

50376  
1984  
299

No d'ordre : 620

50376  
1984  
299

**UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES de LILLE**

THESE

présentée à l'Université de Lille I  
pour obtenir le titre de Docteur es-SCIENCES NATURELLES  
par

Colette DISSOUS - LEMPEREUR

\*

ETUDE des ANTIGENES de SURFACE  
de  
**SCHISTOSOMA MANSONI**

CARACTERISATION de MOLECULES IMPLIQUEES  
dans  
L'IMMUNITE à la REINFECTION

\*

Présentée le 5 JUIN 1984 devant la commission d'examen

Hex

**Membres du Jury :** *Président*  
*Rapporteurs*

M. J. MONTREUIL  
M. A. CAPRON  
M. H. EISEN  
M. G. STRECKER  
M. A. BUTTERWORTH  
M. J. KREMBEL

*Examineurs*



50376  
1984  
299

50376  
1984  
299

L'ensemble de ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'INSTITUT PASTEUR de LILLE ( INSERM U.167- CNRS 624 ) sous la direction de Mr Le Professeur André CAPRON.



Nous remercions très sincèrement:

Monsieur Le Professeur A.CAPRON qui nous a accueillie dans son laboratoire et qui a dirigé l'ensemble de ce travail

Monsieur Le Professeur J.MONTREUIL qui nous fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse

Messieurs H.EISEN, G.STRECKER, A.BUTTERWORTH et J.KREMBEL qui ont accepté de juger ce travail

Nous exprimons notre profonde reconnaissance

à J.TROLET et J.M.CAULIEZ pour leur précieuse collaboration technique

à M.F.MASSARD et C.DROLEZ pour leur participation à la préparation du  
manuscrit

à J.M.GRZYCH et à tous les membres du laboratoire qui nous ont aidé  
à la réalisation de ce travail

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes:

*Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula*

C. DISSOUS, C. DISSOUS, A. CAPRON  
Mol. Biochem. Parasitol. (1981) 3, 215

*Isolation of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula*

C. DISSOUS, A. CAPRON  
Protides of Biologicals Fluids (1982) 179

*Schistosoma mansoni surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a*

C. DISSOUS, J. M. GRZYCH, A. CAPRON  
J. Immunol. (1982) 129, 2232

*Characterization of potentially protective antigens from the surface of Schistosoma mansoni schistosomula*

C. DISSOUS, A. CAPRON  
Fed. Proceed. (1982) 41, 483

*Messenger RNA extracted from Schistosoma mansoni larval forms codes for parasite antigens when translated in vitro*

D. GRAUSZ, C. DISSOUS, A. CAPRON, W. ROSKAM  
Mol. Biochem. Parasitol. (1983) 7, 293

*Schistosoma mansoni: antigenic community between schistosomula surface and adult worm incubation products as a support for concomitant immunity*

C. DISSOUS, A. CAPRON  
Febs. Lett. (1983) 162, 355

*Human antibody response against Schistosoma mansoni surface antigens defined by protective monoclonal antibodies*

C. DISSOUS, A. PRATA, A. CAPRON  
J. Infec. Dis. (1984) 149, 227

*Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis*

J. M. GRZYCH, M. CAPRON, C. DISSOUS, A. CAPRON  
J. Immunol. (1984) sous presse

Communications orales lors de congrès:

C. DISSOUS and A. CAPRON

*Surface antigens of Schistosoma mansoni schistosomula.*

XXIX Colloquium of Protides of Biologicals Fluids, Brussels, 1981

C. DISSOUS and A. CAPRON

*Isolation of surface antigens from S. mansoni schistosomula.*

SWG Meeting on the schistosome membrane, WHO, Geneva, 1982

( Rapport publié dans Nature, 1982, 296, 809 )

C. DISSOUS and A. CAPRON

*Characterization of potentially protective antigens from the surface of S. mansoni schistosomula.*

FASEB "annual meeting", 1982, New Orleans, Louisiana

## R É S U M É

La technique de marquage par  $^{125}\text{I}$  en présence de lactopéroxydase nous a permis d'envisager l'étude des antigènes exposés à la surface du parasite de S.mansoni et susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes d'immunité à la réinfection par le parasite.

A la surface du schistosomule, nous avons pu identifier 4 antigènes majeurs de poids moléculaires très proches en gel de polyacrylamide-SDS ( 40K, 38K, 37K et 32K ) et de points isoélectriques identiques. Ces antigènes sont immunoprécipités par les anticorps élaborés lors de l'infection expérimentale ( rat, souris et singe ) et humaine; seule la molécule 38K est précipitée par un anticorps monoclonal anti-S.mansoni de sous-classe IgG2a ( IPLSm1 ) dont les activités biologiques protectrices ont été mises en évidence in vitro et in vivo chez le rat.

Les études réalisées sur les parasites prélevés à différents stades de leur développement, indiquent que les anticorps IPLSm1 se fixent préférentiellement à la surface des stades larvaires ( cercaire, schistosomule ) et qu'ils reconnaissent un antigène 115K parmi les produits d'incubation des schistosomes adultes. Ces résultats viennent étayer, à l'échelle moléculaire, l'hypothèse selon laquelle l'immunité concomitante dans la schistosomiase serait stimulée par des composants dérivés de vers adultes.

Les résultats de l'analyse de la réponse humorale chez l'homme confirment l'immunogénicité importante des antigènes 30-40K: 97% des patients étudiés présentent des anticorps anti 30-40K et la réponse humorale est maximale entre 10 et 20 ans, lorsque la fréquence et l'intensité de l'infec-

tion dans les zones endémiques sont aussi les plus importantes. On peut donc considérer que la réponse anti-38K en particulier puisse être un marqueur de l'infection par les schistosomes et envisager l'application des anticorps IPLSm1 dans le diagnostic de la maladie.

Les premiers essais d'immunisation contre les antigènes 38K et 115K ont montré qu'il est nécessaire de définir aussi bien le mode de présentation des antigènes que la structure exacte de l'épitope spécifique des anticorps protecteurs pour espérer obtenir une vaccination efficace. L'analyse biochimique des antigènes suggère que l'épitope soit, au moins en partie, de nature glucidique et la détermination de sa structure est en cours.

## T A B L E   D E S   M A T I E R E S

INTRODUCTION	Page 1
GENERALITES	
I. <u>LE CYCLE DE S. MANSONI ET SES DIFFERENTS STADES D'EVOLUTION</u>	
A. <u>Description du cycle</u>	3
B. <u>Caractéristiques des différents stades évolutifs du parasite</u>	5
1. <u>La cercaire</u>	
2. <u>Le schistosomule</u>	
3. <u>Le schistosome</u>	6
4. <u>L'oeuf</u>	7
5. <u>Le miracidium</u>	
6. <u>Le sporocyste</u>	
II. <u>L'IMMUNITE A S.MANSONI</u>	9
A. <u>Immunité naturelle</u>	
1. <u>Mise en évidence</u>	
2. <u>Mécanismes</u>	10
B. <u>Immunité acquise</u>	
1. <u>Mise en évidence</u>	12
2. <u>Origine du stimulus antigénique</u>	13
3. <u>Le concept de l'immunité concomitante</u>	15

4. <u>Les mécanismes effecteurs de l'immunité</u>	16
a) Mécanismes d'immunité non spécifique	
b) Mécanismes d'immunité spécifique	17
<i>i) Cytotoxicité dépendante du complément</i>	
<i>ii) Cytotoxicité en présence de cellules</i>	18
5. <u>Les mécanismes d'évasion du parasite</u>	23
III. <u>LES ANTIGENES DE S. MANSONI</u>	28
A. <u>Caractérisation d'antigènes membranaires</u>	30
B. <u>Etude des antigènes de surface</u>	31
IDENTIFICATION DES ANTIGENES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE	
I. <u>MARQUAGE DES PROTEINES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE</u>	33
A. <u>Iodation catalysée par la lactopéroxydase</u>	
B. <u>Iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER</u>	36
C. <u>Iodation par l'acide iodosulfanilique diazoté</u>	37
II. <u>IMMUNOPRECIPITATION DES ANTIGENES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE</u>	
<u>PAR DES SERUMS D'HOTES INFECTES PAR S. MANSONI</u>	38
A. <u>Extraction des protéines de surface du schistosomule</u>	
B. <u>Immunoprécipitation par des sérums de rats</u>	41
1. <u>Caractérisation des antigènes</u>	
2. <u>Etude de l'accessibilité des antigènes</u>	44
a) Iodation catalysée par des enzymes insolubilisées	
b) Accessibilité aux anticorps spécifiques	45

C. <u>Immunoprécipitation par des sérums de souris</u>	47
D. <u>Immunoprécipitation par des sérums de primates</u>	
E. <u>Discussion</u>	49
III. <u>ANTIGENES DE SURFACE DEFINIS PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX</u>	53
A. <u>Caractéristiques des anticorps IPLSm1</u>	54
1. <u>Sélection de l'hybride cellulaire</u>	
2. <u>Propriétés biologiques des anticorps IPLSm1</u>	56
B. <u>Identification de l'antigène reconnu par les anticorps IPLSm1</u>	57
IV. <u>ANTIGENES COMMUNS AUX DIFFERENTS STADES DU PARASITE</u>	61
A. <u>Antigènes des premiers stades larvaires</u>	
B. <u>Antigènes de schistosomule au stade "poumon"</u>	67
C. <u>Antigènes de schistosome</u>	68
1. <u>Immunsation par injection de schistosomes</u>	
2. <u>Identification des antigènes communs</u>	70
D. <u>Conclusion</u>	
ETUDE DE LA REPONSE HUMORALE DANS L'INFECTION HUMAINE	
I. <u>METHODE DE MESURE QUANTITATIVE</u>	74
A. <u>Principe</u>	
B. <u>Résultats</u>	75
II. <u>ETUDE DE LA REPONSE HUMORALE EN FONCTION DE L'AGE DES PATIENTS</u>	
A. <u>Origine des sérums étudiés</u>	
B. <u>Analyse des sérums</u>	77
III. <u>DISCUSSION</u>	82

<b>CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES ANTIGENES</b>	
I. <u>ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DES ANTIGENES</u>	85
A. <u>Electrophorèse bidimensionnelle</u>	
B. <u>Protéolyse ménagée des antigènes 30-40K</u>	89
1. <u>Sensibilité des antigènes 30-40K aux protéases</u>	
2. <u>Analyse des fragments résultant de l'action de la V8 protéase de S. aureus</u>	90
II. <u>CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNES DE LECTINES</u>	92
A. <u>Adsorption sur Con A-Sépharose</u>	93
B. <u>Adsorption sur LCA-Sépharose</u>	
III. <u>ETUDE DE L'EPITOPE RECONNU PAR LES ANTICORPS IPLSm1</u>	96
A. <u>Arguments en faveur d'une nature glucidique de l'épitope</u>	
B. <u>Inhibition de la liaison IPLSm1-38K par des oligosaccharides de structure déterminée</u>	99
 CONCLUSION	 101
 MATERIEL ET METHODES	
I. <u>PARASITES</u>	108
A. <u>Cercaires</u>	
B. <u>Schistosomules</u>	
1. <u>Schistosomules "peau"</u>	
2. <u>Schistosomules "mécaniques"</u>	
3. <u>Schistosomules "poumon"</u>	109

C. <u>Schistosomes</u>	
II. <u>SOURCES D'ANTICORPS</u>	110
A. <u>Sérums</u>	
B. <u>Anticorps monoclonaux</u>	
III. <u>TECHNIQUES D'IODATION</u>	
A. <u>Iodation en présence de lactopéroxydase</u>	
B. <u>Iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER</u>	111
C. <u>Iodation par l'acide iodosulfanilique diazoté</u>	
IV. <u>TECHNIQUE D'IMMUNOPRECIPITATION</u>	112
V. <u>ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE</u>	113
A. <u>Electrophorèse monodimensionnelle</u>	
B. <u>Electrophorèse bidimensionnelle</u>	
C. <u>Analyse</u>	
1. <u>Coloration par le bleu de Coomassie</u>	
2. <u>Coloration par le nitraté d'argent</u>	114
3. <u>Autoradiographie</u>	
VI. <u>PRODUITS UTILISES</u>	

## BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

Les maladies parasitaires sont encore de nos jours des causes importantes de mortalité et de morbidité dans le monde. Seconde endémie mondiale après le paludisme, la bilharziose ou schistosomiase atteint environ 250 millions d'individus. Cette maladie est liée à une infection par des trématodes digénétiques de la famille des Schistosomatidae et transmise par l'intermédiaire de mollusques.

Trois espèces de schistosomes affectent le plus couramment l'homme : Schistosoma haematobium (Bilharz, 1852 ; Weinland, 1858) responsable de la bilharziose urinaire ou vésicale, Schistosoma mansoni (Sambon, 1907) agent de la bilharziose intestinale et Schistosoma japonicum (Katsurada, 1904) affectant plus spécialement le système artério-veineux.

L'infection expérimentale à S. mansoni est relativement facile à établir chez les rongeurs et cela a considérablement favorisé l'étude des différents stades du parasite et la compréhension des manifestations immunopathologiques liées à sa présence dans l'organisme. En effet, si la majorité des hôtes développent une immunité plus ou moins importante à une réinfection par le parasite, la réponse immune suscitée est cependant inefficace sur la population des parasites de la première infection qui peuvent alors survivre très longtemps chez l'hôte infesté.

Les travaux effectués durant ces quinze dernières années ont surtout visé, grâce à l'établissement de modèles d'infection expérimentale, à analyser les relations existant entre l'hôte et le parasite et plus spécialement les mécanismes régissant à la fois

la destruction des larves infestantes et le maintien de la population parasitaire initialement établie. Différents systèmes de cytotoxicité dépendant de la présence d'anticorps spécifiques de S. mansoni ont été mis en évidence in vitro ; ceux-ci sont efficaces uniquement sur les premiers stades larvaires du parasite et suggèrent l'existence d'antigènes cibles définis à la surface des larves. C'est en particulier la démonstration de ces mécanismes qui a motivé notre intérêt pour l'étude des antigènes de surface de S. mansoni impliqués dans les réactions de défense immunitaire de l'hôte.

Avant d'aborder les résultats de notre contribution à l'étude de ces antigènes, nous présenterons brièvement le cycle du parasite et résumerons les nombreuses données acquises relatives au développement d'un état d'immunité chez l'hôte.

GENERALITES

## I. LE CYCLE DE S. MANSONI ET SES DIFFERENTS STADES D'EVOLUTION

### A. Description du cycle

La schistosomiase à S. mansoni sévit surtout dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique et de l'Amérique du Sud, où l'on compte au moins 10 espèces différentes de Planorbes (genre Biomphalaria) capables d'assurer le cycle du parasite. Lorsque les conditions de température de l'eau et de lumière sont favorables, les mollusques aquatiques libèrent des larves infectantes ou cercaires, et c'est très précocement, dans l'enfance, que l'homme s'infeste par voie cutanée à l'occasion de bains.

L'évolution du parasite chez ses deux hôtes successifs est schématisée dans la figure 1 (p.4).

Lorsque les cercaires ① pénètrent la peau, elles perdent leur partie caudale pour se transformer en schistosomules ② qui migrent progressivement vers le poumon puis dans le foie où ils se différencient en schistosomes mâles ou femelles ③. Les femelles gravides gagnent les capillaires du système mésentérique pour pondre, et les oeufs ④, munis d'un éperon latéral, traversent la paroi intestinale pour être éliminés dans les selles. L'éclosion de l'oeuf se produit au contact de l'eau et s'accompagne de la libération d'un miracidium ⑤, larve ciliée nageant rapidement et infectante pour le Planorbe. Le miracidium donne ensuite naissance à un sporocyste primaire ⑥ dans lequel bourgeonnent des sporocystes fils ou secondaires ⑦ lesquels produisent des cercaires infestantes pour l'hôte vertébré.

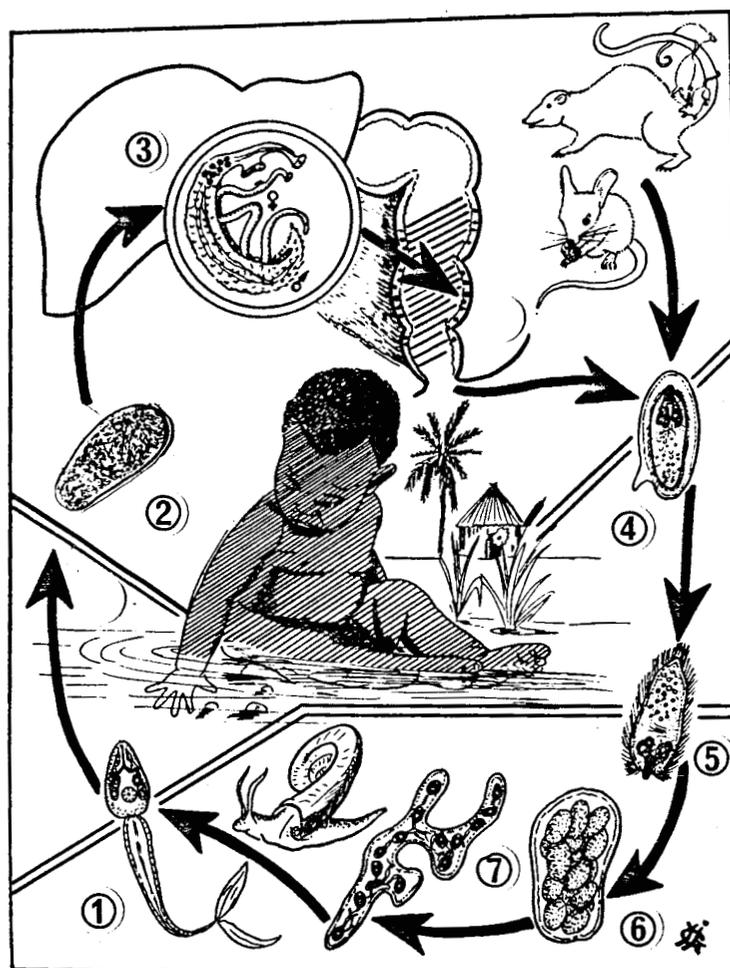


Figure 1 : Représentation schématique du cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (d'après GOLVAN Y.J., *Eléments de parasitologie médicale*, édition Flammarion, 1969).

Au laboratoire, le cycle expérimental est reproduit chez Biomphalaria glabrata et Mesocricetus auratus (hamster doré).

## B. Caractéristiques des différents stades évolutifs du parasite

### 1. La cercaire

La cercaire est formée d'une tête et d'une queue bifide, d'où son nom de "furcocercaire". La durée de vie des cercaires est brève : à des températures comprises entre 20 et 24°C, elles perdent presque toute leur activité dans les 8 à 12 heures qui suivent leur émission, probablement par épuisement de leurs réserves en glycogène.

L'organisme est limité par une membrane unitaire recouverte d'une couche superficielle de mucus, le glycocalyx. La cercaire possède un tube digestif primitif apparemment non fonctionnel, un système nerveux et plusieurs paires de glandes parmi lesquelles on note les glandes préacétabulaires qui se vident lors de la pénétration de l'hôte vertébré en libérant des enzymes capables de lyser les tissus.

### 2. Le schistosomule

Lors de la pénétration de la peau, la cercaire perd sa partie caudale. La tête subit immédiatement des transformations morphologiques et physiologiques, et devient schistosomule. Le schistosomule n'a plus le glycocalyx cercarien et il est devenu sensible à l'eau. Il prend très vite une forme allongée (100 - 120 µm de long) et acquiert une double membrane (membrane heptalaminée) qu'il gardera jusqu'au stade adulte.

Des granules de sécrétion contenant de nombreuses membranes disposées en cercles concentriques migrent vers le tégument et leur contenu s'étend à la surface du parasite pour former la seconde membrane du schistosomule (1).

Le schistosomule migre à travers les tissus et il gagne en général le poumon au 6ème jour. A ce stade, il mesure 120 à 180 µm de long.

### 3. Le schistosome

Les parasites atteignent leur maturité sexuelle dans le foie. Le schistosome mâle est plus trapu que la femelle et possède un canal gynécophore dans lequel se place la femelle. Les vers vivent ainsi appariés dans l'organisme. Grâce à sa ventouse ventrale, le mâle s'ancre aux parois des vaisseaux sanguins et résiste ainsi au courant sanguin.

L'appareil digestif des schistosomes comprend un oesophage court qui se divise en deux branches réunies à la partie postérieure pour former le caecum. Ces parasites sont hémato-phages et chez la femelle en particulier, l'intestin renferme un pigment noir d'origine sanguine (l'hématine) qui rend aisée la distinction entre mâle et femelle.

La longueur des vers mâles et femelles varie respectivement de 6 à 12 mm et 7 à 17 mm. Une autre caractéristique intéressante de ces parasites est leur longévité importante qui est de l'ordre de 2 à 5 ans en moyenne (2), certains schistosomes étant capables de vivre pendant 20 à 30 ans dans l'organisme humain (3).

#### 4. L'oeuf

Les oeufs sont de teinte jaunâtre. Ils ne possèdent pas d'opercule mais un éperon latéral qui les aide à résister au courant sanguin et aussi à pénétrer la paroi des veinules. Pendant leur migration vers la lumière intestinale, les oeufs opèrent leur maturation en miracidia. Un grand nombre d'oeufs restent séquestrés dans les tissus et sont à l'origine des granulomes et des réactions inflammatoires qui les accompagnent. Les oeufs qui parviennent à s'échapper sont éliminés dans les selles de l'hôte.

#### 5. Le miracidium

Au contact de l'eau, l'oeuf éclot et libère le miracidium qui devient actif et se propulse grâce à ses quatre rangées de cils implantés dans les cellules épidermiques. Il est pourvu d'un intestin primitif apparemment non fonctionnel et quatre cellules à flammes constituent l'appareil excréteur. Une paire de glandes saillantes unicellulaires s'ouvrent à la base de la papille apicale et favorisent par leurs sécrétions la pénétration dans le mollusque.

#### 6. Le sporocyste

Lorsque le miracidium pénètre dans le mollusque hôte qui lui est spécifique, il perd son revêtement cilié, ses muscles dégénèrent et il se transforme en sporocyste primaire, contenant des cellules germinales qui deviendront en 10 à 15 jours des sporocystes fils.

Contrairement au sporocyste primaire, les sporocystes fils sont mobiles et passent dans les glandes digestives et l'ovotestis du mollusque. Les cellules germinales se transforment en cercaires qui s'échappent du sporocyste fils ; ce dernier se régénère ensuite et peut ainsi produire des cercaires pendant plusieurs mois.

La production de cercaires matures requiert 4 à 5 semaines à partir de l'infestation du mollusque.

## II. L'IMMUNITÉ A S. MANSONI

On peut distinguer deux types d'immunité : l'immunité naturelle ou résistance à l'infection et l'immunité acquise qui confère une résistance à la réinfection.

### A. Immunité naturelle

Nous exprimerons ici par "immunité" la résistance de l'hôte à l'infection par le parasite, que les mécanismes impliqués soient ou non de nature immunologique.

#### 1. Mise en évidence

Bien qu'une grande variété de mammifères soient des hôtes pour S. mansoni, le degré d'infection toléré par chacun d'eux varie considérablement. Le degré de susceptibilité d'un hôte est déterminé par la mesure du pourcentage de vers pouvant se développer, la taille de ces vers, leur capacité à pondre des oeufs viables et l'importance des manifestations immunopathologiques observées.

Parmi les animaux de laboratoire, le hamster est considéré comme l'hôte le plus permissif et constitue donc un hôte de choix pour maintenir le cycle de S. mansoni. La souris est également un hôte très susceptible au parasite mais le nombre de schistosomes matures et d'oeufs viables récupérés chez cet animal demeure inférieur à celui obtenu chez le hamster.

Le lapin et le cobaye tolèrent le développement des schistosomes mais ces derniers ne produisent pas d'oeufs.

Le rat est un hôte spécial pour S. mansoni car si les parasites peuvent migrer jusqu'au foie, la majorité d'entre eux sont éliminés entre la 4ème et la 6ème semaine suivant l'infection (4, 5). Chez le singe Rhésus, hôte très susceptible à S. mansoni, on observe également lors d'infections massives, une réduction du degré d'infection après 8 à 12 semaines d'infection, se traduisant par une décroissance brutale du nombre d'oeufs émis et la mort de la plupart des parasites (6, 7).

L'homme se comporte comme un hôte susceptible à S. mansoni chez qui les schistosomes peuvent survivre très longtemps. Il présente en général un niveau d'infection stable à l'âge adulte.

En plus des différences spécifiques d'espèce, des variations dans la susceptibilité à l'infection peuvent apparaître au sein d'une même espèce. CARDOSO (1953) observait que la race noire humaine était plus résistante à l'infection que la race blanche (8) et ce phénomène de susceptibilité génétique fut ensuite démontré, chez la souris en particulier, grâce à l'utilisation d'animaux de souches différentes (9).

## 2. Mécanismes

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer l'immunité variable des hôtes à l'infection.

La pénétration des cercaires à travers la peau étant dépendante de mécanismes enzymatiques (10), certains auteurs pensèrent que la susceptibilité de l'hôte était liée à la densité et au degré de polymérisation des glycoprotéines constituant sa barrière cutanée (11).

D'autre part KAGAN et LEVINE (1956) relièrent l'activité cercaricide du sérum de l'hôte à sa susceptibilité à l'infection (12).

Enfin, PURNELL (1966) observa que les vers mâles de S. haematobium récupérés chez le hamster mâle étaient plus développés que ceux obtenus chez le hamster femelle et cet auteur suggéra que le sexe de l'hôte puisse influencer l'équilibre sexuel de la population parasitaire (13). L'effet des hormones sexuelles sur le développement des parasites fut également étudié. Il fut ainsi démontré que l'injection de testostérone à des souris infestées réduisait le nombre d'oeufs émis par le parasite (14) et que l'administration d'anti-testostérone conduisait à la disparition des testicules chez les vers mâles en même temps qu'à l'involution des ovaires chez les femelles (15).

La résistance du rat albinos et du singe Rhésus se manifeste surtout par le phénomène dit de "self-cure", c'est-à-dire, l'élimination brutale de la majorité de la population parasitaire après quelques semaines d'infection (4 - 7). Ce phénomène de "self-cure" est relié chez le singe Rhésus à l'importance de l'infection initiale et on peut donc supposer qu'il soit fonction du degré du stimulus antigénique procuré et en conséquence, dépendant du niveau d'immunité induit (16). Cependant, bien que CHEEVER et POWERS (1969) aient aussi observé que le pourcentage de vers détruits est plus faible dans le cas de singes ayant subi une splénectomie (17), il demeure encore difficile de faire la part exacte des mécanismes immunologiques impliqués dans ce phénomène de "self-cure". De même, les études de CIOLI et al sur la résistance à l'infection de rats thymectomisés ont abouti à la conclusion que les mécanismes immunitaires ne peuvent être qu'en partie responsables de l'état non-permissif du rat (18).

## B. Immunité acquise

Il ne fait aucun doute que l'homme et les animaux acquièrent, comme contre tout agent infectieux, une immunité vis-à-vis des schistosomes. Cependant, cette immunité s'exprime différemment de l'immunité anti-bactérienne car si l'hôte infecté devient immun à la réinfection par le parasite, il reste incapable de se débarrasser de la population de vers établie lors de la première infection. Cet état a été appelé "immunité concomitante" (19), par analogie à la situation préalablement observée dans l'immunité anti-tumorale (20).

### 1. Mise en évidence de l'immunité acquise

Les résultats rapportés de nombreuses études épidémiologiques indiquent que l'homme acquiert une immunité aux schistosomes. De nombreux auteurs ont trouvé que dans les zones endémiques, la schistosomiase est surtout une maladie des personnes jeunes et que dans les tranches d'âge plus avancé, on assiste à une diminution du nombre d'oeufs émis et un effacement des symptômes qui sont habituellement associés. La fréquence et l'intensité de l'infection par S. mansoni sont maximales entre 10 et 20 ans (21, 22) et l'idée que l'immunité puisse être le facteur contrôlant la fréquence de la schistosomiase dans les zones endémiques a été largement admise (23). On ne peut cependant pas exclure que la réduction de la maladie chez les personnes âgées, ne puisse aussi être la conséquence d'expositions moins fréquentes à l'infection et/ou le résultat d'une kératinisation progressive de la peau avec l'âge.

La plupart des études directes de la résistance à la réinfection ont évidemment été réalisées sur les animaux d'expérience.

Différents auteurs ont étudié la résistance à la réinfection du singe (6, 24 - 26) et bien que leurs résultats ne soient pas toujours concordants quant à la dose nécessaire de cercaires infectantes ou le délai observé dans l'apparition de la protection, une résistance complète à l'infection fut démontrée chez cet animal.

PEREZ et al démontrèrent que chez le rat, l'immunité à la réinfection apparaît à la 3ème semaine suivant l'infection initiale, atteint un pic entre la 6ème et la 7ème semaine et décline ensuite jusqu'à devenir nulle (27).

Chez la souris, SHER et al observèrent une diminution du nombre de schistosomules dans le poumon à deux périodes différentes : la première se situe entre la 1ère et la 4ème semaine suivant l'infection initiale et la seconde est plus tardive, vers la 7ème semaine. La première diminution du nombre de schistosomules au stade poumon pourrait refléter uniquement un retard dans la migration des parasites (28).

Le hamster, quant à lui, développe à la suite d'une infection, une forte immunité à la réinfection qui atteint un plateau au bout de 6 semaines après l'infection initiale (29).

## 2. Origine du stimulus antigénique

Chaque stade parasitaire (oeuf, schistosomule ou schistosome) est potentiellement immunogène mais la principale difficulté rencontrée dans l'identification de l'antigène inducteur de l'immunité protectrice fut le manque quasi-général de succès dans les tentatives de vaccination par des fractions purifiées des parasites de différents stades.

Peu d'arguments expérimentaux plaident en faveur d'un rôle essentiel de l'oeuf dans l'immunité à S. mansoni. Par exemple,

VOGEL (1958) montra que le singe Rhésus devient potentiellement, et même dans quelques cas complètement, résistant à une réinfection par schistosomes, à la suite d'une infection unisexuée par des cercaires ne donnant naissance qu'à des vers mâles (30).

Le rôle des larves infestantes dans le développement de l'immunité a été envisagé dans différents modèles par l'utilisation de cercaires atténuées par irradiation. Dans la plupart des cas, une protection à la réinfection fut obtenue mais les doses d'irradiation utilisées par les auteurs étaient extrêmement variables. Certains affirmaient que la protection de la souris est maximale lorsqu'on irradie fortement les cercaires (31 - 33), d'autres trouvaient une meilleure protection en irradiant les cercaires avec des doses plus faibles (34, 35). Dans ce dernier cas, il se posait évidemment le problème de savoir quel est le stade parasitaire qui induit la résistance car la croissance et la maturation du parasite varient largement selon la dose d'irradiation employée. Il faut également noter qu'en général, le nombre de cercaires irradiées injectées est toujours très supérieur à celui des cercaires utilisées pour les infections expérimentales.

Etant donné que le schistosome adulte correspond au stade parasitaire qui reste le plus longtemps présent dans l'organisme, il fut émis l'hypothèse, puis démontré, que celui-ci pouvait procurer un stimulus antigénique continu conférant une immunité à la réinfection.

### 3. Le concept de l'immunité concomitante

Le concept de l'immunité concomitante dans la schistosomiase fut introduit pour la première fois par SMITHERS et TERRY en 1969 (19). Il décrivait une situation dans laquelle l'hôte est résistant à la réinfection mais ne peut en même temps se débarrasser des vers de la première infection. Le concept fut basé sur l'observation que les vers adultes de S. mansoni persistent longtemps après qu'une résistance se soit développée contre la réinfection. Ce concept fut ensuite supporté par d'autres études chez le babouin (36) et la souris (28).

Le développement lent de l'immunité du singe et de la souris était en faveur d'un stimulus antigénique majeur provenant du ver adulte mais l'évidence directe fut apportée par des expériences de transfert de vers adultes dans le système porte du singe Rhésus (26). Ces singes devenaient alors résistants à la réinfection mais ne pouvaient rejeter les vers adultes transférés, ces derniers étant donc protégés de la réponse immune qu'ils avaient provoquée.

Mac CULLOUGH et BRADLEY apportèrent la preuve de l'existence d'une immunité concomitante dans la schistosomiase humaine en montrant la remarquable stabilité au cours des années du nombre d'oeufs émis chez un groupe d'écoliers atteints par S. haematobium et vivant en zone endémique (37).

Le cas du rat est particulier puisque l'animal rejette la majorité des parasites au bout de quelques semaines (4, 5). On remarque cependant que l'immunité apparaît juste au moment de ce rejet et on peut donc supposer que le développement de l'immunité soit la conséquence d'un lâcher important d'antigènes de vers adultes lors de leur lyse. Par ailleurs, la disparition de l'immunité quelques

semaines plus tard peut aussi s'expliquer par le fait qu'un stimulus continu et suffisamment important soit nécessaire pour maintenir l'état d'immunité (27).

Ces différentes observations, toutes en faveur du rôle du ver adulte dans l'établissement de l'immunité de l'hôte, conduisent à se poser deux questions principales :

- Quels sont les mécanismes précis qui permettent chez l'hôte immun la destruction des larves infestantes ?
- Par quels moyens le ver adulte échappe-t-il à la réponse immune qu'il a suscitée?

#### 4. Les mécanismes effecteurs de l'immunité

La description de ces mécanismes a fait l'objet d'une revue récente par CAPRON et al (38).

Nous distinguerons les mécanismes non spécifiques ne faisant pas intervenir d'anticorps, des mécanismes spécifiques nécessitant la présence d'anticorps anti-S. mansoni.

##### a) Mécanismes d'immunité non spécifique

L'activation du complément peut être en partie responsable de la mort du schistosomule. Cette activation s'effectuerait par la voie alterne au niveau de la surface du parasite (39) et l'activité létale pourrait être amplifiée en présence de cellules portant des récepteurs C3b à leur surface (par exemple, les éosinophiles) mais en absence d'anticorps spécifiques (40, 41).

Des macrophages activés par des lymphokines peuvent exercer une activité toxique sur les schistosomules (42). Une action létale

des macrophages peut être également observée après stimulation par des IgG agrégées et en présence de complément (43).

b. Mécanismes d'immunité spécifique

L'analyse des différents composants de la réponse immune contre les schistosomes révèle l'existence d'une réponse humorale très intense et la production d'une quantité importante d'anticorps anaphylactiques (44). Les résultats expérimentaux obtenus par transfert passif de sérum (72) et utilisation d'animaux traités à la naissance par un sérum anti- $\mu$  ont démontré le rôle essentiel de la réponse anticorps dans l'immunité (45).

En particulier, il a été mis en évidence que ces anticorps peuvent participer à la destruction des larves de S. mansoni en coopération avec d'autres éléments de la réponse immunitaire qui sont le complément et certaines cellules phagocytaires.

i) Cytotoxicité dépendante du complément

CLEGG et SMITHERS (46) observèrent pour la première fois que l'incubation in vitro de schistosomules en présence de sérum de singe immun à S. mansoni et de complément, conduisait à la mort des parasites. L'anticorps responsable fut appelé "anticorps léthal" et identifié comme appartenant à la classe des IgG.

La présence d' "anticorps léthal" fut ensuite mise en évidence dans le sérum de diverses espèces animales infectées par S. mansoni (homme, lapin, rat, souris) (47, 48).

Cependant, la signification biologique de ce mécanisme n'est pas encore clairement établie. Il faut noter que chez le rat par exemple, si l'immunité à la réinfection est très faible vers la

12ème semaine après l'infection, le titre en "anticorps léthal" est encore très élevé à cette période (27). De plus, l'utilisation du complément homologue, particulièrement dans le cas de l'homme et du rat, n'est pas toujours aussi efficace que celle d'un complément hétérologue (de cobaye) (48).

Des expériences récentes indiquent que des "facteurs bloquants" tels que des antigènes parasitaires ou des complexes immuns circulants seraient susceptibles de moduler cette activité létale. Pour un sérum donné, on observe une relation inverse entre sa capacité à tuer les parasites et son contenu en antigènes libres ou complexés (49). D'autre part, l'existence d'antigènes circulants, capables d'activer le complément par la voie classique ou alterne et présentant une activité anti-complémentaire in vivo, a été récemment décrite (50).

#### ii) Cytotoxicité en présence de cellules

Différents mécanismes de cytotoxicité ont été décrits dans la littérature (51 - 58). Ces mécanismes impliquent plus spécialement des anticorps de classe IgG ou IgE et des cellules connues pour leurs fonctions de phagocytose, à l'exception toutefois des plaquettes sanguines (voir Tableau I, p.19 ).

Les systèmes de cytotoxicité dépendante des macrophages et des éosinophiles ont été plus particulièrement étudiés dans le laboratoire et de nombreuses données ont été acquises concernant les mécanismes d'activation des cellules et les processus de lyse des parasites.

$\alpha$ ) En 1975, CAPRON et al. (56) observèrent que des macrophages péritonéaux de rat incubés en présence de sérum de rat immun à S. mansoni adhéraient aux schistosomules ; cette phase d'adhérence était suivie 18 heures plus tard par la mort des parasites. Le chauffage du sérum

TABLEAU I

MECANISMES D'IMMUNITE DEPENDANTE D'ANTICORPS ET DE CELLULES

Cellule effectrice	Anticorps	Modèle	Mise en évidence	Ref.
Neutrophile	IgG	Rat	Dean <u>et al</u> (1974)	51
Eosinophile	IgG	Homme	Butterworth <u>et al</u> (1975)	52
Eosinophile	IgG2a	Rat	Capron <u>et al</u> (1978)	53
Eosinophile	IgG	Souris	Kassis <u>et al</u> (1979)	54
Eosinophile	IgE	Rat	Capron <u>et al</u> (1980)	55
Macrophage	IgE	Rat	Capron <u>et al</u> (1975)	56
Monocyte	IgE	Homme Babouin	Joseph <u>et al</u> (1978)	57
Plaquette	IgE	Homme, rat	Joseph <u>et al</u> (1983)	58

abolissait son pouvoir cytotoxique et par des expériences d'adsorption du sérum sur différents anticorps anti-isotypes, ces auteurs démontrèrent que les anticorps responsables étaient de classe IgE et présents sous la forme complexée à des antigènes de S. mansoni (59). Des expériences similaires furent ensuite réalisées avec des monocytes humains ou des macrophages péritonéaux de babouin, montrant un rôle identique des complexes IgE dans ces systèmes (57).

$\beta$ ) La première évidence de la fonction des éosinophiles dans les mécanismes d'immunité à S. mansoni fut apportée par BUTTERWORTH et al (52) ; ces auteurs montrèrent que des éosinophiles humains normaux peuvent tuer des schistosomules en présence d'anticorps IgG du sérum de malades atteints de schistosomiase.

Les expériences de MAHMOUD et al , bien que controversées, indiquant qu'un sérum anti-éosinophile peut déprimer fortement l'immunité à la réinfection chez la souris (60) stimulèrent considérablement l'intérêt de l'étude de la fonction effectrice de l'éosinophile dans la schistosomiase humaine et expérimentale.

Ainsi, la fonction de l'éosinophile dans l'immunité fut démontrée in vitro pour le babouin (61), le rat (62 - 53) et la souris (63). Chez le rat, CAPRON et al (53, 64) mirent en évidence le rôle des mastocytes (et plus particulièrement celui de leurs produits de dégranulation) dans l'activation des éosinophiles et leur action cytotoxique, soulevant alors le problème de la participation des anticorps anaphylactiques dans ce mécanisme. Par des expériences d'adsorption sur différents anticorps anti-isotypes, ces auteurs montrèrent que les anticorps de sous-classe IgG2a, qui sont préférentiellement produits au cours des 6 premières semaines d'infection par S. mansoni, sont impliqués dans la cytotoxicité à cette période de l'immunité (53).

L'IgG2a représente la sous-classe majeure des IgG du rat et est considérée comme le second anticorps anaphylactique chez cet animal (65 - 67). De la même manière, RAMALHO-PINTO et al démontrèrent que le mécanisme de cytotoxicité par les éosinophiles est dépendant chez la souris de la présence d'anticorps IgG1 (63), immunoglobulines douées aussi de propriétés anaphylactiques.

D'autre part, une relation étroite fut trouvée entre l'activité cytotoxique d'éosinophiles péritonéaux de rats infectés par S. mansoni (pour des cibles non recouvertes d'anticorps) et la capacité du sérum des animaux à rendre cytotoxiques des éosinophiles de rats sains. Ces résultats indiquent donc la présence d'anticorps à la surface des cellules d'animaux infectés. Cependant, à certaines périodes de l'infection, les éosinophiles ne sont pas et ne peuvent pas être rendus cytotoxiques pour les schistosomules ; la présence de complexes immuns capables de bloquer l'activation des cellules a été envisagée (68).

Par la suite, le rôle des anticorps IgE dans l'activation des éosinophiles a été exploré et les résultats d'études cinétiques ont montré qu'après 6 semaines d'infection, la cytotoxicité en présence de sérum de rat infecté n'était plus attribuée à des anticorps IgG2a mais à des anticorps IgE (55). Une coopération IgE-éosinophile semblerait donc avoir un rôle important dans la période plus tardive de l'immunité du rat.

L'effet cytotoxique des éosinophiles s'accompagne d'une dégranulation de la cellule au contact de la cible. Certains auteurs ont démontré que des substances d'origine éosinophilique comme la peroxydase (69) ou la MBP (Major Basic Protein, constituant principal des granules de sécrétion) (70) exerçaient un effet toxique in vitro sur le schistosomule. Par ailleurs, grâce à la mise au point d'une technique de marquage des phospholipides membranaires par incorporation de lécithine radioactive par le parasite, nous avons pu montrer une libération accrue de choline radioactive associée à l'activité cytotoxique des éosinophiles, suggérant que la phospholipase D des éosinophiles puisse avoir également un rôle dans la destruction du parasite (71).

En résumé, il apparaît que les anticorps anaphylactiques peuvent jouer en coopération avec les cellules phagocytaires, un rôle important dans l'immunité aux schistosomes. Chez le rat, le rôle de ces anticorps dans l'immunité a aussi été mis en évidence par des expériences de transfert passif de sérum immun, montrant que l'élimination sélective des IgE ou des IgG2a de ce sérum aboutit à une diminution significative de son pouvoir protecteur (72). D'autre part, des études cinétiques de la production chez le rat des IgG2a et des IgE spécifiques de S. mansoni et de leur activité dans la cytotoxicité in vitro indiquent que dans ce modèle le système IgG2a-éosinophile précéderait chronologiquement les systèmes IgE-éosinophile et IgE-macrophage (38).

Enfin, l'existence de ces mécanismes d'immunité suppose la reconnaissance à la surface du parasite d'antigènes cibles définis portant des épitopes accessibles aux anticorps spécifiques de S. mansoni.

### 5. Les mécanismes d'évasion du parasite

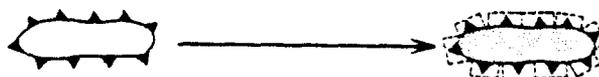
De nombreux auteurs (73 - 76) ont apporté la démonstration que les schistosomules perdent leur susceptibilité à l'attaque immune de l'hôte au cours de leur développement. Par des expériences de transfert de sérum immun à différentes périodes après l'infection par S. mansoni, SHER (73) observa que le schistosomule devenait complètement insensible à la réponse immune 24 heures après sa pénétration dans l'organisme. Les expériences de cytotoxicité réalisées in vitro confirmèrent ensuite ce phénomène (74 - 76).

Le schéma présenté ci-dessous (d'après SHER et MOSER, 77) résume les trois hypothèses qui tentent d'expliquer à l'heure actuelle l'adaptation du parasite à la réponse immune de l'hôte.

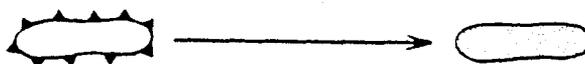
Susceptible

Résistant

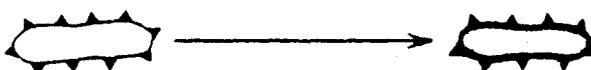
$\alpha$ ) Masquage des antigènes parasitaires par des molécules de l'hôte



$\beta$ ) Perte d'antigènes de surface



$\gamma$ ) Développement d'un tégument résistant



$\alpha$ ) Le phénomène d'acquisition de molécules d'hôte par les schistosomes fut d'abord mis en évidence par DAMIAN (78, 79) et CAPRON et al (80, 81) qui observaient l'existence dans des extraits de schistosomes, d'antigènes portant des épitopes communs à ceux de l'hôte.

SMITHERS et al (82) étudièrent in vivo ce phénomène. Des schistosomes étaient transférés d'animaux donneurs (souris) à des animaux receveurs (singes), les animaux receveurs ayant été préalablement immunisés contre les tissus, et en particulier contre les érythrocytes, des animaux donneurs. Dans cette expérience, les vers étaient détruits dans les 24 heures qui suivaient le transfert et ces résultats suggéraient que les schistosomes étaient recouverts à leur surface de molécules de l'hôte.

Des expériences plus récentes ont permis d'identifier à la surface des parasites des antigènes de groupe sanguin A, B, 0 et Lewis (83) ainsi que des produits du complexe majeur d'histocompatibilité de la souris (84). La capacité des vers à fixer des immunoglobulines par leur fragment Fc a aussi été démontrée (85, 86). De plus, TORPIER et CAPRON (87) ont observé en microscopie électronique que l'application d'un sérum anti-hôte sur les schistosomes entraîne un réarrangement membranaire au cours duquel les particules intramembranaires (qui sont des inclusions de protéines dans les feuillettes lipidiques de la membrane) s'agrègent sous la forme de tétrades caractéristiques.

Cependant, ce mécanisme de résistance par acquisition d'antigènes d'hôte est insuffisant pour expliquer l'adaptation du parasite à la réponse de l'hôte car une résistance est également observée lorsque les parasites sont cultivés dans des milieux ne contenant aucune macromolécule (74, 76). Certains auteurs ont pensé que le schistosome échappe à la réponse immune grâce à la présence, non pas d'antigènes acquis, mais d'antigènes parasitaires présentant des parentés antigéniques avec des composants de l'hôte. Ce phénomène a été appelé "mimétisme moléculaire" et deux exemples principaux ont été cités dans la littérature : DAMIAN et al (88) montrèrent que des anticorps anti $\alpha$ -2 macroglobuline réagissent avec les différents stades de S. mansoni et DEAN et SELL (89) mirent en évidence à la surface des schistosomules des antigènes communs à l'antigène de Forssman.

$\beta$ ) Au cours de son évolution, le parasite subit des modifications importantes au niveau de sa surface. La cercaire est limitée par une membrane plasmique "trilaminée" alors que le schistosomule et le ver adulte possèdent une membrane heptalaminée formée de deux doubles couches lipidiques étroitement apposées. De nombreux corps membranaires sont présents dans le tégument du ver adulte de S. mansoni et servent au remplacement de la membrane externe qui est continuellement détruite et reformée (90) A ce sujet, PEREZ et TERRY (91) ont montré une augmentation du taux de renouvellement de la membrane lorsqu'on incube les schistosomes en présence d'anticorps qui sont dirigés contre leur surface ; le parasite se débarrasse ainsi des complexes immuns formés à sa surface et ce phénomène pourrait représenter un mécanisme d'évasion du parasite.

D'autre part, différents auteurs (74, 92) qui observaient au cours de la maturation du parasite une diminution de sa reconnaissance par les mécanismes effecteurs de l'immunité (voir p.17) suggéraient que le parasite n'exprime plus à sa surface les mêmes antigènes.

Y) Enfin, la dernière hypothèse est celle d'un changement intrinsèque du tégument indépendant de tout masquage des antigènes parasitaires par des molécules d'hôte. Cette hypothèse a été formulée à la suite des expériences de MOSER et al qui utilisaient des parasites sur lesquels des haptènes étaient fixés (93). Ces auteurs observaient que, si les schistosomules au stade peau et les schistosomules au stade poumon fixaient la même quantité d'anticorps anti-haptène, seuls les schistosomules au stade peau étaient sensibles aux mécanismes de cytotoxicité dépendante du complément ou des éosinophiles (voir p. 17)

La raison exacte de cette résistance reste encore mal connue. Les résultats d'analyse en microscopie électronique montrent une augmentation considérable du nombre de particules intramembranaires dans la membrane externe du schistosomule au stade poumon (1, 94) ; une relation entre un tel changement de structure membranaire et l'acquisition d'une résistance du parasite à l'attaque immune peut être envisagée. D'autre part, les travaux de SCHLAGER suggèrent que la synthèse et l'incorporation de certains lipides et acides gras dans la membrane des cellules tumorales affectent leur susceptibilité aux mécanismes d'immunité (95). On peut également supposer que la résistance du schistosomule résulte en partie d'un mécanisme analogue.

L'ensemble de ces données indiquant que la susceptibilité du parasite à la réponse immune de l'hôte concerne principalement ses tout premiers stades larvaires, signifiait alors que l'isolement et l'identification des antigènes cibles des mécanismes effecteurs dans l'immunité devaient être en priorité envisagés au niveau de la cercaire ou du jeune schistosomule.

### III. LES ANTIGENES DE S. MANSONI

L'étude des antigènes de schistosomes a d'abord été orientée dans deux directions principales : d'une part, la préparation de fractions purifiées d'antigènes permettant un diagnostic sensible et spécifique de S. mansoni et d'autre part, l'identification et l'isolement de composants du parasite jouant un rôle dans le développement d'une immunité, et en conséquence susceptibles d'induire par immunisation une protection contre l'infection.

Différents auteurs ont démontré dans le sérum d'animaux ou d'hommes infestés par S. mansoni, la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes porteurs d'une activité enzymatique : ce sont les cas par exemple de l'acétylcholinesterase (96), de la globinase (97, 98), de certaines aminopeptidases (99) et de la malate deshydrogénase qui fut isolée sous la forme de deux isoenzymes spécifiques du genre Schistosoma (100).

La démonstration de l'existence d'antigènes circulants a également stimulé les recherches pour l'amélioration du diagnostic de la schistosomiase. En particulier, un antigène de nature glycoprotéinique a été identifié par CARLIER et al et appelé "antigène M". Cet antigène a été retrouvé dans le sérum, l'urine et le lait maternel des patients ainsi que dans le sérum et l'urine des animaux infestés par S. mansoni ; la présence d'anticorps dirigés contre cet antigène a aussi été décelée dans le sérum d'un grand nombre de patients (101 - 103). L'"antigène M" est un composant de type mucine localisé dans la paroi du tube digestif du ver adulte (104). D'autres antigènes circulants, présentant de nombreuses similarités avec l'"antigène M" ont été mis en évidence par DEELDER et al (105) et NASH et al (106)

D'autre part, l'utilisation de fractions purifiées d'antigènes d'oeufs de S. mansoni s'est avérée efficace dans le diagnostic sérologique de la maladie (107, 108).

Si de nombreuses préparations antigéniques se sont révélées être d'un grand intérêt pour le diagnostic de la maladie, un nombre très limité d'antigènes purifiés ou semi-purifiés a pu conférer par immunisation une protection significative contre l'infection. BOUT et al montrèrent l'effet protecteur chez le rat d'antigènes de schistosomes se liant spécifiquement à des drogues schistosomicides (109). MADDISON et al obtinrent une protection chez la souris par injection d'extraits de membranes de schistosomes et de Corynebacterium parvum comme adjuvant (110). HOROWITZ et al réussirent à protéger de manière significative des souris par injection de cercaires soumises aux ultrasons et additionnées d'alun comme adjuvant, cette protection s'accompagnant alors d'une production importante d'IgE spécifiques (111). Enfin, plus récemment, AURIAULT et al ont démontré que l'injection des produits d'incubation in vitro du schistosomule donne lieu sans addition d'adjuvant à une réponse IgE protectrice ; les antigènes inducteurs de cette réponse IgE correspondraient à des molécules 22 K et 26 K (112)

La démonstration et la connaissance de plus en plus approfondie des mécanismes d'immunité dépendante d'anticorps a incité de nombreux auteurs à s'orienter vers l'étude des molécules impliquées plus précisément dans les interactions hôte-parasite, en d'autres termes vers la caractérisation des antigènes qui composent les membranes limitant le parasite et qui présentent en particulier des épitopes accessibles aux anticorps élaborés lors de l'infection.

## A - Caractérisation d'antigènes membranaires

Le terme "membranaire" est ici utilisé au sens large car les membranes limitant le parasite sont le plus souvent isolées en même temps qu'une fraction du tégument qui leur est sous-jacent.

Les premiers essais d'isolement de préparations membranaires ont été effectués par KUSEL en 1972 qui, par congélation et décongélations successives ou par incubation des parasites dans une solution hypertonique de saponine- $\text{CaCl}_2$ , réussit à libérer la majeure partie du tégument des formes jeunes et adultes de S. mansoni (113). D'autres méthodes utilisant des concentrations élevées en KCl (114) ou des détergents non ioniques à des concentrations faibles (115) ont été également employées pour obtenir des fractions membranaires.

Plus récemment, SIMPSON et al. ont montré qu'une simple incubation des schistosomes adultes en tampon phosphate salin, suffit à entraîner le détachement du tégument. Les membranes externes peuvent être purifiées par centrifugation du matériel libéré sur un gradient discontinu de saccharose ; les vésicules membranaires se stabilisent à une densité de 1,03 - 1,14, densité qui est relativement faible par rapport à celle des membranes plasmiques des cellules de mammifères (116).

Enfin, une méthode originale de purification des membranes a été décrite par CESARI et al. (117). Cette technique est basée sur l'observation que les membranes du schistosome interagissent facilement avec des composants basiques (118) grâce à la présence d'un nombre important de charges négatives à leur surface. Utilisant des billes de polyacrylamide recouvertes de polylysine, ces auteurs ont pu isoler un complexe membranaire dont le degré de pureté est au moins comparable à celui des membranes purifiées sur gradient de saccharose (116)

Différents travaux ont mis en évidence la complexité de la composition en protéines et glycoprotéines des fractions membranaires isolées des stades larvaires et adultes de S. mansoni (113, 119). De plus, les expériences d'immunoprécipitation par des sérums d'hôtes infestés, ont démontré l'existence d'antigènes communs entre les membranes du schistosomule et de l'adulte (120). L'introduction de l'hybridation cellulaire et de la production d'anticorps monoclonaux contre les parasites a aussi permis à NORDEN et al de mettre en évidence des déterminants antigéniques communs à la cercaire et au schistosome adulte. Ces épitopes sont portés par des glycoprotéines localisées au niveau des épines du parasite et les antigènes présentent des poids moléculaires différents selon le stade considéré (120.000 pour la cercaire et 170.000 pour les schistosomes mâles ou femelles) (121).

Enfin, TAYLOR et BUTTERWORTH ont identifié par un anticorps monoclonal de souris, un antigène de poids moléculaire 24.000 contenu dans un extrait détergent de schistosomules ; la capacité de l'anticorps à se fixer sur le schistosomule vivant suggère que l'antigène 24.000 soit exposé à la surface du parasite (122). De même, ZODDA et PHILLIPS ont précipité un composant de poids moléculaire 130.000 présent dans un extrait KCl 4M de cercaires. L'anticorps monoclonal sélectionné par ces auteurs possède la propriété de protéger, par transfert passif, la souris d'une infection par les schistosomes (114); on peut donc supposer que l'antigène 130.000 correspond à un composant de surface du parasite capable de jouer un rôle dans l'immunité.

#### B. Etude des antigènes de surface

La caractérisation des antigènes exposés à la surface du parasite a été surtout envisagée par les techniques de marquage par l'iode radioactif. Les premiers résultats concernant le marquage des schisto-

somes adultes ont été rapportés par HAYUNGA et al (123). Ces auteurs ont montré que, parmi les techniques d'iodation existantes, la méthode utilisant le réactif de BOLTON-HUNTER était l'une des plus efficaces pour obtenir une radioactivité spécifique élevée. De ces produits marqués, ils isolèrent ensuite à l'aide de sérums d'hôtes infestés, huit antigènes dont les poids moléculaires variaient de 10 à 100.000 (124).

La relative inefficacité de l'iodation en présence de lactoperoxydase des formes adultes fut également retrouvée par SNARY et al qui montrèrent que, si dans les vers mâles un nombre limité de composants de surface marqués peuvent toutefois être détectés, aucun des composants de surface des vers femelles n'est apparemment marqué par cette technique (125).

Si l'on replace l'intérêt des relations hôte-parasite dans le contexte de l'immunité de protection, on conçoit aisément qu'il est important de considérer les antigènes de surface présents préférentiellement aux stades larvaires du parasite. Dans le travail que nous présentons dans ce mémoire, nous avons envisagé l'identification et la caractérisation des antigènes de surface du schistosomule reconnu par les anticorps élaborés lors de l'infection humaine et expérimentale, ainsi que par des anticorps monoclonaux de rat dont les propriétés protectrices ont été établies in vitro et in vivo (126). L'existence de ces antigènes ou de certains de leurs déterminants a ensuite été recherchée au niveau des autres stades de développement du parasite. L'éventualité d'un pouvoir protecteur des antigènes isolés est discutée.

IDENTIFICATION DES ANTIGENES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE

L'étude des antigènes exposés à la surface des schistosomules nécessitait la mise au point de techniques de marquages externes présentant une radioactivité spécifique élevée. L' $^{125}\text{I}$  Iode a été choisi comme marqueur préférentiel des protéines de surface du parasite.

### I. MARQUAGE DES PROTEINES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE

Le marquage par l' $^{125}\text{I}$  des protéines de surface d'une cellule utilise nécessairement des réactifs ne pénétrant pas la membrane cellulaire. Des réactifs comme la chloramine T ou l'iode monochlorure couramment employés pour marquer des protéines en solution, peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules et marquer des protéines internes, comme l'ont montré les résultats d'analyses autoradiographiques de microscopie électronique. De plus, ces réactifs sont de puissants agents oxydants qui détériorent en partie les cellules (127).

Des méthodes plus douces, utilisant soit des enzymes comme catalyseurs de la réaction, soit des composés iodés à groupements réactifs ont donc été développées pour le marquage des surfaces cellulaires et en particulier, trois d'entre elles ont été appliquées à l'étude des protéines de surface du schistosomule.

#### A. Iodation catalysée par la lactoperoxydase

Cette méthode utilise la lactoperoxydase qui, en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , catalyse l'oxydation de l'iode et sa fixation sur les acides aminés aromatiques (tyrosine, histidine). MARCHALONIS décrit cette technique en 1969 pour le marquage d'immunoglobulines en solution

(128) et la modifia ensuite pour l'appliquer au marquage de surface des lymphocytes. MARCHALONIS et al montrèrent alors que la radioactivité était essentiellement associée à la surface des cellules qui ne présentaient par ailleurs aucune perte évidente de viabilité (127).

Les schistosomules ont été marqués dans des conditions sensiblement identiques à celles décrites par MARCHALONIS et al (cf "Matériel et Méthodes"). Les résultats d'analyse en gel de polyacrylamide-SDS sont présentés dans la figure 2A (p.35). Trois bandes majeures de poids moléculaire 100 K, 80 K et 55 K sont identifiées en même temps que de nombreuses bandes dans la zone 30-40 K. Une quantité importante de la radioactivité migre avec le front du tampon ; celle-ci peut être attribuée à des composés lipidiques et/ou à de l'iode radioactif libre. Pour ce qui concerne la bande 80 K, on ne peut exclure la participation possible de la lactoperoxydase qui est elle-même iodée lors de la réaction et risque de contaminer la préparation.

Dans l'expérience de la figure 2A, nous avons comparé les résultats du marquage des schistosomules obtenus après le passage des cercaires à travers une peau de souris (a) ou préparés mécaniquement par rupture de la queue des cercaires sous agitation (b). Les schistosomules "mécaniques" ont été ensuite incubés in vitro 3 heures à 37°C, ce délai étant nécessaire à la formation de la membrane heptalaminée (90). Aucune différence notable n'apparaît lors de la comparaison des deux profils électrophorétiques, indiquant donc que la pénétration à travers la peau ne modifie pas de manière significative la composition protéique de la surface du parasite. L'incubation des schistosomules iodés en présence de trypsine entraîne une libération quasi-complète de la radioactivité fixée sur les parasites (Fig. 2B, p.35) et démontre ainsi un marquage préférentiel des composants de surface du parasite.

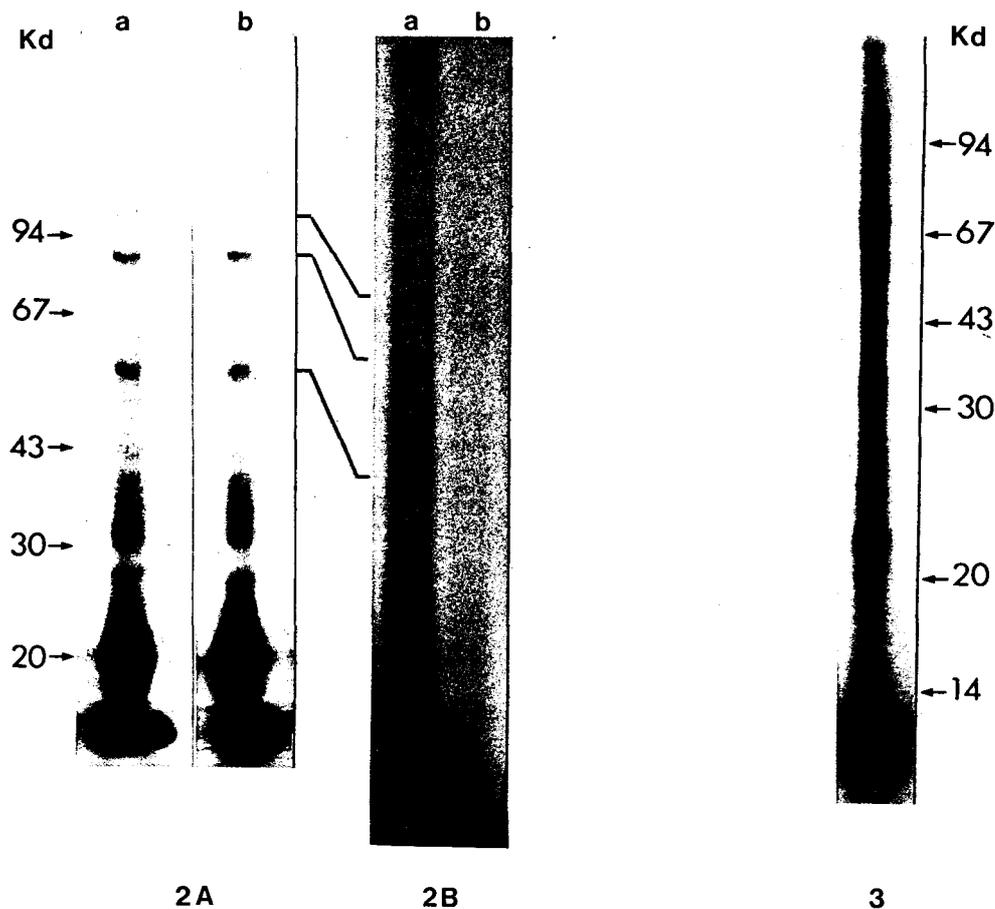


Figure 2 : Iodation catalysée par la lactoperoxydase.

- A - Autoradiographie de l'analyse en gel de polyacrylamide-SDS (10-15 %) de schistosomes "peau" (a) ou "mécaniques" (b). Les parasites sont resuspendus dans le tampon d'échantillon (voir "Matériel et Méthodes") et la suspension est placée à 100°C pendant 3 mn puis centrifugée à 400 g pendant 5 mn. Des parties aliquotes du surnageant (équivalentes à 100 parasites) sont analysées.
- B - Traitement par la trypsine des schistosomes "peau". Les parasites sont incubés 30 mn à 37°C en tampon PBS (a) ou en tampon PBS contenant 0.1 mg/ml de trypsine (b) puis lavés en tampon PBS contenant 100 U/ml d'aprotinine. Les analyses sont effectuées dans les conditions décrites en A.

Figure 3 : Iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER.

L'équivalent de 100 schistosomes "peau", marqués selon le protocole décrit dans "Matériel et Méthodes" est analysé en gel de polyacrylamide 13 %.

## B - Iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER

Le réactif de BOLTON-HUNTER (N-succinimidyl 3(-4-hydroxy-5-  $^{125}\text{I}$  iodophenyl)propionate) est un ester instable qui s'hydrolyse en milieu aqueux. L'acide propionique portant le groupement phenyl iodé se fixe en milieu légèrement alcalin (pH 8-8,5) sur les groupements  $\text{NH}_2$  terminaux ou sur les  $\text{NH}_2$  des résidus lysine. Cette méthode de conjugaison est relativement douce et a été spécialement développée pour éviter les problèmes de dénaturation des molécules lors de l'exposition à des agents oxydants, comme la chloramine T par exemple. Elle offre également l'avantage par rapport à la technique d'iodation par la lactoperoxydase, de substituer des acides aminés différents et s'adapte donc à des protéines dépourvues de tyrosine(129).

Bien que cette technique ait connu de nombreuses applications pour le marquage de protéines en solution, elle fut peu utilisée pour ioder les protéines de surface de cellules ou d'organismes vivants. Toutefois, HAYUNGA et al ont testé différentes conditions de marquage des protéines de surface du schistosome de S. mansoni et montré que le réactif de BOLTON-HUNTER permettait d'obtenir la plus haute activité spécifique. En dépit du pH non physiologique auquel s'effectue la réaction et du caractère relativement diffusible du réactif, ces auteurs obtiennent un marquage préférentiel de la surface, probablement grâce à l'existence de la double membrane dense et complexe qui recouvre le schistosome. On observe toutefois, à la suite du marquage, une vacuolisation du tégument du parasite (123).

Lorsque nous avons appliqué cette technique à l'analyse de la surface du schistosomule, nous avons pu identifier quatre bandes majeures de poids moléculaire 70 K, 58 K, 34 K et 22 K ainsi qu'un nombre important de bandes moins intenses (Fig. 3, p.35). Ces résultats sont apparemment très différents de ceux obtenus après iodation par la lactoperoxydase (Fig. 2A) et peuvent s'expliquer par le fait que l'iode radioactif s'est fixé sur des groupements différents.

#### C - Iodation par l'acide iodosulfanilique diazoté

L'acide iodosulfanilique diazoté a été utilisé par différents auteurs pour marquer les membranes de globules rouges (130) et de plaquettes (131). Ce réactif est non-pénétrant et respecte la viabilité des cellules ; il se fixe préférentiellement au groupement imidazole de l'histidine et sur le noyau phénolique de la tyrosine mais peut aussi réagir avec des groupements NH<sub>2</sub> présents sur des chaînes aliphatiques.

TAYLOR et al (132) ont réalisé le marquage de schistosomules "mécaniques" incubés in vitro pendant 18 heures et identifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, huit protéines de poids moléculaire 105 K, 80 K, 68 K, 46 K, 40 K, 36 K et 14 K. Une expérience a été réalisée dans des conditions identiques sur des schistosomules obtenus après passage de la peau : cinq bandes de poids moléculaire 62 K, 52 K, 40 K, 24 K et 20 K ont pu être identifiées. Cependant dans cette expérience, ainsi que dans celles effectuées par TAYLOR et al , l'efficacité du marquage considérée en terme de radioactivité spécifique est très faible, comparativement à celle obtenue après iodation par la lactoperoxydase ou le réactif de BOLTON-HUNTER.

Différentes raisons nous ont conduit à choisir la technique d'iodation par la lactopéroxydase :

- la réaction s'effectue à pH neutre et la viabilité des parasites, évaluée en microscopie optique, est parfaitement préservée
- lors des contrôles réalisés en microscopie électronique aucune altération évidente de la surface du parasite n'a été décelée ; en particulier, la double membrane limitant le parasite a gardé son intégrité (Fig. 4, p.39)
- la radioactivité spécifique des composants marqués est suffisamment élevée pour permettre une détection rapide des antigènes isolés.

## II. IMMUNOPRECIPITATION DES ANTIGENES DE SURFACE DU SCHISTOSOMULE PAR DES SERUMS D'HOTES INFECTES PAR S. MANSONI

L'incubation d'un extrait de protéines radioactives de schistosomules avec les anticorps du sérum permet la formation de complexes immuns qui sont ensuite isolés par adsorption sur des billes de Protéine A-Sépharose. Le terme d'immunoprécipitation a été étendu à cette technique.

### A. Extraction des protéines de surface du schistosomule

Une première série d'expériences a été effectuée dans le but de déterminer les conditions optimales de solubilisation des protéines de surface du parasite. Les résultats présentés dans la figure 5 (p.40) montrent qu'une incubation de 30 mn dans le Nonidet P40 à 0.5 % suffit à extraire la majeure partie des protéines de surface (comparer a et c). En effet, la quantité de protéines retrouvées dans l'extrait

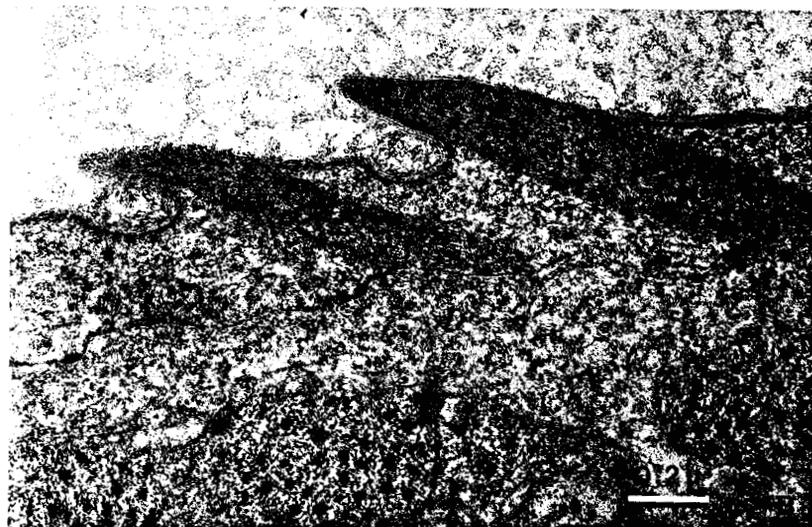
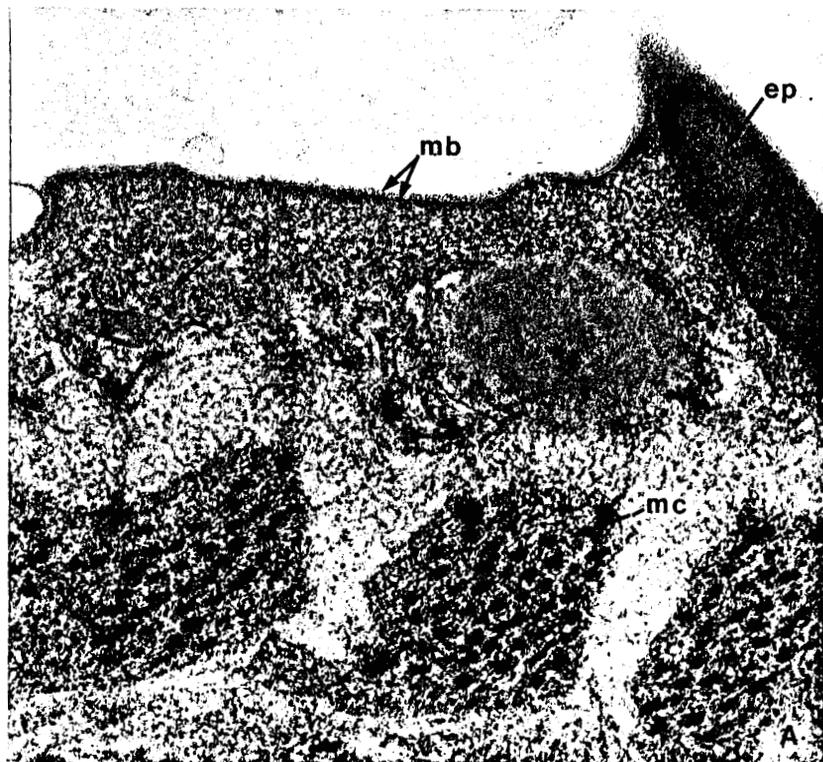


Figure 4 : Observation en microscopie électronique de coupes de schistosomules "peau" avant (A) ou après (B). iodation en présence de lactopéroxydase. (Photos de A. OUAISSI).

Aucun changement notable n'est observé dans l'ultrastructure du parasite. Dans A et B, on distingue la membrane heptalaminée formée de la juxtaposition des deux membranes unitaires (mb) ; ep : épine ; mc : muscles circulaires ; teg : tégument

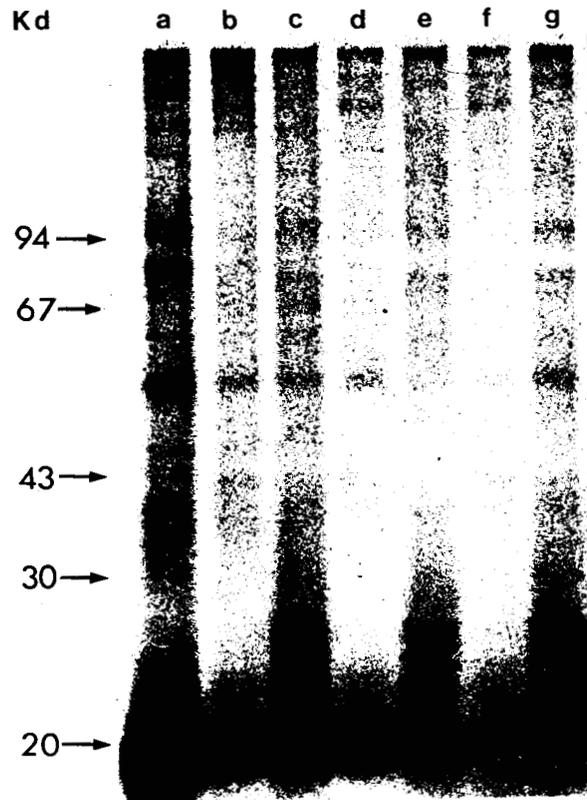


Figure 5 : Extraction des protéines de surface du schistosomule.

Les schistosomules marqués par  $^{125}\text{I}$  en présence de lactopéroxydase (a) sont incubés à  $0^{\circ}\text{C}$  pendant 30 mn dans une solution de Nonidet P40 0.5 % (b,c), Nonidet P40 1 % (d, e) ou Nonidet P40 0.5 % et desoxycholate de Na 0.1 % (f, g) dans le tampon Tris-HCl 10 mM pH 6,8 contenant 100 U/ml d'aprotinine. Les schistosomules traités (b, d, f) et les extraits solubles de parasites (c, e, g) sont analysés en gel de polyacrylamide-SDS. L'équivalent de 100 parasites est analysé dans chacune des pistes.

détergent n'est que très faiblement augmentée lorsque les schistosomules sont traités par le Nonidet P40 à 1 % (e) ou encore lorsqu'on combine l'action d'un détergent ionique comme le desoxycholate de Na au Nonidet P40 (g). Dans les trois cas, une bande radioactive de poids moléculaire 55 K est retrouvée dans le sédiment de schistosomules marqués et dans l'extrait détergent alors que des composants de haut poids moléculaire ( $> 100$  K) restent associés aux parasites (b, d, f). A partir de ces résultats, nous pouvons conclure qu'un traitement des parasites par le Nonidet P40 à 0.5 % est suffisant pour obtenir un échantillon représentatif des protéines de surface extractibles par le détergent.

## B. Immunoprécipitation par des sérums de rats

### 1. Caractérisation des antigènes

Les schistosomules iodés en surface sont traités par le Nonidet P40 à 0.5 % puis l'extrait est incubé en présence de sérums de rats infectés par S. mansoni. L'analyse en gel de polyacrylamide-SDS des complexes immuns isolés par adsorption sur Protéine A-Sépharose, révèle l'existence de plusieurs antigènes dont le poids moléculaire varie de 30 à 40 K. Des résultats identiques sont obtenus lorsque l'électrophorèse est effectuée dans des conditions réductrices (en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol) suggérant que les molécules antigéniques de 30-40 K sont constituées de chaînes uniques.

La figure 6A (p.42) présente les résultats d'une analyse cinétique réalisée avec des sérums de rats Hooded-Lister collectés à des périodes variables après l'infection. On observe que les anticorps dirigés contre les antigènes 30-40 K apparaissent dans le sérum après 4 semaines et restent présents au moins jusqu'à la 25ème semaine d'infection. Des

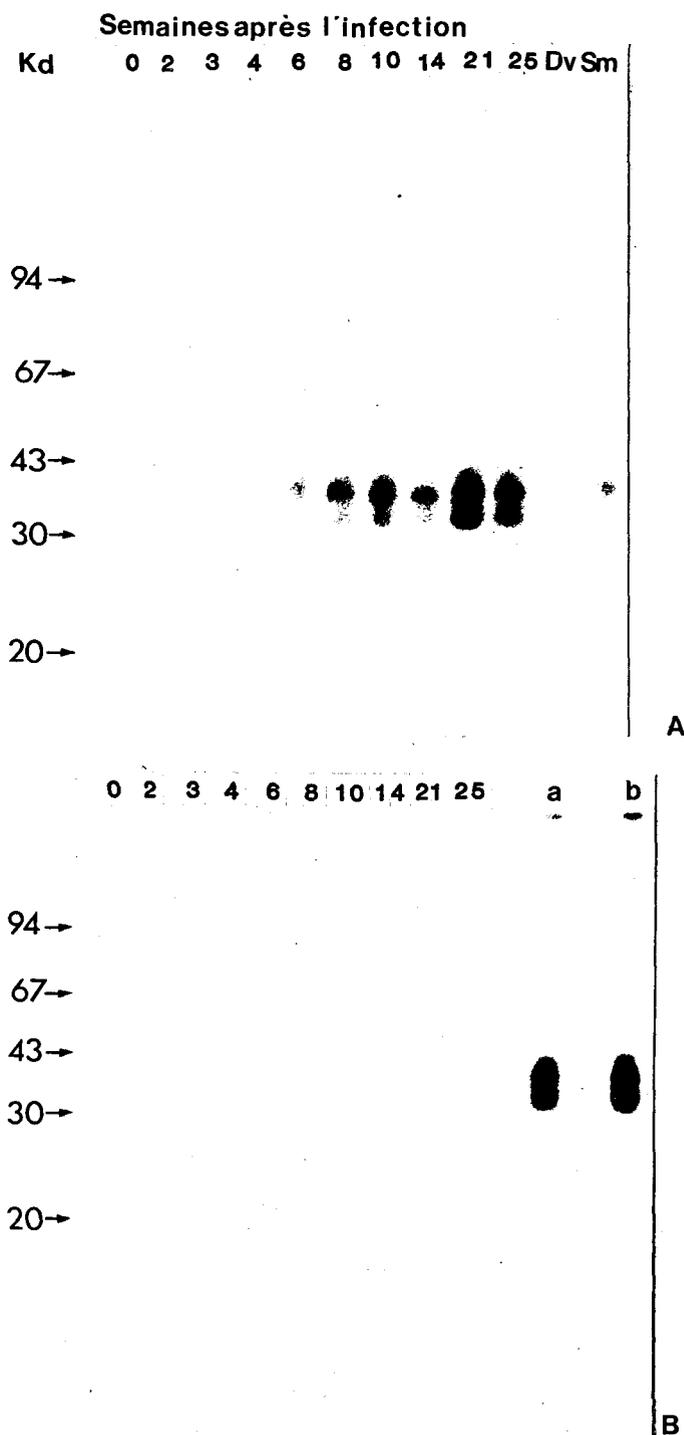


Figure 6 : Immunoprécipitation des antigènes de surface du schistosomule par des sérums de rats infectés.

- A - Des sérums de rats Hooded-Lister collectés avant (0) ou après 2 - 25 semaines d'infection par *S. mansoni* sont incubés avec un extrait Nonidet P40 0.5 % de schistosomules iodés en présence de Tactoperoxydase, dans les conditions décrites dans "Matériel et Méthodes". Les complexes immuns sont isolés par adsorption sur Protéine-A-Sépharose puis analysés en gel de polyacrylamide-SDS (10 - 15 %). Des sérums de rat Fischer infectés par *Dipetalonema viteae* (Dv) ou infectés par *S. mansoni* (Sm) depuis 8 semaines sont utilisés comme contrôles.
- B - Le matériel, non fixé sur la Protéine A-Sépharose lors de l'expérience A, est ensuite incubé avec 10 µl de sérum de chèvre anti-IgG de rat pendant 18 h à 4°C puis redéposé sur la Protéine A-Sépharose. Les produits élués de la Protéine A sont analysés dans les conditions décrites en A. L'addition de sérum anti-IgG de rat (b) à un mélange d'incubation d'un extrait de parasites avec du sérum de rat infecté depuis 8 semaines (a) ne modifie pas le profil électrophorétique des produits élués de la Protéine A.

contrôles utilisant du sérum de rat normal ou du sérum de rat infecté par la filaire Dipetalonema viteae démontrent la spécificité de genre Schistosoma de ces antigènes.

Dans cette expérience, l'électrophorèse des antigènes a été effectuée dans un gradient linéaire 10-15 % de polyacrylamide mais le pouvoir de résolution dans la zone 30-40 K du gel est faible. Des expériences ultérieures ont été faites en gel homogène 13 % et dans ces conditions, nous avons pu distinguer au moins quatre composants de poids moléculaire 40 K, 38 K, 37 K et 32 K (voir Fig. 13, p.59).

Toutefois, nous avons enregistré d'importantes variations dans l'intensité de la bande 40 K au cours des expériences.

La méthode d'isolement des complexes immuns requiert la fixation des immunoglobulines sur la Protéine A par leur fragment Fc. MEDGYESI et al ont étudié l'affinité des immunoglobulines de rat appartenant aux différentes sous-classes d'IgG et montré que les IgG1 et les IgG2c se fixent sur la Protéine A alors que les IgG2a et IgG2b ne se fixent pas (133). Etant donné que les immunoglobulines de la sous-classe IgG2a représentent la majeure partie des IgG du rat (65), il était nécessaire de rechercher si des anticorps n'ayant pas d'affinité pour la Protéine A pouvaient ou non reconnaître d'autres antigènes de surface du schistosomule. Les "effluents" de la Protéine A-Sépharose provenant de l'expérience de la figure 6A ont donc été incubés en présence de sérum de chèvre anti-IgG de rat puis redéposés sur des billes de Protéine A-Sépharose. Les résultats de l'analyse des produits élués de ces billes sont présentés dans la figure 6B (p.42). Seules quelques traces de radioactivité sont détectées dans la zone 30-40 K qui correspondent aux antigènes précédemment caractérisés. Ces expériences démontrent donc que parmi les composants de surface du schistosomule, seuls quatre

antigènes majeurs marqués par l' $^{125}\text{I}$  sont reconnus par les IgG spécifiques produites dans la schistosomiase du rat. On ne peut toutefois pas exclure une participation possible d'autres classes d'immunoglobulines ayant une affinité pour la Protéine A (IgM par exemple) dans la reconnaissance de ces antigènes.

## 2. Etude de l'accessibilité des antigènes

L'observation que les antigènes 30-40 K ne peuvent plus être isolés à partir de parasites ayant été incubés en présence de trypsine, était déjà en faveur de leur localisation à la surface du parasite. Des données complémentaires furent ensuite obtenues confirmant l'exposition de ces antigènes à la surface du parasite et démontrant leur accessibilité aux anticorps qui leur sont spécifiques.

### a) Iodation catalysée par des enzymes insolubilisées

Les techniques de marquage utilisant des enzymes insolubilisées permettent d'éliminer la contamination possible des produits iodés par ces enzymes. Dans le cas précis des marquages de surface, le principal avantage apporté par l'insolubilisation des enzymes est d'empêcher leur pénétration à travers les membranes cellulaires et donc d'éviter le marquage de certains composants cellulaires internes.

Nous avons effectué le marquage par l' $^{125}\text{I}$  des schistosomules en présence d'un réactif commercialisé par BioRad (BioRad Lab., Richmond, California) sous le nom d' "enzymobead radioiodination reagent". Ce réactif est constitué par de la lactopéroxydase et de la glucose oxydase couplées à un support solide. L'addition de glucose à la suspension de billes entraîne la génération par la glucose oxydase

de  $H_2O_2$  qui sert alors de substrat à la lactopéroxydase. Dans cette expérience, les résultats de l'immunoprécipitation par des sérums de rat ont été identiques à ceux obtenus après iodation des parasites en présence de lactopéroxydase soluble et d' $H_2O_2$  (Fig. 7, p.46; comparer a et b). En conséquence, ces résultats indiquent que le marquage des antigènes 30-40 K n'est pas dû à la pénétration de la lactopéroxydase à l'intérieur du parasite et confirment l'exposition de ces antigènes à la surface du parasite.

b) Accessibilité aux anticorps spécifiques

Le rôle des antigènes de surface dans l'immunité dépend de l'accessibilité aux anticorps du sérum, des déterminants antigéniques exposés à la surface du parasite vivant. Nous avons réalisé deux types d'expériences dans le but de démontrer la fixation possible des anticorps aux antigènes 30-40 K lorsque ceux-ci sont incorporés dans la membrane du parasite.

Dans la première expérience, les schistosomules iodés ont été incubés en présence de sérum de rat infecté et les complexes immuns formés à la surface du parasite ont été isolés puis analysés (Fig. 7, c p. 46). Dans la seconde expérience, les complexes immuns ont été formés à la surface de schistosomules non marqués puis isolés et marqués par l' $^{125}I$  avant d'être analysés (fig. 7, d). Dans chacun des cas, nous avons pu identifier les antigènes 30-40 K et apporter ainsi la preuve que ces antigènes de surface sont accessibles aux anticorps du sérum et surtout que cette accessibilité n'est pas la conséquence d'une modification de la structure membranaire due aux conditions de marquage.

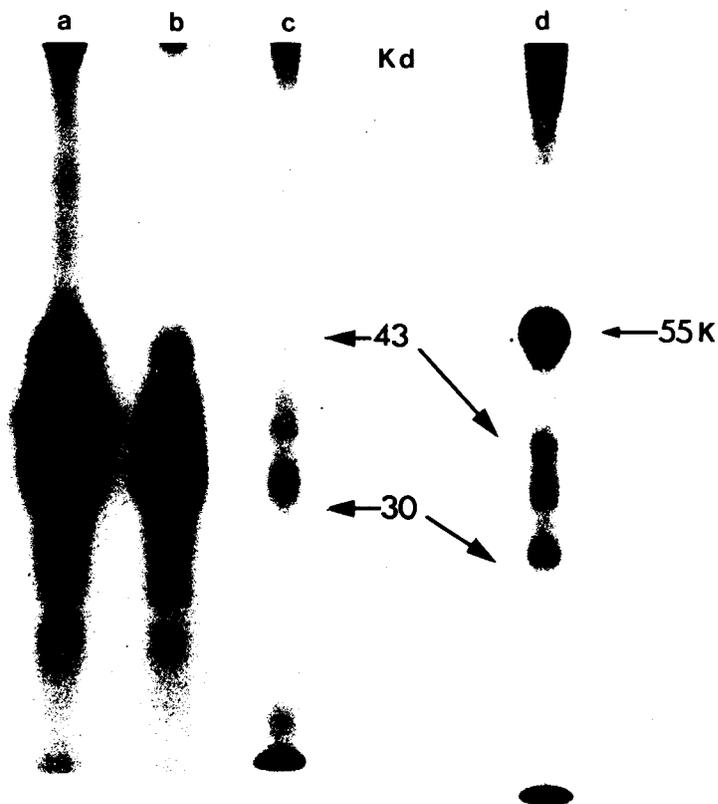


Figure 7 : Accessibilité des antigènes de surface du schistosomule.

Les parasites sont marqués par  $^{125}\text{I}$  en présence de lactopéroxydase soluble (a) ou d' "enzymobeads" (BioRad Lab., CA) selon le protocole conseillé par BioRad (b). Les antigènes de 500 (a) et 5000 (b) parasites sont immunoprécipités par du sérum de rat infecté.

Dans c et d, 4000 schistosomules marqués en présence de lactopéroxydase soluble (c) ou non marqués (d) sont incubés pendant 1 h à  $4^{\circ}\text{C}$  dans 250  $\mu\text{l}$  de sérum de rat infecté préalablement chauffé 30 mn à  $56^{\circ}\text{C}$  et dilué au 1/2 par du tampon PBS contenant 5 mM NaF, 200 U/ml aprotinine et 0.5 mM PMSF. Les parasites sont ensuite lavés dans le tampon PBS et traités par le Nonidet P40 à 0.5 %. Les complexes immuns sont adsorbés sur la Protéine A-Sépharose puis analysés directement (c) ou après marquage par  $^{125}\text{I}$  et la chloramine T selon la technique de HUNTER et GREENWOOD (Réf. 134) (d). En d, la bande de 55 K correspond vraisemblablement à des chaînes lourdes d'IgG.

### C. Immunoprécipitation par des sérums de souris

Les résultats d'une étude cinétique comparable à celle effectuée chez le rat, sont présentés dans la figure 8, D (p.48 ). Les sérums des souris C57Bl/6 infectées par S. mansoni reconnaissent les antigènes de surface de poids moléculaire 30-40 K précédemment caractérisés. On observe cependant une différence dans le délai d'apparition des anticorps chez la souris et le rat infectés. En effet, la réponse anticorps n'est observée chez la souris qu'après 7 semaines d'infection alors qu'elle apparaît chez le rat à partir de la 4ème semaine d'infection (Fig. 6, p. 42 ). On peut noter également la présence de bandes additionnelles de poids moléculaire 100K, 80 K et 20-25 K qui sont particulièrement évidentes lorsqu'on considère les sérums prélevés aux périodes tardives de l'infection.

### D. Immunoprécipitation par des sérums de primates

Parmi les antigènes de surface précipités par des sérums de singe ou d'homme infectés par S. mansoni, on observe à nouveau la présence des composants majeurs 30-40 K (Fig. 8, B et C). D'autres antigènes mineurs de poids moléculaire plus élevé sont aussi précipités par les sérums des deux espèces et dans le cas de l'homme, des antigènes dont le poids moléculaire varie entre 20 et 25 K sont reconnus avec une intensité différente selon les individus (Fig. 8B et 9, p. 48 ).

De nombreuses parentés antigéniques ont été mises en évidence entre S. mansoni et S. haematobium (31). De plus des réactions croisées importantes ont été observées entre S. mansoni et Fasciola hepatica ;

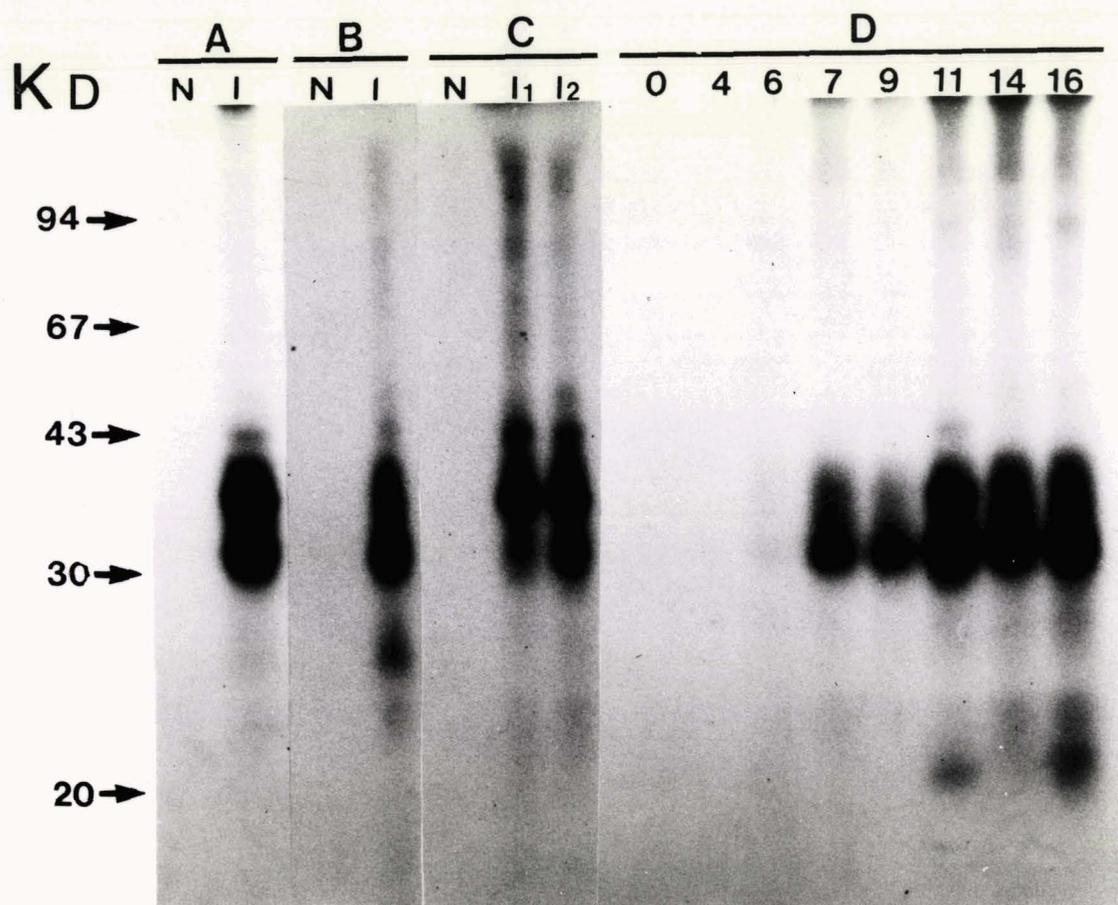


Figure 8 : Analyse des antigènes de surface de schistosomules isolés par des sérums de rat (A), d'homme (B), de singes (C) ou de souris (D).

N : sérum normal, I : sérum d'infection. En C, nous avons testé les sérums prélevés chez deux singes *Erythrocebus patas* 16 mois après une exposition à un total de 1000 cercaires. Les données présentées en D, correspondent à une expérience cinétique dans laquelle les sérums de souris C 57B1/6 sont collectés avec (0) ou après 4 - 16 semaines d'infection.

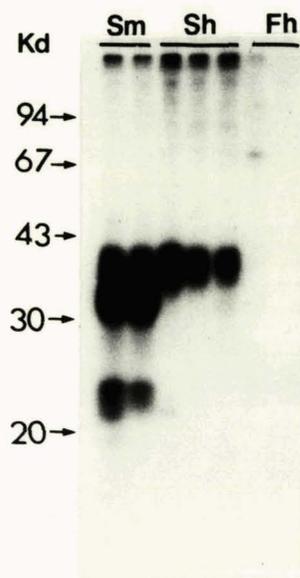


Figure 9 : Analyse des antigènes de surface de *S. mansoni* précipités par des sérums de patients infectés par *Schistosoma mansoni* (Sm), *Schistosoma haematobium* (Sh) ou *Fasciola hepatica* (Fh).



une protection contre l'infection par S. mansoni a même pu être obtenue chez la souris après injection d'extraits de F. hepatica (135). Pour ces raisons, nous avons comparé dans l'expérience de la figure 9 (p.48) les profils électrophorétiques des antigènes de surface de S. mansoni isolés par des sérums de patients atteints de schistosomiase à S. mansoni ou à S. haematobium ou infectés par F. hepatica. Les résultats montrent que les parentés antigéniques entre S. mansoni et F. hepatica sont réduites aux quelques antigènes de haut poids moléculaire alors qu'une identité beaucoup plus importante est mise en évidence entre S. mansoni et S. haematobium. Les différences observées concernent alors les antigènes 32 K et 20-25 K qui apparaissent spécifiques de S. mansoni, les autres antigènes 30 - 40 K étant spécifiques du genre Schistosoma.

#### E. Discussion

Le marquage des schistosomules par l' $^{125}\text{I}$  en présence de lactopéroxydase nous a permis de démontrer l'existence d'un nombre limité de composants de surface précipitables par les anticorps produits au cours de la schistosomiase humaine ou expérimentale. Quatre antigènes de poids moléculaire 40 K, 38 K, 37 K et 32 K ont pu être identifiés par des sérums de rats, de souris, de singes et d'hommes infectés par S. mansoni. Ces différentes espèces animales développent une immunité à la réinfection par S. mansoni (6, 23, 27, 28) et il est surtout intéressant de noter que les anticorps spécifiques des antigènes 30-40 K sont détectés à la fois chez le rat et la souris au moment où l'animal acquiert une immunité à la réinfection. Cette période correspond chez le rat à la 4ème semaine d'infection et chez la souris à la 7ème semaine d'infection

(cf Fig. 10 et ref. 27, 28). Un premier pic d'immunité a été enregistré chez la souris vers la 3<sup>ème</sup> semaine d'infection qui semble correspondre à un retard dans la migration des parasites vers le poumon (28). Nous avons pu vérifier l'absence d'anticorps spécifiques des antigènes 30-40 K dans le sérum des animaux prélevés à cette période précoce de l'infection.

Par ailleurs, la démonstration que les déterminants antigéniques définis par les anticorps du sérum sont accessibles à la surface des parasites vivants est en faveur d'un rôle possible de ces antigènes dans les mécanismes d'immunité dépendant d'anticorps spécifiques.

Lorsque les schistosomules sont marqués par le réactif de BOLTON-HUNTER, les antigènes de surface 30-40 K sont à peine identifiables. Par contre, les antigènes majeurs précipités par des sérums de rats correspondent à des bandes de 100 K, 95 K, 80 K, 70 K et à une bande beaucoup plus intense dont le poids moléculaire varie de 26 à 20 K (Fig. 11, b, p. 52). Des résultats sensiblement identiques peuvent être obtenus après immunoprécipitation par des sérums de souris, de singes et d'hommes infectés.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le fait que les composants 30-40 K sont représentés de façon mineure après iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER. Il est possible que les antigènes 30-40 K possèdent peu ou pas de groupements NH<sub>2</sub> accessibles au réactif iodé ou encore que la fixation du réactif iodé sur les antigènes empêchent leur reconnaissance par les anticorps spécifiques. Une autre hypothèse serait que dans les conditions de marquage par le réactif de BOLTON-HUNTER, il se produit une libération accrue des antigènes 30-40 K dans le milieu. Dans l'expérience de la figure 11, les parasites ont été marqués successivement par le réactif de BOLTON-HUNTER puis iodés en présence de

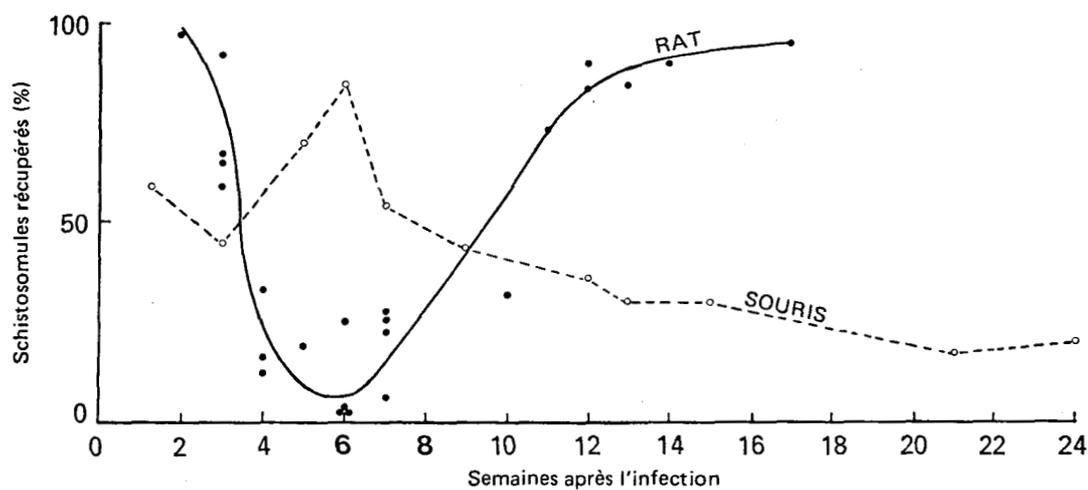


Figure 10 : Développement d'une immunité de protection contre S. mansoni chez le rat et la souris (d'après SMITHERS et TERRY, Réf. 16).

Les animaux sont infectés par des cercaires à des périodes différentes suivant une première infection. L'immunité est exprimée en fonction du nombre de parasites récupérés des poumons. Plus le pourcentage de parasites est bas, plus l'immunité est importante.

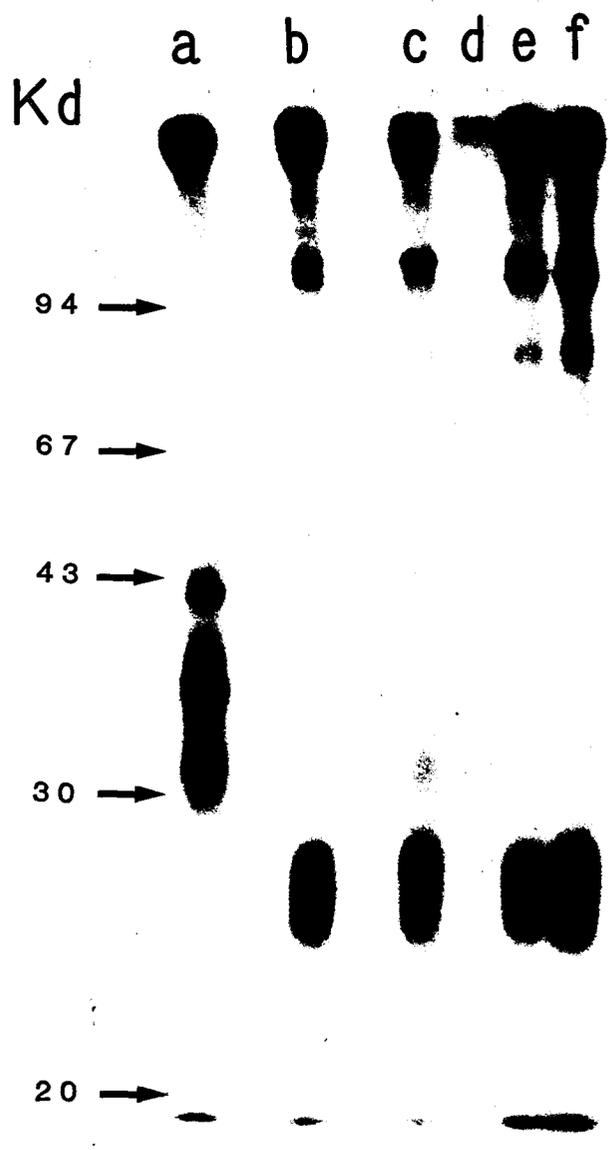


Figure 11 : Comparaison des antigènes de surface iodés en présence de lactoperoxydase ou par le réactif de BOLTON-HUNTER.

Les antigènes de surface sont immunoprécipités par du sérum de rat infecté, à partir de schistosomules marqués en présence de lactoperoxydase (a) ou par le réactif de BOLTON-HUNTER (b). En c et d, les schistosomules sont incubés en tampon EBSS pH 8,5 avec (c) ou sans (d) le réactif de BOLTON-HUNTER puis iodés en présence de lactoperoxydase. En e et f, les schistosomules sont incubés en présence de lactoperoxydase et d' $H_2O_2$  avec (e) ou sans (f)  $^{125}I$  puis marqués par le réactif de BOLTON-HUNTER.

Lactopéroxydase ou inversement. Les résultats montrent que si une seconde iodation en présence de lactopéroxydase n'affecte pas l'isolement des antigènes préalablement marqués par le réactif de BOLTON-HUNTER (c), l'iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER de parasites déjà marqués en présence de lactoperoxydase entraîne la disparition quasi-quantitative des antigènes 30-40K isolés (e).

Enfin, une comparaison est très délicate entre nos résultats et ceux obtenus par TAYLOR et al (132) après marquage par l'acide iodosulfanilique de schistosomules de 18 heures. Après analyse en gel de polyacrylamide-SDS des antigènes reconnus par des sérums de souris infectées, ces auteurs identifient dans le gel, trois pics de radioactivité à des poids moléculaires moyens de 105K, 68K et 28K, dont certains peuvent, compte tenu de la plus grande finesse de résolution des analyses autoradiographiques, correspondre à des antigènes préalablement identifiés après marquage par le réactif de BOLTON-HUNTER.

### III. ANTIGENES DE SURFACE DEFINIS PAR DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La découverte de l'hybridation cellulaire en 1960 par BARSKI et CORNEFERT (136) a conduit au cours de ces dernières années à un intense développement des techniques de fusion cellulaire. Dans le domaine immunologique en particulier, KÖHLER et MILSTEIN furent les premiers en 1975 à fusionner une cellule myélomateuse et un lymphocyte B, immortalisant ainsi un génome B lymphocytaire producteur d'immunoglobulines monoclonales (137). La production et l'utilisation d'anticorps monoclonaux ont connu alors un essor considérable, autant pour l'étude des marqueurs de populations cellulaires que pour l'identification d'antigènes tumoraux et de différenciation tissulaire. Enfin, l'application de cette technique aux modèles parasitaires a permis de sélectionner

au laboratoire, divers anticorps monoclonaux spécifiques de S. mansoni (138) parmi lesquels une immunoglobuline de sous-classe IgG2a, appelée IPLSm1, a été plus spécialement étudiée pour ses propriétés biologiques particulières (126).

#### A. Caractéristiques des anticorps IPLSm1

##### 1. Sélection de l'hybride cellulaire

Le schéma, présenté dans la figure 12, résume les différentes étapes de la fusion cellulaire et du clonage des cellules hybrides qui ont permis à J.M. GRZYCH de sélectionner le clone IPLSm1. Une description détaillée de la technique a été faite précédemment (126).

Brièvement, des cellules spléniques sont prélevées chez un rat infecté par S. mansoni depuis 35 jours et mises à fusionner avec des cellules myélomateuses IR983F. Ces cellules sont dérivées d'un immunocytome de rat LOU/C ; elles sont non productrices d'immunoglobulines et présentent une déficience en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT , E.C. 2.4.2.8.) (139). La fusion cellulaire est induite par le polyéthylène glycol et le diméthylsulfoxyde, et la sélection s'opère en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) (140). Le clonage des cellules hybrides productrices d'anticorps spécifiques de S. mansoni est ensuite effectué par la technique de dilution limite. Les clones positifs sont soumis à un second clonage puis multipliés.

La production massive d'anticorps monoclonaux est envisagée soit en culture in vitro, soit par le développement d'ascites in vivo. Les concentrations en protéines monoclonales obtenues sont de l'ordre du µg/ml dans les surnageants de culture in vitro alors qu'elles peuvent atteindre plusieurs mg/ml dans les liquides d'ascite.

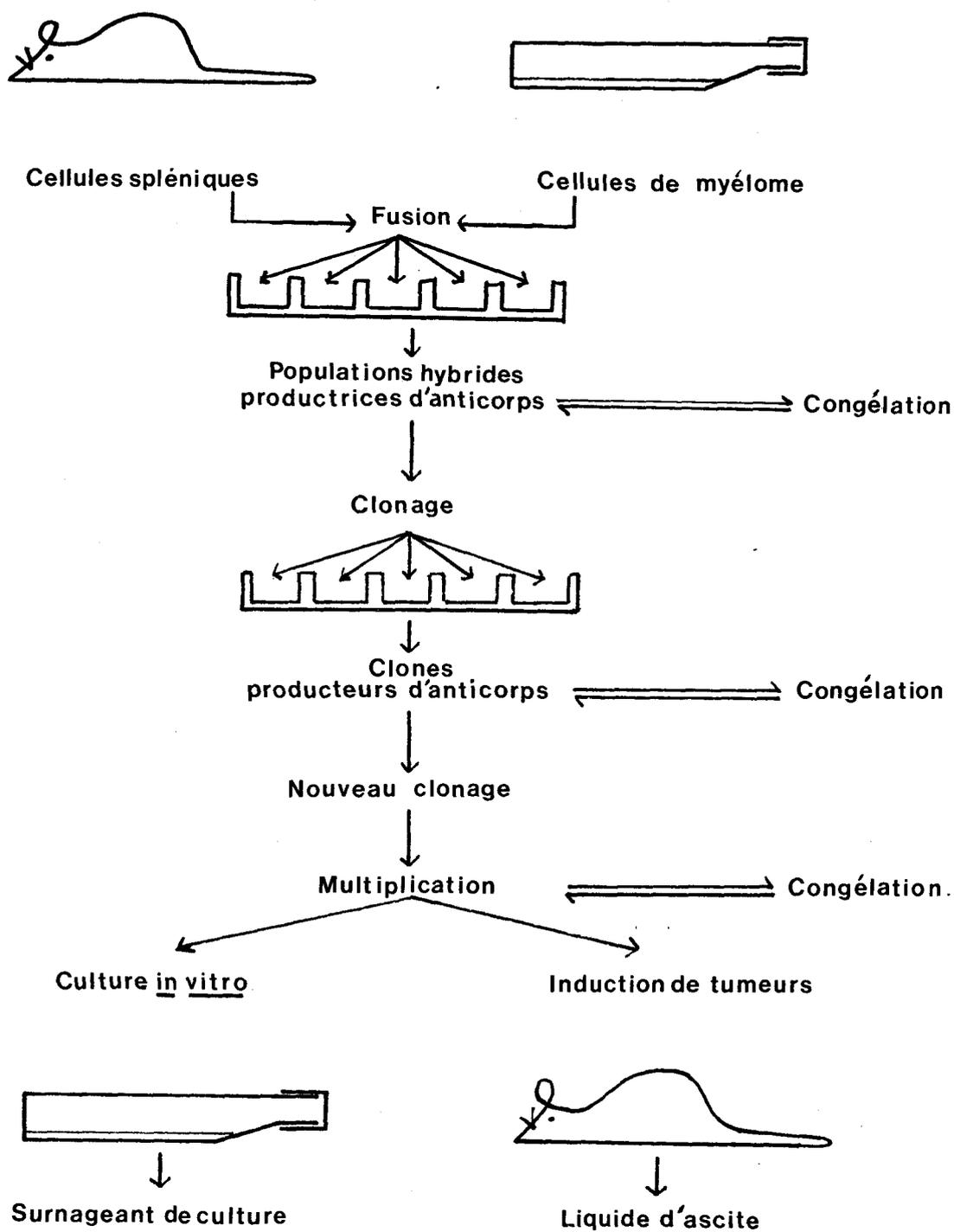


Figure 12 : Production des anticorps monoclonaux.

La spécificité anti-S. mansoni des anticorps IPLSm1 a été détectée par immunofluorescence indirecte sur coupes de schistosomules. L'isotype IgG2a des immunoglobulines monoclonales a été déterminée par la technique de double diffusion en gel (141).

## 2. Propriétés biologiques des anticorps IPLSm1

Les premières démonstrations de l'existence d'une cytotoxicité dépendante d'éosinophiles et d'anticorps spécifiques furent apportées par BUTTERWORTH et al (52) qui observaient que des éosinophiles humains normaux pouvaient tuer in vitro des schistosomules de S. mansoni en présence des anticorps IgG du sérum de patients infectés par S. mansoni. CAPRON et al décrivent chez le rat un système analogue impliquant des anticorps de sous-classe IgG2a (53) ; l'analyse des populations cellulaires actives dans ce mécanisme montra aussi que les mastocytes potentialisaient la cytotoxicité par les éosinophiles (64).

GRZYCH et al (126) ont étudié l'effet des anticorps IPLSm1 dans ce système et démontré que les surnageants de culture du clone IPLSm1 présentaient une activité cytotoxique comparable à celle d'un sérum de rat infecté depuis 35 jours (85 - 90 %). D'autre part, la multiplication du clone IPLSm1 par induction de tumeurs chez l'animal a permis d'obtenir dans les liquides d'ascite des quantités très importantes d'anticorps cytotoxiques : un pourcentage de mortalité de 70 % fut encore enregistré pour une dilution au 1/4000ème du liquide d'ascite. Le pouvoir cytotoxique des immunoglobulines monoclonales purifiées par chromatographie d'échange d'ions (sur DEAE-Trisacryl, IBF, France) n'était que très peu inférieur à celui du liquide d'ascite dont elles étaient extraites. Enfin, la présence de mastocytes était nécessaire pour obtenir une cytotoxicité.

La démonstration in vitro d'activités biologiques similaires entre les anticorps IPLSm1 et le sérum de rat infecté, fut en partie à l'origine de l'intérêt porté à l'étude in vivo du rôle des anticorps IPLSm1 dans l'immunité acquise à S. mansoni. Par des expériences de transfert passif chez le rat, GRZYCH et al (126) démontrèrent que l'injection du liquide d'ascite IPLSm1 protégeait de manière significative (50 - 60 %) l'animal d'une infection par S. mansoni. Un degré de protection comparable peut être obtenu par injection de sérum de rat infecté. Ces résultats étaient également en accord avec les observations précédentes de CAPRON et al montrant que l'élimination des anticorps IgG2a du sérum de rat infecté réduisait de plus de 50% sa capacité à transférer l'immunité (38).

#### B. Identification de l'antigène reconnu par les anticorps IPLSm1

L'efficacité des anticorps IPLSm1 dans les mécanismes de cytotoxicité in vitro suggérait une reconnaissance spécifique de la surface des schistosomules et leurs fonctions protectrices in vivo laissaient supposer que l'on puisse isoler par ces anticorps un antigène potentiellement protecteur contre l'infection par S. mansoni.

La reconnaissance spécifique de la surface du schistosomule fut tout d'abord mise en évidence par la technique d'immunofluorescence indirecte et l'identification de l'antigène de surface défini par les anticorps IPLSm1 fut réalisée par la technique d'immunoprécipitation, précédemment appliquée à l'isolement des antigènes reconnus par les sérums d'hôtes infectés. Pour pallier le manque d'affinité des IgG2a de rat pour la Protéine A, des anticorps anti-IgG de rat furent préalablement fixés sur la Protéine A-Sépharose.

Les résultats présentés dans la figure 13A (p. 59 ) indiquent que les anticorps IPLSm1 précipitent spécifiquement un antigène de surface du schistosomule de poids moléculaire 38.000 (b). Cet antigène 38 K correspond effectivement à l'un des antigènes 30-40 K précipités par les anticorps produits durant l'infection du rat (c) puisqu'il ne peut plus être isolé par les anticorps du sérum lorsque l'extrait de schistosomules marqués a été préalablement incubé avec le liquide d'ascite IPLSm1 (d)

De plus, les résultats d'une expérience dans laquelle l'antigène 38 K est d'abord isolé par précipitation avec les anticorps IPLSm1 puis incubé avec des sérums de divers hôtes infectés par S. mansoni , confirment que la souris, le singe et l'homme développent aussi au cours de l'infection une réponse anticorps contre l'antigène 38 K, défini par l'anticorps monoclonal (Fig. 13B, p. 59 ).

En conclusion, ces expériences suggèrent que l'antigène 38 K puisse représenter au niveau du schistosomule la cible des mécanismes effecteurs spécifiques dépendants d'éosinophiles. Nous avons préalablement observé que les anticorps anti 30-40 K et anti-38 K en particulier, apparaissent dans le sérum du rat vers la 4ème semaine d'infection (Fig. 6A, p. 42 ), c'est-à-dire à la période à laquelle l'animal devient immun à la réinfection (Fig. 10, p. 51 ). Cette observation, s'ajoutant à la démonstration du pouvoir protecteur des anticorps IPLSm1, serait en faveur d'un rôle potentiel de l'antigène 38K dans le développement de l'immunité à S. mansoni.

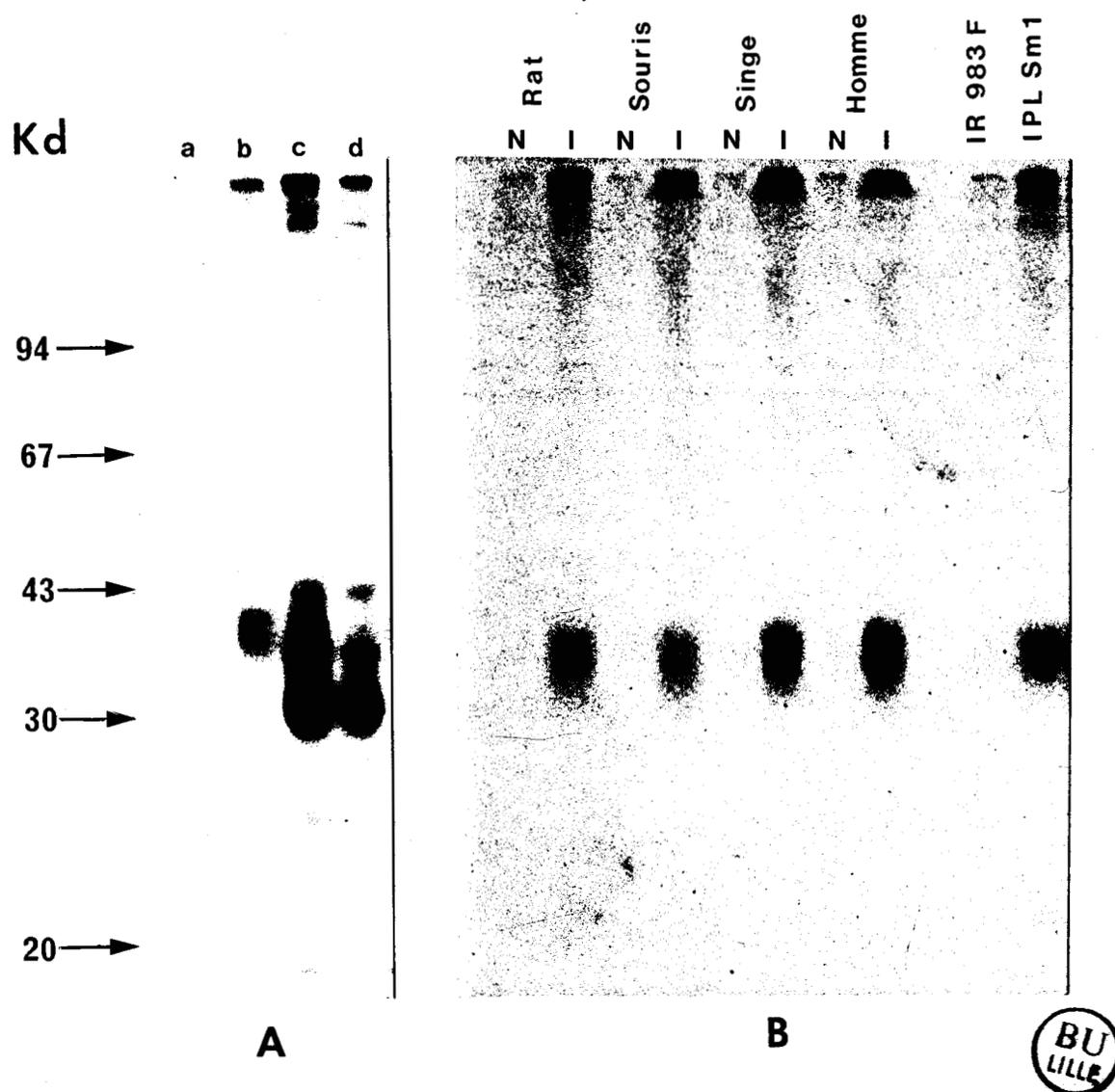


Figure 13 : Identification de l'antigène de surface reconnu par les anticorps monoclonaux IPLSm1.

- A. Un extrait détergent de 500 schistosomules est incubé avec 10  $\mu$ l de liquide d'ascite IR983F (a) ou IPLSm1 (b) puis déposé sur Protéine A-antiIgG de rat (voir "Matériel et Méthodes"). Les produits élués sont analysés en SDS-Page. Le matériel qui n'a pas réagi avec la Protéine A en a et b est ensuite incubé avec 10  $\mu$ l de sérum de rat infecté et les complexes immuns sont isolés sur Protéine A-Sépharose puis analysés respectivement en c et d.
- B. Les complexes immuns formés après incubation d'un extrait détergent de parasites avec le liquide d'ascite IPLSm1 sont isolés sur Protéine A-antiIgG de rat puis élués en SDS 2 % à 100°C pendant 2 mn. L'éluat est dilué par 6 volumes de Triton x 100 2 % (voir "Matériel et Méthodes") et incubé avec 10  $\mu$ l de sérum normal (N) ou de sérum d'hôtes infectés (I). Les liquides d'ascites IR983F et IPLSm1 sont utilisés comme contrôles.

Toutefois, il est important de remarquer que si les anticorps anti-38K continuent à être détectés dans le sérum des animaux jusqu'à la 25ème semaine d'infection (Fig. 6A, p. 42 ) l'immunité développée par l'animal s'annule vers la 10-12ème semaine ( Fig. 10, p. 51 ). Tous les anticorps dirigés contre l'antigène 38 K ne seraient donc pas doués d'activité cytotoxique ou protectrice! C'est ce qui a été confirmé récemment grâce à la sélection d'un clone IPLSm3 sécrétant des IgG2c monoclonales spécifiques de l'antigène 38K. Non seulement ces anticorps IPLSm3 ne sont ni cytotoxiques in vitro, ni protecteurs in vivo, mais en plus ils peuvent inhiber les activités cytotoxiques et protectrices des anticorps IPLSm1 (142). En conséquence, l'immunité de l'hôte pourrait donc être dépendante d'un mécanisme de régulation de la réponse humorale anti-38K, opérant au niveau de la synthèse préférentielle de certaines sous-classes d'IgG.

#### IV. ANTIGENES COMMUNS AUX DIFFERENTS STADES DU PARASITE

Les modalités d'interaction entre l'hôte et le parasite varient largement en fonction du stade parasitaire considéré. En effet, le parasite subit au cours de son développement de nombreuses modifications de surface et différents auteurs (73 - 76) ont montré que si le schistosomule est la cible principale dans les mécanismes d'immunité, celui-ci devient très vite au cours de sa maturation, insensible à la réponse immune de l'hôte, l'acquisition de molécules d'hôte pouvant alors représenter un mécanisme essentiel d'évasion. Par ailleurs, les résultats de SMITHERS et TERRY, indiquant que le ver adulte peut stimuler le développement de l'immunité (26) soulèvent la question de l'existence d'antigènes communs aux stades larvaires et adulte du parasite. Une série d'expériences a donc été consacrée à l'analyse des antigènes qui sont présents aux différents stades du parasite et qui possèdent en particulier un (des) déterminant(s) antigénique(s) commun(s) à l'antigène de surface 38 K du schistosomule.

##### A. Antigènes des premiers stades larvaires

Dans l'expérience de la figure 14A (p. 62 ), nous avons analysé les antigènes présents à la surface des cercaires et des schistosomules préparés mécaniquement puis incubés à 37°C pendant des temps différents. Les résultats de l'immunoprécipitation par un sérum de rat infecté montrent l'existence des antigènes 37-38 K à la surface des cercaires (a) et des schistosomules (b - c). L'antigène 40 K apparaît sur les schistosomules après 1 h d'incubation (c) et un profil identique à celui observé pour les schistosomules "peau" (f) est obtenu pour des schistosomules incubés 2 h (d) ou 3 h (e).

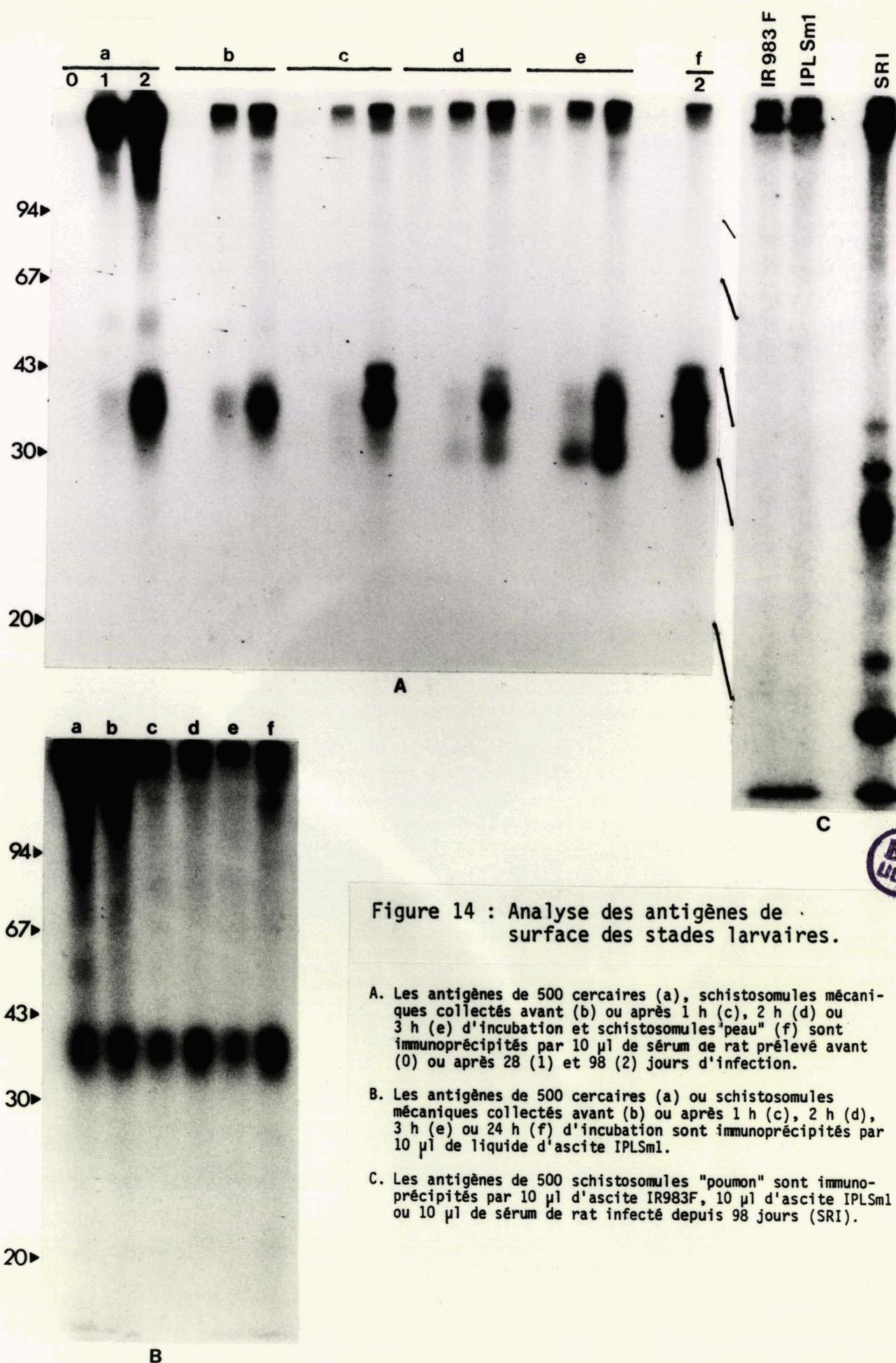


Figure 14 : Analyse des antigènes de surface des stades larvaires.

A. Les antigènes de 500 cercaires (a), schistosomules mécaniques collectés avant (b) ou après 1 h (c), 2 h (d) ou 3 h (e) d'incubation et schistosomules "peau" (f) sont immunoprécipités par 10 µl de sérum de rat prélevé avant (0) ou après 28 (1) et 98 (2) jours d'infection.

B. Les antigènes de 500 cercaires (a) ou schistosomules mécaniques collectés avant (b) ou après 1 h (c), 2 h (d), 3 h (e) ou 24 h (f) d'incubation sont immunoprécipités par 10 µl de liquide d'ascite IPLSm1.

C. Les antigènes de 500 schistosomules "poumon" sont immunoprécipités par 10 µl d'ascite IR983F, 10 µl d'ascite IPLSm1 ou 10 µl de sérum de rat infecté depuis 98 jours (SRI).

La reconnaissance de ces parasites par les anticorps IPLSm1 a tout d'abord été mise en évidence par la technique d'immunofluorescence indirecte. Une fluorescence intense est observée à la surface de la cercaire (tête et partie caudale) ainsi que sur les schistosomules "mécaniques" incubés 1 h ou 3 h (Fig. 15, p. 64 ). Les résultats de l'immunoprécipitation par les anticorps IPLSm1 (Fig. 14B, p. 62 ) confirment la présence de l'antigène 38 K à la surface des cercaires et des schistosomules ; celui-ci est encore identifié à la surface des parasites après 24 h d'incubation.

Il est important de noter, dans le cas des cercaires et des schistosomules nouvellement transformés, qu'une proportion importante de la radioactivité immunoprécipitée est associée à des composants de haut poids moléculaire (HPM). Une co-précipitation non spécifique de ces composants semble peu probable puisque:

- d'une part, il est possible de précipiter à nouveau par les anticorps IPLSm1 les composants HPM extraits du gel d'une première analyse
- d'autre part, les composants HPM extraits du gel sont capables d'inhiber la reconnaissance de l'antigène 38 K du schistosomule par les anticorps IPLSm1.

Il semble également peu probable que cette radioactivité corresponde à des complexes immuns non dissociés car le traitement des échantillons en milieu réducteur (S-S) n'a pas modifié le profil obtenu.

Ces données suggèrent donc l'existence d'une identité antigénique entre les composants HPM et l'antigène 38K.

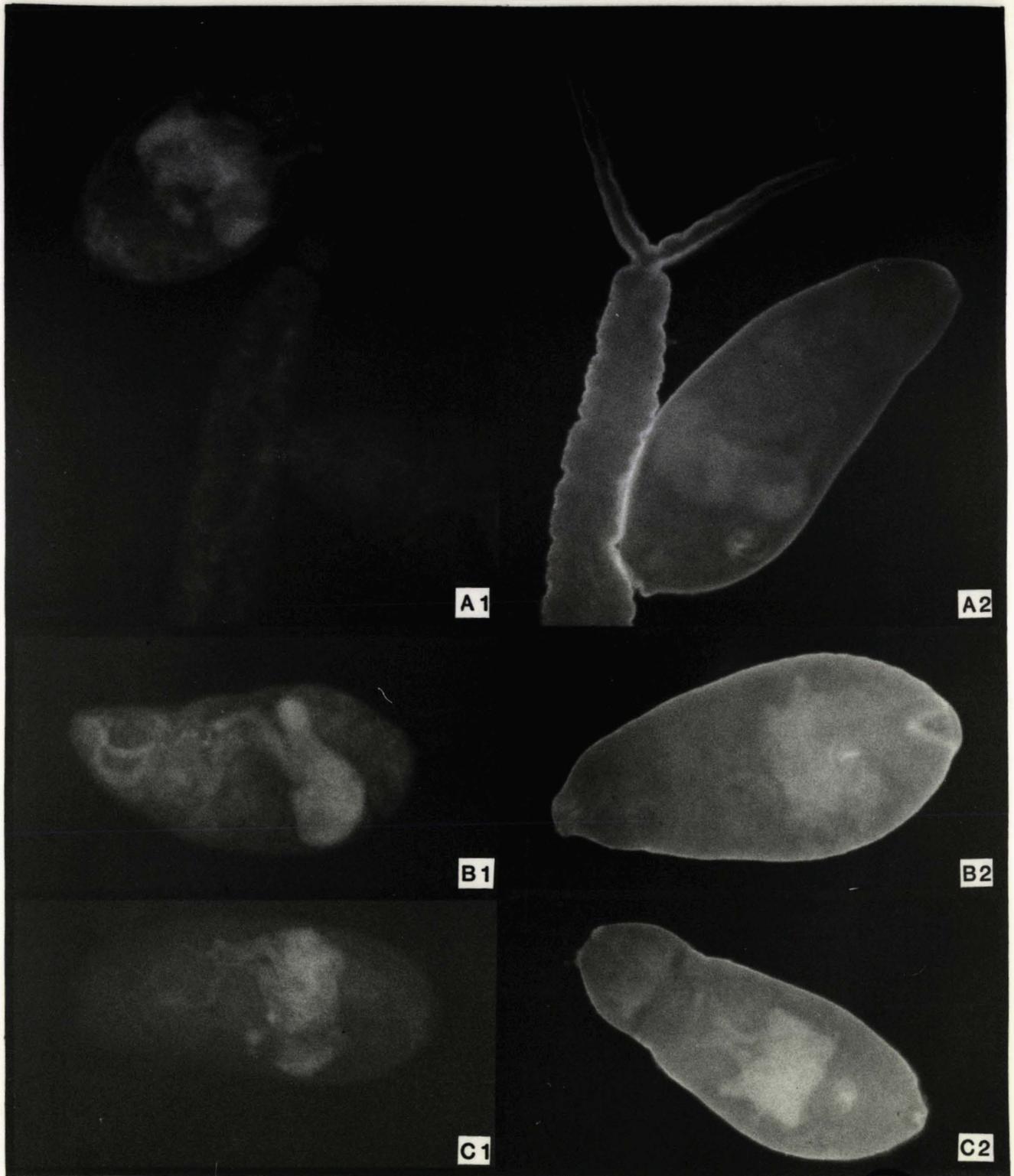


Figure 15 : Fixation des anticorps IPLSm1 à la surface des cercaires (A) et des schistosomules "mécaniques" avant (B) ou après 3 h d'incubation (C).

Les parasites sont fixés en tampon PBS par la glutaraldéhyde 0.5 % puis incubés 1/2 h à 37°C dans du sérum de lapin sain dilué au 1/10 (pour éviter la fixation non spécifique des IgG à la surface des parasites, réf. 53). 1000 parasites sont incubés 1/2 h à 37°C dans 1 ml d'une solution à 50 µg/ml d'IgG2a ne présentant pas d'activité anti-*S. mansoni* (C119 BG4, 1) ou d'IgG2a purifiées du liquide d'ascite IPLSm1 (2). La fixation des anticorps est révélée par l'addition d'un sérum de lapin anti-IgG de rat marqué par la fluorescéine (dilution 1/40ème en tampon PBS).



Dans un second temps, nous avons étudié le devenir des antigènes HPM et 38 K au cours de la transformation de la cercaire en schistosomule. Pour cela, des cercaires ont été marquées en surface par l' $^{125}\text{I}$  puis déposées sur un fragment de peau abdominale de souris. L'analyse des antigènes isolés a montré qu'environ 20 % de l'antigène 38 K initialement présent à la surface de la cercaire restent associés au schistosomule après le passage de la peau. Par contre, on assiste à une disparition totale des composants HPM de la surface du parasite.

Des données complémentaires furent apportées par une cinétique d'incubation de schistosomules préparés mécaniquement à partir de cercaires marquées. Les résultats, présentés dans la figure 16, indiquent que les antigènes HPM et 38 K sont progressivement libérés dans le milieu au cours de la maturation du parasite mais, comme il a été observé pour les schistosomules "peau", les antigènes HPM sont libérés en proportion plus importante (90 %) par rapport à l'antigène 38 K (60 %) ceci après 24 h d'incubation (p. 66).

En résumé, ces résultats indiquent que tous les antigènes 30-40 K sont présents à la surface des schistosomules "mécaniques" lorsque ceux-ci atteignent le stade de schistosomule "peau", tout au moins en ce qui concerne l'acquisition de leur double membrane. Si les antigènes 40 K et 32 K semblent spécifiques du stade "schistosomule", les antigènes 38K et 37K sont présents à la surface de tous les stades larvaires. Les résultats de l'immunoprécipitation par des sérums immuns ou les anticorps IPLSm1, montrent que des antigènes HPM, présentant une identité antigénique avec l'antigène 38 K, sont associés à la surface de la cercaire. L'observation que ces antigènes HPM sont libérés quantitativement lors de la transformation du parasite par passage à travers la peau, suggère qu'ils fassent

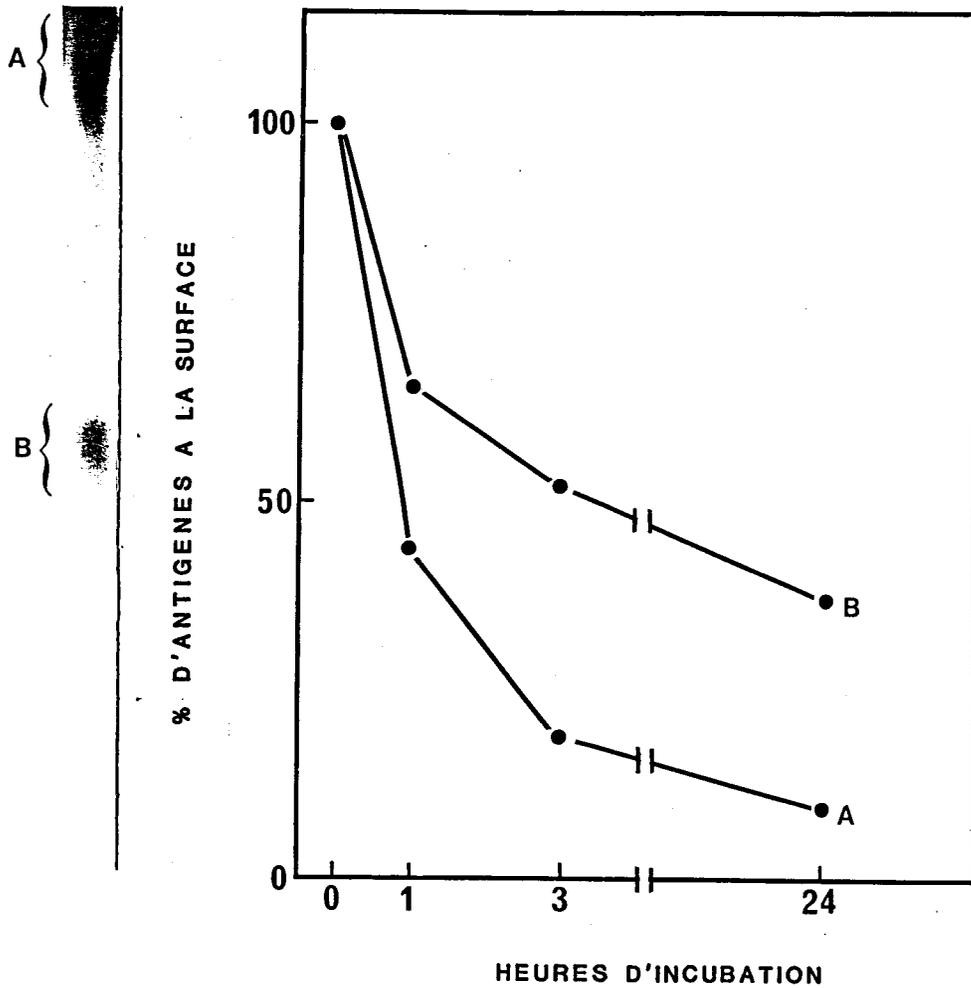


Figure 16 : Libération des antigènes de surface de cercaires.

Les schistosomules sont préparés mécaniquement à partir de cercaires marquées en surface puis incubés en MEM pendant 1 h, 3 h ou 24 h à 37°C. Les parasites sont traités par le NP40 à 0.5 %. Les antigènes sont précipités par 10 µl d'ascite IPLSm1 à partir des extraits de 500 parasites ou de leur milieu d'incubation. Après analyse en gel de polyacrylamide et autoradiographie, la radioactivité contenue dans les portions du gel correspondant aux antigènes HPM (A) et 38 K (B) est déterminée. Le pourcentage d'antigènes restant associés à la surface des parasites est calculé par rapport à la somme de la radioactivité isolée des parasites et du milieu d'incubation.

partie intégrante du glycocalyx cercarien. Quant à l'antigène 38 K, sa détection continue sur les schistosomules transformés, peut correspondre à la mise en évidence d'une quantité résiduelle d'antigènes d'origine cercarienne. Toutefois, le fait que l'antigène 38 K soit libéré en quantité importante de la surface de la cercaire (80 % lors du passage cutané) peut aussi traduire un taux de renouvellement membranaire élevé pendant la période de transformation du parasite.

#### B. Antigènes de schistosomule au stade "poumon"

Des parasites, récupérés du poumon de rats infectés depuis 5 jours par S. mansoni, ont été marqués en surface par l' $^{125}\text{I}$ . Les résultats de l'immunoprécipitation par les anticorps IPLSm1 n'indiquent pas la présence de l'antigène 38 K à la surface des parasites (Fig.14, p. 62). Ceci pourrait être la conséquence d'un masquage de l'antigène par des molécules d'hôte bien que les résultats obtenus avec le sérum de rat infecté ne soient pas en faveur de cette hypothèse. En effet, parmi les antigènes 30 - 40 K isolés par les anticorps du sérum, on remarque seulement l'absence de la bande 38 K et le profil électrophorétique est très similaire à celui précédemment obtenu lorsqu'un extrait de protéines de schistosomules "peau" est épuisé par les anticorps IPLSm1 avant d'être mis à réagir avec un sérum de rat infecté (Fig. 13, p. 59). On peut remarquer, dans le cas des schistosomules "poumon", des bandes additionnelles de poids moléculaire 22 et 18 K, apparemment spécifiques de ce stade parasitaire.

Ces résultats indiquent donc que l'antigène 38 K est un composant de surface des premiers stades larvaires du parasite. Il est évidemment tentant de relier l'absence (ou la non-exposition) en surface de cet antigène et la résistance du schistosomule "poumon" aux mécanismes d'immunité spécifique.

### C. Antigènes de schistosome

L'existence d'antigènes communs aux schistosomules et aux schistosomes de S. mansoni a été mise en évidence par différents auteurs (120, 143). Par ailleurs, le parallélisme observé entre l'évolution au cours de l'infection du rat, de la réponse humorale contre les antigènes 30-40 K du schistosomule et la réponse anticorps anti-schistosome (mesurée par la technique d'hémagglutination passive) (Tableau II, p. 69) pouvait suggérer indirectement la présence chez l'adulte d'antigènes communs aux antigènes 30-40 K du schistosomule.

#### 1. Immunisation par injection de schistosomes

Dans cette expérience, des rats ont reçu par voie intrapéritonéale des injections successives de vers adultes de S. mansoni. L'apparition d'anticorps dirigés contre la surface des schistosomules a été analysée chez ces animaux en utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte et d'immunoprécipitation. Les profils électrophorétiques, présentés dans la figure 17A (p. 71) montrent que le sérum des rats immunisés par les vers adultes reconnaît à la surface du schistosomule les antigènes 30-40 K (c) et 38 K en particulier (d). D'autres antigènes de poids moléculaire plus faible (20-25K) sont également isolés.

TABLEAU II

ETUDE DE LA REPOSE ANTI-SCHISTOSOMULE ET ANTI-SCHISTOSOME DANS  
L'INFECTION DU RAT

Semaines d'infection	Antigènes 30-40 K isolés Radioactivité en cpm	Anticorps anti-Schisto- some - Titre HMG
0	-	-
2	-	8
3	31	
4	907	16
5	1124	128
6	1523	256
7	1877	512
8	2162	1024
11	2621	2048
16	3210	2048
18	2903	2048

Les antigènes 30-40K sont précipités par 10 $\mu$ l de sérum à partir de 500 schistosomules marqués. La quantité d'anticorps dirigés contre un extrait total de schistosomes est déterminée par la technique d'hémagglutination passive utilisant des hématies de mouton formolées sur lesquelles l'antigène a été couplé par la glutaraldéhyde. Le titre HMG correspond à la dilution limite du sérum qui donne lieu à une hémagglutination.

## 2. Identification des antigènes communs

Nous avons tenté d'identifier au niveau du schistosome la(les) molécule(s) qui peuvent être responsable(s) de l'induction de la réponse anticorps contre l'antigène 38K. Compte tenu de l'observation que la capacité du ver adulte à stimuler l'immunité de protection (au moins chez le singe Rhésus) peut être dépendante de processus métaboliques impliquant l'excrétion ou la sécrétion de matériel antigénique (26), nous avons choisi de rechercher dans les produits d'incubation in vitro des schistosomes adultes, le (les) antigène(s) inducteur(s) de la réponse anti-38K.

Les premières expériences ont consisté à étudier le pouvoir inhibiteur des produits de vers adultes (libérés lors d'une incubation de 3 h dans le tampon PBS) sur la liaison des anticorps du sérum aux antigènes de surface du schistosomule. Les résultats ont montré que les produits libérés par 15 couples de schistosomes (contenant 50 µg de protéines) sont capables d'inhiber la précipitation par 10 µl de sérum des antigènes 30 - 40 K de 500 schistosomules. Les molécules qui entrent en compétition ne sont pas dialysables et sont présentes chez les vers mâles et femelles. Une inhibition similaire fut observée pour des incubats de vers mâles ou femelles présentant la même concentration en protéines.

L'anticorps monoclonal IPLSm1 nous a ensuite permis d'identifier l'antigène de schistosome possédant un (des) déterminants antigénique(s) commun(s) à l'antigène 38 K. Les produits d'incubation de schistosomes ont été marqués par l'<sup>125</sup>I et les résultats de la figure 17 B (p. 71) montrent que les anticorps IPLSm1 précipitent un antigène de poids moléculaire 115.000. Cet antigène 115K est également précipité par des sérums de rat

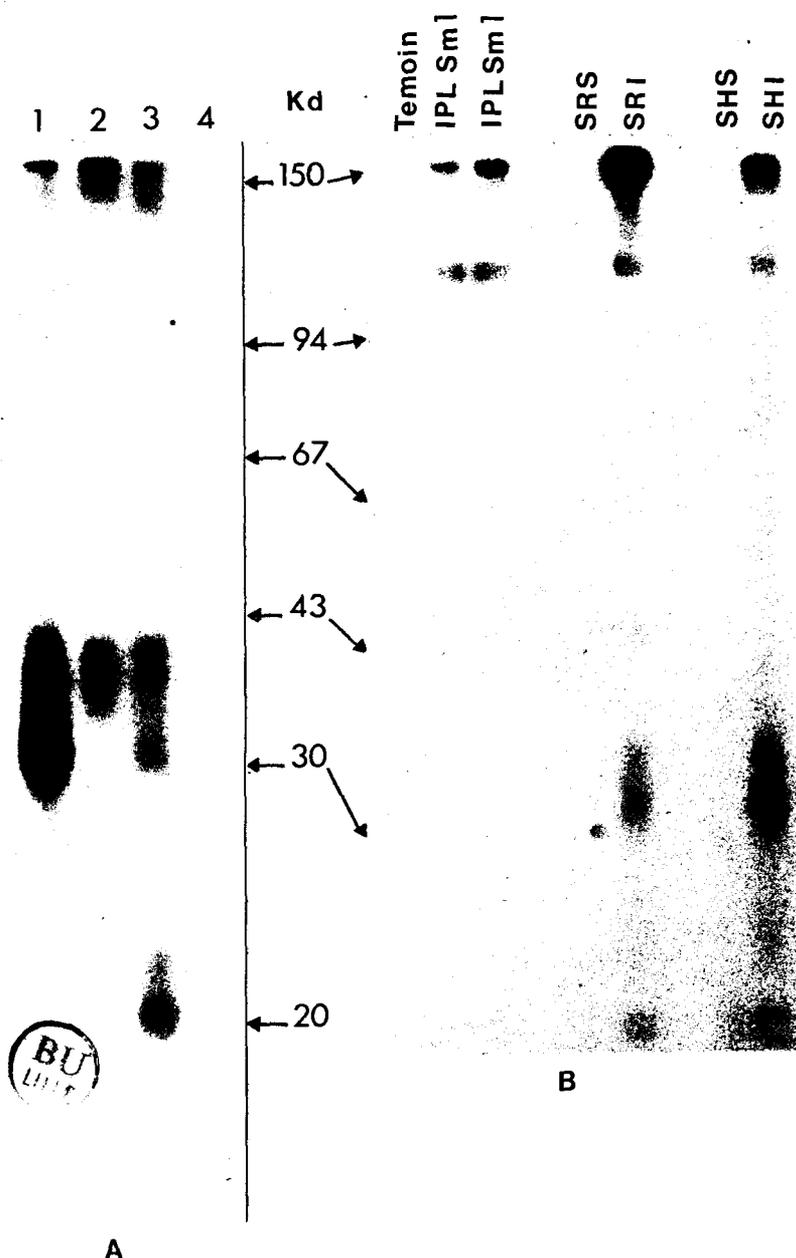


Figure 17 : A - Immunoprécipitation des antigènes de surface de schistosomule par des sérums de rat immunisés contre les vers adultes de S. mansoni.

Des rats Fischer reçoivent à une semaine d'intervalle 6 injections successives de 100 schistosomes (fraichement récupérés chez le hamster). Le sérum de ces animaux est collecté 7 semaines après l'injection initiale de schistosomes et 10  $\mu$ l de ce sérum sont incubés avec l'extrait (NP40 0.5 %) de 500 schistosomes iodés en présence de lactoperoxydase (3). En (4), les antigènes isolés en (3) sont à nouveau incubés avec 20  $\mu$ g d'anticorps IPLSmI et les complexes immuns sont analysés. En (1) et (2) les antigènes sont isolés respectivement par le sérum de rat infecté (10  $\mu$ l) et les anticorps IPLSmI (20  $\mu$ g)

#### B - Identification des antigènes de schistosomes

25 couples de schistosomes sont incubés dans 0.3 ml de tampon PBS pendant 3 h à 37°C et les produits d'incubation sont iodés en présence de lactoperoxydase (127). Des fractions aliquotées (40  $\mu$ l) sont incubées avec 20  $\mu$ g d'IgG2a C119BG4 (témoin), 20  $\mu$ g d'IgG2a IPLSmI (deux préparations différentes sont utilisées), 10  $\mu$ l de sérum de rat sain (SRS) ou infecté (SRI) ou 10  $\mu$ l de sérum d'homme sain (SHS) ou infecté (SHI). Les complexes immuns sont analysés.

et d'homme infectés par S.mansoni. De plus, nous avons pu démontrer que l'injection chez le rat de l'antigène 115K (en présence d'adjuvant complet de Freund) induisait la production d'anticorps anti-38K (voir Tableau IV, p.97 ). La localisation de l'antigène 115K au niveau du schistosome n'a pas été déterminée. Ce dernier n'a pas été mis en évidence à la surface des schistosomes après iodation en présence de lactopéroxydase ou par le réactif de BOLTON-HUNTER mais ce résultat n'exclut pas la possibilité qu'il corresponde à un antigène membranaire non-exposé à la surface, la méthode de préparation des incubats étant très similaire à celle préconisée par SIMPSON et al (116) pour la préparation de membranes de schistosomes.

#### D. Conclusion

Les anticorps IPLSm1 reconnaissent donc des antigènes de haut poids moléculaire ( $> 150$  K) et 38 K à la surface des cercaires, un antigène 38 K à la surface du schistosomule et un antigène 115 K dans les produits d'incubation in vitro du schistosome. L'observation que des anticorps monoclonaux précipitent des structures différentes dans les divers stades du parasite a également été décrite par STRAND et al (144) et NORDEN et al (121) et ces auteurs ont supposé que l'épitope reconnu correspond à une copule glucidique associée à des structures protéiques différentes.

L'existence d'une identité antigénique entre des composants de surface du schistosomule et des antigènes membranaires de schistosomes a déjà été démontrée par SHER et al (143). Ces auteurs observaient que des fractions de schistosomes administrées chez le rat en présence d'adjuvant de Freund pouvaient induire une réponse anticorps présentant pour les schistosomules une activité létale in vitro en présence de complément. Dans cette expérience, la caractérisation des antigènes "inducteur" et "cible" à la surface du parasite n'avait pas été effectuée.

Grâce à l' utilisation des anticorps monoclonaux IPLSm1, nous ayons pu démontrer qu'au moins un motif antigénique était commun aux stades larvaires et adulte de S.mansoni et que des injections répétées de vers adultes vivants induisaient chez le rat une réponse anticorps contre un antigène de stade larvaire, lui-même défini par des anticorps protecteurs contre l'infection. La caractérisation dans cette étude des antigènes "inducteur " et "cible" dans chacun des stades parasitaires pouvait donc être considérée comme un premier support moléculaire apporté à l'hypothèse de l'immunité concomitante.

ETUDE DE LA REPOSE HUMORALE DANS L'INFECTION HUMAINE

Cette étude a eu pour but d'analyser le développement de la réponse anticorps contre les antigènes de surface du schistosomule au cours de l'infection humaine. Etant donné que dans les zones endémiques la majorité de la population s'infecte très précocement dans l'enfance, nous avons choisi d'étudier cette réponse en fonction de l'âge des patients, en émettant l'hypothèse que les résultats obtenus puissent traduire indirectement l'évolution générale de l'infection chez l'homme.

## I. METHODE DE MESURE QUANTITATIVE

### A. Principe

L'intensité de la réponse anticorps contre les antigènes 30-40 K et 38 K du schistosomule est exprimée par la quantité de radioactivité associée aux antigènes qui sont immunoprécipités par les anticorps du sérum.

Les complexes immuns formés par incubation d'un extrait de schistosomules marqués en surface avec le sérum des patients, sont isolés par adsorption sur des billes de Protéine A-Sépharose puis élués. L'éluat est divisé en 2 parts égales : une part est analysée directement en gel de polyacrylamide-SDS tandis que l'autre part est incubée à nouveau en présence des anticorps monoclonaux IPLSm1. Les complexes isolés sont analysés en gel de polyacrylamide-SDS.

Après séchage et autoradiographie, la zone du gel correspondant aux antigènes 30-40K ou 38K est découpée et la radioactivité est déterminée. Ce procédé présente l'avantage d'éliminer toute interférence possible au niveau des comptages de l'iode radioactif libre ou éventuellement adsorbé non spécifiquement.

## B. Résultats

Les antigènes contenus dans un extrait de schistosomules marqués (500 parasites) ont été immunoprécipités par des quantités croissantes d'un sérum humain fortement positif (0 - 10  $\mu$ l) et les résultats, présentés dans la figure 18 (p. 76 ) indiquent que le taux de radioactivité associée aux antigène 30-40 K isolés augmente proportionnellement avec la quantité de sérum ajouté pour des volumes variant de 0 à 7.5  $\mu$ l. Des résultats identiques sont obtenus lorsqu'on considère la radioactivité associée à l'antigène 38 K.

Nous avons donc choisi d'utiliser un volume de 5  $\mu$ l de sérum pour évaluer selon cette technique l'intensité de la réponse anti-schistosomule chez les patients bilharziens.

## II. ETUDE DE LA REPONSE HUMORALE EN FONCTION DE L'AGE DES PATIENTS

### A. Origine des sérums étudiés

Les sérums ont été collectés par le Dr A. PRATA (Université de Brasilia) à partir de 125 patients infectés par Schistosoma mansoni et vivant dans la zone hyperendémique de Catolandia (Bahia, Brésil). Les patients ont été classés en 5 groupes d'âge de 0-10, 11-20, 21-30, 31-40 et plus de 40 ans. Dans ces groupes respectifs, 13,20,14,8 et 7 patients ont été traités six ans auparavant par l'oxamniquine ( dose: 15mg/kg ). Ces patients ont continué à vivre dans la zone endémique jusqu'au moment où les sérums ont été collectés.

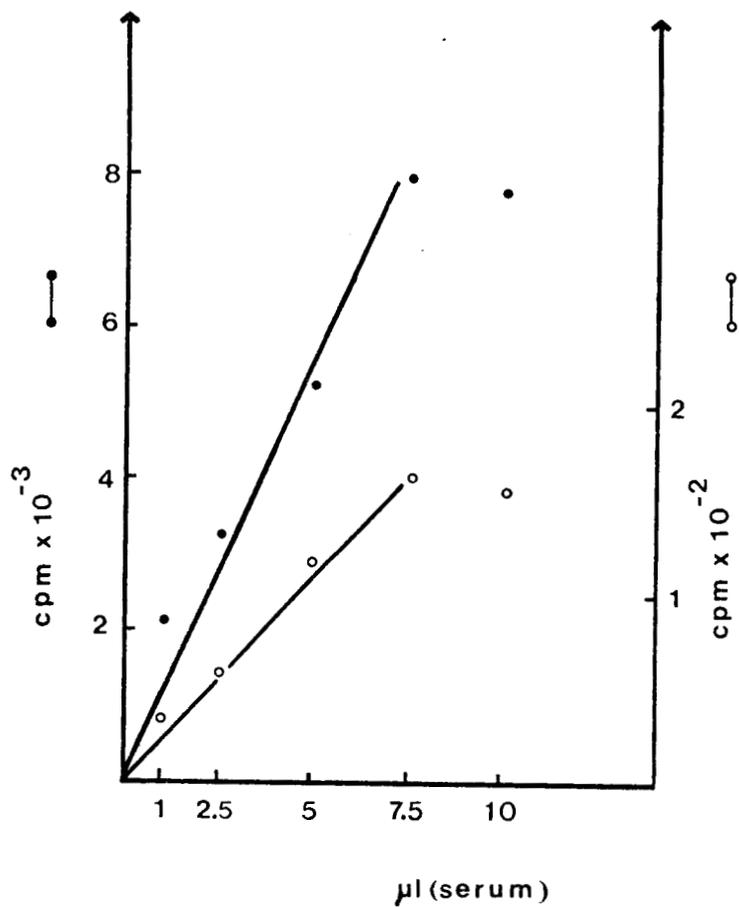


Figure 18 : Relation entre la quantité de sérum et le taux d'antigènes isolés.

Le tableau ci-dessous résume quelques caractéristiques importantes concernant l'état d'infection des patients à cette période.

Age	0-10	11-20	21-30	31-40	>40
Nbre de patients	26	28	26	23	22
Nbre moyen d'oeufs/g de selles	310	522	155	377	81
Nbre de cas de spléno-mégalie	1	6	9	2	2
Nbre de cas d'hépatomégaly	25	22	17	21	20

Le comptage du nombre d'oeufs dans les selles a été effectué selon la technique de KATO (145) .

#### B. Analyse des sérums

Les sérums des 125 patients brésiliens ont été analysés selon la technique décrite précédemment. Les résultats ont montré que seuls 3 sérums prélevés chez un enfant de 8 ans et deux enfants de 9 ans ne présentaient pas d'anticorps contre les antigènes 30-40 K du schistosomule. L'analyse autoradiographique des gels révèle surtout des différences quantitatives dans les profils électrophorétiques des antigènes isolés. Ces différences sont exprimées par des taux de radioactivité dans la zone 30-40 K extrêmement variables en fonction des individus. Les valeurs moyennes ont été calculées dans les 5 groupes d'âge et les données, présentées dans la figure 19 (p. 78) indiquent une augmentation significative du taux d'antigènes 30-40 K isolés par les sérums des patients de 11-20 ans par rapport aux enfants de 0-10 ans.

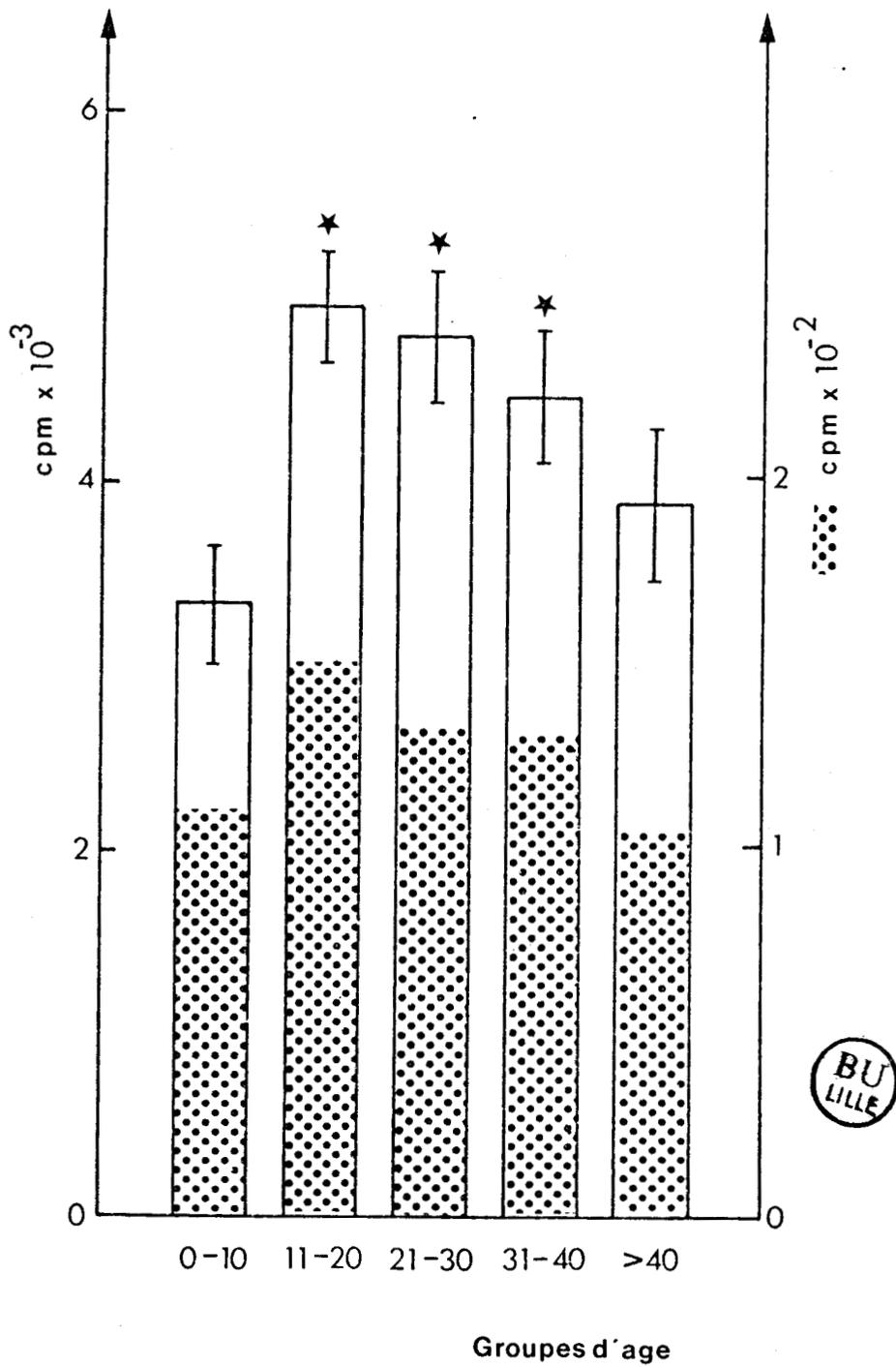


Figure 19 : Analyse quantitative de la réponse anticorps contre les antigènes 30-40 K et 38 K en fonction de l'âge des patients.

La moyenne des valeurs de radioactivité associée aux antigènes 30-40 K et 38 K est calculée pour chacun des groupes ;  , moyenne ± écart type à la moyenne ; ★ significativement différent du groupe 0-10 ans (p < 0.05).

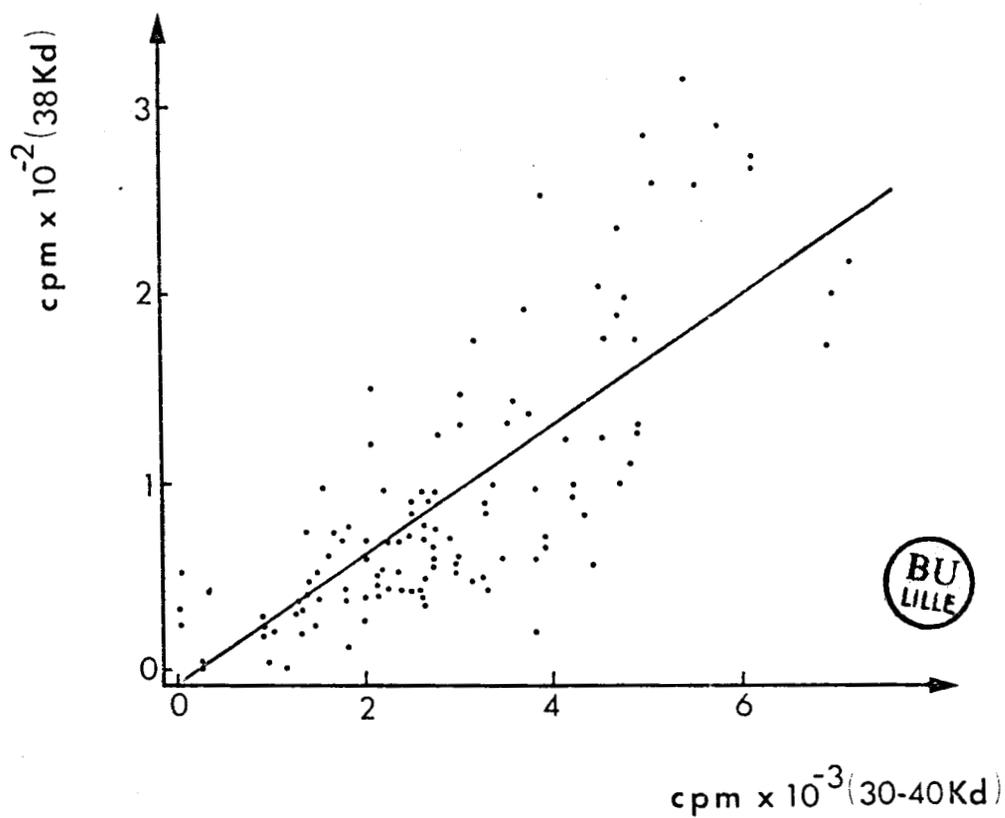


Figure 20: Corrélation entre le taux d'antigènes 30-40K et 38K isolés.

L'analyse de régression (méthode des moindres carrés) montre une relation linéaire statistiquement significative entre les deux paramètres ( $r = 0.8$  ;  $p < 0.001$ ).

On observe ensuite une diminution progressive de la réponse chez les patients plus âgés, les résultats ne montrant plus de différence statistiquement significative entre le groupe des enfants de 0-10 ans et celui des adultes de plus de 40 ans.

Un histogramme comparable est obtenu lorsqu'on analyse les résultats de l'immunoprécipitation sélective de l'antigène 38 K par les anticorps IPLSm1. De plus l'analyse statistique des résultats met en évidence une corrélation entre la réponse anticorps contre les antigènes 30-40 K et la réponse spécifique contre l'antigène 38 K chez chaque patient (Fig. 20, p. 79 ).

Les valeurs obtenues pour les patients traités par l'oxamniquine ne sont pas significativement différentes de celles mesurées pour la population totale (Tableau III). Ces données laissent donc supposer que le traitement six ans auparavant par la drogue schistosomicide n'interfère pas de façon évidente dans l'interprétation des résultats.

Enfin, si le profil d'intensité de la réponse en fonction de l'âge est comparable à celui de l'intensité de l'infection, classiquement observé lors d'études épidémiologiques (21, 22), dans cette population étudiée, aucune relation directe entre le nombre d'oeufs dans les selles et l'intensité de la réponse anti-schistosomule n'a pu être mise en évidence.

TABLEAU III

## ANALYSE QUANTITATIVE DE LA REPONSE ANTI 30-40K CHEZ LES PATIENTS TRAITES PAR L'OXAMNIQUINE

Groupe d'âge	Population totale		Patients traités par l'oxamniquine	
	Nombre de patients	Radioactivité en cpm *	Nombre de patients	Radioactivité en cpm *
0 - 10	26	3312 ± 306	13	3418 ± 416
11 - 20	28	4914 ± 280	20	4844 ± 344
21 - 30	26	4798 ± 356	14	5402 ± 438
31 - 40	23	4226 ± 348	8	4570 ± 704
> 40	22	3836 ± 410	7	4132 ± 944

\* moyenne ± écart type à la moyenne



### III. DISCUSSION

Les résultats d'études épidémiologiques (21, 22) indiquent que la fréquence et l'intensité de l'infection humaine par S. mansoni sont maximales au cours de la deuxième décennie de la vie et il a été admis que le développement d'une immunité à la réinfection pouvait être responsable de la diminution progressive de ces deux paramètres d'infection chez les personnes âgées (23). Selon cette hypothèse, nous n'apportons par cette étude aucune indication que la réponse anticorps anti-schistosomule puisse être un marqueur d'immunité chez l'homme.

Des mécanismes effecteurs d'immunité chez l'homme ont été mis en évidence in vitro (38) et il a été montré en particulier (52) que des éosinophiles humains normaux peuvent tuer des schistosomules en présence d'anticorps IgG du sérum de malades atteints de schistosomiase. Cependant, si chez le rat on a pu démontrer le rôle cytotoxique des anticorps IgG2a en présence d'éosinophiles, la nature de la sous-classe IgG impliquée dans les mécanismes dépendant d'éosinophiles chez l'homme, n'a pas été à l'heure actuelle clairement identifiée. Il reste donc envisageable que la présence d'anticorps spécifiques de l'antigène 38K du schistosomule (lui-même défini par des anticorps monoclonaux protecteurs chez le rat) puisse témoigner d'un état d'immunité chez l'homme mais qu'il soit nécessaire de considérer la réponse anticorps spécifique d'une sous-classe d' IgG donnée pour mettre en évidence une telle relation.

Une notion intéressante apportée par cette étude est la démonstration que 97 % des patients bilharziens présentent des anticorps contre l'antigène 38 K. Ces résultats suggèrent donc que cet antigène (ou des molécules portant des déterminants antigéniques communs) corresponde(nt) à un(des) immunogène(s) important(s) et que la réponse anti-38K puisse être utilisée comme marqueur d'infection. D'autre part, nous avons montré auparavant (p.48) que l'antigène 38K était commun à S. mansoni et S. haematobium et cette parenté antigénique pourrait présenter un avantage pour le diagnostic de la maladie causée par ces deux espèces voisines de schistosomes.

De nombreuses études ont eu pour but de déterminer les paramètres principaux d'une infection active par les schistosomes et de l'importance de la charge parasitaire chez les patients. Différents auteurs ont mis en évidence des antigènes de nature polysaccharidique présents sous forme circulante et capables d'induire une production d'anticorps chez l'homme et les animaux (104-106). La détection des antigènes circulants est apparue comme une méthode intéressante pour le diagnostic de la schistosomiase mais le taux d'antigènes détectés n'a pas toujours été relié à l'importance de la charge parasitaire (105). Dans notre étude, si l'intensité de la réponse anti-38K est plus importante aux périodes où la fréquence des formes graves de la maladie est maximale( p. 77 ), nous n'avons pas non plus observé de relation directe entre la réponse anti-38K et la charge parasitaire ( toutefois estimée uniquement par le nombre d'oeufs émis dans les selles ). La présence possible d'anticorps complexés à l'antigène libéré lors d'infections massives devrait aussi être considérée.

En conclusion, l'étude de la réponse humorale anti-38K chez l'homme a permis d'envisager un test diagnostique qui est actuellement mis au point au laboratoire. Ce test de compétition est basé sur l'inhibition par les sérums de patients de la liaison des anticorps IPLSm1 à l'antigène 38K fixé sur phase solide.

## CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES ANTIGENES

Les expériences présentées dans ce chapitre, ont eu pour but de définir certaines caractéristiques biochimiques des antigènes 30-40K susceptibles d'orienter l'analyse des déterminants antigéniques portés par ces molécules et en particulier celle de l'épitope reconnu par les anticorps IPLSm1.

## I. ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DES ANTIGENES

### A. Electrophorèse bidimensionnelle

L'electrophorèse bidimensionnelle des protéines en milieu dénaturant introduite par O'FARRELL en 1975 (146) consiste à effectuer successivement une focalisation isoélectrique en présence d'urée puis une électrophorèse en présence de SDS. La haute résolution obtenue par ce type d'analyse est due au fait que les paramètres utilisés (point isoélectrique,  $P_i$  ; poids moléculaire, PM ) sont indépendants.

La figure 21A (p. 86 ) présente les résultats de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines contenues dans un extrait total de schistosomules. Après coloration par le nitrate d'argent, on observe un grand nombre de protéines de PM 150 à 10K et dont le  $P_i$  varie de 8,2 à 4. Parmi ces protéines, on peut distinguer l'actine (a) de PM 46K et de  $P_i$  5,5-5,8.

L'analyse bidimensionnelle des composants de surface iodés par la lactopéroxydase (Fig. 21B) révèle la présence de nombreuses taches dont aucune d'entre elles ne semble correspondre aux protéines majeures du parasite colorées par le nitrate d'argent. Les résultats montrent une

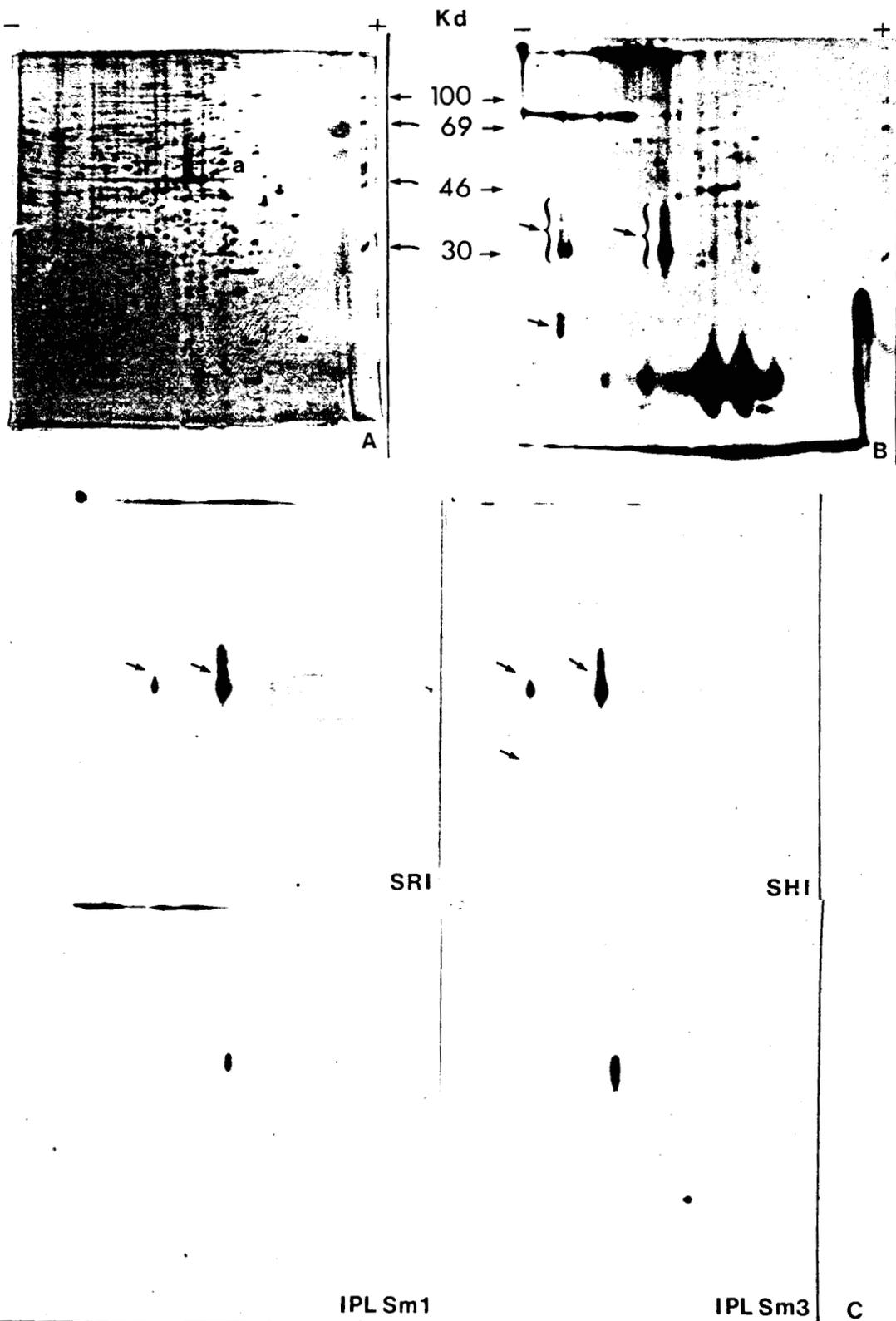


Figure 21 : Electrophorèse bidimensionnelle des antigènes de schistosomules iodés en présence de lactoperoxydase.

- A - Analyse bidimensionnelle d'un extrait de 1000 schistosomules "peau" renfermant l'équivalent de 100 schistosomules marqués. Coloration par le nitrate d'argent (a : actine)
- B - Analyse autoradiographique du gel A
- C - Analyse autoradiographique des antigènes isolés à partir de 500 schistosomules marqués, par 10 $\mu$ l de sérum de rat (SRI) ou d'homme infecté (SHI) et 20  $\mu$ g d'anticorps monoclonaux IPLSm1 ou IPLSm3.

A la fin de l'électrofocalisation, les valeurs extrêmes du gradient de pH étaient respectivement de 3,2 et 3,9. L'analyse dans la 2 $^{\text{e}}$ me dimension a été effectuée dans un gel de polyacrylamide à 12,5 %.

série de composants de PM 80K et de Pi 8,2-6,5 ainsi que différents antigènes de PM 70-46K et de Pi 6,5-5 .

Cependant, l'observation la plus intéressante faite dans cette analyse concerne le comportement des antigènes 30-40K étudiés précédemment. Ceux-ci sont principalement focalisés à deux pH différents: la majeure partie des antigènes 30-40K présente un Pi de 6-6,2 alors qu'une autre partie se stabilise à un pH de 7,5.

L'analyse des complexes immuns formés par incubation d'un extrait de schistosomules avec du sérum de rat ou d'homme infecté (Fig. 21C) montre à nouveau l'existence préférentielle de ces antigènes sous ces deux formes. Dans le cas du sérum humain, on retrouve les antigènes de PM 20-25K observés lors de leur analyse monodimensionnelle (Fig. 9, p. 48 ) qui présentent également un Pi de 7,5. L'analyse des complexes immuns formés par les anticorps monoclonaux IPLSm1 ou IPLSm3 confirme la reconnaissance de l'antigène 38K par ces deux anticorps. Les anticorps IPLSm3 précipitent un antigène supplémentaire de PM 20K et de Pi voisin de 5.

Des expériences identiques ont été réalisées à partir de schistosomules marqués par le réactif de BOLTON-HUNTER. Les résultats présentés dans la figure 22 (p. 88 ) témoignent de la fixation du réactif sur un grand nombre de composants de surface (A) et l'analyse des complexes immuns (B) montre qu'un nombre limité de ces composants peut être précipité par les anticorps du sérum de rat infecté. Les antigènes majoritaires sont représentés sous la forme de 3 ou 4 taches de PM 95-100K et de Pi 5,8-6 mais si ces données sont en accord avec celles précédemment acquises lors de l'analyse monodimensionnelle des antigènes (Fig. 11, p. 52 ), il n'en est pas de même pour ce qui concerne la bande majeure 20-26K qui n'a pu être retrouvée dans les gels d'analyse bidimensionnelle (C). Ces résultats laissent supposer que le Pi très basique de cet anti-

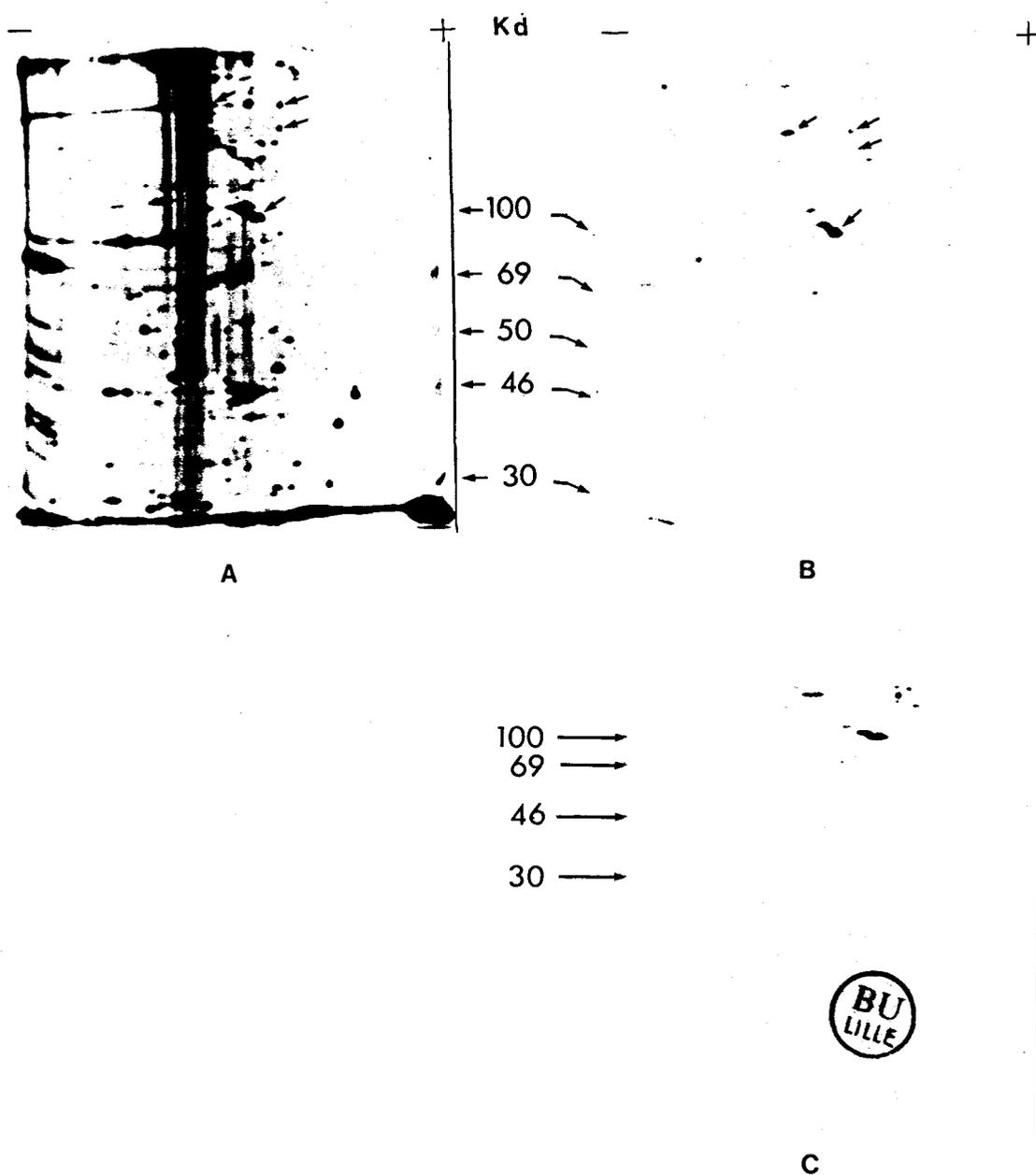


Figure 22 : Electrophorèse bidimensionnelle des antigènes de schistosomules marqués par le réactif de BOLTON-HUNTER

A - Analyse autoradiographique d'un extrait total de 100 schistosomules.

B et C - Analyse des antigènes précipités par 10 µl de sérum de rat infecté à partir de 500 schistosomules marqués.

Les conditions d'électrofocalisation sont identiques à celles utilisées dans l'expérience de la figure 21. En A et B, l'analyse dans la 2ème dimension est effectuée dans un gel de polyacrylamide à 7.5 % alors qu'en C elle est réalisée dans un gel à 12.5 %.

gène ne permet pas son analyse dans les conditions de cette expérience. Ce point pourrait être confirmé en substituant à l'analyse par focalisation isoélectrique, une électrophorèse en gradient de pH avant l'équilibre (non-equilibrium pH gradient electrophoresis) (147).

## B. Protéolyse ménagée des antigènes 30-40K

L'étude de la cinétique d'apparition des antigènes 30-40K au cours de la maturation du parasite (Fig. 14, p. 62 ) permettait de supposer que les molécules 40K et 32K trouvées à la surface des schistosomules transformés puissent être les produits de modifications structurales plus ou moins importantes des antigènes 37K et 38K déjà exposés à la surface des cercaires. L'observation supplémentaire que ces antigènes présentaient en focalisation isoélectrique des  $P_i$  identiques, soulevait à nouveau l'hypothèse d'une homologie de structure pour ces antigènes, peut-être au niveau de leur partie protéique,

Des expériences préliminaires ont été effectuées pour étudier la sensibilité des antigènes 30-40K à différentes enzymes protéolytiques et analyser les fragments résultant de leur protéolyse.

### 1. Sensibilité des antigènes 30-40K aux protéases

Un extrait Nonidet P40 (0,5%) de schistosomules a été incubé en présence de diverses protéases: trypsine, V8 protéase de S.aureus, papaïne et protéinase K à la concentration finale de 1mg/ml ou pronase à 100µg/ml. Dans ces conditions expérimentales, seule l'action de la pronase a affecté l'isolement ultérieur des antigènes 30-40K par les anticorps d'un sérum de rat infecté.

L'action de ces mêmes enzymes (utilisées à la même concentration) sur les antigènes isolés (présentés sous la forme de complexes immuns

adsorbés sur la Protéine A-Sépharose) a conduit à des résultats identiques, indiquant donc une résistance relativement importante des antigènes aux protéases connues.

Toutefois, à l'issue de ces deux expériences, il demeurerait possible d'envisager que les sites de protéolyse des antigènes n'aient pas été accessibles aux enzymes, soit à cause d'une solubilisation insuffisante des antigènes membranaires par le Nonidet P40, soit à cause d'un masquage de ces sites par les anticorps dans le cas du traitement des complexes immuns.

Dans un second temps, nous avons donc fait agir ces mêmes protéases sur les complexes immuns élués de la Protéine A-Sépharose et dissociés en présence de SDS. Dans ces conditions, une hydrolyse totale des antigènes a été obtenue avec la pronase, la papaïne et la protéinase K alors qu'une hydrolyse partielle a été observée avec la trypsine et la V8 protéase de S.aureus. Cette dernière enzyme, spécifique de l'hydrolyse des liaisons glutamate ou aspartate en position C-terminale, a été choisie pour tenter d'établir une carte peptidique des antigènes.

## 2. Analyse des fragments résultant de l'action de la V8 protéase de S.aureus

La technique de CLEVELAND et al (148) permet de réaliser la carte peptidique de protéines préalablement séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

Les autoradiogrammes, présentés dans la figure 23 (p. 91) correspondent à l'analyse selon cette technique des antigènes 30-40K hydrolysés par la V8 protéase de S.aureus.

Dans cette expérience, l'hydrolyse de l'antigène 38K isolé par les anticorps monoclonaux IPLSm1 a donné naissance à deux fragments de

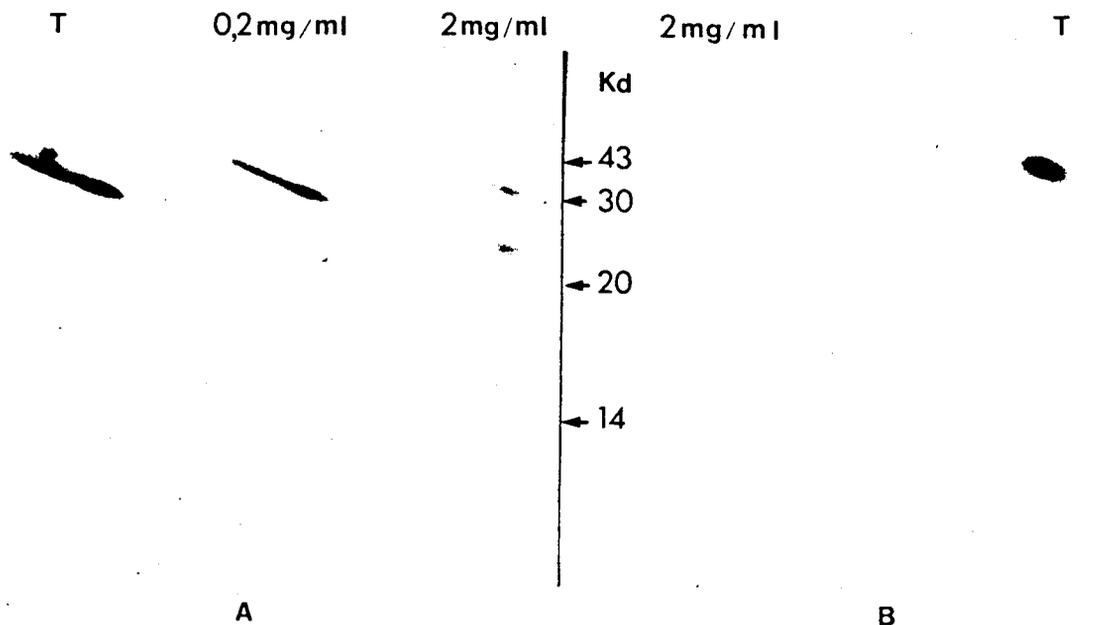


Figure 23: Action de la V8 protéase de S.aureus sur les antigènes 30-40K isolés

A- Les complexes immuns formés par incubation d'un extrait de schistosomes iodés avec un sérum de rat infecté sont isolés puis analysés dans un gel de polyacrylamide-SDS à 13%. La portion de gel renfermant les antigènes 30-40K est excisée, équilibrée dans le tampon Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS 1% (tampon A) puis déposée sur un gel de polyacrylamide à 18% recouvert d'un gel de concentration à 5 (préparé dans le tampon A). 100µl de tampon A ou d'une solution de protéase à 0,2mg/ml ou 2mg/ml sont déposés. L'électrophorèse commence immédiatement (10mA). Lorsque l'échantillon a atteint la limite inférieure du gel de concentration, le courant est arrêté. Une heure plus tard, le courant est rétabli et l'électrophorèse est poursuivie.

B- Analyse dans des conditions identiques à celles décrites en A, de l'antigène 33K précipité par les anticorps IPLS m1.

poids moléculaires 27K et 22K(Fig. 23B). Dans la figure 23A, on peut observer une "fusion" des antigènes 38K et 32K se traduisant par la visualisation d'une seule bande oblique. L'action de la V8 protéase sur ces antigènes fait alors apparaître deux bandes additionnelles sensiblement parallèles à la bande d'origine. Cette observation laisse supposer que les antigènes 38K et 32K subissent un même type de dégradation et pourrait donc être en faveur d'une homologie de structure entre ces deux antigènes.

Quant aux antigènes 40K et 37K, l'hydrolyse conduit pour chacun d'entre eux à la détection de trois fragments de poids moléculaires apparemment très proches et compris entre 20K et 14K. A la vue de ce résultat, il est difficile de conclure qu'une relation structurale existe au niveau de la partie protéique de ces deux antigènes. L'utilisation de protéases présentant d'autres spécificités enzymatiques et l'analyse des fragments dans des conditions permettant une détermination plus précise des faibles poids moléculaires, pourraient être envisagées.

## II. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNES DE LECTINES

Au cours de ces dernières années, différents travaux ont concerné l'étude de la fixation des lectines à la surface de S.mansoni et les variations d'affinité de ces lectines pour les différents stades du parasite (149,150) . La capacité des lectines à se fixer sur le parasite a été mise à profit pour étudier le taux de renouvellement membranaire, mettre en évidence des modifications ultrastructurales induites par leur fixation (151) ou encore identifier des antigènes membranaires de nature glycoprotéinique (152) .

Dans cette étude, nous avons réalisé deux chromatographies sur colonnes de ConA-Sépharose et LCA-Sépharose afin d'analyser la nature glycoprotéinique des antigènes de surface 30-40K.

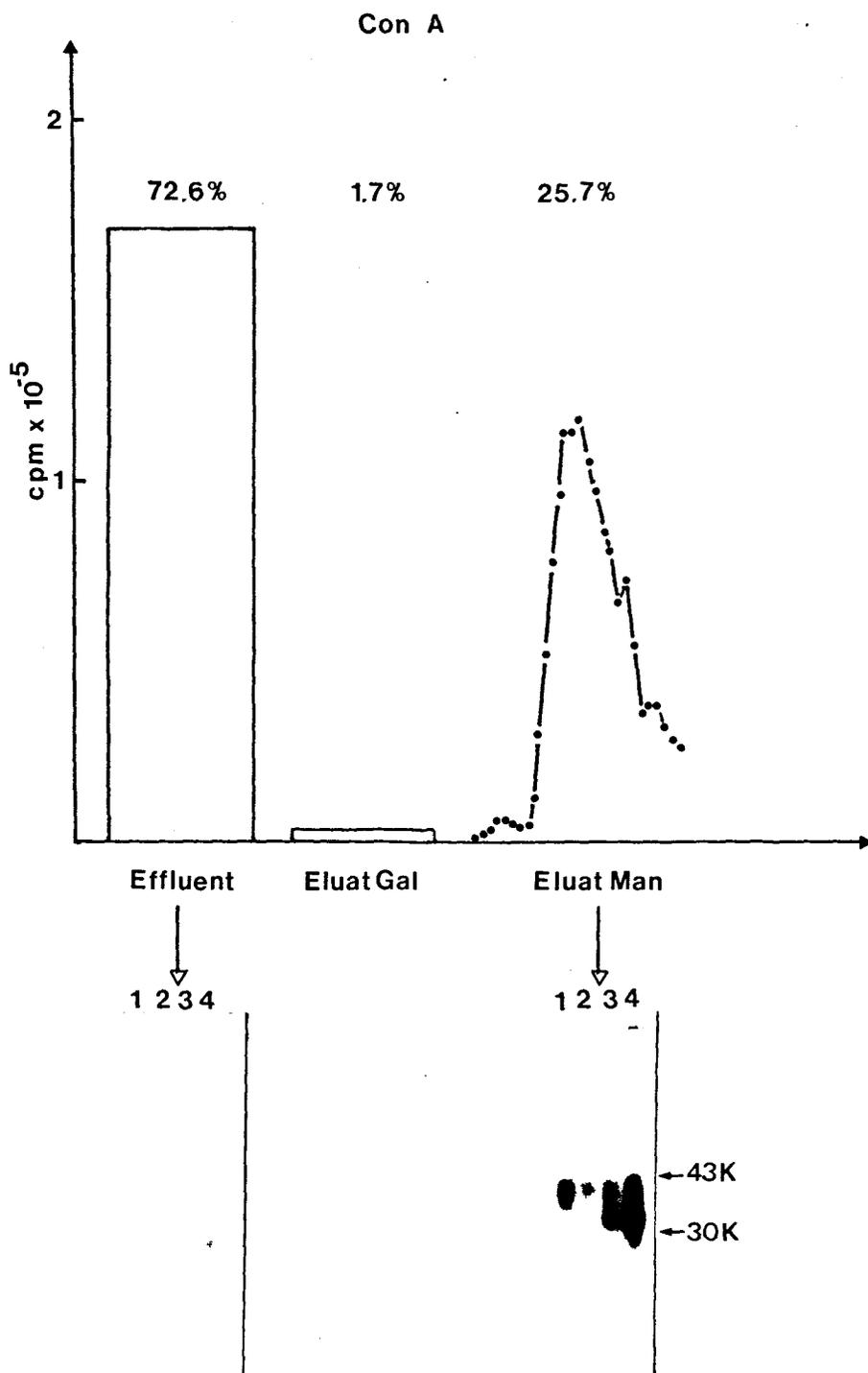
#### A. Adsorption sur Con A-Sépharose

Les résultats de la chromatographie d'un extrait de schistosomules iodés sur une colonne de Con A-Sépharose (Fig. 24, p. 94 ) montrent qu'une fraction relativement importante (25%) de la radioactivité associée aux composants de surface du schistosomule, est retenue et éluée spécifiquement par l' $\alpha$ -D-méthyl mannopyrannoside. Cet éluat contient la quasi-totalité des antigènes 30-40K, comme l'indiquent les profils électrophorétiques correspondant à l'immunoprécipitation, par les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, de l'effluent d'une part et de l'éluat d'autre part.

#### B. Adsorption sur LCA-Sépharose

Les résultats présentés dans la figure 25 (p. 95 ), indiquent que la fraction de radioactivité totale retenue sur la colonne de LCA-Sépharose (9%) est moins importante que celle retenue sur la Con A-Sépharose. Dans les conditions expérimentales utilisées, la LCA présente peu ou pas d'affinité pour les antigènes 30-40K. Ces derniers sont retrouvés principalement dans l'effluent de la colonne; seul l'antigène 32K est retenu en partie sur la colonne de lectine.

En conclusion, l'affinité de la Con A pour les composants de surface 30-40K suggère une nature glycoprotéinique de ces antigènes. La Con A et la LCA sont deux lectines spécifiques de l' $\alpha$ -mannose et l' $\alpha$ -glucose mais l'étude de leur affinité pour des oligosaccharides et des glycopeptides de structure déterminée, a mis en évidence certaines différences de spécificité entre ces deux lectines, et en particulier l'importance des groupements fucose dans la reconnaissance des glycopeptides par la LCA (153). Il est possible d'envisager que le manque



**Figure 24 : Chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-Sépharose**

Un extrait Nonidet P40 de schistosomules marqués (200 µl) est dialysé contre le tampon Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 0.5 %, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM (TNN<sup>++</sup>) puis déposé sur une colonne de 2.5 ml de Con A-Sépharose stabilisée en TNN<sup>++</sup>. La chromatographie s'effectue pendant une heure puis l'effluent est récupéré. La colonne est lavée par 50 ml de TNN<sup>++</sup> puis par 4 ml de galactose 0.2 M en TNN<sup>++</sup>. L'élution est réalisée par passage d'une solution de 0-méthyl α-D mannopyranoside 0.2 M en TNN<sup>++</sup>. Des fractions de 0.2 ml sont collectées et la radioactivité est déterminée. Les fractions correspondant au pic de radioactivité sont rassemblées et constituent l'éluat Man. L'effluent et l'éluat Man sont dialysés contre le tampon Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP40 0.5 % puis divisés en 4 parties égales. Ces parties aliquotes sont incubées en présence de 10 µl de liquide d'ascite IPLSm3 (1), 20 µg d'anticorps IPLSm1 (2) ou 10 µl de sérum de rat (3) ou d'homme (4) infecté. Les complexes immuns sont analysés en SDS-PAGE.

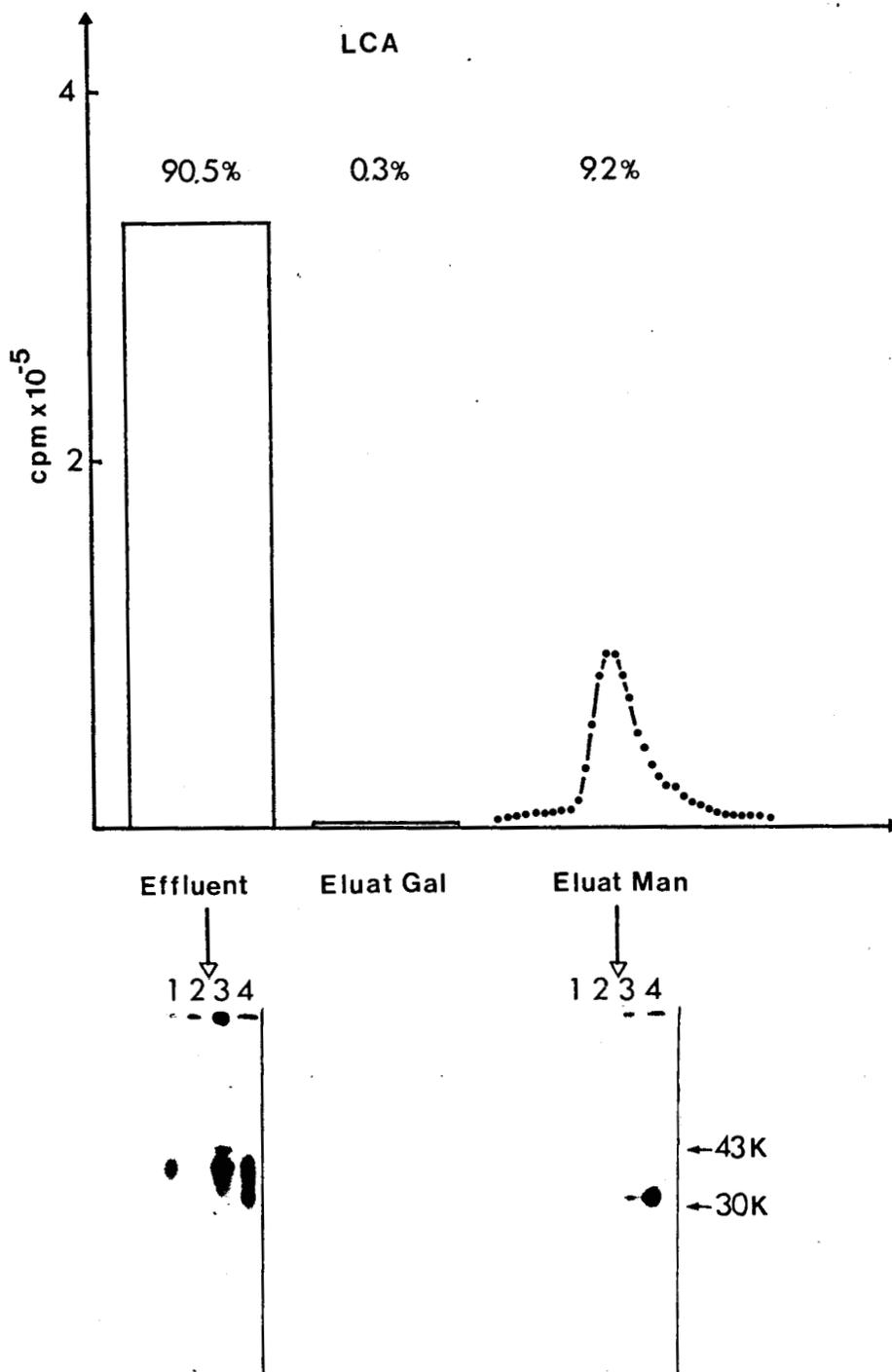


Figure 25 : Chromatographie d'affinité sur colonne de LCA-Sépharose

La chromatographie est effectuée dans les conditions décrites pour la Con A-Sépharose (Fig. 24).  
(1) Liquide d'ascite IPLSm3, (2) anticorps IPLSm1, (3) sérum de rat infecté, (4) sérum d'homme infecté.

d'affinité de la LCA pour les antigènes isolés soit lié, au moins en partie, à l'absence de fucose au niveau des copules glucidiques des antigènes.

### III. ETUDE DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR LES ANTICORPS IPLSm1

Les expériences d'hybridation cellulaire et la sélection des anticorps monoclonaux ont montré que l'antigène 38K pouvait induire la production d'au moins deux types d'immunoglobulines spécifiques: les unes de sous-classe IgG2a protectrices, les autres de sous-classe IgG2c non-protectrices et bloquant les activités biologiques des IgG2a (142). D'autre part, lors des expériences d'immunisation chez le rat utilisant les antigènes isolés de stades larvaires ou adulte, aucune protection contre l'infection n'a pu être observée en dépit du développement chez les animaux immunisés d'une réponse IgG anti-38K assez importante ( Tableau IV, p.97)

A partir de ces observations, nous pouvions supposer que la détermination précise, voire l'isolement ou la synthèse, de l'épitope reconnu par les IgG2a protectrices, puissent faciliter l'analyse d'un éventuel pouvoir "protecteur" de l'antigène.

#### A. Arguments en faveur d'une nature glucidique de l'épitope

Des expériences de synthèse protéique in vitro ont été effectuées en système de réticulocytes de lapin à partir d'ARN messager de cercaires, de schistosomules ou de schistosomes. En collaboration avec D.GRAUSZ et al (154), nous avons pu montrer que si les anticorps présents dans le sérum des rats et des hommes infectés étaient capables de précipiter un nombre relativement important des produits de traduction pour

TABLEAU IV

Exp	Antigène	Adjuvant	Réponse anti-38K	%protection
1	Cercaires-SRI	-	-	NS
2	Cercaires-SRI	Saponine	-	NS
3	Cercaires-SRI	Perthydral	-	NS
4	Cercaires-SRI	ACF	+	NS
5	Cercaires-IPLSm3	ACF	+	NS
6	Schistosomules-IPLSm3	ACF	+	NS
7	Adultes-IPLSm3	ACF	+	NS
8	Adultes vivants	-	+	44,8% ( $p < 0,01$ )

Ce tableau résume les résultats de différentes expériences d'immunisation de rats contre les antigènes isolés de stades larvaires et adulte, par le sérum de rat infecté(SRI) ou par les anticorps IPLSm3. Les animaux ont été immunisés soit par injection sous-cutanée(sans adjuvant ou avec saponine ou perthydral), soit par injection dans les coussinets plantaires(ACF: adjuvant complet de Freund) des complexes immuns dissociés en présence de SDS 0,3% et de  $\beta$ -mercaptoéthanol 10% à 100°C pendant 3mn puis dialysés contre du tampon PBS. Dans l'expérience 8, les rats ont subi à une semaine d'intervalle 6 injections de 150 vers. Dans tous les cas, les rats ont été infectés à la suite d'une exposition à 1000 cercaires et la charge parasitaire a été évaluée trois semaines plus tard après une perfusion totale des animaux. Seule une protection est observée dans le cas de l'injection de vers vivants ; NS:non significative

chacun des stades du parasite, aucune des protéines synthétisées in vitro ne pouvait être reconnue spécifiquement par les anticorps IPLSm1. La traduction des ARNs messagers dans les oeufs de Xenopus laevis n'a pas non plus donné de résultats positifs (D.GRAUSZ, communication personnelle), suggérant donc que les antigènes 38K et 115K doivent subir des modifications post-traductionnelles importantes (glycosylation par exemple) pour être reconnus par les anticorps IPLSm1. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que le(s) RNA(s) messenger(s) codant éventuellement pour ces antigènes est(soient) absent(s) ou présent(s) en quantité trop faible au niveau des stades parasitaires considérés pour permettre la détection des molécules synthétisées.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet d'un traitement par l'acide périodique de l'antigène 38K sur sa reconnaissance par les anticorps IPLSm1. Un extrait de schistosomules marqués a été traité selon le protocole décrit par STEWART et al (155) en présence de 10mM métapériodate, 50mM acétate de Na, pH 4,5 à 4°C pendant 2h. A la suite de ce traitement, nous avons montré que les anticorps IPLSm1 étaient incapables de précipiter l'antigène 38K alors que peu de variations étaient observées dans la quantité d'antigène isolé par les anticorps du sérum de rat infecté. Il est intéressant de noter que le poids moléculaire apparent en électrophorèse-SDS de l'antigène 38K est resté inchangé après le traitement par l'acide périodique.

La sensibilité à l'oxydation périodique de l'épitope considéré a également été confirmée par la démonstration qu'un même traitement inhibe totalement la reconnaissance par les anticorps IPLSm1 de l'antigène 115K du ver adulte et à plus de 50% celle des antigènes HPM de la cercaire.



Enfin, un dernier argument a été obtenu au cours d'expériences d'inhibition de la précipitation par des antigènes de surface non marqués. Ces derniers, traités préalablement par la pronase, étaient toujours capables d'entrer en compétition avec la molécule 38K marquée pour les anticorps IPLSm1.

Ces différentes données laissaient supposer que les anticorps IPLSm1 étaient spécifiques d'une partie glucidique de la molécule. Nous avons ensuite tenté de préciser sa structure par le biais d'un éventuel pouvoir inhibiteur d'oligosaccharides de structure déterminée.

B. Inhibition de la liaison IPLSm1- 38K par des oligosaccharides de structure déterminée

Dans les premières expériences, nous avons utilisé des solutions de monosaccharides (Glc, Gal, Man, GlcNAc, Fuc) à la concentration de 1mg/ml mais aucune inhibition n'a pu être observée avec aucun de ces sucres. L'action de la neuraminidase de Vibrio cholerae (Koch Light Lab., England) sur les parasites vivants ou sur un extrait détergent de parasites n'a pas non plus affecté l'isolement de l'antigène.

Des expériences ont ensuite été réalisées en collaboration avec G.STRECKER et J.C. MICHALSKI (Laboratoire de Chimie Biologique, Lille I) utilisant des oligosaccharides de type:

- Gal ( $\beta$  1-3) GlcNAc ou Gal ( $\beta$  1-4) GlcNAc portant ou non des groupements Fuc ou NeuAc et branchés ou non sur des structures trimannosidiques ou Gal ( $\beta$  1-4) Glc
- polymannoses
- mucine

Utilisées à la concentration finale de 1mg/ml, aucune de ces structures n'a inhibé la liaison IPLSm1- 38K. De nombreuses structures différentes peuvent encore être testées mais l'alternative consiste à purifier les oligosaccharides d'un extrait total de parasites et vérifier leur effet inhibiteur afin d'asseoir définitivement la nature exclusivement glucidique de l'épitope. Par  $\beta$ - élimination ou par hydrazinolyse, il devrait être possible de distinguer respectivement le rôle inhibiteur des O- glycannes et des N- glycannes et envisager ensuite la purification du(des) glycanne(s) responsable(s) de l'inhibition. Ce travail sera entrepris prochainement en collaboration avec le groupe de Lille I ( Prof. MONTREUIL).

CONCLUSION

La technique d'iodation catalysée par la lactopéroxydase nous a permis d'analyser les composants exposés à la surface des stades larvaires du parasite S.mansoni et d'identifier, parmi ces composants de surface, quatre antigènes majeurs dont les poids moléculaires apparents en gel de polyacrylamide-SDS sont de 40K, 38K, 37K et 32K. Ces antigènes sont reconnus à la fois par les anticorps élaborés dans l'infection humaine et expérimentale du rat, de la souris et du singe. Des expériences récentes de SIMPSON et al ont confirmé l'apparition d'anticorps dirigés contre ce groupe d'antigènes 30-40K dans l'infection de la souris mais également dans des expériences d'immunisation utilisant des cercaires fortement atténuées par irradiation, démontrant ainsi la particulière immunogénicité de ces antigènes (156). Cette immunogénicité importante a été également observée dans l'étude que nous avons effectuée chez l'homme et qui montre que 97% des patients présentant des symptômes d'infection possèdent des anticorps contre ces antigènes.

Dans le domaine des helminthes, de nombreux travaux ont aussi mis en évidence que seul un nombre limité d'antigènes peut être iodé à la surface des nématodes (T.spiralis, O.volvulus, B.malayi, etc..) (157). Par ailleurs, d'autres informations ont été obtenues concernant l'importance des variations observées dans l'expression des antigènes de surface au cours du développement de T.spiralis (158). D'une manière comparable, les résultats des analyses effectuées sur les parasites de S.mansoni prélevés à différents stades de leur développement, ont montré que les antigènes 38K et 37K sont exposés à la surface de la cercaire et du schis-

tosomule alors que les antigènes 40K et 32K apparaissent à la surface du schistosomule au cours des quelques heures qui suivent la transformation du parasite. Des expériences préliminaires ont montré que des inhibiteurs métaboliques comme la cycloheximide et la tunicamycine n'affectent pas, lorsqu'ils sont utilisés à des doses compatibles avec la survie du parasite, l'expression des antigènes 30-40K à la surface du schistosomule.

La cercaire de S.mansoni est limitée par une membrane unitaire classique alors que le schistosomule possède une membrane double formée de la juxtaposition de deux membranes unitaires. Les études ultrastructurales ont démontré que ce complexe membranaire s'effectue au cours des trois heures qui suivent la pénétration de la cercaire à travers la peau, et cela essentiellement par la migration vers le tégument de vacuoles renfermant des membranes préformées et le déversement de leur contenu à la surface du parasite( 90). On peut envisager que les antigènes 30-40K, et en particulier ceux qui sont identifiés plus tardivement à la surface du schistosomule transformé, représentent des composants de ces membranes préformées.

Les antigènes 30-40K ont été immunoprécipités par les anticorps de classe IgG présents dans le sérum des animaux et des hommes infectés. Chez l'homme, si aucune relation directe n'a été observée entre la charge parasitaire et la quantité d'anticorps sériques, la courbe d'intensité de la réponse anti 30-40K exprimée en fonction de l'âge des individus était très similaire à celle de l'intensité de l'infection dans les zones endémiques. Chez la souris, les anticorps anti 30-40K ont été détectés principalement au cours de la phase tardive de l'infection (à partir de la 7ème semaine) et les résultats ont montré que le rat exprime une réponse

humorale anti 30-40K immédiatement après qu'il ait rejeté la majorité de sa population parasitaire (vers la 4<sup>ème</sup> semaine). Ces données, auxquelles peut s'ajouter l'observation que les patients continuent à présenter une réponse humorale anti 30-40K très longtemps après l'infection, étaient apparemment en faveur d'un stimulus antigénique d'origine adulte; la détection continue d'anticorps dans le sérum des rats à des périodes très tardives de l'infection, pouvait alors s'expliquer par la présence d'un pourcentage résiduel ( généralement estimé à 1% ) de schistosomes chez l'animal.

De nombreux résultats expérimentaux ont établi le rôle essentiel joué par les anticorps dans l'immunité anti-schistosome, principalement par leur participation dans les mécanismes de cytotoxicité dépendant de cellules. Le rôle des anticorps IgG2a dans le développement de l'immunité du rat a été mis en évidence in vitro et confirmé in vivo, non seulement dans des modèles d'infection mais aussi plus récemment dans des expériences d'immunisation utilisant des cercaires atténuées par irradiation et dans lesquelles le pouvoir protecteur des sérums par transfert passif a pu également être attribué à la présence des IgG2a spécifiques (M.FORD, communication personnelle). Enfin, la production d'un anticorps monoclonal de sous-classe IgG2a doué de propriétés cytotoxiques in vitro en présence d'éosinophiles et protectrices in vivo, a apporté à nouveau une preuve décisive du rôle essentiel des IgG2a dans l'immunité du rat. Les propriétés biologiques de cet anticorps monoclonal IPLSm1 laissaient aussi supposer que l'on puisse isoler de la surface du parasite un antigène parasitaire potentiellement vaccinant.

Par immunoprécipitation, nous avons pu démontrer que l'anticorps IPLSm1 reconnaissait à la surface du schistosomule l'un des antigènes(38K) préalablement identifiés par les anticorps d'hôtes infestés, suggérant ainsi que l'antigène 38K puisse représenter la cible des mécanismes effecteurs dépendant des éosinophiles. Par contre, l'anticorps IPLSm1 ne semblait pas avoir d'affinité pour aucun des composants exposés à la surface des parasites aux stades poumon et adulte. En conséquence, il était facile d'établir une relation entre ces observations et celles qui concernent la perte rapide de susceptibilité à l'attaque immune du schistosomule dès sa pénétration dans l'organisme de l'hôte ( 77 ). On pouvait alors supposer que l'antigène 38K ne soit plus exprimé à la surface des parasites aux stades plus tardifs de leur développement ou qu'il soit masqué par des molécules de l'hôte adsorbées à la surface des parasites. Selon cette dernière hypothèse, on devait toutefois concevoir un masquage sélectif de l'antigène 38K puisqu'apparemment les autres antigènes 30-40K étaient isolés de la surface des schistosomules au stade poumon.

Nous avons préalablement envisagé que le schistosome adulte puisse être l'inducteur de la réponse anti 30-40K et anti 38K en particulier. L'injection de parasites adultes chez le rat a confirmé que le schistosome adulte peut induire une réponse anti 38K en même temps qu'un état de protection contre l'infection. L'utilisation des anticorps monoclonaux nous a ensuite permis de démontrer qu'une molécule 115K contenue dans les produits d'incubation des vers adultes possédait au moins un déterminant antigénique commun à l'antigène 38K. La molécule 115K pouvait donc être considérée comme l'antigène "inducteur" de la réponse anticorps dirigée contre l'antigène "cible" 38K, ces résultats constituant alors un support moléculaire pour l'hypothèse de l'immunité concomitante dépendante des mécanismes de cytotoxicité en présence d'éosinophiles.

Cependant, si l'on attribue à l'IgG2a un rôle essentiel dans l'immunité acquise du rat, on connaît par ailleurs l'importance des anticorps IgE et de leur fonction cytotoxique en présence de différentes cellules effectrices. Des travaux récents réalisés dans le laboratoire ont apporté l'évidence que des antigènes provenant du schistosomule pouvaient induire une réponse IgE cytotoxique in vitro et protectrice in vivo (112). Les propriétés de ces anticorps supposent donc qu'ils reconnaissent aussi un(des) antigène(s) de surface défini(s); la caractérisation de cet(ces) antigène(s) est actuellement en cours.

Des expériences d'immunisation contre les antigènes 38K et 115K purifiés ont été réalisées pour tenter de déterminer le rôle de ces antigènes dans le développement de l'immunité du rat. Cependant, si les résultats obtenus ont confirmé le pouvoir immunogène des antigènes, ils n'ont pas mis en évidence un état de protection chez l'animal immunisé. Ces observations ont pu être interprétées en fonction d'autres données acquises concernant l'activité "bloquante" d'un second anticorps monoclonal IPLSm3 de sous-classe IgG2c spécifique également des antigènes 38K et 115K. On pouvait donc se demander si la production d'anticorps protecteurs chez le rat nécessitait une présentation particulière de l'antigène et/ou impliquait un épitope défini et distinct de celui reconnu par les anticorps bloquants. Le problème de la détermination précise des épitopes était alors posé.

L'analyse biochimique des antigènes semble indiquer que les composants 30-40K seraient de nature glycoprotéinique et que les anticorps IPLSm1 reconnaîtraient, au moins en partie, une structure glucidique portée par la molécule 38K. La structure exacte de cet épitope reste encore à être déterminée. D'autre part, la préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes 40K, 37K et 32K devrait aussi permet-

tre d'aborder non seulement la signification de ces antigènes dans la réponse immune, mais également la question de l'existence ou pas de relations structurales entre les antigènes 30-40K. En effet, si l'analyse des fragments résultant de la protéolyse par la V8 protéase nous a permis de suggérer qu'il existe une homologie de structure entre les antigènes 38K et 32K, il semblerait que ces molécules soient antigéniquement très différentes l'une de l'autre puisqu'aucune des IgG produites par immunisation contre l'antigène 38K n'est capable de précipiter l'antigène 32K. Si l'on admet que les copules glucidiques portées par ces antigènes peuvent être principalement responsables de leur pouvoir immunogène, on pourrait peut-être envisager que l'expression des antigènes 38K et 32K soit reliée à des processus de glycosylation différents.

En conclusion, la caractérisation de l'antigène 38K grâce à la sélection des anticorps monoclonaux IPLSm1 peut présenter des applications diagnostiques. Il semble raisonnable d'espérer que la détection des anticorps anti 38K dans l'infection humaine pourra constituer dans un proche avenir une méthode de diagnostic des infections par schistosomes, qu'elles soient dues à S.mansoni ou à S.haematobium, puisque l'antigène 38K est commun à ces deux parasites.

Parallèlement à la détermination précise de l'épitope défini par les anticorps protecteurs, l'étude du potentiel protecteur des antigènes 38K ou 115K devra être envisagée, en premier lieu chez le rat, par l'utilisation de différents modes de présentation des antigènes, en absence ou en présence d'adjuvants divers, en tentant ainsi de reproduire, au moins

en partie, la réponse protectrice observée dans l'infection. Les modes d'induction de la réponse protectrice anti 38K seront en même temps envisagés par J.M.GRZYCH au moyen d'anticorps anti-idiotypes produits spécifiquement contre les anticorps IPLSm1. L'hypothèse d'une action synergique entre les antigènes cibles des anticorps IPLSm1 et d'autres molécules du parasite, telles que par exemple les antigènes reconnus par les anticorps IgE, doit également être considérée.

## MATERIEL ET METHODES

## I. PARASITES

Nous avons utilisé dans toutes les expériences une souche portoricaine de Schistosoma mansoni dont le cycle biologique est maintenu au laboratoire chez la planorbe Biomphalaria glabrata (variété albinos) et le hamster doré Mesocricetus auratus.

### A. Cercaires

Les mollusques infectés sont exposés pendant 1h30mn à la lumière et à 30°C et les cercaires libérées sont purifiées et concentrées par ascension vers une source lumineuse.

### B. Schistosomules

#### 1. Schistosomules "peau"

Les schistosomules ont été préparés selon la technique de CLEGG et SMITHERS (46) par passage des cercaires à travers une peau abdominale de souris. La récolte des schistosomules est effectuée 3h après le dépôt des cercaires dans un milieu HLEG (hydrolysate lactalbumine earle glucose) maintenu à 37°C et contenant 100U/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine.

#### 2. Schistosomules "mécaniques"

La suspension de cercaires est répartie dans des tubes en verre ( $1-2 \times 10^4$  cercaires/ tube) puis placée à l'obscurité et dans la glace pendant 15mn. Les cercaires sédimentées sont resuspendues dans 2ml d'eau et soumises à une agitation sur "Vortex" de 2mn. La suspension de parasites

( $5 \times 10^4$ ) est immédiatement déposée dans un tube conique sur un coussin de 15ml d'une solution isotonique de Percoll à 54% (54ml Percoll, 6ml NaCl 9%, 40ml milieu MEM (minimum essential medium) ) et centrifugée pendant 10mn à 500g. Le sédiment de schistosomules est lavé 3 fois par 15ml de milieu MEM contenant 100U/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine.

### 3. Schistosomules "poumon"

Des rats Fischer, infectés depuis 5 jours à la suite d'une exposition à 500 cercaires, sont sacrifiés. Les poumons sont prélevés et hachés par coupes de 500µm à l'aide d'un "tissue chopper" (Mc ILWAIN, Mickle Laboratory Engineering Co, Ltd, England). Les fragments de poumon sont incubés pendant une nuit à 4°C, en milieu MEM contenant 250U/ml d'héparine, dans un tube conique muni d'un tamis de gaze stérile. Le sédiment de schistosomules est lavé en milieu MEM puis les parasites sont purifiés des morceaux de tissu et des cellules contaminantes par sédimentation à travers une solution de Percoll isotonique à 45% selon la technique modifiée de LAZDINS et al ( 159).

### C. Schistosomes

Des hamsters infectés depuis 6 semaines subissent une perfusion portale avec de l'eau physiologique. Les vers adultes sont collectés et lavés abondamment en milieu MEM.

## II. SOURCES D'ANTICORPS

### A. Sérums

Des rats Hooded-Lister ou Fischer ont été infectés à la suite d'une exposition à 1000 cercaires (pénétration cutanée abdominale) et le sang a été collecté au niveau du sinus rétro-orbitaire à différentes périodes de l'infection.

Les sérums de souris C57B1/6 proviennent d'animaux infectés par 50 cercaires.

Des sérums ont été prélevés chez des singes Erythrocebus patas 16 mois après leur exposition à un total de 1000 cercaires.

Les sérums humains ont été obtenus après ponction intraveineuse chez des patients présentant une schistosomiase parasitologiquement confirmée.

### B. Anticorps monoclonaux

Une description détaillée du protocole de sélection et de multiplication des clones producteurs d'anticorps a été faite par J.M.GRZYCH (126,160). Les anticorps IPLSm1 ont été purifiés à partir des liquides d'ascite par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Trisacryl (IBF, France).

## III. TECHNIQUES D'IODATION

### A. Iodation en présence de lactopéroxydase

Les parasites ont été marqués selon la technique modifiée de MARCHALONIS et al (127).  $10^4$  schistosomules sont lavés 3 fois en tampon PBS (Phosphate de Na 10mM pH 7,4 , NaCl 150mM) pour éliminer les traces

de milieu de culture puis marqués dans le tampon PBS dans un volume final de 250 $\mu$ l contenant 0,5mCi  $^{125}$ I, 12,5 $\mu$ l NaI 6 $\mu$ g/ml et 12,5 $\mu$ l de lactopéroxydase à 1mg/ml. La réaction est initiée par l'addition de 12,5 $\mu$ l d' $H_2O_2$  30% (110 vol.) diluée au 1/10000 et s'effectue à 4°C pendant 15mn. La réaction est arrêtée par l'addition de 25 $\mu$ l d'une solution de NaI à 6mg/ml et l'iode radioactif non fixé est éliminé immédiatement au cours de 3 lavages successifs par 8ml de tampon PBS stabilisé à 4°C.

#### B. Iodation par le réactif de BOLTON-HUNTER

50 $\mu$ l (0.1mCi  $^{125}$ I) de la solution de réactif sont déposés dans un tube conique et le solvant (benzène) est évaporé sous hotte sous un faible courant de  $N_2$ . 2500 schistosomules en suspension dans 25 $\mu$ l de tampon EBSS (earle's balanced salt solution) pH 8,5, sont immédiatement ajoutés au réactif et la réaction s'effectue à 4°C pendant 15mn. On arrête la réaction en ajoutant 1ml d'une solution de glycocolle à 1% (p/v) dans le tampon EBSS. Les parasites sont ensuite lavés 3 fois par 5ml de tampon EBSS.

#### C. Iodation par l'acide iodosulfanilique diazoté

La conversion de l'acide iodosulfanilique en sel diazoté est réalisée dans les conditions décrites par NEN (New England Nuclear) . 2500 parasites sont marqués par le réactif (1mCi  $^{125}$ I) dans 500 $\mu$ l de tampon PBS à 4°C. Après 15mn, la réaction est arrêtée par l'addition de 5ml de sérualbumine bovine à 0,5% (p/v) en tampon PBS. Les parasites sont lavés en tampon PBS.

#### IV. TECHNIQUE D'IMMUNOPRECIPITATION

$10^4$  schistosomules sont traités pendant 30mn à 4°C par 400 $\mu$ l de Nonidet P40 à 0,5% (v/v) dans le tampon Tris-HCl 10mM pH 6,8, contenant 100U/ml d'aprotinine. Les parasites sont sédimentés à la suite d'une centrifugation de 1mn à 200g et le surnageant (extrait détergent) est ajusté à une concentration de SDS de 2% puis placé dans un bain-marie bouillant pendant 2mn. L'extrait détergent est additionné de 6 volumes de tampon (Tris-HCl 5mM pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Triton X100 2% (v/v), aprotinine 100U/ml).

Des fractions aliquotes (170 $\mu$ l) sont incubées en présence des anticorps pendant 18h à 4°C puis transférées dans des tubes coniques de 1,5ml (Eppendorf) contenant 10mg (poids sec) de Protéine A-Sépharose préalablement équilibrée dans le tampon d'adsorption (Tris-HCl 5mM pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Triton X100 1,7% (v/v), SDS 0,3%, aprotinine 100U/ml). Les tubes sont placés sur un agitateur rotatif (Cenco, Pays-Bas) pendant 3h à température ambiante (ou une nuit à 4°C). Les billes de Protéine A-Sépharose sont lavées successivement par 3x1ml de tampon d'adsorption, 3x1ml de tampon Tris-HCl 5mM pH 7,4, NaCl 150mM et 3x1ml de tampon Tris-HCl 5mM pH 7,4. Les complexes immuns sont élués par 40 $\mu$ l de Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 3%, saccharose 10% à 100°C pendant 3mn puis analysés en gel de polyacrylamide-SDS.

★ Lorsque l'immunoprécipitation est effectuée par les anticorps monoclonaux IPLSm1, les billes de Protéine A-Sépharose sont préalablement incubées dans 500 $\mu$ l de tampon d'adsorption contenant 10 $\mu$ l de sérum (de chèvre ou de lapin) anti-IgG de rat pendant 3h à température ambiante puis lavées dans le même tampon.

## V. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

### A. Electrophorèse monodimensionnelle

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est effectuée dans les conditions décrites par LAEMMLI (161). Des gels de 1,5mm d'épaisseur (14 x16cm) sont utilisés. Les protéines sont concentrées dans un gel de polyacrylamide à 5% puis séparées soit dans un gradient linéaire 10-15%, soit le plus souvent dans un gel de réticulation homogène à 13%.

### B. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est effectuée selon la méthode de GARRELLS (162). La focalisation isoélectrique est réalisée dans des tubes capillaires de diamètre 1,3mm dans un gradient d'ampholines 3-10 (LKB, Suède). Les molécules sont séparées dans la 2ème dimension dans un gel de polyacrylamide-SDS à 12,5% ou 7,5%. Dans cette technique, le gel de concentration est supprimé car il n'est pas utile, compte tenu du faible diamètre des gels de 1ère dimension.

### C. Analyse

#### 1. Coloration par le bleu de Coomassie

Les gels sont colorés pendant 2h et sous agitation dans une solution de bleu de Coomassie (0,85g bleu de Coomassie, 500ml méthanol, 100ml acide acétique, 500ml eau) puis décolorés dans une solution de méthanol 20%, acide acétique 8%.

## 2. Coloration par le nitrate d'argent

Les gels sont colorés par le nitrate d'argent après fixation par la glutaraldéhyde et réduction par le dithiothreitol selon la méthode décrite par MORRISSEY (163).

## 3. Autoradiographie

Les gels sont séchés sous vide dans un appareil LKB (n° 2003) puis mis en contact avec un film Kodak X-Omat AR (Eastman Kodak Co, Rochester, U.S.A.) entre deux écrans renforçateurs Lightning Plus (Dupont de Nemours, France) à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## VI. PRODUITS UTILISES

Les milieux de culture MEM (base saline de Earle), HLEG et EBSS sont commercialisés sous forme de poudre par GIBCO (Flobio, France). La solution de Percoll TM est un produit Pharmacia (Uppsala, Suède).

La Protéine A, la Concanavaine A et la Lens culinaris agglutinine ont été couplées à la Sépharose 4B par Pharmacia.

Le Triton X100 est un produit Hopkin Williams (Essex, England) et le Nonidet P40 un produit BDH (Poole, England).

L'aprotinine, la lactopéroxydase (E.C. 1.1.1.7., 90U/ml), le Trizma base et le SDS sont commercialisés par Sigma (St Louis, Missouri, U.S.A.).

L'acrylamide et la bis-acrylamide proviennent de chez Serva (Heidelberg, R.D.A.).

L' $^{125}\text{I}$  (IMS 30) et le réactif de BOLTON-HUNTER sont des produits Amersham (The Radiochemical Centre, England). L'acide iodosulfanilique ( $^{125}\text{I}$ ) est un réactif NEN (Boston, Massachusetts, U.S.A.).

La V8 protéase de S.aureus est un produit Miles (Elkhart, Indiana, U.S.A.).

## BIBLIOGRAPHIE

1. SMITHERS, S.R., Mc LAREN, D.J. and RAMALHO-PINTO, F.J. (1977)  
Immunity to schistosomes : the target. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,  
26, (Suppl.), 11.
2. HAIRSTON, N.G. (1973) The dynamics of transmission, in *Epidemiology  
and Control of schistosomiasis*, Ansari, N., Ed. S. Karger, Basel  
and University Park Press, Baltimore, 302.
3. GIRGIS, R. (1934) *Schistosomiasis*, John Bale, Sons Danielsson Ltd,  
London, 495.
4. SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1965) Acquired resistance to experi-  
mental infections of S. mansoni in the albino rat. *Parasitology*,  
55, 711.
5. MADDISON, S.E., NORMAN, L., GEIGER, S.J. and KAGAN, I.G. (1970)  
S. mansoni infection in the rat. I. Worm burden and serological  
response in infected, reexposed and antigen sensitized animals.  
*J. Parasitol.*, 56, 1058.
6. SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1965) Naturally acquired resistance  
to experimental infections of S. mansoni in the Rhesus monkeys  
(*Macaca Mulatta*). *Parasitology*, 55, 701.
7. CHEEVER, A.W. and POWERS, K.G. (1972) Schistosoma mansoni infec-  
tion in Rhesus monkeys : comparison of the course of heavy and  
light infections. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 46, 301.
8. CARDOSO, W. (1953) A esquistossomiase mansonica no negro. *Medicina,  
Cirurgia, Farmacia*, Rio de J., 202, 89.
9. KAGAN, I.G. (1958) Contributions to the immunology and serology  
of schistosomiasis. *Rice. Inst. Pamph.*, 45, 151.

10. LEWERT, R.M. (1958) Invasiveness of helminth larvae. Rice Inst. Pamph., 45, 97.
11. LEWERT, R.M. and MANDLOWITZ, S. (1963) Innate immunity to S. mansoni relative to the state of connective tissue. Ann. N.Y. Acad. Sci., 113, 54.
12. KAGAN, I.G. and LEVINE, D.M. (1956) Studies on the serology of schistosomiasis. II. The in vitro activity of cercariae of S. mansoni in sera of normal and antigen infected animals. Exp. Parasitol., 5, 48.
13. PURNELL, R.E. (1966) Host-parasite relationships in schistosomiasis. II. The effects of age and sex on the infection of mice and hamsters with cercariae of S. mansoni and of hamsters with cercariae of S. haematobium. Ann. Trop. Med. Parasit., 60, 94.
14. ROBINSON, E.J. (1957) A possible effect of testosterone on the development of Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 43, 59.
15. DAVIES, P. and JACKSON, H. (1970) Experimental studies on the chemosterilization of S. mansoni. Parasitology, 61, 167.
16. SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1976) The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasitol., 14, 399.
17. CHEEVER, A.W. and POWERS, K.G. (1969) Schistosoma mansoni infection in rhesus monkeys : changes in egg production and egg distribution in prolonged infections in intact and splenectomized monkeys. Ann. Trop. Med. Parasit., 63, 83.
18. CIOLI, A. and DENNERT, G. (1976) The course of Schistosoma mansoni infection in thymectomized rats. J. Immunol., 117, 59.
19. SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1969) Immunity in schistosomiasis. Ann. N.Y. Acad. Sci., 160, 826.

20. GERSHON, R.K., CARTER, R.L. and KONDO, K. (1967) On concomitant immunity in tumour-bearing hamsters. *Nature*, 213, 674.
21. LEHMAN, J.S., MOTT, K.E., MORROW, R.H., MUNIZ, T.M. and BOYER, M.H. (1976) The intensity and effects of infection with Schistosoma mansoni in a rural community in Northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25, 285.
22. ABDEL-WAHAB, M.F., STRICKLAND, G.T., EL-SAHLY, A., AHMED, L., ZAKARIA, S., EL KADY, N. and MAHMOUD, S. (1980) Schistosomiasis mansoni in an Egyptian village in the Nile Delta. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 868.
23. WARREN, K.S. (1973) Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man : immunology or ecology ? *J. Inf. Dis.*, 127, 595.
24. NAIMARK, D.H., BENENSON, A.S., OLIVER-GONZALEZ, J., MAC MULLEN, D.B. and RITCHIE, L.S. (1960) Studies of schistosomiasis in primates : observation on acquired resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 9, 430.
25. RITCHIE, L.S., KNIGHT, W.B., Mac MULLEN, C.B. and VON LICHTENBERG, F. (1966) The influence of infection intensity of S. mansoni on resistance against existing and subsequent infections in Macaca mulatta. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 15, 43.
26. SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1967) Resistance to experimental infection by S. mansoni in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 517.

27. PEREZ, H., CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1974) Acquired immunity to Schistosoma mansoni in the rat : measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology*, 69, 349.
28. SHER, F.A., MACKENZIE, P. and SMITHERS, S.R. (1974) Decreased recovery of invading parasites from the lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the laboratory mouse. *J. Inf. Dis.*, 130, 626.
29. SMITH, M.A., CLEGG, J.A., KUSEL, J.R. and WEBBE, G. (1975) Lung inflammation in immunity to Schistosoma mansoni. *Experientia* , 31, 595.
30. VOGEL, H. (1958) Acquired resistance to Schistosoma infection in experimental animals. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 18, 1097.
31. MINARD, P., DEAN, D.A., JACOBSON, R.H., VANNIER, W.E. and MURREL, K.D. (1978) Immunization of mice with Cobalt-60 irradiated Schistosoma mansoni cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 76.
32. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. and OLIVIER, L. (1963) Schistosoma mansoni : development of challenge infections in mice exposed to irradiated cercariae. *Science*, 140, 411.
33. BICKLE, Q.D., TAYLOR, M.G., DOENHOFF, M.J. and NELSON, G.S. (1979) Immunization of mice with gamma-irradiated intramuscularly infected schistosomula of Schistosoma mansoni. *Parasitology*, 79, 209.
34. VILLELLA, J.B., GOMBERG, H.J. and GOUD, S.E. (1961) Immunization to Schistosoma mansoni in mice inoculated with irradiated cercariae. *Science*, 134, 1073.
35. RADKE, M.G. and SADUN, E.H. (1963) Resistance produced in mice by exposure to irradiated Schistosoma mansoni cercariae. *Exp. Parasitol.*, 13, 134.

36. TAYLOR, M.G., NELSON, G.S., SMITH, M. and ANDREWS, B.J. (1973).  
Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. Observations on the development of acquired homologous and heterologous immunity in Schistoma mansoni in baboons. Bull. Wld. Hlth. Org., 49, 57.
37. Mac CULLOUGH, F.S. and BRADLEY, D.J. (1973) Egg output stability and the epidemiology of Schistosoma haematobium. I. Variation and stability in Schistosoma haematobium egg counts. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67, 475.
38. CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M. and TORPIER, G. (1982) Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. Immunol. Rev., 61, 41.
39. SANTORO, F., LACHMANN, P.J., CAPRON, A. and CAPRON, M. (1979)  
Activation of the complement by Schistosoma mansoni schistosomula : killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. J. Immunol., 123, 1551.
40. OTTESEN, E.A., STANLEY, E.M., GELFAND, J.A., GADEK, J.E., FRANK, M.M., NASH, T.E. and CHEEVER, A.W. (1977) Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomules. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 134.
41. RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J. and SMITHERS, S.R. (1978)  
Complement mediated killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by rat eosinophils in vitro. J. Exp. Med., 147, 147.
42. BOUT, D., JOSEPH, M., DAVID, J.R. and CAPRON, A. (1981) In vitro killing of S.mansoni schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. J. Immunol., 127, 1.

43. AURIAULT, C., PESTEL, J., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. and CAPRON, A. (1981) Interaction between macrophage and Schistosoma mansoni schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of  $\beta$ -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.*, 62, 15.
44. SADUN, E.H. and GORE, R.W. (1970) Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium : homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. *Exp. Parasitol.*, 78, 435.
45. BAZIN, H., CAPRON, A., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. and PAUWELLS, R. (1980) Effect of neonatal injection of anti- $\mu$  antibodies on immunity to schistosomes (Schistosoma mansoni) in the rat. *J. Immunol.*, 124, 2373.
46. CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1972) The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.*, 2, 79.
47. CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. et PETITPREZ, A. (1974) Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative in vitro de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de S. mansoni. *Int. J. Parasitol.*, 4, 613.
48. CAPRON, M., CAMUS, D., CARLIER, Y., FIGUEIREDO, J.F.M., PRATA, A. and CAPRON, A. (1977) Immunological studies in human schistosomiasis. II. Cytotoxic antibodies for Schistosoma mansoni schistosomules. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26, 248.
49. CAPRON, M., CARLIER, Y., NZEYIMANA, H., MINIPRIO, P., SANTORO, F. and CAPRON, A. (1980) In vitro study of immunological events in human and experimental schistosomiasis : relationships between cytotoxic antibodies and circulating Schistosoma antigens. *Parasite Immunol.*, 2, 223.

50. SANTORO, F., PESTEL, J., LEPRESLE, T., LIEBART, M.C. and CAPRON, A. (1980) Schistosoma mansoni anticomplementary antigens (SACA). Detection in schistosomula and adult worms. Immunol. Lett., 2, 43.
51. DEAN, D.A., WISTAR, R. and MURREL, K.D. (1974) Combined in vitro effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of Schistosoma mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 420.
52. BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, C. and REES, P.M. (1975) Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula. Nature, 256, 727.
53. CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D. and JOSEPH, M. (1978) Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. Eur. J. Immunol., 8, 127.
54. KASSIS, A.I., AIKAWA, M. and MAHMOUD, A.A.F. (1979) Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol., 122, 398.
55. CAPRON, M., BAZIN, H., JOSEPH, M. and CAPRON, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., 126, 1764.
56. CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. and BAZIN, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules. Nature, 253, 474.
57. JOSEPH, M., CAPRON, A., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F. and HOUBA, V. (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.

58. JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H. and VIENS, P. (1983) A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 303, 810.
59. CAPRON, A., DESSAINT, J.P., JOSEPH, M., ROUSSEAUX, R., CAPRON, M. and BAZIN, H. (1977) Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat : a new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.*, 7, 315.
60. MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S. and PETERS, P.A. (1975) A role for the eosinophil in acquired resistance to Schistosoma mansoni infection as determined by anti-eosinophil serum. *J. Exp. Med.*, 142, 805.
61. BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. and TAYLOR, R. (1976) Schistosoma mansoni in baboons. Antibody-dependent cell-mediated to Cr-labelled schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.*, 25, 95.
62. MACKENZIE, C.D., RAMALHO-PINTO, F.S., Mc LAREN, D.J. and SMITHERS, S.R. (1977) Antibody-mediated adherence of rat eosinophils schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, 30, 97.
63. RAMALHO-PINTO, F.J., DE ROSSI, R. and SMITHERS, S.R. (1979) Murine Schistosoma mansoni : antischistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement and eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. *Parasite Immunol.*, 1, 295.
64. CAPRON, M., ROUSSEAUX, J., MAZINGUE, C., BAZIN, H. and CAPRON, A. (1978) Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody dependent eosinophil cytotoxicity to Schistosoma mansoni schistosomula. *J. Immunol.*, 121, 2518.
65. BAZIN, H., BECKERS, A. and QUERINJEAN, P. (1974) Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c. *Eur. J. Immunol.*, 4, 44.

66. BACH, M.K., BLOCH, K.J. and AUSTEN, K.F. (1971) IgE and IgG<sub>a</sub> anti-body-mediated release of histamine from rat peritoneal cells.  
II. Interaction of IgG<sub>a</sub> and IgE at the target cell. J. Exp. Med., 133, 772.
67. HALPER, J. and METZGER, H. (1976) The interaction of IgE with rat basophil leukemia cells. VI. Inhibition by IgG<sub>a</sub> immune complexes. Immunochemistry, 15, 907.
68. CAPRON, M., TORPIER, G. and CAPRON, A. (1979) In vitro killing of S. mansoni schistosomula by eosinophils from infected rats : role of cytophilic antibodies. J. Immunol., 123, 2220.
69. JONG, E.C., MAHMOUD, A.A.F. and KLEBANOFF, S.J. (1981) Peroxidase mediated toxicity to schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Immunol., 126, 468.
70. BUTTERWORTH, A.E., WASSOM, D.L., GLEICH, G.J., LOEGERING, D.A. and DAVID, J.R. (1979) Damage to schistosomula of Schistosoma mansoni induced directly by eosinophil MBP. J. Immunol., 122, 221.
71. LEMPEREUR, C., CAPRON, M. and CAPRON, A. (1980) Identification and measurement of rat eosinophil phospholipase D. Its activity on schistosomula phospholipids. J. Immunol. Meth ., 33, 249.
72. CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M. and PESTEL, J. (1980) Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 849.
73. SHER, A. (1977) Immunity against Schistosoma mansoni in the mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 20.
74. DEAN, D.A. (1977) Decreased binding of cytotoxic antibody by developing Schistosoma mansoni : evidence for a surface change independent of host antigen adsorption and membrane turnover. J. Parasitol., 63, 418.

75. TAVARES, C.A.P., SOARES, R.C., COELHO, P.M.Z. and GAZINELLI, G. (1978) Schistosoma mansoni : evidence for a role of serum factors in protecting artificially transformed schistosomula against antibody-mediated killing in vitro. Parasitology, 77, 225.
76. DESSEIN, A., SAMUELSON, J., BUTTERWORTH, A.E., HOGAN, M.E., SHERRY, B.A., VADAS, M.A. and DAVID, J.R. (1981) Immune evasion by Schistosoma mansoni : loss of susceptibility to antibody or complement-dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules. Parasitology, 82, 357.
- 77.. SHER, A. and MOSER, G. (1981) Schistosomiasis : immunologic properties of developing schistosomula. Am. J. Pathol., 102, 121.
78. DAMIAN, R.T. (1964) Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am. Nat., 98, 129.
79. DAMIAN, R.T. (1967) Common antigens between adult S. mansoni and the laboratory mouse. J. Parasitol., 53, 60.
80. CAPRON, A., BIGUET, J., ROSE, F. et VERNES, A. (1965) Les antigènes de S. mansoni. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de S. mansoni. Ann. Inst. Pasteur, 109, 798.
81. CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. et AFCHAIN, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol., 16, 121.
82. SMITHERS, S.R., TERRY, R.J. and HOCKLEY, D.J. (1969) Host antigens in schistosomiasis. Proc. R. Soc. Ser B, 171, 483.
83. GOLDRING, O.L., CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1976) Acquisition of human blood group antigens by Schistosoma mansoni. Clin. Exp. Immunol., 26, 131.

84. SHER, A., HALL, B.F. and VADAS, M.A. (1978) Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of Schistosoma mansoni. J. Exp. Med., 148, 46.
85. KEMP, W.M., MERRITT, S.C., BOGUICKI, M.S., ROSIER, J.G. and SEED, J.R. (1977) Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of Schistosoma mansoni. J. Immunol., 119, 1849.
86. TORPIER, G., CAPRON, A. and OUAISSI, M.A. (1979) Receptor for IgG (Fc) and human  $\beta$ 2 microglobulin on S. mansoni schistosomula. Nature, 278, 447.
87. TORPIER, G., OUAISSI, M.A. and CAPRON, A. (1979) Freeze-fracture study of immune induced Schistosoma mansoni membrane alterations. I. Complement-dependent damage in the presence of antisera to host determinants. J. Ultrast. Res., 67, 276.
88. DAMIAN, R.J., GREENE, N.D. and HUBBARD, W.J. (1973) Occurrence of mouse  $\alpha$ 2-macroglobulin antigenic determinants on S. mansoni adults with evidence on their nature. J. Parasitol., 59, 64.
89. DEAN, D.A. and SELL, K.W. (1972) Surface antigens on S. mansoni. II. Adsorption of a Forssman-like host antigen by schistosomula. Clin. Exp. Immunol., 12, 525.
90. HOCKLEY, D.J. and Mac LAREN, D.J. (1973) Schistosoma mansoni : changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. Int.J. Parasitol., 3, 13.
91. PEREZ, H. and TERRY, R.J. (1973) The killing of adult Schistosoma mansoni in vitro in the presence of antisera to host antigenic determinants and peritoneal cells. Int.J. Parasitol., 3, 499.
92. SAMUELSON, J.C., SHER, A. and CAUFIELD, J.P. (1980) Newly-transformed schistosomula spontaneously lose surface antigens and C3 acceptor sites during culture. J. Immunol., 124, 2055.

93. MOSER, G., WASSOM, D. and SHER, A. (1980) Studies of the antibody-dependent killing of schistosomula of S. mansoni employing haptenic target antigens : I. Evidence that the loss in susceptibility of immune damage undergone by developing schistosomula involves a change unrelated to the masking of parasite antigens by host molecules. J. Exp. Med., 152, 41.
94. TORPIER, G., CAPRON, M. and CAPRON, A. (1977) Structural changes of the tegumental membrane complex in relation to developmental stages of Schistosoma mansoni. J. Ultrast. Res., 61, 309.
95. SCHLAGER, S.I. (1982) Relationship between cell-mediated and humoral immune attack on tumor cells. II. The role of cellular lipid metabolism and cell surface charge in the outcome of immune attack. Cell. Immunol., 66, 300.
96. BOUT, D., CARLIER, Y., DESSAINT, J.P. and CAPRON, A. (1977) Characterization and purification of S. mansoni antigens. Les Colloques de L'INSERM, 72, 71.
97. SAUER, M.C.V. and SENFT, A.W. (1972) Properties of a proteolytic enzyme from Schistosoma mansoni. Comp. Biochem. Physiol., 42B, 205.
98. SENFT, A.W. and MADDISON, S.E. (1975) Hypersensitivity to parasite proteolytic enzyme in schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 83.
99. DAMONNEVILLE, M., AURIAULT, C., PIERCE, R.J. and CAPRON, A. (1982) Antigenic properties of Schistosoma mansoni aminopeptidases : evolution during the development in mammalian hosts. Mol. Biochem. Parasitol., 6, 265.
100. BOUT, D., DUPAS, H., CAPRON, M., EL GAZAWI, A., CARLIER, Y., DELACOURTE, A. and CAPRON, A. (1977) Purification, immunochemical and biological characterization of malate dehydrogenase of Schistosoma mansoni. Immunochemistry, 15, 633.

101. CARLIER, Y., BOUT, D., BINA, J.C., CAMUS, D., FIGUEIREDO, J.F.M. and CAPRON, A. (1975) Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 949.
102. CARLIER, Y., BOUT, D. and CAPRON, A. (1978) Further studies on the circulating M antigen in human and experimental Schistosoma mansoni infections. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 129C, 811.
103. SANTORO, F., CARLIER, Y., BOROJEVIC, R., BOUT, D., TACHON, P. and CAPRON, A. (1977) Parasite M antigen in milk from mothers infected with Schistosoma mansoni. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 71, 121.
104. CARLIER, Y., BOUT, D., STRECKER, G., DEBRAY, H. and CAPRON, A. (1980) Purification, immunochemical and biologic characterization of the Schistosoma circulating M antigen. *J. Immunol.*, 124, 2442.
105. DEELDER, A.M., KORNELIS, D., VAN MARCK, E.A.E., EVELEIGH, P.C. and VAN EGMOND, J.G. (1980) Schistosoma mansoni : characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Exp. Parasitol.*, 50, 16.
106. NASH, T.E., PRESCOTT, B. and NEVA, F.A. (1974) The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.*, 112, 1500.
107. PELLELY, R.P., PELLELY, R.J., HAMBURGER, J., PETERS, P.A. and WARREN, K.S. (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.

108. Mc LAREN, M.L., LILLYWHITE, J.E., DUNNE, D.W. and DOENHOFF, M.J. (1981) Serodiagnosis of human Schistosoma mansoni infections : enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing S. mansoni egg antigens w1 and  $\alpha$ 1. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 72.
109. BOUT, D., DUPAS, H., CAPRON, M., TRAN VAN KY, P. and CAPRON, A. (1977) Drugs as ligands of immunogenic molecules in parasites : an approach to the isolation of target antigens. J. Immun. Meth., 15, 1.
110. MADDISON, S.E., SLEMENDA, S.B., CHANDLER, F.W. and KAGAN, I.G. (1978) Studies on putative adult worm-derived vaccines and adjuvants for protection against Schistosoma mansoni infection in mice. J. Parasitol., 64, 986.
111. HOROWITZ, S., SMOLARSKY, M. and ARNON, R. (1982) Protection against Schistosoma mansoni achieved by immunization with sonicated parasite. Eur. J. Immunol., 12, 327.
112. AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., VERWAERDE, C., PIERCE, R., JOSEPH, M., CAPRON, M. and CAPRON, A. (1984) Rat IgE directed against schistosomula released products (SRP-A) is cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomula in vitro. Eur. J. Immunol., in press.
113. KUSEL, J.R. (1972) Protein composition and protein synthesis in the surface membranes of Schistosoma mansoni. Parasitology, 65, 55.
114. ZODDA, D.M. and PHILLIPS, M. (1982) Monoclonal antibody-mediated protection against Schistosoma mansoni infection in mice. J. Immunol., 129, 2326.

115. OAKS, J.A., CAIN, G.D., MOWER, D.A. and RAJ, R.K. (1981) Disruption and removal of the tegument from Schistosoma mansoni with Triton X-100. J. Parasitol., 67, 761.
116. SIMPSON, A.J.G., SCHRYER, M.D., CESARI, I.M., EVANS, W.H. and SMITHERS, S.R. (1981) Isolation and partial characterization of the tegumental outer membrane of adult Schistosoma mansoni. Parasitology, 83, 163.
117. CESARI, I.M., TORPIER, G. and CAPRON, A. (1983) Schistosoma mansoni : Surface membrane isolation by polycationic beads. Exp. Parasitol., 56, 119.
118. CESARI, I.M. and POLANCO, N. (1980) Schistosoma mansoni : L-lysyl residues in agglutination of mouse erythrocytes by acid phospholipids of parasite membranes. Exp. Parasitol., 50, 195.
119. CORDEIRO, M.N. and GAZINELLI, G. (1979) Schistosoma mansoni : resolution and molecular weight estimates of tegument glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Exp. Parasitol., 48, 337.
120. KUSEL, J.R., SHER, A., PEREZ, H., CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1975) Use of radioactive isotopes in the study of specific schistosome membrane antigens. In : Nuclear techniques in Helminthology Research, IV, p. 127, International Atomic Energy Agency, Vienna.
121. NORDEN, A.P., ARONSTEIN, W.S. and STRAND, M. (1982) Schistosoma mansoni : Identification, characterization and purification of the spine glycoprotein by monoclonal antibody. Exp. Parasitol., 54, 432.
122. TAYLOR, D.W. and BUTTERWORTH, A.E. (1982) Monoclonal antibodies against surface antigens of schistosomes of Schistosoma mansoni. Parasitology, 84, 65.

123. HAYUNGA, E.G., MURREL, K.D., TAYLOR, D.W. and VANNIER, W.E. (1979) Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni. I. Evaluation of techniques for radioisotope labeling of surface proteins from adult worms. *J. Parasitol.*, 65, 488.
124. HAYUNGA, E.G., MURREL, K.D., TAYLOR, D.W. and VANNIER, W.E. (1979) Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni. II. Antigenicity of radiolabeled proteins from adult worms. *J. Parasitol.*, 65, 497.
125. SNARY, D., SMITH, M.A. and CLEGG, J.A. (1980) Surface proteins of Schistosoma mansoni and their expression during morphogenesis. *Eur. J. Immunol.*, 10, 573.
126. GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H. and CAPRON, A. (1982) In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J. Immunol.*, 129, 2739.
127. MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E. and SANTER, V. (1971) Enzymic iodation. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.*, 124, 921.
128. MARCHALONIS, J.J. (1969) An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.*, 113, 299.
129. BOLTON, A.E. and HUNTER, W.M. (1973) The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing acylating agent. *Biochem. J.*, 133, 529.
130. SEARS, D.A., REED, C.F. and HELMKAMP, R.W. (1971) A radioactive label for the erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, 233, 716.
131. GEORGE, J.N., POTTERF, R.D., LEWIS, P.C. and SEARS, D.A. (1976) Studies on platelet plasma membranes. I. Characterization of surface proteins of human platelets labeled with diazotized ( $^{125}\text{I}$ )-diiodosulfanilic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, 88, 232.

132. TAYLOR, D.W., HAYUNGA, E.G. and VANNIER, W.E. (1981) Surface antigens of Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 3, 157.
133. MEDGYESI, G.A., FUST, G., GERGELY, J. and BAZIN, H. (1978) Classes and subclasses of rat immunoglobulins : interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. Immunochemistry, 15, 125.
134. HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C. (1962) Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194, 495.
135. HILLYER, G.V. and SERRANO, A.E. (1982) Cross protection in infections due to Schistosoma mansoni using tegument antigens of Fasciola hepatica. J. Inf. Dis., 145, 728.
136. BARSKI, G. et CORNEFERT, F. (1960) Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de celles "hybrides". C.R. Acad. Sci. (Paris), 251, 1825.
137. KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 26, 495.
138. VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., BAZIN, H., CAPRON, M. and CAPRON, A. (1979) Production d'anticorps monoclonaux anti-Schistosoma mansoni. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. C.R. Acad. Sci. (Paris), 289, 7250.
139. BAZIN, H., GRZYCH, J.M., VERWAERDE, C. and CAPRON, A. (1980) Lou rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. Ann. Immunol., 131D, 359.
140. LITTLEFIELD, W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145, 709.
141. OUCHTERLONY, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, 5, 1.

142. GRZYCH, J.M., CAPRON, M., DISSOUS, C. and CAPRON, A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. J. Immunol., in press.
143. SHER, A., KUSEL, J.R., PEREZ, H. and CLEGG, J.A. (1974) Partial isolation of a membrane antigen which induces the formation of antibodies lethal to schistosomes cultured in vitro. Clin. Exp. Immunol., 18, 357.
144. STRAND, M., McMILLAN, A. and PAN, X.Q. (1982) Schistosoma mansoni : Reactivity with infected human sera and monoclonal antibody characterization of a glycoprotein in different developmental stages. Exp. Parasitol., 54, 145.
145. KATO, K. and MIURA, M. (1954) Comparative examinations (in Japanese). Jap. J. Parasitol., 3, 35.
146. O'FARRELL, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007.
147. O'FARRELL, P.Z., GOODMAN, H.M. and O'FARRELL, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell, 12, 1133.
148. CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W. and LAEMMLI, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 252, 1102.
149. MURRELL, K.D., TAYLOR, D.W., VANNIER, W.E. and DEAN, D.A. (1978) Schistosoma mansoni : analysis of surface membrane carbohydrates using lectins. Exp. Parasitol., 46, 247.
150. SIMPSON, A.J.G., CORREA-OLIVEIRA, R., SMITHERS, S.R. and SHER, A. (1983) The exposed carbohydrates of schistosomula of Schistosoma mansoni and their modification during maturation in vivo. Mol. Biochem. Parasitol., 8, 191.

151. TORPIER, G. and CAPRON, A. (1980) Intramembrane particle movements associated with binding of lectins on Schistosoma mansoni surface. J. Ultrast. Res., 72, 325.
152. BENNETT, J.L. and SEED, J.L. (1977) Characterization and isolation of concanavalin A binding sites from the epidermis of S. mansoni. J. Parasitol., 63, 250.
153. DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. Eur. J. Biochem., 117, 41.
154. GRAUSZ, D., DISSOUS, C., CAPRON, A. and ROSKAM, W. (1983) Messenger RNA extracted from Schistosoma mansoni larval forms codes for parasite antigens when translated in vitro. Mol. Biochem. Parasitol., 7, 293.
155. STEWART, W.E., LIN, L.S., WIRANOWSKA-STEWART, M. and CANTELL, K. (1977) Elimination of size and charge heterogeneities of human leukocyte interferons by chemical cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4200.
156. SIMPSON, A.J.G., JAMES, S.L. and SHER, A. (1983) Identification of surface antigens of schistosomula of Schistosoma mansoni recognized by antibodies from mice immunized by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae. Infect. Immun., 41, 591.
157. MAIZELS, R.M., PHILIPP, M. and OGILVIE, B.M. (1982) Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. Immunol. Rev., 61, 109
158. PHILIPP, M., PARKHOUSE, R.M.E. and OGILVIE, B.M. (1980) Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. Nature, 287, 538.

159. LAZDINS, J.K., STEIN, M.J.; DAVID, J.R. and SHER, A. (1982) Schistosoma mansoni : rapid isolation and purification of schistosomula of different developmental stages by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. *Exp. Parasitol.*, 53, 39.
160. GRZYCH, J.M. (1982) Production d'anticorps monoclonaux contre Schistosoma mansoni. Etude de leurs activités biologiques. Thèse de 3ème cycle, Lille I.
161. LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680.
162. GARRELLS, J.I. (1979) Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.*, 254, 7961.
163. MORRISSEY, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 117, 307.

