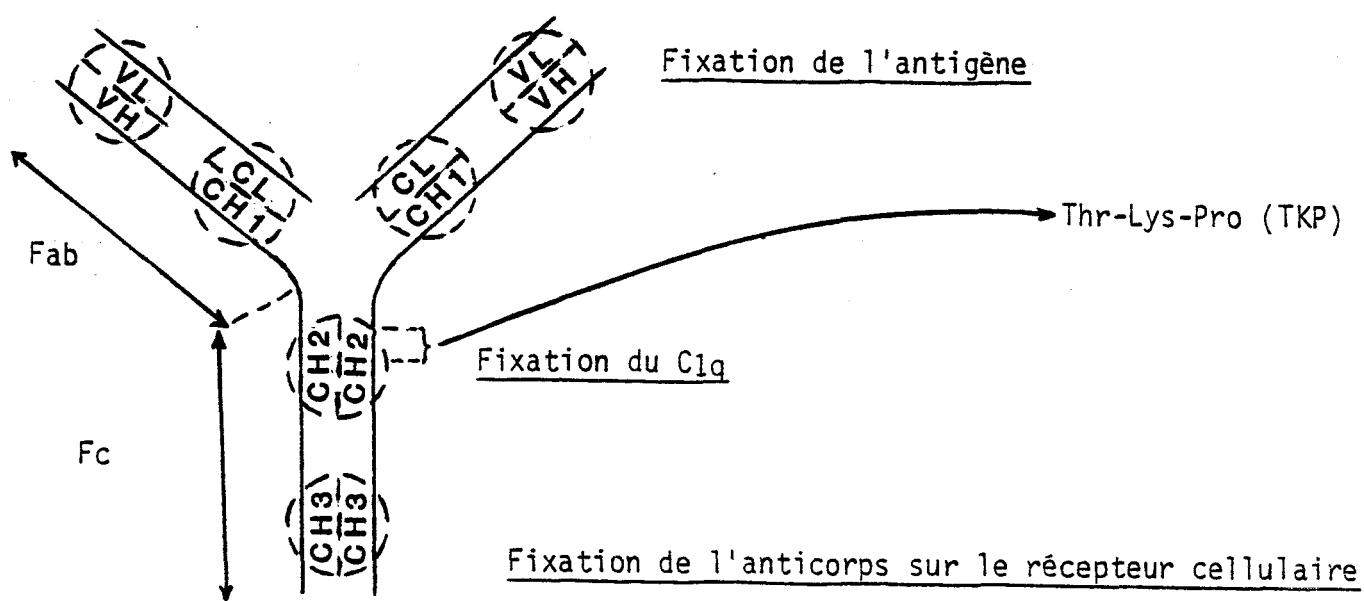
Dans la schistosomiase, un deuxième mécanisme classique d'ADCC a été décrit avec des macrophages et des IgG capables de se fixer sur le parasite et d'entraîner sa destruction par les macrophages (Perez et Smithers, 1977).

1.3.4. EFFET DU TRIPEPTIDE THR-LYS-PRO SUR LES DIFFERENTES FONCTIONS DU MACROPHAGE

Les IgG se fixent à la surface du schistosomule par leur fragment Fc, au niveau d'un récepteur spécifique mis en évidence par la technique de rosette (Torpier et coll., 1979). Auriault et coll. (1981a) ont pu mettre en évidence qu'après leur fixation, les IgG sont clivées par des protéases sécrétées par les schistosomules. Ce clivage a pour conséquence de libérer des peptides d'IgG dans le milieu de culture tout en maintenant en place le fragment Fc de l'anticorps sur la membrane du schistosomule. Deux des enzymes responsables du clivage ont été identifiées comme étant une métalloaminopeptidase et une protéase du groupe sérine.

La conséquence biologique de ce mécanisme tient au fait que les peptides d'IgG ainsi formés exercent une activité modulatrice de diverses fonctions effectrices et métaboliques du macrophage. En effet, l'incubation des macrophages en présence des peptides provenant de l'hydrolyse de l'IgG par les enzymes parasitaires, inhibe les fonctions effectrices dépendant de l'IgE des macrophages vis-à-vis des schistosomules. Il semble que plus généralement les fonctions phagocytaires des macrophages soient inhibées par les peptides d'IgG, notamment la libération d'enzymes lysosomiales (β -glucuronidase), l'incorporation de la glucosamine et la phagocytose des billes de latex (Auriault et coll., 1980 ; Auriault et coll., 1981b).

La région CH₂ (ou second domaine constant) de la molécule d'IgG est une cible électorale pour l'hydrolyse protéasique. Elle permet aussi la fixation du premier composant du complément (C1q). Ces arguments, parmi beaucoup d'autres, ont permis de penser que les peptides libérés dans l'environnement du schistosomule proviennent de la région CH₂ de l'IgG (voir schéma ci-dessous).



Anticorps IgG

En effet, sur cette base, Auriault et coll. (1983) ont identifié et synthétisé certains peptides dont le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) capable à lui seul de reproduire l'effet inhibiteur obtenu par l'hydrolysat total de l'IgG. Effectivement, la libération de β -glucuronidase ou d'anion superoxyde par les macrophages stimulés par le système IgE-anti-IgE ainsi que la migration de ces cellules, sont inhibées après traitement des macrophages par le TKP (Auriault et coll., 1983). De plus, il semble que les macrophages incubés avec le MAF (macrophage-activating factor) ou l'IgE-anti-IgE, sont maintenus en état d'inactivation en présence du TKP. D'autre part, il a été récemment démontré que ce tripeptide inhibe la synthèse de l'Interleukine I (IL₁) par les macrophages (communication personnelle). Compte-tenu du fait que les macrophages jouent un rôle inducteur dans la formation des granulomes, notamment par la synthèse de monokines (IL₁), le TKP constitue donc un bon candidat pour l'étude de la modulation des granulomes qui fait l'objet de notre travail.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. BILHARZIOSE EXPERIMENTALE A SCHISTOSOMA MANSONI CHEZ LA SOURIS

2.1.1. Souches de souris utilisées

Les expérimentations ont été faites sur des souris mâles, pesant entre 20 et 24 g, âgées de 7 à 8 semaines.

Deux souches de souris syngéniques ont été utilisées, C57 B1/6 et CBA/J (BOM., Danemark). Pour éviter les perturbations physiologiques que subissent les animaux après le voyage, les souris sont gardées au laboratoire une à deux semaines avant leur utilisation.

2.1.2. Maintien du cycle parasitaire au laboratoire

La souche de Schistosoma mansoni utilisée au laboratoire est d'origine portoricaine.

Le mollusque, hôte intermédiaire, utilisé est Biomphalaria glabrata, variété albinos. L'hôte définitif est le hamster doré, Mesocricetus auratus. Les oeufs sont extraits du foie ou par grattage des intestins grêles, des hamsters à leur 40ème jour d'infection. Mis sur une plaque chauffante (30°C), exposés à la lumière, les oeufs éclosent en 15 à 30 minutes et libèrent des miracidia.

Chaque mollusque est infesté par environ 10 miracidia. Après la maturation des sporocytes II (vers 21ème jour), les mollusques sont exposés à la lumière, à une température de 30°C pour l'obtention

des furco-cercaires. Chaque hamster est infesté par baignade dans l'eau désionisée contenant environ 900 furco-cercaires.

Les furco-cercaires après pénétration transcutanée se transforment en schistosomules qui atteignent le stade adulte en 35 à 40 jours. La ponte débute alors ; les oeufs se logent dans le foie et les intestins du hamster infecté.

2.1.3. Infestation des souris

Nous utilisons la méthode décrite par Smithers et Terry en 1965. Chaque souris, rasée préalablement au niveau de l'abdomen, est anesthésiée par injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique ($55 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ de poids). Un cylindre métallique d'un centimètre de diamètre est appliqué sur l'abdomen. Le cylindre tenu immobile par une bande adhésive, reçoit 0,2 ml (environ 30 furco-cercaires) d'une solution aqueuse de furco-cercaires, fraîchement préparée et numérotée auparavant.

La pénétration transcutanée des furco-cercaires s'effectue dans l'obscurité pendant 30 min.

2.2. PREPARATION DE L'ANTIGENE SOLUBLE DES OEUFS DE S. MANSONI

2.2.1. Obtention des oeufs

Elle est réalisée selon la technique de Boros et Warren (1970). Les oeufs sont récoltés à partir des foies des hamsters infectés par S. mansoni depuis 40 j. Les foies sont broyés dans une solution physiologique hypertonique (pour empêcher l'éclosion des oeufs). La récupération des oeufs se fait par filtration du broyat (billes

de verre, tamis) ou en utilisant un gradient de gomme arabique. Après lavage, les oeufs sont stockés à -30°C .

2.2.2. Préparation de l'antigène soluble des oeufs

L'extraction de l'antigène soluble des oeufs (SEA) est réalisée selon la procédure de Boros et Warren (1970). De légères modifications ont été apportées à cette technique (M. Damonville, communication personnelle). Les oeufs décongelés sont dilués (10^6 x ml^{-1}) avec du tampon phosphate (0,01 M phosphate sodique, 0,5 M NaCl, pH 6,8). L'homogénéisation des oeufs se fait par plusieurs passages (15 au minimum) sur l'X-press (BIOX, LKB, Paris, France). Le surnageant des extraits des oeufs est dialysé à 4°C pendant 24 h contre de l'eau distillée, congelé et lyophilisé. Le contenu en protéines de l'extrait antigénique soluble est déterminé par la méthode de Lowry et coll. (1951) (généralement 50 % de protéines).

2.3. TECHNIQUE DE MIGRATION CELLULAIRE

Nous avons utilisé la méthode décrite par Falk et coll. (1980). C'est une technique particulièrement rapide pour tester l'effet chimiotactique de diverses substances vis-à-vis de différents types cellulaires.

2.3.1. Récupération des macrophages péritonéaux

Un lavage péritonéal est effectué pour chaque souris en injectant 10 ml du milieu MEM (GIBCO) additionné de 10 % de sérum de

veau foetal décomplémenté par un chauffage de 30 min à 56°C (SVFD) et de $12,5 \text{ UI} \times \text{ml}^{-1}$ de calciparine (Lab. CHOAY, Paris, France).

Le produit de lavage péritonéal de plusieurs souris est centrifugé pendant 10 min à 500 g. Les cellules sont mises en suspension dans du milieu et réparties dans des proportions convenables, dans des boîtes de Pétri de 3 cm de diamètre préalablement traitées par du sérum de veau foetal décomplémenté. L'incubation se fait pendant 2 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2 et 95 % d'air (Joseph et coll., 1977). Les cellules non adhérentes sont éliminées par plusieurs lavages avec du MEM seul. Le tapis de cellules adhérentes est traité pendant 30 min avec le tripeptide Thr-Lys-Pro en solution dans du MEM à 10 % de SVFD. Les cellules adhérentes sont décrochées au froid par aspiration et refoulement du milieu MEM seul (Auriault et coll., 1983).

Les cellules sont lavées et mises en suspension dans du MEM à 10 % de sérum de veau foetal chauffé ($1 \text{ à } 1,5 \cdot 10^6 \text{ cellules} \times \text{ml}^{-1}$).

N.B. : MEM = Eagles minimum medium

2.3.2. Facteurs chimiotactiques

Pour toutes les expériences nous avons employé de l'antigène soluble des oeufs de Schistosoma mansoni. Des aliquots de différentes concentrations, dans du MEM à 10 % de SVFD sont préparés et conservés à -20°C.

Comme témoin positif, nous avons utilisé un composant du complément (C5a) obtenu par activation du sérum de rat sain par le zymozan ($25 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$). Le sérum est alors incubé pendant 1 h à 37°C avec des agitations toutes les 5 min. Après centrifugation (500 g, 10 min)

le surnageant est récupéré, puis passé à travers un filtre millipore ($0,2 \mu\text{m}$). Le sérum activé est dilué 10 fois par le milieu MEM à 10 % de SVFD et stocké à -20°C . La dilution au 1/10ème correspond au pic de chimiotactisme pour les monocytes (Falk et coll., 1980).

2.3.3. Description des chambres de migration

Les chambres de migration sont composées de 48 puits. Elles sont formées de 2 parties, séparées par un joint en silicone permettant leur application l'une sur l'autre, de manière à assurer l'étanchéité. Un système de 6 boulons permet de tenir les deux plaques ensemble.

Un filtre de polycarbonate poreux (diamètre des pores : $5 \mu\text{m}$) se met entre le joint et la plaque inférieure. Les puits ont des bordures légèrement relevées pour éviter le mélange des solutions à tester. La surface du filtre utilisée par chaque puits est de 8 mm^2 .

2.3.4. Test de migration cellulaire

Les puits sont remplis par la solution chimiotactique ($25 \mu\text{l}$). Le filtre est déposé délicatement sur la plaque inférieure. Le joint et la partie supérieure sont appliqués au dessus. Chaque puits supérieur reçoit environ $45 \mu\text{l}$ de la suspension cellulaire (1 à $1,5 \times 10^6$ cellules $\times \text{ml}^{-1}$). La chambre est alors incubée pendant 2 à 3 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO_2 et 95 % d'air. A la fin de l'incubation, les cellules n'ayant pas migrées sont enlevées en frottant légèrement la partie supérieure du filtre contre

un racloir en caoutchouc. Le frottement est répété 2 à 3 fois ; il succède toujours à un affleurement du filtre dans du tampon phosphate (PBS 0,01 M).

Le filtre est coloré au GIEMSA.

L'appréciation de la migration cellulaire se fait par l'examen des sections du filtre, correspondant aux puits utilisés, en microscopie photonique.

Des moyennes du nombre de cellules par champ microscopique (Gr: 10 x 12,5 ou 50 x 12,5) sont effectuées pour chaque type expérimental. Toutes les expériences sont faites au moins en 3 exemplaires.

2.4. METHODOLOGIE DE LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO

Le modèle d'étude in vitro de la formation des granulomes a été décrit très récemment par Doughty et coll. (1982a). Nous avons introduit cette technique au niveau du laboratoire avec de très légères modifications.

2.4.1. Milieu de culture

Le milieu de culture consiste en du RPMI 1640 (GIBCO) additionné d'antibiotiques (pénicilline G100 unités.ml⁻¹ ; sulfate de streptomycine 50 µg.ml⁻¹), 0,1 % de glucose, de 2-mercaptoéthanol (5x10⁻⁵M), et de 20 % de sérum de veau foetal inactivé par chauffage 30 min à 56°C.

2.4.2. Préparation des globules rouges

Les prélèvements sanguins sont réalisés dans des conditions stériles, par ponction au niveau du sinus rétro-orbital de souris saines (mêmes souches que les donneurs de cellules). L'échantillon de sang est mis en suspension dans du milieu de culture hépariné. Les globules rouges sont obtenus par centrifugation 10 min à 500 g. Les cellules sont lavées deux fois par le milieu de culture et additionnées à raison de 10^8 cellules par flacon.

Les globules rouges semblent permettre une meilleure viabilité des parasites in vitro et semblent activer la maturation des oeufs.

2.4.3. Culture des vers adultes

Les couples de vers adultes sont extraits aseptiquement de la veine-porte des hamsters infectés depuis 40 jours (1000 Furco-cercaires par hamster). Les parasites sont lavés 2 ou 3 fois par le milieu de culture. Les vers sont mis par groupes de 3 couples dans des flacons de 25 cm^2 de surface ayant un fond quadrillé. Chaque flacon contient 5 ml de milieu de culture additionné de 10^8 globules rouges. La présence du sérum de veau foetal et des hématies semble nécessaire pour assurer la survie des parasites et de la maturation des oeufs. Les cultures de vers sont maintenues à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 et 95 % d'air. Pour chaque flacon un renouvellement de 2 ml du milieu de culture est fait tous les 3 jours.

2.4.4. Suspensions cellulaires

2.4.4.1. Cellules spléniques totales

Les rates sont obtenues stérilement à partir de souris infectées par S. mansoni ou saines comme contrôle et mises dans une boîte de Pétri (6 cm de diamètre) contenant du milieu de culture. Elles sont écrasées par le piston d'une seringue en plastique sur un morceau de tissu Blutex (Tripette et Renaud, France).

Les cellules sont lavées par centrifugation 10 min. à 500 g. Le culot est pris dans 1 ml de milieu. Les cellules viables sont numérées à l'aide d'une cellule de THOMA par le test d'exclusion du Bleu Trypan en solution à 0,02 % (en tampon véronal, pH 8,7).

Vers le 6^{ème} jour de culture des parasites, 10^7 cellules sont additionnées à chaque flacon.

2.4.4.2. Prélèvement des macrophages de la suspension de cellules spléniques

Les cellules spléniques sont mises en suspension dans 20 ml de milieu de culture à raison de 20×10^6 cellules $\times \text{ml}^{-1}$. La suspension cellulaire est placée dans un flacon de culture en plastique de 75 cm^2 . Les flacons sont incubés à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 pendant 2 h. Les cellules non adhérentes sont récupérées et analysées pour leur teneur en macrophages par coloration au GIEMSA.

2.4.4.3. Récupération des macrophages péritonéaux ou spléniques

Elle se fait suivant la procédure décrite dans le paragraphe précédent sur la migration cellulaire (2.3.1.). Dans ce cas, nous utilisons le milieu RPMI 1640.

2.4.5. Evaluation de la formation des granulomes in vitro

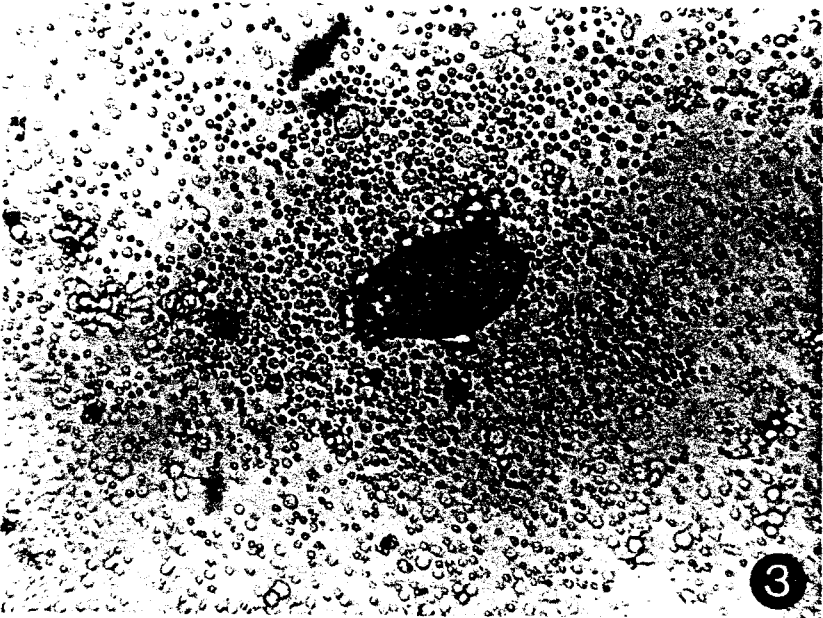
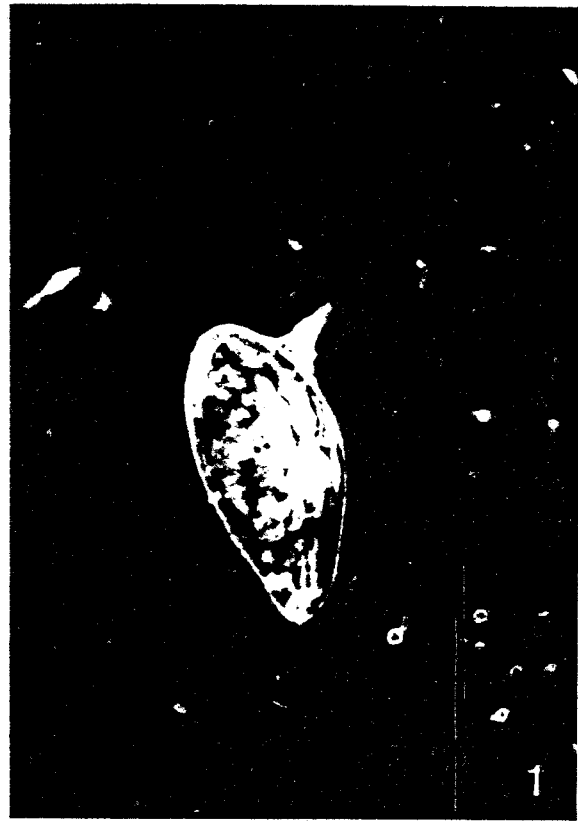
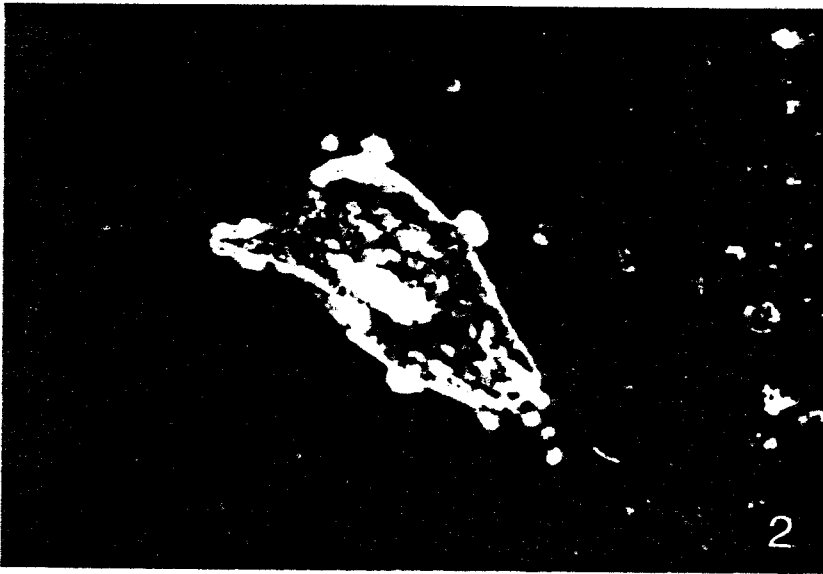
3 ou 6 jours après l'adjonction des cellules, les cultures sont examinées au microscope photonique. Les réactions cellules-oeufs sont classées selon des critères déterminés. La formation des granulomes est alors découpée en 5 stades selon le nombre de cellules au contact de l'oeuf :

- Stade 1 : Oeuf isolé (PL.B₁) ;
- Stade 2 : Une ou plusieurs cellules adhérentes à l'oeuf (PL.B₂) ;
- Stade 3 : Une ou plusieurs cellules montrant des changements morphologiques de transformation lymphoblastique, immédiatement au voisinage ou directement au contact de l'oeuf. Une couronne de migration de cellules mononucléées se forme autour de l'oeuf (PL.B₃) ;
- Stade 4 : une couche de cellules adhérentes à l'oeuf avec un accroissement du phénomène de migration cellulaire (PL.B₄) ;
- Stade 5 : Plusieurs couches cellulaires autour de l'oeuf accompagnées par des migrations cellulaires (PL.B₅).

100 réactions sont déterminées pour chaque flacon.

PLANCHE B : Etapes de la formation des granulomes bilharziens in vitro :
les oeufs pondus par les schistosomes adultes sont mis en
culture avec des cellules spléniques de souris CBA/J
infectées par S. mansoni.

- 1 - Un oeuf sans cellules à son contact ; stade 1 du granulome.
Gr : 40 x 12,5
- 2 - Quelques cellules adhérentes à la surface de l'oeuf ; stade 2
du granulome. Gr : 40 x 12,5.
- 3 - Une couronne de cellules en migration autour de l'oeuf ; stade
3 du granulome. Gr : 20 x 12,5.
- 4 - Un oeuf entouré d'une couche de cellules ; stade 4 du granulome.
Gr : 20 x 12,5.
- 5 - Un granulome complètement développé (stade 5) avec plusieurs
couches de cellules entourant l'oeuf. Gr : 20 x 12,5.



BUS
LILLE

2.4.6. Analyse des données

Les groupes expérimentaux sont composés de 3 exemplaires : 100 déterminations sont effectuées au niveau de chaque flacon. Le parcours des flacons se fait toujours de la même manière. Le nombre de chaque type de réaction est multiplié par l'indice correspondant (de 1 à 5). Le total est calculé pour chaque flacon. Le résultat est divisé par 100 pour avoir l'indice de la réaction moyenne pour chaque culture. Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne des indices des 3 exemplaires nommée "Indice granulométrique" (IG).

$$IG = \sum_{S=1}^5 \frac{N_S \times S}{100}$$

N : nombre de réactions au stade S.

S : numéro du stade (1 à 5).

2.5. LA SYNTHÈSE BIOCHIMIQUE DES PEPTIDES

Les peptides de la molécule d'IgG que nous avons utilisés ont été synthétisés biochimiquement par le Professeur Tartar à la Faculté de Pharmacie de Lille. Il utilise un appareil Beckman automatisé 990B (Auriault et coll., 1983). Les peptides bruts sont purifiés par filtration (G_{10} , Pharmacia) suivie d'une chromatographie préparative en phase inverse (Labor. C_8 , Merck). Les peptides purifiés sont contrôlés par chromatographie HPLC analytique. La séquence en acides aminés est effectuée comme contrôle après chaque synthèse.

CHAPITRE 3

R É S U L T A T S

3.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE FORMATION DE GRANULOMES IN VITRO

3.1.1. LA PONTE DES OEUFS IN VITRO PAR LES SCHISTOSOMES ADULTES (SCHISTOSOMA MANSONI)

3.1.1.1. Cinétique de l'oviposition

Pour la formation des granulomes in vitro, les cellules de souris sont mises en présence des oeufs pondus in situ par les parasites. La réaction granulomateuse est surtout due aux sécrétions antigéniques de l'oeuf qui dépendent du degré d'évolution de l'embryon (maturation). Afin de mieux connaître l'état de maturation des oeufs au cours de notre expérimentation (granulomes in vitro), nous avons suivi la progression de l'oviposition et l'évolution de ses éléments pendant 14 jours de culture des schistosomes adultes.

Les vers sont prélevés stérilement dans la veine porte des hamsters 40 jours après leur infection. Ils sont mis en culture (RPMI 20 % SVFD...) par groupe de deux couples par flacon en présence de 10^8 globules rouges de souris CBA/J mâles non infectées.

Des comptages d'oeufs sont effectués tous les deux jours. Seuls les oeufs matures sont pris en considération pour les expériences de granulomes in vitro ; c'est pourquoi nous avons distingué les oeufs matures des oeufs immatures, morts et non fertiles.

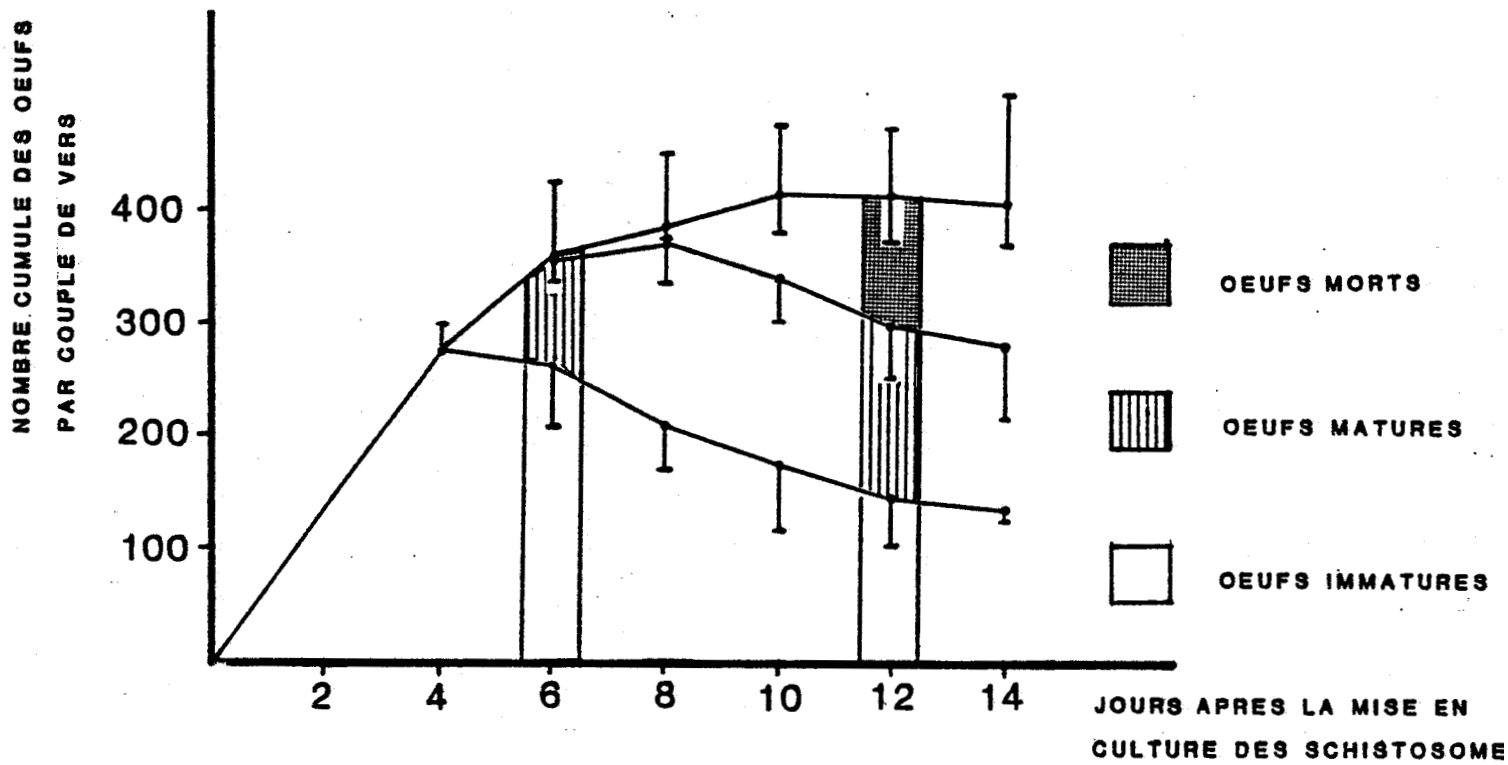


Fig. 1 : Cinétique de la ponte des oeufs *in vitro* par les schistosomes adultes en présence de 10^8 globules rouges dans 5 ml de milieu de culture.



La figure 1 représente le nombre cumulé des oeufs immatures, matures et morts, pondus par couple de vers au cours des 14 jours de culture.

La ponte des oeufs augmente uniformément pendant les 6 premiers jours ; puis ralentit avant d'atteindre un maximum d'environ 400 oeufs par couple entre le 9ème et le 14ème jour. Nous avons observé que les oeufs pondus après le 6ème jour sont de petite taille et n'aboutissent pas à maturité. Au 6ème jour 73 % d'oeufs sont immatures, 25 % matures et 2 % morts ; au 12ème jour, 36 % seulement sont immatures, 37 % matures et 27 % morts.

3.1.1.2. Effet des vers et des globules rouges sur l'oviposition

Afin d'améliorer, éventuellement, nos conditions expérimentales, nous avons voulu rendre compte de l'importance des globules rouges et des vers dans le processus de ponte et de maturation des oeufs in vitro.

3.1.1.2.1. Intérêt des globules rouges pour les cultures de schistosomes

Deux couples de schistosomes adultes sont mis en culture in vitro selon le protocole décrit précédemment. La figure 2 représente le nombre cumulé des oeufs immatures, matures et morts par couple de vers au 6ème et 12ème jour de culture ; ces jours correspondent

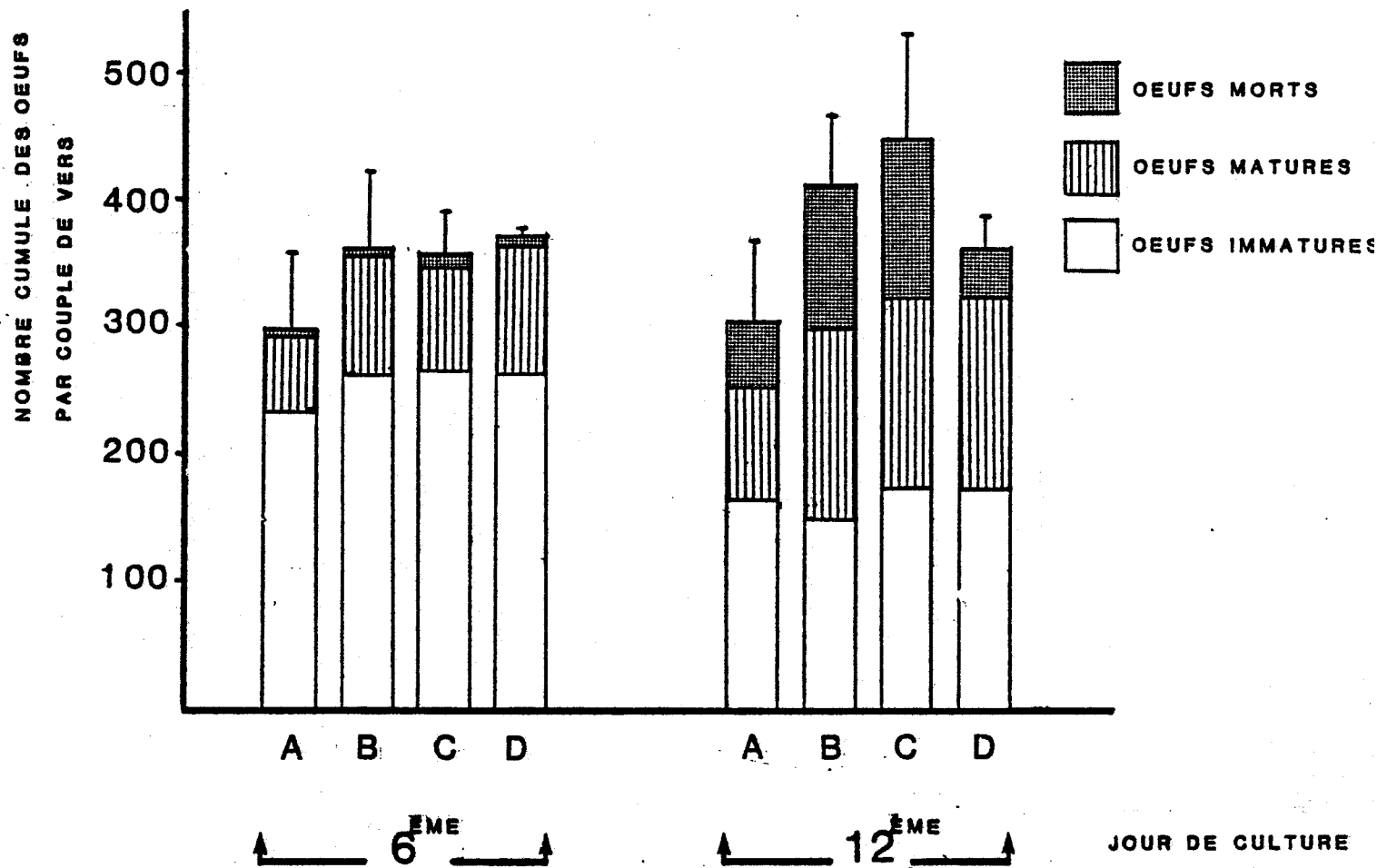


Fig. 2 : Effet des globules rouges sur la ponte et la maturation des oeufs in vitro.

- A. Cultures sans globules rouges.
- B. Cultures contenant 10^8 globules rouges
- C. Cultures contenant $2 \cdot 10^8$ globules rouges
- D. Cultures en présence d'un lysat filtré de globules rouges.

respectivement à l'addition des cellules de rate et à la lecture de l'indice granulométrique dans les expériences de formation des granulomes in vitro.

Les expériences sont réalisées en l'absence de globules rouges ou en présence, soit de 10^8 et 2.10^8 hématies, soit d'un lysat de ces cellules. La comparaison des taux d'oeufs pondus entre les différents types expérimentaux, au 6ème et 12ème jour, montre que les globules rouges ou leur contenu cellulaire, n'exercent pas d'effet significatif sur l'oviposition. L'absence de globules rouges n'aurait pas de retentissement significatif sur le nombre d'oeufs matures viables présents dans les cultures. Si l'on tient compte des oeufs éclatés, nous pouvons dire que les hématies semblent favoriser le phénomène de maturation des oeufs, les rendant ainsi plus exposés à l'éclosion.

3.1.1.2.2. Effet des vers sur l'oviposition et la maturation des oeufs

Les parasites sont mis en culture dans 5ml de milieu (cf "Matériel et Méthodes") en présence de 10^8 globules rouges. La figure 3 représente l'action des vers, mis en culture par groupe de 2 femelles, ou 2, 3, 5 et 10 couples, sur la ponte et la maturation des oeufs. Pour chaque cas expérimental, nous avons représenté le nombre cumulé des oeufs immatures, matures et morts au 6ème et 12ème jour succédant la mise en culture des schistosomes.

Le graphique montre que lorsque les vers sont incubés en couple (2C), on observe une meilleure fécondité par rapport aux femelles seules (2F). En présence des couples, le nombre d'oeufs parvenant à leur maturité est plus grand en comparaison avec les cultures contenant uniquement des femelles.

La ponte et la maturation des oeufs sont maximums pour les cultures contenant 2 et 3 couples de vers.

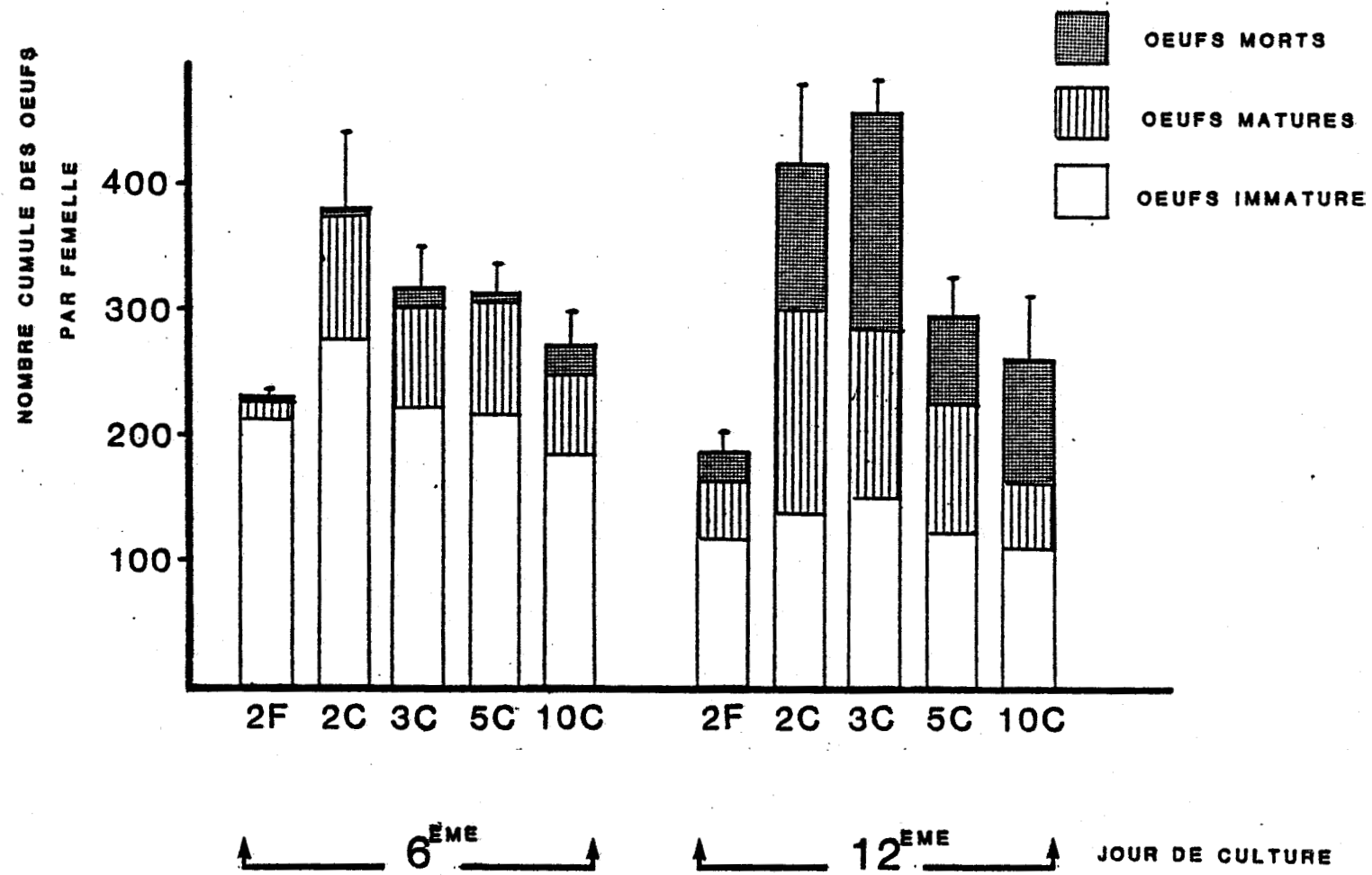


Fig. 3 : Effet des vers sur la ponte et la maturation des oeufs in vitro. Les schistosomes sont mis en culture par groupe de 2 femelles (F) ou 2, 3, 5 et 10 couples (C) de vers.

L'aspect jaunâtre des milieux dans lesquels 5 à 10 couples sont incubés par flacon, rend compte de l'appauvrissement du milieu ce qui a pour conséquence la diminution de l'oviposition observée.

3.1.1.3. Discussion et conclusion

Parmi les milieux étudiés, le milieu RPMI 1640 a été sélectionné comme permettant à la fois la survie des schistosomes, l'oviposition et la maturation des oeufs (Newport et Weller, 1982a). Selon ces mêmes auteurs, le sérum de veau foetal stimule la déposition des oeufs et le développement de leur embryon (miracidium) in vitro. Les meilleurs résultats sont obtenus par un taux de sérum dans le milieu voisin de 20 %. Dans le présent travail, comme il a déjà été décrit antérieurement (Newport et Weller, 1982b), les globules rouges ne semblent pas affecter significativement la production des oeufs et leur maturation, bien que les hématies constituent des éléments nutritifs essentiels pour les schistosomes (Bogitsh, 1981).

Les couples de vers sont plus féconds in vitro que les femelles seules ; et il est probable que les parasites, surtout de sexe mêlé, libèrent dans les cultures des substances qui tamponneraient le milieu ou stimuleraient la croissance des miracidia. Le meilleur rendement concernant la ponte et la maturation des oeufs est obtenu pour 2 à 3 couples de vers par flacon de culture.

Donc en utilisant 3 couples de vers dans du RPMI 1640 supplémenté de 20 % de sérum de veau foetal et 10^8 globules rouges, nous nous plaçons, en principe, dans les conditions optimales de maintien en survie in vitro des schistosomes. Avec un tel protocole expérimental, la ponte des oeufs commence dès le premier jour, augmente uniformément

jusqu'au 6ème jour, puis se stabilise entre le 9ème et le 14ème jour. Les oeufs sont pondus immatures, groupés autour d'une sorte de mucus. Cinq à six jours sont nécessaires pour le développement complet du miracidium. Au moment du ralentissement de l'oviposition (6ème jour) nous avons environ 250 oeufs matures par flacon et quand la ponte est arrêtée (du 9ème au 14ème jour), nous disposons dans les cultures, de près de 450 oeufs ayant terminé leur maturation.

3.1.2. FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO

Six jours après la mise en culture des vers adultes (cf "Matériel et Méthodes"), 10^7 cellules de rates de souris sont additionnées aux flacons de culture. Trois à six jours plus tard, la formation des granulomes est déterminée par l'analyse de la succession des réactions cellulaires vis-à-vis des oeufs pondus par les schistosomes et ayant terminé leur maturation. Un indice granulométrique (IG) a été, à cet effet, défini par B. Doughty, tenant compte du nombre de cellules venant au contact de l'oeuf.

Les expériences sont réalisées en 3 exemplaires et répétées 2 à 3 fois.

3.1.2.1. Description de la séquence des réactions cellulaires vis-à-vis des oeufs

Lors de l'individualisation du granulome, les cellules migrent vers l'oeuf, s'y accrochent et finissent par le recouvrir complètement. Les premières cellules qui adhèrent à l'oeuf proviennent généralement de la lignée monocyttaire. Les lymphocytes viennent, peu de temps après, adhérer sur la coque de l'oeuf ou sur les cellules qui les ont précédées (stade 2). Le premier contact avec l'oeuf survient très souvent au niveau de son éperon. Autour de l'oeuf, fixé au fond du flacon par les cellules adhérentes, se développe une couronne de migration cellulaire. Ce phénomène fait intervenir de nouveaux macrophages et lymphocytes ainsi que des éosinophiles et des fibroblastes (stade 3). Plus tard, une couche de cellules s'organise autour de l'oeuf (stade 4), commençant par sa partie antérieure. La taille du granulome augmente progressivement et l'oeuf finit par être complètement englobé dans plusieurs couches cellulaires (stade 5). Les différents composants du granulome achevé apparaissent très solidement liés les uns aux autres. Il est probable que les fibroblastes sécrètent du collagène servant de ciment pour cet ensemble. L'étude histologique de ces formations granulomateuses est en cours de réalisation.

Pour les cultures prolongées (plus de 9 jours après l'addition des cellules), les réactions granulomateuses régressent ; seules les cellules phagocytaires restent regroupées autour des débris des oeufs fragmentés.

L'individualisation du granulome in vitro autour des oeufs de schistosomes, est donc marquée essentiellement par deux phénomènes : Tout d'abord l'adhérence des macrophages, puis les transformations lymphoblastiques et la migration cellulaire.

3.1.2.2. Distribution des réactions granulomateuses à différents moments de la culture

Les lectures de l'indice granulométrique ont été effectuées au 3ème et 6ème jour après l'addition des cellules spléniques de souris CBA/J.

Dans le tableau 1, les indices granulométriques pour les animaux infectés par S. mansoni sont significativement plus élevés par rapport à ceux correspondant aux expériences utilisant des animaux sains. L'ampleur de la réactivité des cellules spléniques de souris infectées, mises en présence des oeufs pondus par les schistosomes, se traduit par l'augmentation du nombre des dernières réactions cellules-oeufs (St3, St4 et St5).

Au 6ème jour de culture, la réaction granulomateuse marque une légère augmentation, mais non significative par rapport au 3ème jour.

3.1.2.3. Cinétique de formation des granulomes in vitro au cours de l'infection des souris par S. mansoni

Pour connaître les conditions optimales de la réponse granulomateuse in vitro, nous avons suivi l'évolution de l'indice granulométrique (IG) au cours de l'infection des souris par S. mansoni. Deux lignées de souris, CBA/J et C57B1/6, ont été utilisées. L'évaluation des réactions cellulaires vis-à-vis des oeufs (IG) a été réalisée 6 jours après l'adjonction des cellules spléniques aux cultures.

cellules spléniques totales de souris CBA/J	J3		J6		
	saines	infectées par <u>S. mansoni</u>	saines	infectées par <u>S. mansoni</u>	
stades de réaction cellules-oeufs (%)					
stade 1	81 ± 4,28	22 ± 7,43	48,5 ± 14,6	19,13 ± 9,51	
stade 2	17,63 ± 4,24	51 ± 3,64	43 ± 15,47	42,76 ± 18,9	
stade 3	1,11 ± 0,30	5,33 ± 3,38	7 ± 4,41	15,75 ± 5,54	
stade 4	0,36 ± 0,47	8 ± 4,15	1,75 ± 1,87	6,5 ± 2,15	
stade 5	0 ± 0	8 ± 4,15	0,75 ± 1,22	16,5 ± 8	
	1,21 ± 0,05	2,27 ± 0,15	1,65 ± 0,14	2,55 ± 0,19	indice granulométrique
	—	< 0,001	—	0,005	P

Tableau 1 : Formation des granulomes in vitro par les cellules spléniques de souris CBA/J infectées depuis 8 semaines par S. mansoni. La lecture des cultures se fait 3 (J3) ou 6 jours (J6) après l'addition des cellules. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences différentes, chacune réalisée en 3 exemplaires. La significativité des résultats a été déterminée par le test de Student (P).

L'examen de la figure 4 apporte deux renseignements :

- d'une part, la réponse des cellules en présence des oeufs est plus importante pour les souris CBA/J que pour les souris C57/BL/6. La différence des indices granulométriques pour les deux souches de souris est significative tout au long des 20 premières semaines de l'infection ;
- d'autre part, le maximum de la réaction granulomateuse est atteint vers la 8ème semaine succédant l'infestation des souris. L'évolution des granulomes in vitro au cours de l'infection reproduit celle décrite in vivo pour ces mêmes formations au niveau du foie chez les animaux infectés.

Nous avons remarqué de plus (figure 5) que le pourcentage des oeufs au stade de réaction 3 (Transformation lymphoblastique); contrairement aux autres stades, suit étroitement l'évolution de l'indice granulométrique au cours de l'infection. Cela témoigne donc de l'importance de la stimulation lymphoblastique (T), qui est à l'origine de divers mécanismes induisant la réponse granulomateuse, notamment par le biais de la synthèse de lymphokine .

3.1.2. 4. Discussion et Conclusion

Le développement des granulomes in vitro se fait en 3 étapes :

- La première étape consiste en l'adhérence des macrophages et quelques lymphocytes à l'oeuf ;
- La seconde étape correspond à la formation d'une couronne cellulaire (Transformation et Prolifération lymphoblastiques) autour de l'oeuf, impliquant, outre les macrophages et les lymphocytes, des éosinophiles et des fibroblastes.

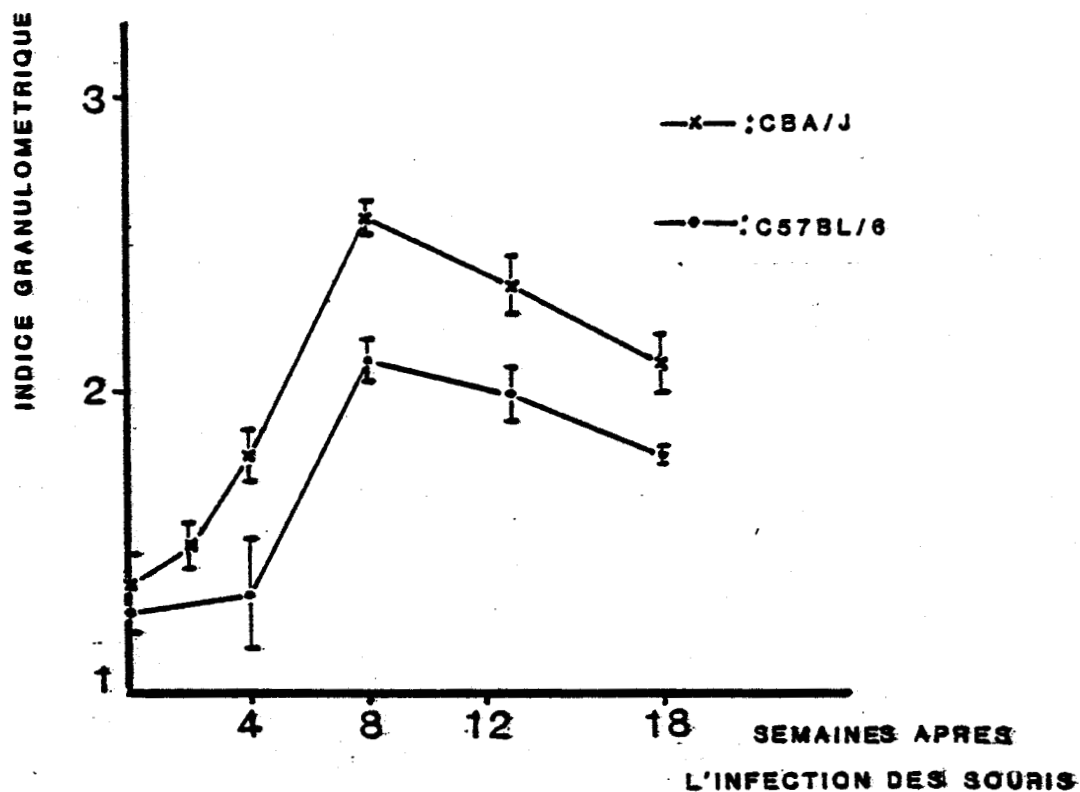


Fig. 4 : Cinétique de la formation des granulomes in vitro au cours de l'infection de souris CBA/J et C57BL/6 par S. mansoni.

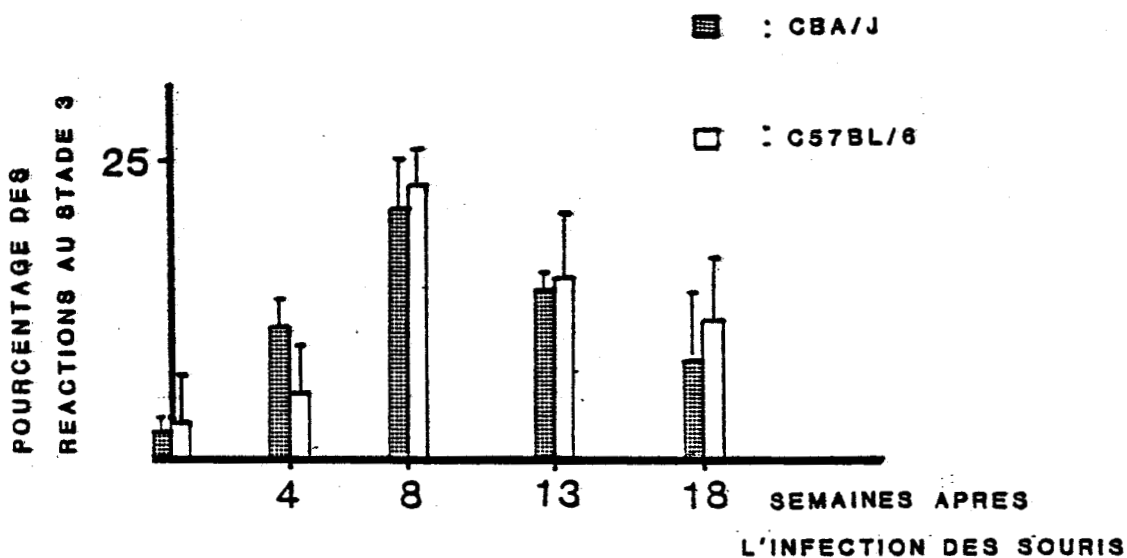


Fig. 5 : Pourcentage de réactions au stade 3 de la formation des granulomes in vitro au cours de l'infection des souris CBA/J et C57BL/6 par S. mansoni.

- La dernière étape est caractérisée par la production de collagène par les cellules fibroblastiques qui donne un aspect compact au granulome.

Les mêmes étapes s'observent in vivo (Bentley et coll., 1982).

Au cours de l'infection des souris par S. mansoni, la formation des granulomes se fait en deux phases, aiguë et chronique tant in vivo qu'in vitro (Doughty et coll., 1982a).

L'indice granulométrique atteint son maximum vers la 8ème semaine de l'infection (phase aiguë).

La réaction granulomateuse in vitro est plus forte pour les souris CBA/J que pour les souris C57BL/6. Ce résultat est à rapprocher de ceux de Lewis et Wilson (1981) qui ont montré que les cellules spléniques de souris CBA/J répondent mieux au stimulus antigénique de l'oeuf que celles de souris C57BL/6.

Il y a une relation étroite entre la prolifération lymphocytaire (T) et le développement des granulomes in vitro au cours de l'infection. En effet, les lymphocytes T stimulés produisent des lymphokines (Gillis et coll., 1978) capables d'activer diverses cellules contribuant au développement des granulomes, telles que les macrophages (Steinman et coll., 1980 ; Beller et Ho, 1982), les éosinophiles (James et Colley, 1975) et les fibroblastes (Wahl et Gately, 1983).

Par ailleurs, nous avons pu confirmer que l'utilisation de cellules spléniques permet l'obtention de granulomes in vitro de plus grande taille en comparaison avec ceux obtenus à partir de cellules de ganglions mésentériques. De plus, Garb et coll., 1981, ont montré sur des souris infectées par S. japonicum un synchronisme

étroit, concernant notamment les proliférations cellulaires et les synthèses de lymphokines, entre les cellules spléniques et celles formant les granulomes à différents moments de l'infection.

La rate constituerait donc l'organe lymphoïde producteur de cellules adéquates pour les expériences de granulomes in vitro.

Disposant des données essentielles concernant la formation des granulomes in vitro, il est désormais possible d'utiliser ce modèle pour étudier l'effet du tripeptide Thr-Lys-Pro sur le phénomène d'induction des granulomes.

Comme nous serons amenés à travailler sur un aspect de modulation de la réponse granulomateuse, nous avons décidé pour la suite de notre étude, d'utiliser des cellules spléniques de souris CBA/J à leur 8ème semaine d'infection.

3.2. MODULATION DE LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO PAR LE TRIPEPTIDE THR-LYS-PRO (TKP)

3.2.1. EFFET DE DIFFERENTS PEPTIDES PROVENANT DU SECOND DOMAINE CONSTANT DE LA MOLECULE D'IgG SUR LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO.

Les cultures de granulomes in vitro sont réalisées selon la technique décrite précédemment ; brièvement, 6 jours après la mise en culture des schistosomes les cellules spléniques de souris CBA/J (saines ou infectées depuis 8 semaines par 30 furcocercaires de S. mansoni) sont introduites dans les cultures contenant des oeufs pondus in situ par les parasites, à raison de 10^7 cellules par flacon. Les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % CO₂. La lecture des indices granulométriques se fait 3 jours après l'addition des cellules.

Le lyophilisat des peptides d'IgG est mis en solution dans du milieu de culture (RPMI 1640, 20 % SVFD). Des aliquots de différentes concentrations sont réalisés puis stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. 40 µl de la solution à tester sont ajoutés puis mélangés dans chaque flacon de culture.

La viabilité des cellules est déterminée à l'aide du bleu Trypan vers la fin de l'expérience. Nous avons généralement plus de 90 % de cellules viables avec ou sans peptides.

Les cultures de granulomes utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées sont traitées avec différents peptides rentrant dans la structure du domaine constant de la molécule d'IgG.

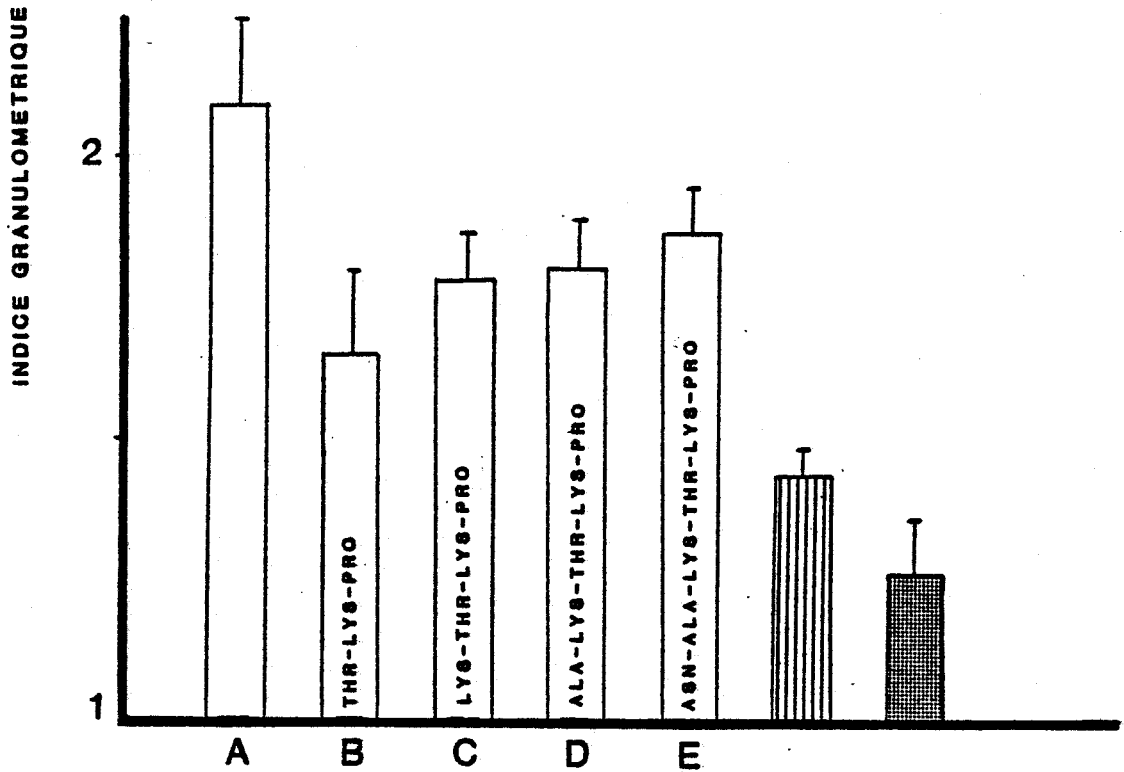


Fig. 6 : Effet de différents peptides appartenant au domaine constant de la molécule d'IgG sur la formation des granulomes in vitro.



Culture utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées par S. mansoni.

A. Non traitées

B, C, D, et E. Traitées par différents peptides .

Ces résultats sont significativement différents de A.

($P_B = 0,01$; $P_C = 0,02$; $P_D = 0,02$ et $P_E = 0,04$)



Culture utilisant des cellules spléniques de souris infectées par S. mansoni, uniquement appauvries en cellules adhérentes aux supports solides.



Culture utilisant des cellules spléniques totales de souris saines.



Notre choix s'est porté sur des peptides inhibant diverses fonctions des macrophages (Auriault et coll., 1983), cellules nécessaires au développement des granulomes.

L'utilisation de ces peptides à la même concentration molaire de 4×10^{-3} moles $\times l^{-1}$ diminue la réponse granulomateuse par rapport au témoin non traité (fig. 6). L'action inhibitrice est maximale avec le tripeptide Thr-Lys-Pro (53 %), l'inhibition minimale est réalisée par l'hexapeptide Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro (28 %), tandis que le tetrapeptide et le pentapeptide ont une activité intermédiaire.

La réaction granulomateuse est également réduite pour les cultures non traitées utilisant des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes ou des cellules spléniques totales de souris saines.

Vue son action inhibitrice maximale, nous avons donc choisi le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) pour approfondir notre étude sur le processus d'inhibition des granulomes.

3.2.2. EFFET INHIBITEUR DU TRIPEPTIDE THR-LYS-PRO (TKP) SUR LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO, EN FONCTION DU MOMENT ET DE LA FREQUENCE DU TRAITEMENT DES CULTURES

Pour tester l'effet du TKP sur la formation des granulomes in vitro, nous avons cherché le moment et la fréquence adéquats des traitements de cultures.

Nous avons utilisé des cellules spléniques de souris CBA/J infectées depuis 8 semaines par 30 furco-cercaires de S. mansoni.

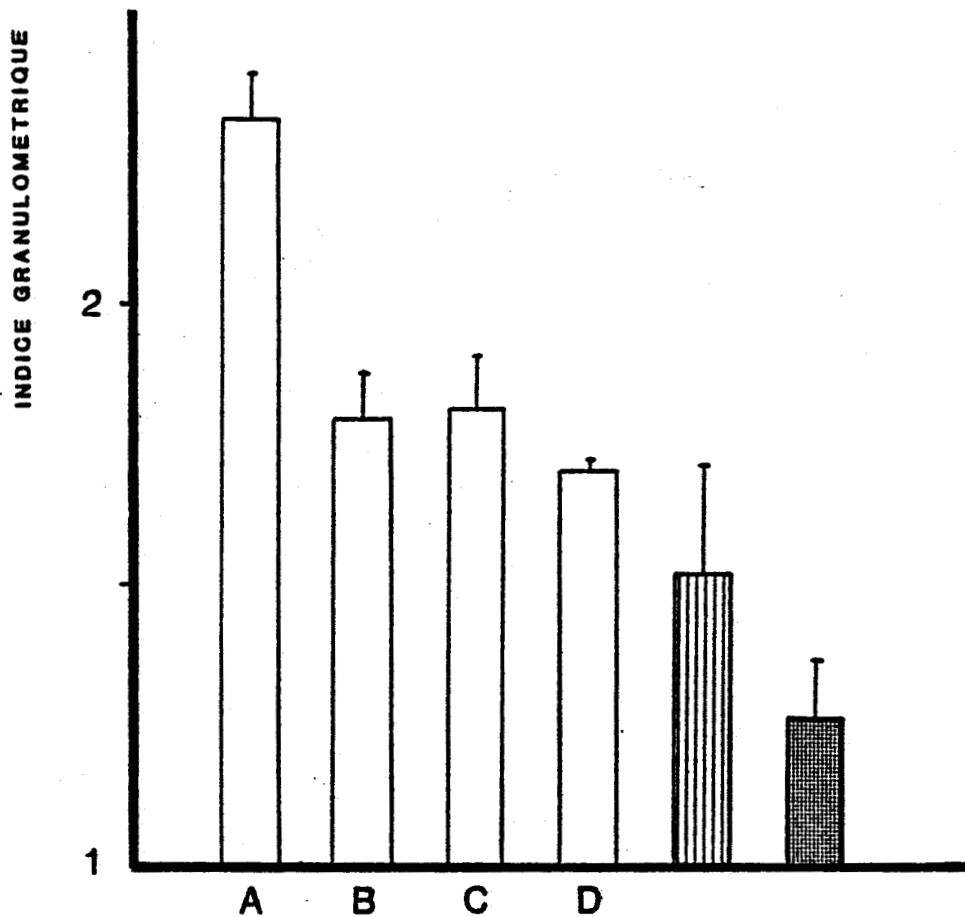


Fig. 7 : Réponse granulomateuse in vitro en fonction du moment et de la fréquence du traitement des cultures par le tripeptide Thr-Lys-Pro.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées par S. mansoni.

A. Non traitées.

B, C et D. Traitées par le tripeptide respectivement

à J0, J0 + J1 et J0 + J1 + J2. Ces résultats sont

significativement différents de A ($P_B = 0,001$; $P_C = 0,002$ et $P_D = 0,002$).



Cultures utilisant des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes aux supports solides.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris saines.



N.B. : J0, J1 et J2 représentent respectivement le moment d'addition des cellules aux cultures, un et deux jours après cette opération.

Comme le montre la figure 7, les cultures de granulomes sont réalisées soit sans traitement, soit en présence de TKP à 4×10^{-3} moles.l⁻¹ au moment de l'addition des cellules (J0) ou au cours des deux ou trois jours succédant cette opération (J0 + J1 et J0 + J1 + J2).

Le contrôle négatif est effectué sur des cellules spléniques de souris syngéniques saines. L'indice granulométrique a été calculé au 3ème jour de culture des granulomes pour chaque condition.

Les résultats indiquent que le TKP réduit significativement la réaction granulomateuse. Il n'y a pas de différence significative entre les 3 types de traitements à J0, J0 + J1 ou J0 + J1 + J2 où nous avons respectivement 50 %, 48 % et 58 % d'inhibition par rapport au témoin non traité (A).

Nous obtenons sensiblement le même résultat pour les cultures non traitées réalisées avec des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes.

En conclusion, le TKP inhibe la formation des granulomes et il suffit de traiter les cultures au moment de l'addition des cellules pour avoir cet effet.

3.2.3. EFFET INHIBITEUR DU TKP SUR LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

Différentes concentrations finales de TKP, dans une gamme allant de $0,004.10^{-3}$ moles x l⁻¹ à 400.10^{-3} moles x l⁻¹ ont été testées dans les cultures de granulomes in vitro.

Les résultats de deux essais expérimentaux sont rassemblés dans le tableau 2. L'effet inhibiteur du TKP commence dès

Cellules spléniques totales de souris CBA/J	Concentration finale en TKP 10^{-3} moles $\times l^{-1}$	Indice granulométrique	Pourcentage d'inhibition	Probabilité (P)
	-	$2,20 \pm 0,028$	-	-
	0,004	$2,13 \pm 0,1$	8	NS
	0,04	$2,29 \pm 0,05$	-	-
infectées par <u>S. mansoni</u>	0,02	$2,00 \pm 0,06$	22	$< 0,004$
	0,4	$1,95 \pm 0,11$	28	$< 0,01$
	4	$1,66 \pm 0,07$	60	$< 0,001$
	40	$1,71 \pm 0,13$	54	0,01
	400	$1,80 \pm 0,07$	44	$< 0,001$
saines	-	$1,3 \pm 0,08$	-	$< 0,001$

Tableau 2 : Inhibition de la formation des granulomes in vitro en fonction de la concentration du milieu de culture en tripeptide Thr-Lys-Pro. La significativité des résultats a été déterminée par le test de Student (P).

NS : non significative.

$0,2 \cdot 10^{-3}$ moles $\times l^{-1}$, et s'amplifie progressivement pour atteindre un maximum (environ 50 % d'inhibition) à partir de $4 \cdot 10^{-3}$ moles $\times l^{-1}$. La viabilité cellulaire, contrôlée au Bleu Trypan n'est pas affectée par les différents types de traitements. Nous avons plus de 90 % de cellules viables avec ou sans peptides.

N.B. : Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin utilisant des cellules spléniques totales de souris CBA/J saines.

3.2.4. ETAPE DE LA FORMATION DES GRANULOMES AFFECTEE PAR LE TRIPEPTIDE TKP

La figure 8 montre que le traitement des cultures, lors de l'addition des cellules spléniques (J0) par $4 \cdot 10^{-3}$ moles $\times l^{-1}$ de TKP, diminue l'ampleur de la réaction granulomateuse. En effet, la valeur de l'indice granulométrique calculé à J3 est égale à $1,67 \pm 0,20$ au lieu de $2,25 \pm 0,10$. Par rapport aux expériences utilisant des cellules spléniques totales de souris saines, ou appauvries en cellules adhérentes de souris infectées par S. mansoni, nous obtenons respectivement 59 % et 72 % d'inhibition.

Par contre, l'indice granulométrique calculé au 6ème jour (J6) pour les cultures de granulomes soumises au traitement par le TKP 3 jours (J3) après leur initiation, n'est pas significativement différent de celui des cultures témoins.

Ces résultats nous amènent à supposer que l'action inhibitrice du tripeptide Thr-Lys-Pro s'exerce au début de la formation des granulomes. En effet, l'analyse des pourcentages de réactions granulomateuses (tableau 3) prouve que le TKP bloque la réaction granulomateuse aux tous premiers stades de son développement (stades 2 et 3)

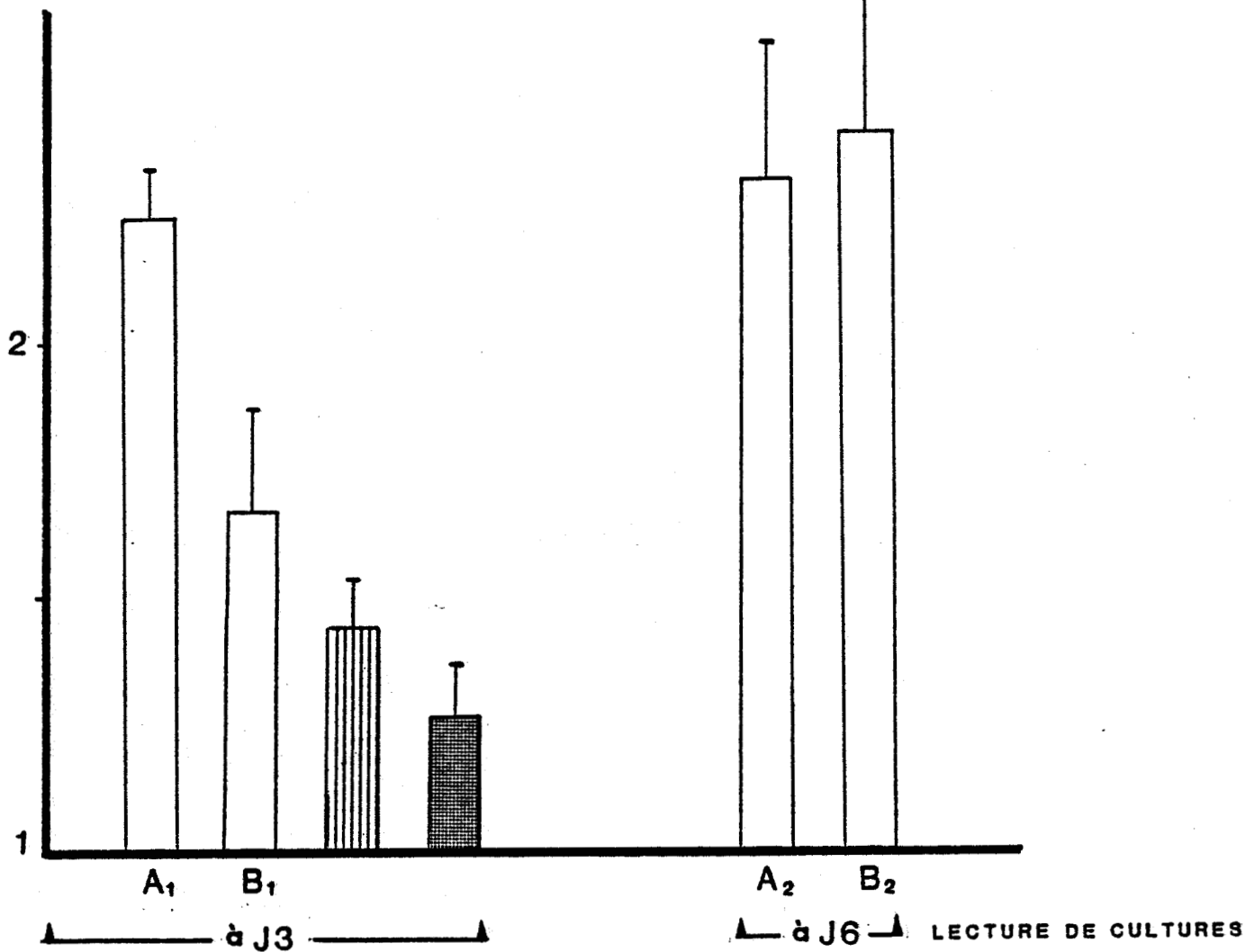


Fig. 8 : Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro à deux stades de la formation des granulomes in vitro.

□ Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées par S. mansoni.

A₁ et A₂. Non traitées.

B₁ et B₂. Traitées avec le tripeptide, respectivement au moment de la mise en culture des cellules et 3 jours après cette opération.

B₁ est significativement différent de A₁ (P = 0,01)

▨ Cultures utilisant des cellules spléniques de souris infectées par S. mansoni, appauvries en cellules adhérentes aux supports solides.

▩ Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris saines.



Souris CBA/J infectées par <u>S. mansoni</u>				Souris CBA/J saines	
cellules spléniques	totales non traitées	totales traitées par $4 \cdot 10^{-3}$ moles $\times 1^{-1}$ de TKP	appauvries en cellules adhérentes; non traitées	totales non traitées	
stades de réaction cellules-oeufs (%)					
stade 1	22 \pm 7,43	36,33 \pm 7,81	67,63 \pm 5,73	81 \pm 4,28	
stade 2	51 \pm 5,81	49,33 \pm 10,39	28,38 \pm 5,97	17,63 \pm 4,24	
stade 3	13,67 \pm 3,38	8 \pm 2,7	1,75 \pm 0,70	1,11 \pm 0,30	
stade 4	5,33 \pm 3,38	2 \pm 1,42	0,35 \pm 0,34	0,36 \pm 0,47	
stade 5	8 \pm 4,15	3,33 \pm 2,01	3,5 \pm 3,19	0	
	2,27 \pm 0,15	1,85 \pm 0,15	1,42 \pm 0,08	1,21 \pm 0,05	Indice granulométrique
	-	< 0,05	< 0,001	< 0,001	(P)

Tableau 3 : Effet du TKP sur la formation des granulomes in vitro exprimé en pourcentage de réaction cellules-oeufs.

La lecture des cultures est faite 3 jours après l'addition des cellules.

La significativité des résultats a été déterminée par le test de Student (P).

Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences différentes chacune réalisée en 3 exemplaires.



mais ne dissocie pas les granulomes une fois formés. La réaction cellulaire vis-à-vis des oeufs dépasse rarement le stade 3, caractérisé par les images de migration cellulaire. De plus, en présence du TKP, nous observons une réduction dans l'intensité des réactions cellulaires autour des oeufs par rapport aux cellules spléniques totales de souris infectées n'ayant pas subi de traitement. Au stade 2, un nombre relativement réduit de cellules, de petite taille, adhèrent aux oeufs. Au stade 3, les auréoles de migration sont rares, moins denses et semblent être moins étendues. Les granulomes complètement achevés sont pratiquement absents.

Pour les cultures non traitées, utilisant des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes ou des cellules spléniques totales de souris saines, la réponse granulomateuse ne dépasse pas le stade 2.

Le tripeptide TKP exerce donc son effet inhibiteur sur la formation des granulomes en freinant la réaction cellulaire, suscitée par les oeufs de S. mansoni, aux toutes premières étapes de son développement. Sachant que les macrophages sont généralement les premières cellules venant adhérer aux oeufs lors de la formation des granulomes d'une part et qu'ils sont nécessaires au développement de cette réponse cellulaire d'autre part, nous avons soupçonné une éventuelle interaction entre le TKP et ces cellules.

3.2.5. POPULATIONS CELLULAIRES AFFECTEES PAR LE TRIPEPTIDE TKP AU COURS DE LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO

La rate contient plusieurs populations de cellules immunocompétentes qu'on peut classer, selon leurs capacités de fixation aux supports solides, en cellules adhérentes, comprenant essentiellement des

macrophages et des fibroblastes, et en cellules non adhérentes, dont une grande majorité de lymphocytes avec en plus des granulocytes.

La première étape de la formation des granulomes in vitro (adhérence des cellules aux oeufs) fait intervenir surtout des cellules de type macrophagique et la deuxième étape de cette réaction cellulaire (transformation lymphoblastique et migration cellulaire) met en oeuvre la totalité des cellules et en particulier des lymphocytes et quelques granulocytes.

Le tripeptide TKP, comme nous l'avons vu précédemment, semble freiner la réponse cellulaire vis-à-vis des sécrétions antigéniques des oeufs aux tous premiers stades de son développement. Nous avons voulu mieux définir les populations cellulaires impliquées dans le processus d'inhibition des granulomes par le TKP.

Pour tenter de répondre à cette question, les cellules adhérentes aux supports plastiques essentiellement composées de macrophages (70 à 80 %) et non adhérentes sont séparées puis traitées ou non par une solution à $2 \cdot 10^{-2}$ moles $\times 1^{-1}$ de TKP pendant 30 min. Les cellules sont ensuite lavées et utilisées pour les cultures de granulomes dans différentes combinaisons. 10^7 cellules dont 30 % d'adhérentes riches en macrophages et 70 % de non adhérentes sont additionnées dans chaque flacon de culture. Avec un tel mélange, nous pensons être dans les normes de la composition cellulaire normale de la rate des souris infectées qui est de 20 à 30 % de macrophages par rapport aux cellules totales.

L'existence de globules rouges et d'une quantité importante de lymphocytes (environ 80 %) au niveau de la rate occasionne des difficultés d'obtention des cellules adhérentes à partir des

suspensions de cellules spléniques totales. C'est pourquoi, dans une première approche (fig. 9), nous avons utilisé des macrophages péritonéaux (faciles à récolter en grande proportion) et des cellules non adhérentes issues de la rate.

Au cours de cette expérience, nous avons constaté que l'intensité des réactions cellulaires vis-à-vis des oeufs est relativement faible. Pour pallier ce problème et pour confirmer les résultats de la première expérience (fig. 9), nous avons utilisé des macrophages de la rate (fig. 10). Les deux types d'expérimentation offrent des résultats complémentaires, allant dans le même sens :

Considérons dans un premier temps uniquement les résultats impliquant les cellules de souris infectées par S. mansoni ; Tout d'abord, en absence de traitement par le tripeptide, le fait de combiner 30 % de cellules adhérentes et 70 % de cellules non adhérentes (An + Nn) pour les cultures de granulomes donne sensiblement les mêmes indices granulométriques que les témoins (CSTn) réalisés avec des cellules spléniques totales. Le fractionnement cellulaire ne modifie donc pas la réaction granulomateuse.

Quand on traite dans le mélange uniquement des cellules non adhérentes (An + Nt), le développement de la réaction granulomateuse n'est pas affecté. Le TKP est donc sans effet sur les cellules non adhérentes. En revanche, quand nous traitons dans le mélange seulement les cellules adhérentes (At + Nn), la réponse granulomateuse subit une réduction significative. Le même résultat est obtenu après traitement des deux populations par le TKP (At + Nt). Le tripeptide agit donc sur les cellules adhérentes. L'inhibition de la formation des granulomes est aussi obtenue :

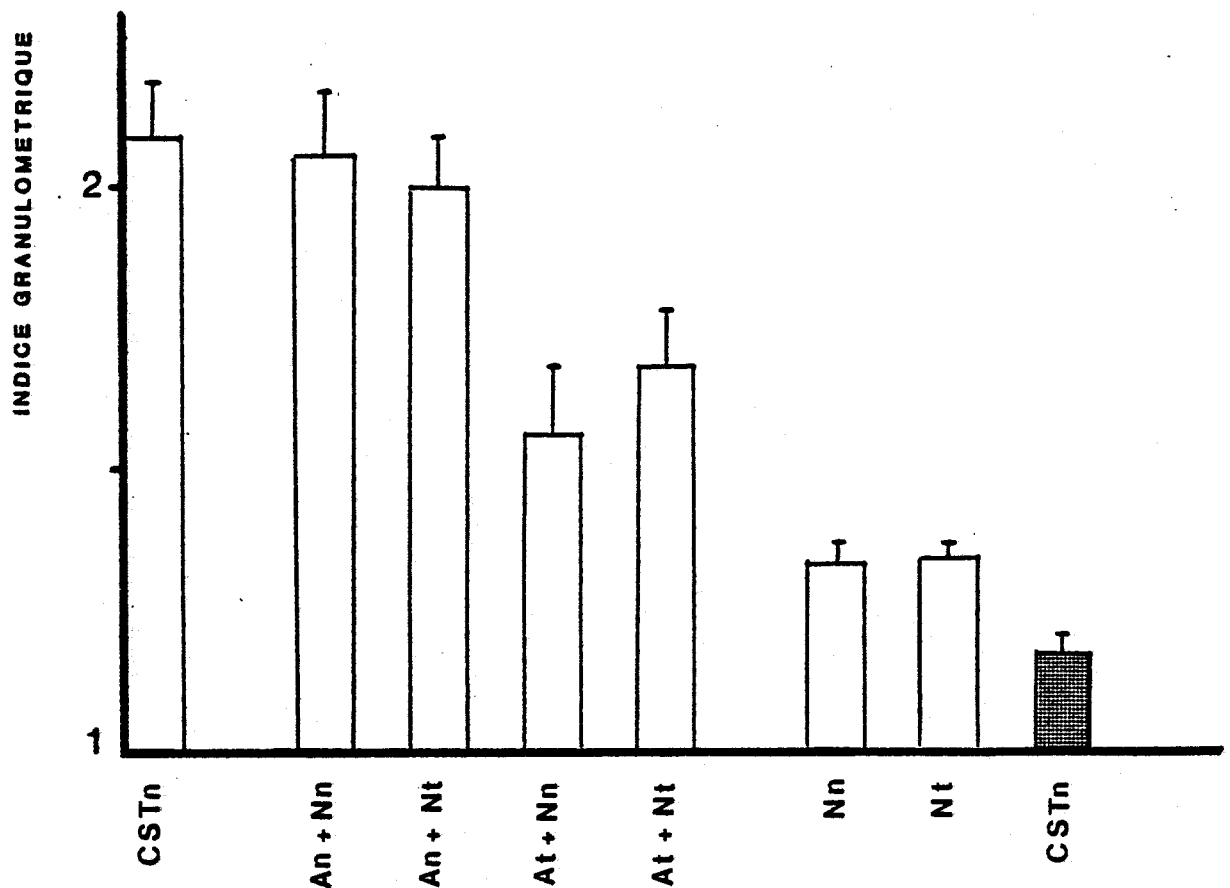




Fig. 9 : Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro sur les cellules adhérentes ou non-adhérentes aux supports solides lors de la formation des granulomes in vitro.

Pour les expériences de formation de granulomes in vitro, nous avons utilisé des cellules de

souris saines  ou infectées par S. mansoni .

On fait intervenir des cellules spléniques totales (CST) ou une recombinaison de 30 % de cellules péritonéales adhérentes aux supports solides (A) et 70 % de cellules spléniques non adhérentes (N) à ces supports. Les cellules sont traitées (t) ou non (n) par le tripeptide.

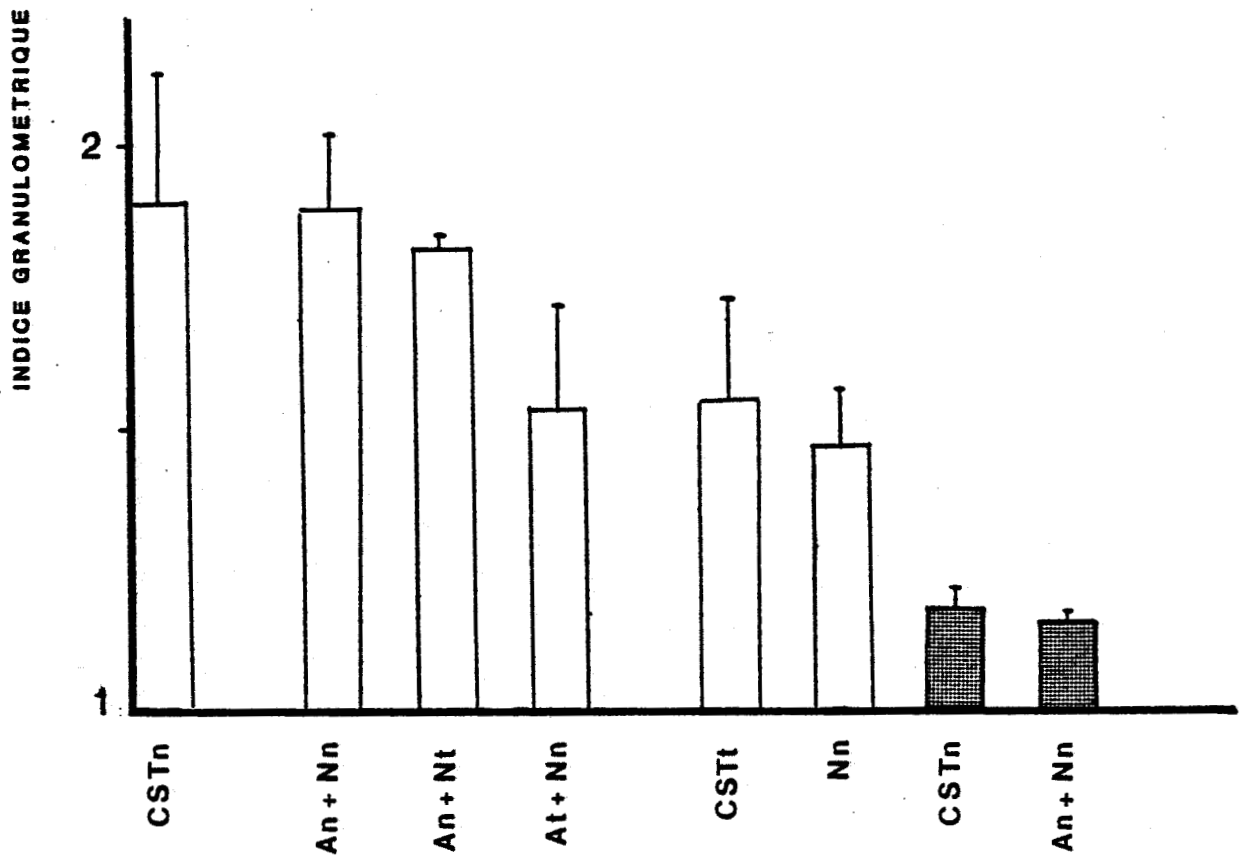




Fig. 10 : Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro sur les cellules adhérentes et non adhérentes aux supports solides lors de la formation des granulomes in vitro.

Les cultures sont réalisées avec des cellules spléniques de souris saines  ou infectées par S. mansoni .

On fait intervenir des cellules spléniques totales (CST) ou une recombinaison de 30 % de cellules adhérentes aux supports solides (A) et 70 % de cellules non adhérentes (N) à ces supports.

Les cellules sont traitées (t) ou non (n) par le tripeptide.

- 1°) en traitant par le TKP les cellules spléniques non fractionnées (CSTt), ce qui confirme l'intervention du tripeptide dans le processus d'inhibition ;
- 2°) par simple appauvrissement des cellules spléniques en cellules adhérentes (Nn). Ce résultat témoigne de l'importance des cellules de type macrophagique dans la formation des granulomes.

Si l'on considère les indices granulométriques obtenus en utilisant des cellules spléniques de souris saines comme étant la base de 100 % de réduction de la réponse granulomateuse, le taux d'inhibition de cette réaction par le tripeptide, pour les expériences CSTt, At + Nn et At + Nt, est d'environ 50 %.

En conclusion, les cellules adhérentes seules semblent affectées par l'action inhibitrice du TKP. Par ailleurs, lors de l'addition de ce peptide au départ des cultures de granulomes, nous avons moins de cellules de type macrophage venant s'accrocher aux oeufs. Nous avons donc pensé que le tripeptide pourrait inhiber la migration des macrophages.

3.2.6. EFFET DU TKP SUR LA MIGRATION DES MACROPHAGES PERITONEAUX VIS-A-VIS DE L'ANTIGENE SOLUBLE DES OEUFS (SEA)

Nous avons traité ou non les macrophages par du TKP à $2 \cdot 10^{-2}$ moles $\times l^{-1}$ pendant 30 min. Les cellules sont ensuite mises en présence du SEA dans des chambres destinées aux tests de migration cellulaire.

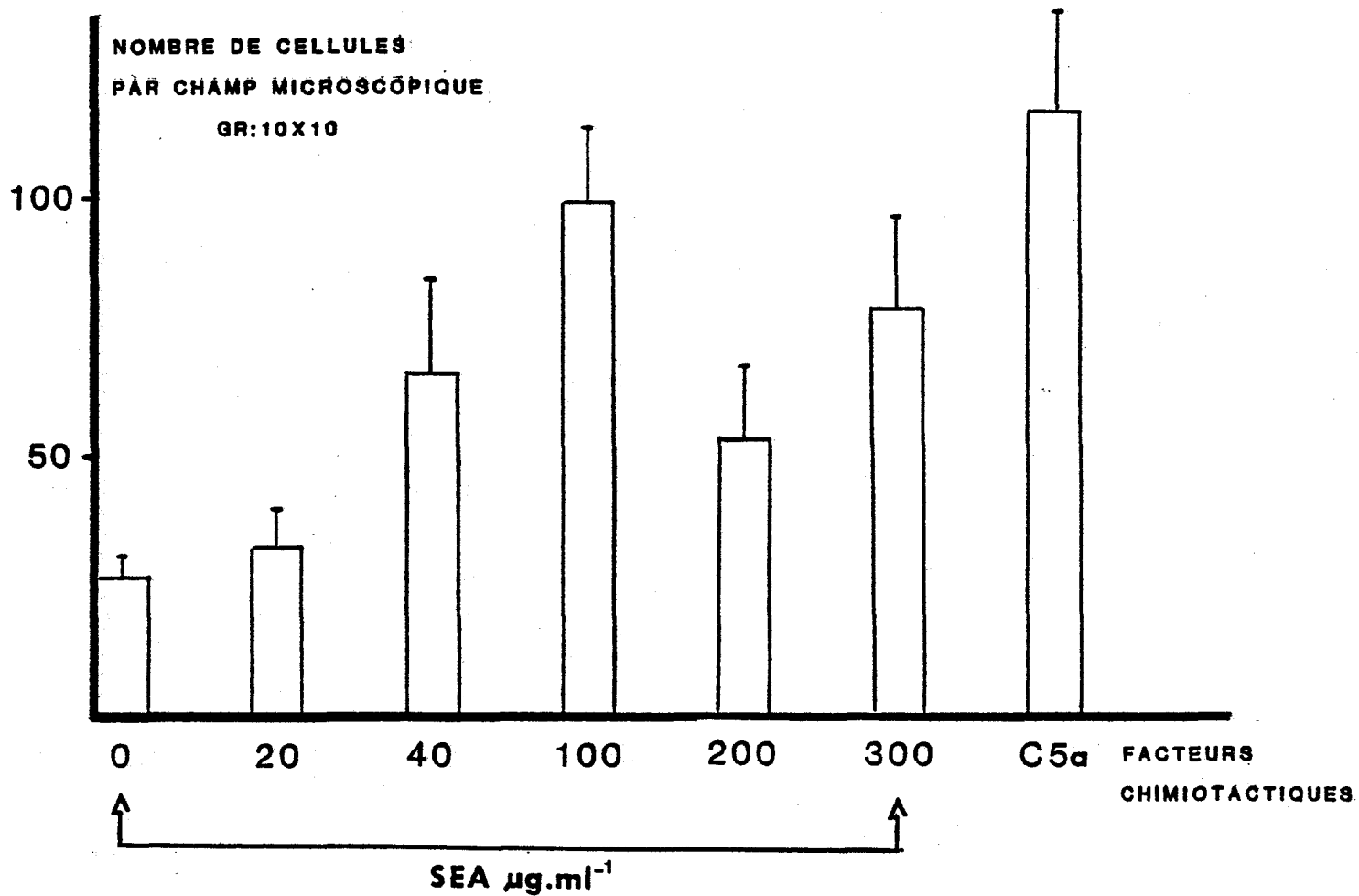


Fig. 11 : Migration des macrophages péritonéaux vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs de S. mansoni (SEA). La suspension cellulaire provient de souris BALB/C saines. Elle est constituée de 85 % de macrophages, non traités.

3.2.6.1. Migration des macrophages péritonéaux vis-à-vis du SEA (fig. 11)

Les macrophages péritonéaux sont obtenus à 85 % de pureté à partir de souris BALB/C saines, de sexe mâle, et pesant approximativement 24 g chacune. Pour chaque expérience un lot de 10 souris a été utilisé. Nous avons employé, pour l'essai chimiotactique, toute une gamme de concentration du SEA (20, 40, 100, 200 et 300 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ en solution dans du milieu MEM supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté. Le composant C5a du complément sert de témoin positif.

La figure 11 représente en ordonnées le nombre de cellules ayant migrées par champ microscopique (Gr. 10 x 10). Les expériences sont réalisées en trois ou quatre exemplaires avec 2 répétitions.

Les résultats montrent qu'à partir de 40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de SEA, la migration cellulaire est augmentée significativement. L'effet chimiotactique le plus élevé est obtenu pour 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de SEA. Nous avons observé pour les deux répétitions, une chute du nombre de cellules par champ pour 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ suivi d'une augmentation à 300 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

3.2.6.2. Effet du TKP sur la migration des macrophages

- Macrophages non immuns (fig. 12a)

Lorsque nous traitons les cellules adhérentes péritonéales de souris BALB/C saines par le TKP, leur migration vis-à-vis du SEA se trouve inhibée de plus de 80 % par rapport aux cellules n'ayant pas subi de traitement.

Fig. 12 : Inhibition de la migration des macrophages péritonéaux vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs de S. mansoni.

La suspension cellulaire provient :

- a. de souris BALB/C saines et contient 85 % de macrophages ;
- b. de souris CBA/J infectées par S. mansoni et contient 75 % de macrophages.

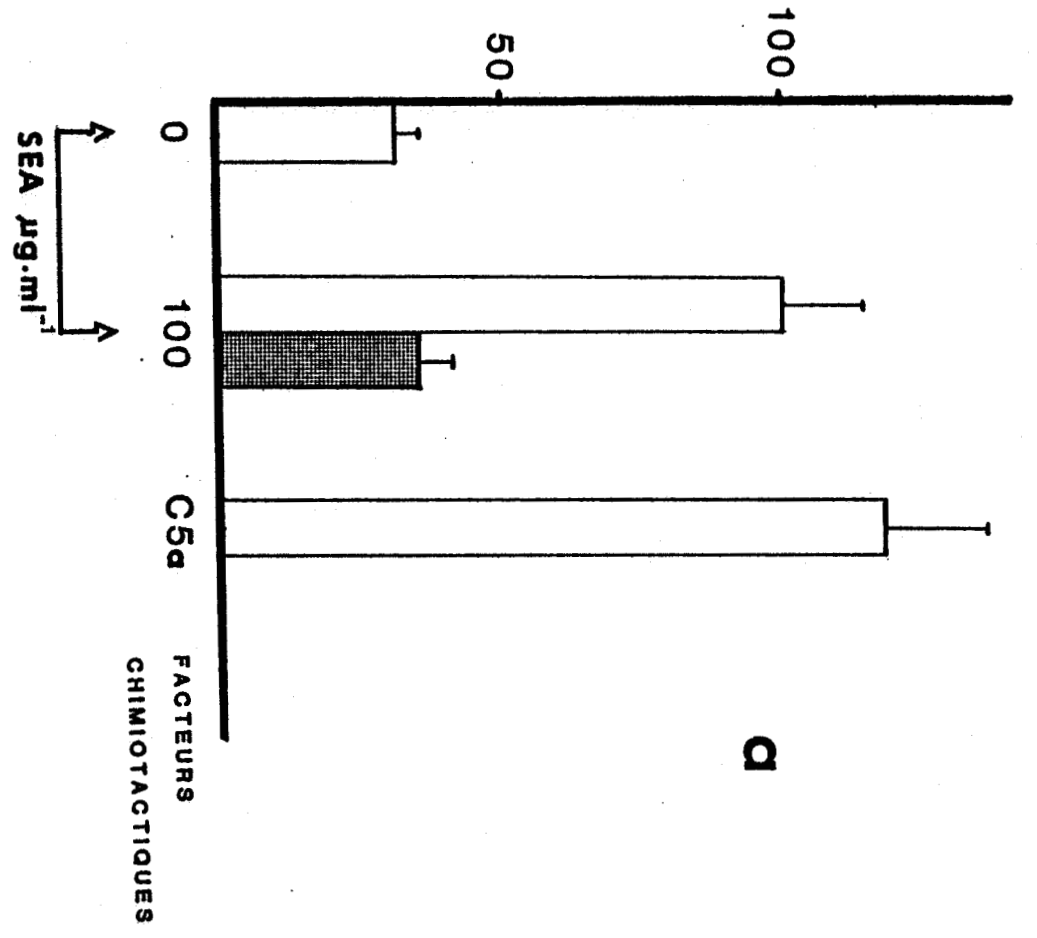


Non traités

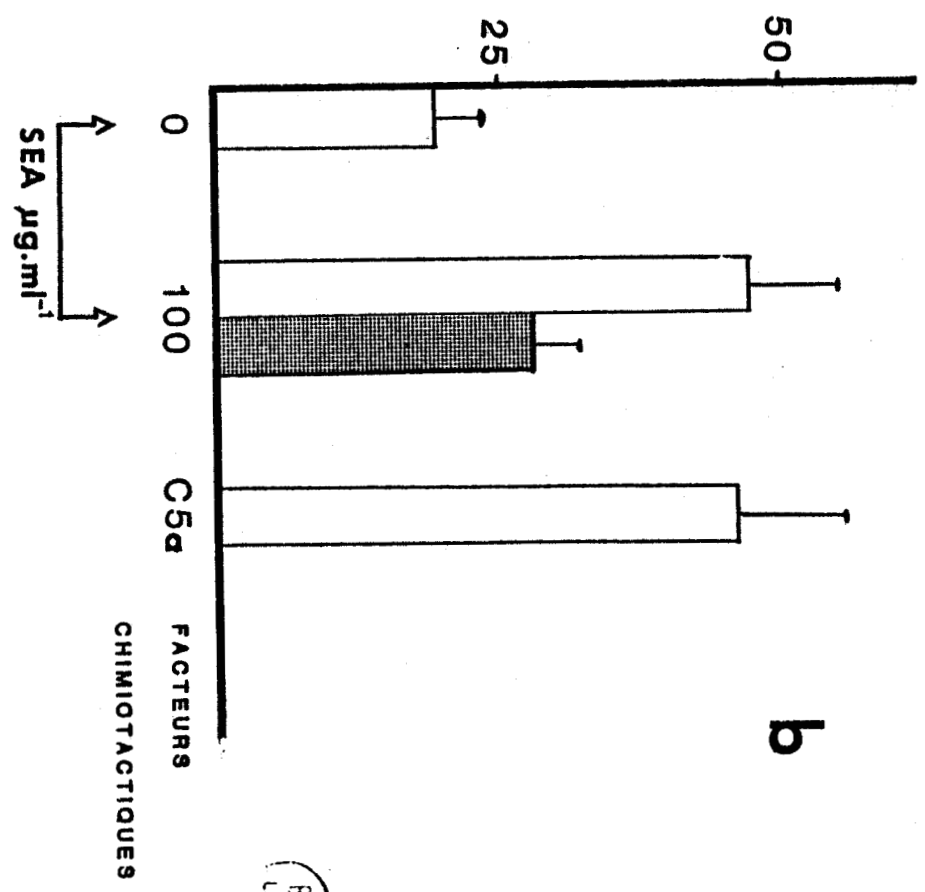


Traités par $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de TKP pendant 30 min.

NOMBRE DE CELLULES
PAR CHAMP MICROSCOPIQUE
GR:10X10



NOMBRE DE CELLULES
PAR CHAMP MICROSCOPIQUE
GR:32X12.5



— Macrophages immuns (fig. 12b)

Les cellules adhérentes contenant environ 80 % de macrophages sont issues de souris CBA/J à leur 8ème semaine d'infection par S. mansoni.

La figure 12b représente les résultats de deux expériences. Le traitement préalable des macrophages par le TKP inhibe d'environ 68 % leur migration en réponse à l'antigène soluble des oeufs.

3.2.7. FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO EN UTILISANT DES CELLULES SPLENIQUES TOTALES DE SOURIS CBA/J INFECTÉES PAR S. MANSONI AYANT SUBI UN TRAITEMENT IN VIVO PAR LE TKP

Les souris CBA/J mâles, infectées depuis 6 à 7 semaines par S. mansoni, sont traitées par des injections intrapéritonéales de solution de TKP dans de l'eau physiologique pendant au moins quatre jours (50 µg par souris et par jour). Les souris sont ensuite sacrifiées, les rates prélevées, lavées puis utilisées après écrasement pour les cultures de granulomes. Trois jours après la mise en culture des cellules, les réactions granulomateuses sont déterminées par le calcul de l'indice granulométrique.

La figure 13 montre que le traitement in vivo des souris par le TKP réduit la formation des granulomes dans les cultures. Dans ce cas, l'indice granulométrique est ramené presque au niveau de celui correspondant à l'expérience témoin réalisée avec des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes ; et le pourcentage d'inhibition calculé par rapport au témoin utilisant des cellules spléniques totales de souris syngéniques saines est d'environ 70 %.

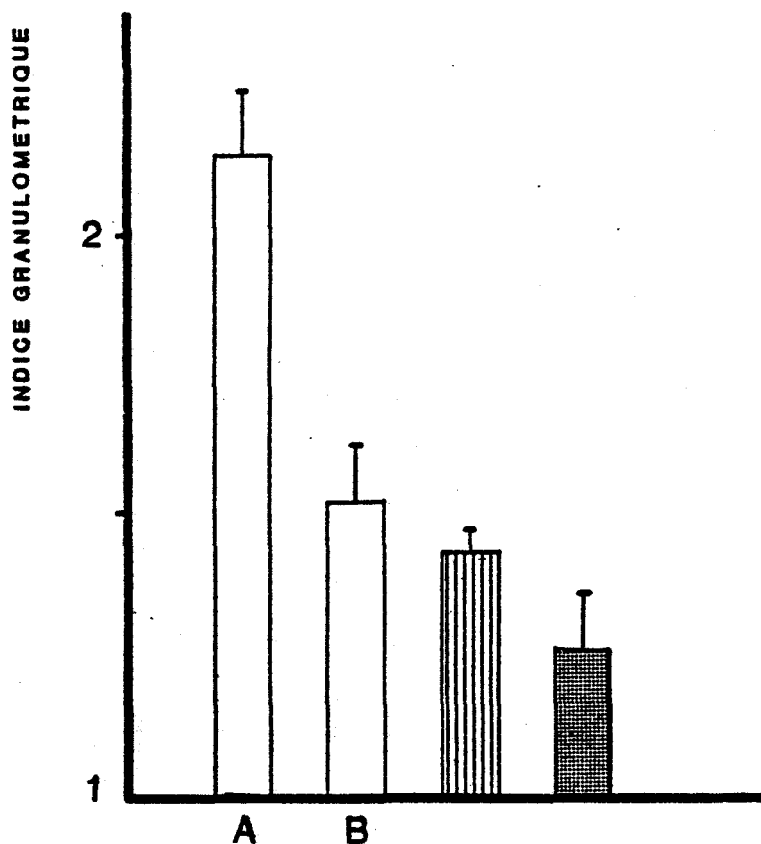


Fig. 13 : Formation des granulomes in vitro utilisant des cellules spléniques de souris infectées par S. mansoni et ayant subi un traitement in vivo par le tripeptide Thr-Lys-Pro.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées par S. mansoni.

A. Non traitées.

B. Traitées in vivo par le tripeptide, significativement différent de A ($P_B < 0,001$).



Cultures utilisant des cellules spléniques de souris infectées par S. mansoni, appauvries en cellules adhérentes aux supports solides.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris saines.

Il est donc raisonnable de penser que le tripeptide Thr-Lys-Pro a un effet in vivo. La réponse granulomateuse plus faible in vitro est probablement la conséquence d'une interaction chez l'animal entre les cellules de la lignée monocytaire et le TKP. Cette interaction pourrait se traduire :

- soit par une réduction du taux de macrophages dans la rate suite à l'inhibition éventuelle de la migration des monocytes vers cet organe lymphoïde. En effet, lorsqu'on traite les souris par le TKP, nous avons un nombre relativement réduit de macrophages au niveau de la rate (12 % au lieu de 20 à 25 %) ;
- soit par un effet inhibiteur direct qui s'exercerait sur la population macrophagique au niveau de la rate ;
- soit par les deux mécanismes à la fois.

3.2.8. EFFET DU TRIPEPTIDE THR-LYS-PRO ET DE SES ANALOGUES PROTEGES SUR LES GROUPEMENTS AMINE ET CARBOXYLIQUES (ACETYL-THR-LYS-PRO ET THR-LYS-PRO-AMIDE) SUR LA FORMATION DES GRANULOMES IN VITRO.

Le tripeptide TKP, produit de dégradation de la molécule d'IgG, a été testé pour la formation des granulomes autour des oeufs pondus in vitro par les schistosomes, sous 3 formes différentes : Thr-Lys-Pro, Thr-Lys-Pro-amide et Acétyl-Thr-Lys-Pro.

Les résultats exprimés par la figure 14 montrent que les trois produits peptidiques, utilisés à la même concentration de 4.10^{-3} moles $\times 1^{-1}$, réduisent la réaction granulomateuse résultant de l'interaction entre les cellules spléniques totales de souris CBA/J.

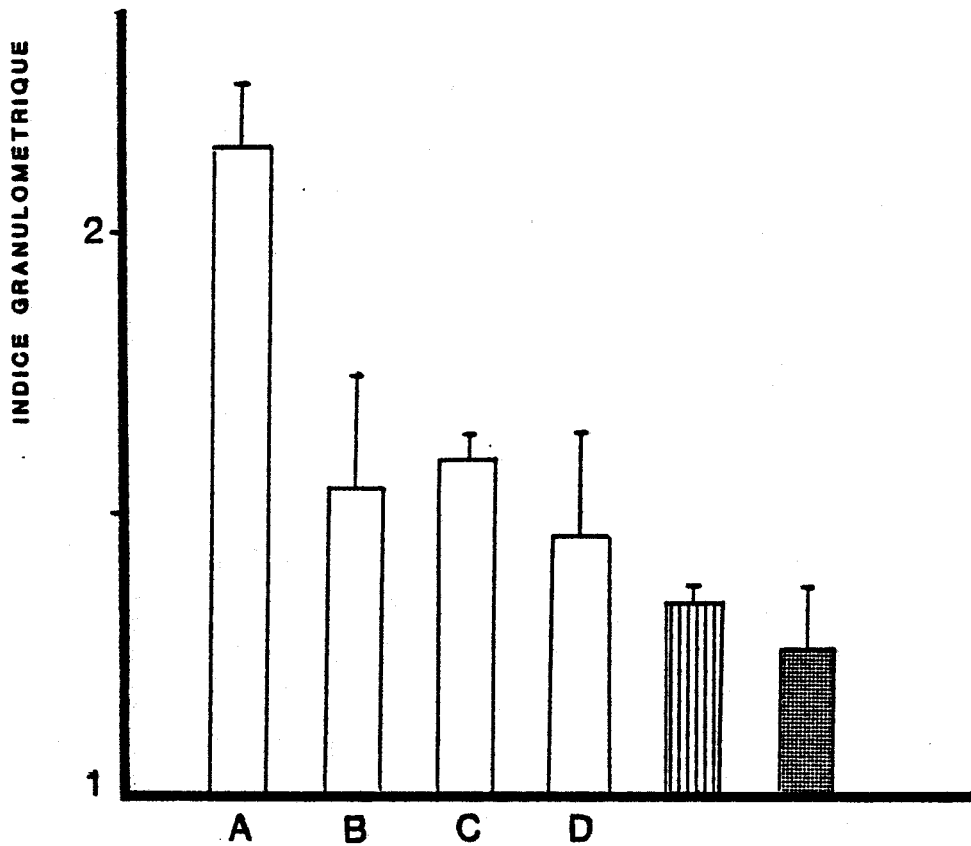


Fig. 14 : Effet du tripeptide Thr-Lys-Pro et ses analogues protégés sur la formation des granulomes in vitro.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris infectées par S. mansoni.

A. Non traitées

B, C et D. Respectivement traitées par Thr-Lys-Pro, Acétyl-Thr-Lys-Pro et Thr-Lys-Pro-amide et significativement différents de A ($P_B = 0,01$; $P_C = 0,003$; $P_D = 0,001$).



Cultures utilisant des cellules spléniques de souris infectées, appauvries en cellules adhérentes aux supports solides.



Cultures utilisant des cellules spléniques totales de souris saines.

infectées par S. mansoni et les oeufs du parasite. Nous obtenons pour les trois types de traitement, des indices granulométriques se rapprochant de ceux correspondant aux témoins négatifs.

L'adjonction au tripeptide Thr-Lys-Pro de radicaux acétyl ou amide, n'affecte donc en rien son aptitude à inhiber la formation de granulomes in vitro.

Pour les tests in vivo, il est donc préférable d'utiliser les formes protégées du TKP pour éviter de probables dégradations peptidasiques.

3.2.9. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail permet de montrer que certains peptides appartenant au second domaine constant de la molécule d'IgG, inhibent la formation des granulomes in vitro autour des oeufs de S. mansoni. L'effet inhibiteur est maximal pour le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) et diminue après l'adjonction des acides aminés supplémentaires en position NH₂. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Auriault et coll., en 1980, qui ont mis en évidence l'inhibition de différentes fonctions des macrophages par des peptides obtenus après l'hydrolyse des IgG par les protéases sécrétées par les schistosomules. Dans ce cas également, l'adjonction des acides aminés en positions terminales (NH₂ et COOH) du tripeptide TKP réduisait l'activité inhibitrice du peptide (Auriault et coll., 1983). La séquence des acides aminés Thr-Lys-Pro constituerait donc le siège d'un site actif camouflé au sein de la chaîne polypeptidique. L'inhibition de la formation des granulomes a lieu pendant les premières étapes du développement de cette réaction cellulaire. Elle fait intervenir uniquement les cellules adhérentes aux supports solides, appartenant essentiellement à la lignée monocytaire. Nous avons aussi montré que le TKP inhibe la réponse chimiotactique des macrophages vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs (SEA). Ceci corrobore les travaux d' Auriault et coll. en 1983 qui ont montré une importante réduction de la mobilité et des capacités phagocytaires des macrophages par le TKP.

L'inhibition du développement de la réaction granulomateuse par le TKP se ferait donc au moins en partie par le biais de l'inhibition de la migration des macrophages. En effet, les macrophages sont les premières cellules venant au contact des oeufs (vonLichtenberg, 1962 ; Bentley et coll., 1982). Ils sont indispensables à la formation des granulomes tant in vivo (Boros et Warren, 1971) qu'in vitro (Doughty et Phillips, 1982a).

D'autre part, les macrophages synthétisent des monokines (IL₁) (Mizel et Mizel, 1981) dont l'un des rôles est de stimuler la prolifération des lymphocytes T (Oppenheim et coll., 1976) et des fibroblastes (Wyler et Rosenwasser, 1982). L'inhibition de la production d'IL₁ par les macrophages sous l'effet du TKP (Auriault et coll., en cours de publication) pourrait être un facteur essentiel de la modulation de la formation des granulomes par le TKP. En effet, bien que la cible soit le macrophage, d'autres cellules comme les lymphocytes et les fibroblastes qui sont des composants essentiels du granulome pourraient être affectées. On pourrait donc en conclure qu'outre la migration des macrophages, leur aptitude à coopérer avec d'autres cellules pourrait être altérée en présence du TKP. Ceci d'ailleurs a posé le problème de la vocation pharmacologique de ce tripeptide dans d'autres domaines que les infections parasitaires. En effet, la formation des granulomes autour des oeufs de schistosomes est un exemple de réaction cellulaire de type inflammatoire. Puisque les macrophages sont souvent associés à ce type de réaction et vu l'action inhibitrice du TKP sur ces cellules, on pourrait envisager l'emploi de ce tripeptide comme agent anti-inflammatoire. D'autre part, bien que mise en évidence in vitro, l'interaction entre les peptides d'IgG et les granulomes via les macrophages pourrait s'inscrire dans le mécanisme de protection du parasite contre la réponse immunitaire de son hôte. En effet, le TKP provient du second domaine constant de la molécule d'IgG (Auriault et coll., 1983). Puisque la phase tardive de l'infection des animaux par les schistosomes (phase chronique) est caractérisée par une synthèse accrue d'anticorps (Oberlin et Weiss, 1977), en particulier ceux appartenant à la classe IgG (Boros et coll., 1982), ces anticorps pourraient contribuer à la régulation de la réponse granulomateuse après leur clivage par des enzymes parasitaires. Ceci pourrait donc expliquer la diminution de la formation des granulomes dus aux oeufs de S. mansoni lors de la phase chronique de

l'infection par ce parasite, s'accompagnant d'une réduction des propriétés phagocytaires des macrophages isolés des granulomes (Welhansen et Boros, 1981).

Le rapprochement de ces différents travaux nous permet d'envisager une dégradation de l'IgG soit par voie catabolique, soit sous l'effet d'enzymes sécrétées par les oeufs ou les schistosomes. Il produirait ainsi des fragments peptidiques ayant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des macrophages et par conséquent des granulomes en formation.

Dans le cas d'une réinfection en phase chronique, les IgG pourraient être dégradées après leur fixation sur la membrane des schistosomules et libèreraient des peptides similaires au TKP, ou du TKP lui-même, qui empêcheraient la formation de nouveaux granulomes.

En 1975, Kotkes et Pick ont démontré que des complexes immuns solubles contenant l'IgG2 immobilisent les macrophages in vitro. Cet effet inhibiteur est aboli lorsque l'anticorps est dépourvu de son fragment Fc. Cette partie de la molécule est donc impliquée dans l'inhibition des macrophages. En effet, des peptides résultant de la portion Fc de l'IgG sont capables d'inactiver les macrophages in vitro (Auriault et coll., 1980). In vivo, les cellules phagocytaires pourraient dégrader les complexes anticorps-antigènes formés au voisinage des oeufs tardivement au cours de l'infection par S. mansoni (von Lichtenberg et coll., 1966). Dans le cas où l'IgG serait impliquée dans la complexation des antigènes d'oeufs, il y aurait libération de peptides de son fragment Fc qui auraient une activité en retour sur les macrophages et donc sur les granulomes en développement.

Les hypothèses que nous venons de formuler viennent s'ajouter au schéma de régulation de la réaction cellulaire due aux oeufs de schistosomes ; cette régulation fait intervenir des lymphocytes T suppresseurs et des

anticorps. Ces derniers agiraient par complexation des antigènes sécrétés par les oeufs (Pelley et Warren, 1978).

Nous obtenons généralement 50 % d'inhibition de la réaction granulomateuse in vitro par le TKP. Sachant que ce peptide agit uniquement sur les cellules de type macrophage, ce résultat suggère deux explications possibles :

- la première supposant l'existence d'un mécanisme compensatoire qui ferait intervenir les autres cellules du granulome .
- la deuxième qui consiste en une action sélective du TKP sur une ou plusieurs populations de macrophages.

Cette deuxième hypothèse paraît plus plausible et nécessite donc une vérification.

Notre étude de l'effet du TKP sur la formation des granulomes in vitro a été restreinte à l'action exercée par ce produit sur la migration des macrophages. Ces travaux méritent d'être étendus :

- d'une part au processus de coopération cellulaire au niveau du granulome, notamment en considérant l'action qu'exercerait le TKP sur la synthèse de monokines (IL1) dont on connaît l'effet stimulant de la prolifération des lymphocytes T et des fibroblastes.
- d'autre part, à l'effet éventuel du TKP sur la synthèse de collagène par les fibroblastes permettant ainsi de cimenter les différents composants cellulaires du granulome. En effet, nous avons montré que ce peptide agit sur les populations cellulaires adhérentes aux supports solides comprenant essentiellement des macrophages mais aussi des fibroblastes.

Enfin, une étude in vivo s'avère nécessaire. Dans ce cas, l'utilisation du TKP sous ses formes protégées serait souhaitable, pour pallier d'éventuelles dégradations protéasiques du peptide.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, R.M., J.G. MERCER, R.A. WILSON & N.P. CARTER. 1982. Transmission of Schistosoma mansoni from man to snail : experimental studies of miracidial survival and infectivity in relation to larval age, water, temperature, host size and host age. *Parasitol.* 85 : 339.
- AURIAULT, C., M. JOSEPH, J.P. DESSAINT & A. CAPRON. 1980. Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by Schistosoma larvae proteases. *Immunol. Lett.* 2 : 135.
- AURIAULT, C., M. JOSEPH, A. TARTAR & A. CAPRON. 1983. Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human immunoglobulin G. *FEBS Lett.* 153 : 11.
- AURIAULT, C., M.A. OUAISSI, G. TORPIER, H. EISEN & A. CAPRON. 1981a. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of Schistosoma mansoni schistosomula. *Parasit. Immunol.* 3 : 33.
- AURIAULT, C., J. PESTEL, M. JOSEPH, J.P. DESSAINT & A. CAPRON. 1981b. Interaction between macrophages and Schistosoma mansoni schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62 : 15.
- BELLER, D.I. & K. HO. 1982. Regulation of macrophage populations. V. Evaluation of the control of macrophage Ia expression in vitro. *J. Immunol.* 129 : 971.
- BENTLEY, A.G., B.L. DOUGHTY & S.M. PHILLIPS. 1982. Ultrastructural analysis of the cellular response to Schistosoma mansoni. III. The in vitro granuloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31 : 1168.

- BOGITSH, B.J. 1981. In vitro effects of inhibitors on ingestion and digestion of hemoglobin by Schistosoma mansoni schistosomules. J. Parasitol. 67 : 875.
- BOROS, D.L., A.F. AMSDEN & A.T. HOOD. 1982. Modulation of granulomatous hypersensitivity. IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of Schistosoma mansoni-infected mice. J. Immunol. 128 : 1050.
- BOROS, D.L., R.P. PELLELY & K.S. WARREN. 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 114 : 1437.
- BOROS, D.L., R. TOMFORD & K.S. WARREN. 1977. Induction of granulomatous and elicitation of cutaneous sensitivity by partially purified SEA of Schistosoma mansoni. J. Immunol. 118 : 373.
- BOROS, D.L. & K.S. WARREN. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor from Schistosoma mansoni eggs. J. Exp. Med. 132 : 488.
- BOROS, D.L. & K.S. WARREN. 1971. Effect of anti-macrophage serum on hypersensitivity (Schistosoma mansoni egg) and foreign body (divinyl-benzene copolymer bead) granulomas. J. Immunol. 107 : 534.
- BOUT, D., M. JOSEPH, J.R. DAVID & A. CAPRON. 1981. In vitro killing of S. mansoni schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages. J. Immunol. 127 : 1.
- BROWN, A.P., H.G. REMOLD, K.S. WARREN & J.R. DAVID. 1977. Partial purification of antigens from eggs of Schistosoma mansoni that elicit delayed hypersensitivity. J. Immunol. 119 : 1275.
- CAPRON, A., H. BAZIN, J.P. DESSAINT & M. CAPRON. 1975. Rôle des anticorps IgE spécifiques dans l'adhérence immune de macrophages normaux aux schistosomules de Schistosoma mansoni. C.R. Acad. Sc. Paris, 280 : 927.

- CAPRON, A., J.P. DESSAINT, M. JOSEPH, R. ROUSSEAU, M. CAPRON & H. BAZIN. 1977. Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat : a new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* 7 : 315.
- CHENSUE, S.W. & D.L. BOROS. 1979. Modulation of granulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in Schistosoma mansoni-infected mice. *J. Immunol.* 123 : 1409.
- CHENSUE, S.W., D.L. BOROS & C.S. DAVID. 1980. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis : in vitro characterization of T lymphocyte subsets involved in the production and suppression of migration inhibition factor. *J. Exp. Med.* 151 : 1398.
- CHENSUE, S.W., D.L. BOROS & C.S. DAVID. 1983. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. II. T suppressor cell-derived I-C subregion-encoded soluble suppressor factor mediates regulation of lymphokine production. *J. Exp. Med.* 157 : 219.
- COLLEY, D.G. 1976. Adoptive suppression of granuloma formation. *J. Exp. Med.* 143 : 696.
- COLLEY, D.G. 1981. T lymphocytes that contribute to the immunoregulation of granuloma formation in chronic murine schistosomiasis. *J. Immunol.* 126 : 1465.
- COLLEY, D.G., F.A. LEWIS & C.W. TODD. 1979. Adoptive suppression of granuloma formation by T lymphocytes and by lymphoid cells sensitive to cyclophosphamide. *Cell. Immunol.* 46 : 192.

- DESSAINT, J.P. & A. CAPRON. 1980. Interactions cellulaires et activation par l'immunoglobuline E. Rev. Inst. Pasteur (Lyon) 13 : 5
- DOMINGO, E.O. & K.S. WARREN. 1967. The inhibition of granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs. II. Thymectomy. Am. J. Pathol. 51 : 757.
- DOMINGO, E.O. & K.S. WARREN. 1968. The inhibition of granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs. III. Heterologous antilymphocyte serum. Am. J. Pathol. 52 : 613.
- DOUGHTY, B.L. & S.M. PHILLIPS. 1982a. Delayed hypersensitivity granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs in vitro. I. Definition of the model. J. Immunol. 128 : 30.
- DOUGHTY, B.L. & S.M. PHILLIPS. 1982b. Delayed hypersensitivity granuloma formation and modulation around Schistosoma mansoni eggs in vitro. II. Regulatory T cell subsets. J. Immunol. 128 : 37.
- EL NAGGAR, A. & D.G. COLLEY. 1982. Modulation of Schistosoma mansoni egg-induced granuloma formation. II. Soluble suppressor activity from lymphoid cells during chronic infection. Cell. Immunol. 72 : 151.
- FALK, W., R.H. GOODWIN & E.J. LEONARD. 1980. A 48-well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J. Immunol. Meth. 33 : 239.
- FIDLER, I.J., J.H. DARNELL & M.B. BUDMEN. 1976. In vitro activation of mouse macrophages by rat lymphocyte mediators. J. Immunol. 117 : 666.
- GARB, K.S., A.B. STAVITSKY & A.A. MAHMOUD. 1981. Dynamics of antigen and mitogen-induced responses in murine schistosomiasis japonica : in vitro comparison between hepatic granulomas and splenic cells. J. Immunol. 127 : 115.
- GILLIS, S., M.M. FERM, W. OU & K.A. SMITH. 1978. T cell growth factor : parameters of production and quantitative microassay for activity. J. Immunol. 120 : 2027.
- GILMAN, S.C., J.S. ROSENBERG & J.D. FELDMAN. 1983. Inhibition of interleukine synthesis and T cell proliferation by monoclonal anti-Ia antibody. J. Immunol. 130 : 1236.

- GREEN, W.F. & D.G. COLLEY. 1981. Modulation of Schistosoma mansoni egg-induced granuloma formation : I-J restriction of T cell-mediated suppression in a chronic parasitic infection. *Immunology* 78 : 1152.
- HANG, L.M., K.S. WARREN & D.L. BOROS. 1974. Schistosoma mansoni : antigenic secretions and the etiology of egg granuloma in mice. *Exp. Parasitol.* 35 : 288.
- JAMES, S.L. & D.G. COLLEY. 1975. Eosinophils and immune mechanisms : production of the lymphokine eosinophil stimulation promotor (ESP)in vitro by isolated intact granuloma. *J. Reticuloend. Soc.* 18 : 283.
- JOKY, A., M. CORNU, D. LOUIS & J.A. GRIMAUD. 1977. Polyvinylchloride (PVC) particles implantation in mouse liver. A technique for experimental study of schistosome eggs-induced liver pathology. *Specialia Experiencia* 34 : 547.
- JOSEPH, M., A. CAPRON, A.E. BUTTERWORTH, R.F. STURROCK & V. HOUBA. 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro : induction by immune complexes containing IgE and Schistosoma mansoni antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 33 : 48.
- JOSEPH, M., J.P. DESSAINT & A. CAPRON. 1977. Characteristics of macrophage activation by IgE immune complexes. *Cell. Immunol.* 34 : 247.
- JOSEPH, M., A.B. TONNEL, A. CAPRON & C. VOISIN. 1980. Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clin. Exp. Immunol.* 40 : 416.
- KLOETZEL, K. 1968. A collagenase-like substance produced by eggs of Schistosoma mansoni. *J. Parasitol.* 54 : 177.
- KOTKES, P. & E. PICK. 1975. Studies on the inhibition of macrophage migration induced by soluble antigen-antibody complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 19 : 105.

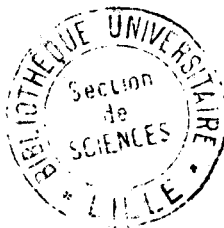
- LEWIS, F.A. & E.M. WILSON. 1981. Strain differences in lymphocyte responses and in vitro suppressor cell induction between Schistosoma mansoni infected C57 BL/6 and CBA mice. *Infect. Immunity.* 32 : 260.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR & R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265.
- MAHMOUD, A.A. 1977. Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 297 : 1329.
- MIZEL, S.B. & D. MIZEL. 1981. Purification to apparent homogeneity of murine interleukin 1. *J. Immunol.* 126 : 834.
- MOORE, D.L., D.I. GROVE & K.S. WARREN. 1976. The Schistosoma mansoni egg granuloma : quantification of cell populations. *J. Pathol.* 121 : 41.
- MOORE, D.V. & J.H. SANDGROUND. 1956. The relative egg producing capacity of Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5 : 831.
- NEWPORT, G.R. & T.H. WELLER. 1982a. Deposition and maturation of eggs of Schistosoma mansoni in vitro : Importance of fatty acids in serum-free media. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31 : 349.
- NEWPORT, G.R. & T.H. WELLER. 1982b. Miracidia infective for snails derived from eggs laid by adult Schistosoma mansoni in vitro. *Parasitology* 84 : 481.
- OBERLIN, U.P. & N. WEISS. 1977. Schistosomiasis mansoni in the hamster : cellular and humoral immune responses to soluble egg antigens (SEA). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26 : 1178.
- OLDS, G.R., R. OLVEDA, J.W. TRACY & A.A. MAHMOUD. 1982. Adoptive transfer of modulation of granuloma formation and hepatosplenic disease in murine schistosomiasis japonica by serum from chronically infected animals. *J. Immunol.* 128 : 1391.

- OLVEDA, R.M., G.R. OLDS & A.A. MAHMOUD. 1981. Quantification, dynamics and mechanisms of pulmonary inflammatory response around schistosomula of Schistosoma mansoni. Am. Assoc. Parasitologists 104 : 150.
- OPPENHEIM, J.J., A. SHNEYOUR & A.I. KOOK. 1976. Enhancement of DNA synthesis and cAMP content of mouse thymocytes by mediator(s) derived from adherent cells. J. Immunol. 116 : 1466.
- PELLEGRINO, J., C.A. OLVEIRA, J. FARIA & A.S. CUNHA. 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11 : 201.
- PELLEY, R.P., R.J. PELLEY, J. HAMBURGER, P.A. PETERS & K.S. WARREN. 1976. Schistosoma mansoni soluble egg antigens. I. Identification and purification of three major antigens, and the employment of radioimmunoassay for their further characterization. J. Immunol. 117 : 1553.
- PELLEY, R.P. & K.S. WARREN. 1978. Immunoregulation in chronic infectious disease : schistosomiasis as a model. J. Invest. Dermatol. 71 : 49.
- PEREZ, H.A. & S.R. SMITHERS. 1977. Schistosoma mansoni in the rat : the adherence of macrophages to schistosomules in vitro after sensitization with immune serum. Int. J. Parasitol. 7 : 315.
- PHILLIPS, S.M., W.A. REID, B.L. DOUGHTY & A.G. BENTLEY. 1980. The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis. Studies in athymic mice and in vitro granuloma formation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 : 820.
- PIERCE, C.W. 1969. Immune response in vitro. Cellular requirements for the immune response by nonprimed and primed spleen cells in vitro. J. Exp. Med. 130 : 345.
- RACE, G.J., R.M. MICHAELS, J.H. MARTIN, E.J.J.R. LARSH & J.C. MATTHEWS. 1969. Schistosoma mansoni eggs : an electron microscopic study of shell pores and microbarbs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130 : 990.
- ROBINSON, J.H. 1983. The ontogeny of antigen-presenting cells in fetal thymus evaluated by MLR stimulation. J. Immunol. 130 : 1592.

- ROCKLIN, R.E., J.W. TRACY & A. EL KHOLY. 1981. Activation of antigen-specific suppressor cells in human schistosomiasis mansoni by fractions of soluble egg antigens nonadherent to Con A-Sepharose. J. Immunol. 127 : 2314.
- SMITHERS, S.R. & R.J. TERRY. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae from Schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms. Parasitol. 55 : 695.
- STADECKER, M.J., D.J. WYLER & J.A. WRIGHT. 1982. Ia antigen expression and antigen-presenting function by macrophages isolated from hypersensitivity granulomas. J. Immunol. 128 : 2739.
- STEIMMAN, R.M., N. NOGUEIRA, M.D. WITMER, J.D. TYDINGS & I.S. MELLMAN. 1980. Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigens on cultured mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 152 : 1248.
- STENGER, R.J., K.S. WARREN & F.A. JOHNSON. 1967. An ultrastructural of hepatic granulomas and schistosome egg-shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Exp. Mol. Pathol. 7 : 116.
- TORPIER, G., A. CAPRON & M.A. OUAISSI. 1979. Receptor for IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on S. mansoni schistosomula. Nature 278 : 447.
- van FURTH, R. 1982. Current view on the mononuclear phagocytes system. Immunobiology 161 : 178.
- van MARCK, E.A.E., S. STOKER, J.A. GRIMAUD, L. KESTENS, P.L.J. GIGASE & A.M. DEELDER. 1980. The implantation of sepharose beads in mouse livers as an aid in the study of hepatic schistosomal fibrosis. Experientia 36 : 1116.
- von LICHTENBERG, F. 1962. Host response to eggs of S. mansoni. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. Am. J. Pathol. 41 : 711.
- von LICHTENBERG, F. & P. RASLAVICIUS. 1967. Host response to eggs of Schistosoma mansoni. V. Reactions to purified miracidia and egg shells and to viable and heat-killed whole eggs. Lab. Invest. 16 : 892.

- von LICHTENBERG, F., J.H. SMITH & A. CHEEVER. 1966. The Heoppli phenomenon in schistosomiasis. Comparative pathology and immunopathology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 115 : 886.
- WAHL, S.M. & C.L. GATELY. 1983. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. J. Immunol. 130 : 1226.
- WARREN, K.S. 1982. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis : in vivo models. Immunological Rev. 61 : 190.
- WARREN, K.S., E.O. DOMINGO & R.B. COWAN. 1967. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am. J. Pathol. 51 : 735.
- WEINSTOCK, J.V. & D.L. BOROS. 1981. Heterogeneity of granulomatous response in the liver, colon, ileum, and ileal Peyer's patches to schistosome eggs in murine schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 127 : 12913.
- WELLHAUSEN, S.R. & D.L. BOROS. 1981. Comparison of Fc, C3 receptors and Ia antigens on the inflammatory macrophage isolated from vigorous or immunomodulated liver granulomas of schistosome-infected mice. J. Reticuloend. Soc. 30 : 191.
- WYLER, D.J. & L.J. ROSENWASSER. 1982. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. II. Functional and biochemical characteristics of egg granuloma-derived fibroblast-stimulating factor. J. Immunol. 129 : 1706.
- WYLER, D.J. & A.E. POSTLETHWAITE. 1983. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. IV. Isolated egg granulomas elaborate a fibroblast chemoattractant in vitro. J. Immunol. 130 : 1371.

- ZUSSMAN, R.A., P.M. BAUMAN and J.C. PETRUSKA. 1970. The role of ingested hemoglobin in the nutrition of Schistosoma mansoni. J. Pathol. 56 : 75.
- YAMASHITA, V. and E.M. SHEVACH. 1977. The expression of Ia antigens on immuno-competent cells in the guinea pig. II. Ia antigens on macrophages. J. Immunol. 119 : 1584.



RESUME

Nous avons mis en évidence l'inhibition de la formation des granulomes bilharziens (Schistosoma mansoni) in vitro par le tripeptide Thr-Lys-Pro (TKP) provenant de la région CH₂ de l'immunoglobuline G (IgG). L'inhibition a lieu aux premiers stades du développement des granulomes autour des oeufs du parasite et fait intervenir uniquement les cellules adhérentes aux supports solides. Ces dernières sont constituées essentiellement de macrophages dont divers travaux antérieurs ont montré le rôle inducteur dans la formation des granulomes. D'autre part, nous avons montré que le TKP inhibe la migration des macrophages vis-à-vis de l'antigène soluble des oeufs de S. mansoni. Très récemment, il a été démontré que le TKP affecte d'autres fonctions effectrices et métaboliques des macrophages qui permettent à ces cellules d'exercer leur rôle immunologique. L'inhibition de la formation des granulomes par le TKP se fait donc au moins en partie via les macrophages.

MOTS CLEFS : - SCHISTOSOMIASE
- SCHISTOSOMIA MANSONI
- IMMUNOGLOBULINE G
- TRIPEPTIDE THR-LYS-PRO