

50376
1987
229

50376
1987
229

N° d'ordre: 742

**UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES de LILLE
FLANDRES ARTOIS**

THESE

présentée à l'Université de LILLE I

pour obtenir le titre de **Docteur ès-Sciences Naturelles**

par

Christine MAZINGUE



Etude des propriétés biologiques d'un facteur
immunosuppresseur libéré par *Schistosoma mansoni*.

*

Présentée le 25 Septembre 1987 devant la commission d'examen

Membres du jury:

Président	M. J. MONTREUIL
Rapporteurs	M. A. CAPRON
	M ^{me} G. SPIK
	M. B. STADLER
Examineur	M. J.P. DESSAINT

Ce travail a été effectué au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité mixte INSERM U167- CNRS 422) de l'Institut Pasteur de Lille sous la direction du Professeur A. CAPRON et à l' "Institut für Klinische Immunologie" de l'Université de Berne (Suisse) sous la direction du Professeur A. De Weck.

Avec les collaborations de:

D. CAMUS (CIBP, Lille)
M. CAPRON (CIBP, Lille)
J.C. CEROTTINI (Institut de Biochimie, Lausanne)
J.P. DESSAINT (CIBP, Lille)
W. DOMZIG (Theodor Kocher Institut, Berne)
C. LANGLET (CIBP, Lille)
M. MARGRAFF (Rhône-Poulenc Santé, Vitry-sur Seine)
B. QUATANNENS (CIBP, Lille)
A.M. SCHMITT-VERHULST (Centre d'Immunologie, Marseille)
B. STADLER (Institut d'Immunologie clinique, Berne)
C. WALKER (Institut d'Immunologie clinique, Berne)

Avec le soutien financier de l'INSERM, du CNRS, de l'Institut Pasteur de Lille et de l'OMS.

A mon directeur de recherche,

Monsieur le Professeur CAPRON,

Dès mon entrée dans votre laboratoire, vous m'avez conseillée, encouragée et suivie avec une bienveillance constante. J'éprouve une grande fierté d'être l'un des chercheurs de votre équipe. Je tiens à vous exprimer ici toute mon admiration pour votre oeuvre scientifique, et toute ma reconnaissance pour le soutien que vous m'avez donné. Que ce travail soit aussi l'expression de ma profonde affection.

Monsieur le Professeur DESSAINT,

Vous êtes l'initiateur des travaux rapportés dans cette thèse et vous en avez suivi et guidé l'évolution . La qualité de votre enseignement m'a permis d'acquérir une formation en immunologie. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.

Monsieur le Professeur STADLER,

Les deux années passées dans votre laboratoire à Berne ont été riches d'enseignements. Votre compétence en immunologie cellulaire m'a permis d'élargir mes connaissances tant sur le plan théorique que pratique. Votre enthousiasme et votre dynamisme ont représenté pour moi une aide précieuse au cours de ce stage et j'espère que notre collaboration se poursuivra dans l'avenir. Je tiens à vous remercier et à vous assurer de ma sincère amitié.

Monsieur le Professeur CAMUS,

Votre départ du laboratoire a malheureusement mis fin à notre collaboration sur l'étude des propriétés biologiques du SDIF. Cependant, je tiens à vous associer à l'ensemble des travaux réalisés sur cette molécule et à vous dire l'importance de vos conseils et de vos encouragements dans le déroulement de ma carrière scientifique. Cette thèse est pour moi l'occasion de vous témoigner toute ma profonde amitié.

Je remercie Monsieur le Professeur J. MONTREUIL qui me fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse et Madame le Professeur G. SPIK qui a accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à :

- Brigitte QUATANNENS et Françoise DETOEUF qui par leur compétence technique et leur dynamisme ont largement contribué à la réalisation de ce travail.
- toutes les personnes qui ont assuré la préparation quasi-quotidienne du SDIF et en particulier Hubert CARON, Claude GODIN et Suzanne VAN WINGENE.
- tous les membres des laboratoires de Lille et de Berne qui m'ont aidée dans ce travail.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	6
RESUME	8
INTRODUCTION	11
RESULTATS	43
DISCUSSION ET CONCLUSION	125
MATERIEL ET METHODES	140
REFERENCES	158
TABLE DES MATIERES	182

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

ARNm: ARN messenger

Bq: Becquerel (1 Curie= 37 GBq)

BSA: "Bovine Serum Albumin"

CD: Cluster de différenciation

CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance

c.p.m.: coups par minute

Con A: Concanavaline A

CTL: "Cytotoxic T Lymphocytes"

DNBS: "Dinitro Benzene Sulfonic Acid"

DNP-: Dinitrophenyl-

EDTA: EthyleneDiamineTetraAcétique

HBSS: "Hank's Balanced Salt Solution"

IL-1, -2, -3: Interleukine 1, 2, 3.

MLC: "Mixed Lymphocyte Culture"

NK: "Natural Killer cell"

OVA: Ovalbumine

PBS: "Phosphate Buffered Saline"

PCA: "Passive Cutaneous Anaphylaxis"

PHA: Phytohemagglutinin A

P.M.: Poids Moléculaire

r.p.m.: révolution par minute

SDIF: "Schistosome Derived Inhibitory Factor"

SVF: Sérum de Veau Foetal

Thy: Thymidine

RESUME

RESUME

Les phénomènes d'immunosuppression observés au cours de la schistosomiase peuvent être expliqués par différents mécanismes dont la production par le parasite de substances immunomodulatrices. A cet égard, les schistosomes libèrent une substance de faible poids moléculaire (SDIF ou Schistosome Derived Inhibitory Factor) capable d'inhiber sélectivement la prolifération lymphocytaire. Le SDIF est capable d'induire chez des animaux sains une immunosuppression dont les caractéristiques sont les mêmes que celles observées chez les animaux infectés par S. mansoni.

Des tentatives de purification du SDIF ont conduit à l'obtention d'une préparation homogène de SDIF, contenant une molécule de P.M. 428. Mais la structure du SDIF n'a pas encore pu être déterminée.

Le SDIF exerce un effet inhibiteur sélectif sur la prolifération de lymphomes T. Cette sélectivité ne peut pas être attribuée à une différence dans la capacité des cellules à absorber l'activité SDIF. Les études faites au cytofluorographe montrent que le SDIF n'a pas d'effet sur les cellules en phase G0 du cycle cellulaire, ni sur la progression des cellules dans la phase G1 du cycle, et que le blocage des cellules a lieu au cours de la transition G1-S ou au début de la phase S du cycle cellulaire.

Une inhibition de la génération des lymphocytes cytotoxiques (CTL) et de cellules suppressives non spécifiques est observée in vitro en présence de SDIF. On observe une altération à la fois de la génération et de l'activité cytolytique des CTL sous l'action du SDIF. Un effet inhibiteur de la réponse anticorps IgE est obtenu in vivo par traitement avec le SDIF. Cet effet est observé aussi bien en réponse primaire que secondaire, et chez des rats bons ou mauvais producteurs d'IgE. Enfin, le SDIF inhibe la dégranulation mastocytaire in vitro et in vivo ainsi que l'activation des plaquettes.

L'efficacité du SDIF au cours de l'infection reste à démontrer mais il pourrait être une des explications de l'immunosuppression de même qu'il pourrait participer à la régulation de certains mécanismes effecteurs. Les propriétés biologiques de cette molécule permettent d'envisager des applications pharmacologiques dans plusieurs domaines.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La multiplicité des équipes de recherche travaillant actuellement dans le monde sur l'immunologie de la schistosomiase témoigne certainement du remarquable intérêt porté par les immunologistes à l'étude de cette parasitose. La bilharziose ou schistosomiase dont l'agent est le trématode Schistosoma atteint actuellement plusieurs centaines de millions d'individus dans des zones endémiques tropicales et subtropicales. Parmi les moyens de lutte envisagés pour éliminer ce fléau, l'obtention d'un vaccin constituerait bien évidemment une méthode de choix. Or il s'est très vite avéré que l'obtention de ce vaccin pose des problèmes particuliers liés à la nature de l'agent infectant. Le fait que les schistosomes soient des métazoaires donc des organismes complexes par rapport à d'autres agents comme les bactéries ou les virus et qu'ils soient des parasites a rendu indispensable, dans le but d'obtenir un vaccin efficace, de comprendre d'abord quels mécanismes régissent la réponse immunitaire de l'hôte parasité et surtout de trouver les moyens d'orienter cette réponse vers une immunité protectrice.

A côté de la stratégie vaccinale, les travaux sur l'immunologie de la schistosomiase ont également permis de répondre à des questions fondamentales concernant les relations hôte-parasite. En effet, la survie prolongée du parasite chez un hôte immunologiquement compétent est le résultat d'un équilibre complexe entre la réponse immunitaire de l'hôte visant à éliminer le parasite et un certain nombre de mécanismes qui vont permettre au parasite d'échapper à cette réponse ou tout au moins d'en limiter les effets. Dans le cas de la schistosomiase par exemple, les mécanismes de défense élaborés par l'hôte permettent d'empêcher partiellement une réinfection et donc limitent l'augmentation de la charge parasitaire qui pourrait être fatale à l'individu, mais les schistosomes de la première infection échappent aux mécanismes immunitaires qu'ils ont eux-mêmes suscités et survivent chez leur hôte pendant

de nombreuses années. Les recherches sur l'immunologie de la schistosomiase ont ainsi amené à une révision des notions concernant le parasitisme. Par exemple, l'existence de structures antigéniques communes entre les schistosomes, leur hôte intermédiaire, leur hôte définitif et des molluscidés plus éloignés dans la phylogénie témoigne d'un processus de conservation au cours de l'évolution. Ce processus pourrait être l'une des clés de la spécificité de l'adaptation du parasite à son hôte.

L'étude des relations hôte-parasite a permis de mettre en évidence de nouveaux concepts qui ont trouvé par la suite des applications en dehors de l'immunologie parasitaire. Par exemple, la mise en évidence de récepteurs pour l'IgE sur les macrophages, les éosinophiles ou les plaquettes a pour origine des observations réalisées dans le modèle parasitaire. Cette découverte a initié toute une série d'observations sur le rôle de ces cellules dans diverses pathologies liées à l'IgE. La mise en évidence du rôle effecteur des plaquettes au cours de la schistosomiase a été suivie par de nombreux travaux sur l'implication des plaquettes dans certaines pathologies. De même la production par les parasites de substances immunomodulatrices est un des mécanismes de défense du parasite, mais ces immunomodulateurs par leur capacité de stimuler ou d'inhiber de façon non spécifique le système immunitaire pourraient être utilisés comme agents pharmacologiques.

Les travaux décrits dans ce mémoire sont une illustration de cette démarche qui à partir d'observations faites dans le modèle parasitaire aboutit à une généralisation du concept et à des applications en dehors du cadre de l'immunologie parasitaire. Nous nous sommes intéressés à une molécule libérée par les schistosomes, molécule qui pourrait participer à l'un des mécanismes de défense du parasite en induisant chez l'hôte un état d'immunosuppression. Les propriétés de cette molécule analysées in vitro et in vivo permettent d'envisager

également des applications pharmacologiques dans plusieurs domaines de la pathologie.

1. CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'INFECTION

Suivant l'espèce de schistosome infectante, diverses pathologies peuvent être caractérisées: S. haematobium est responsable de la bilharziose uro-génitale, S. japonicum de la bilharziose artério-veineuse et S. mansoni provoque une symptomatologie intestinale et hépatique. C'est cette dernière espèce qui a été notre modèle d'étude.

Le cycle de S. mansoni fait intervenir deux hôtes. L'hôte intermédiaire, le mollusque Biomphalaria glabrata est infecté par les formes larvaires miracidiaes. Une maturation chez le mollusque faisant intervenir plusieurs stades intermédiaires conduit à la libération de cercaires, larves infectantes qui nagent et viennent au contact de la peau de l'hôte définitif. Lorsqu'elles pénètrent à travers la peau de leur hôte, les cercaires perdent leur queue et se transforment en schistosomules. Ceux-ci migrent peu à peu jusqu'au poumon puis au foie tout en évoluant vers le stade de ver adulte mâle ou femelle. Le mâle transporte la femelle lovée dans son canal gynécophore jusqu'aux petits vaisseaux mésentériques et ils s'arrêtent dans le colon et le rectum. Au cours de ce transport, la femelle pond des oeufs qui pourront s'accumuler dans les tissus, suscitant ainsi la formation de granulomes inflammatoires. Des oeufs pourront traverser la paroi intestinale pour être éliminés dans les selles. Dans l'eau douce, l'oeuf éclôt rapidement donnant un miracidium cilié qui pénètre chez l'hôte intermédiaire.

L'homme est l'hôte définitif naturel de S. mansoni mais l'approche expérimentale est facilitée par la possibilité d'utiliser différents modèles d'infection animale. Le degré de résistance à l'infection ainsi que les caractéristiques de l'immunité développée sont très variables suivant les hôtes

(KAGAN, 1958). Certains comme la souris ou le hamster sont totalement permissifs c'est à dire qu'ils permettent le développement du parasite jusqu'au stade adulte. Ils présentent très peu d'immunité et meurent dès le quarantième jour de l'infection. Le rat est un hôte semi-permissif chez qui les schistosomules évoluent jusqu'au stade adulte mais la quasi-totalité de la population parasitaire est rejetée vers les troisième-quatrième semaines d'infection. Ceci s'accompagne de l'établissement d'une forte immunité à la réinfection. L'homme est un hôte permissif mais il développe cependant une immunité à la réinfection dont les caractéristiques sont très proches de celles développées par le rat. Ceci explique le choix fait par notre laboratoire de la schistosomiase expérimentale du rat comme modèle de travail.

2. MECANISMES DE L'IMMUNITE.

Il ne s'agit pas ici de faire une étude complète de l'immunité dans la schistosomiase mais simplement d'en décrire les caractéristiques essentielles. Ceci devrait nous conduire à aborder d'une manière plus détaillée la description des mécanismes de régulation qui vont permettre au parasite d'échapper à cette réponse immunitaire ou tout au moins d'en limiter les effets les plus néfastes.

2.1. Caractéristiques de l'immunité

* Des expériences réalisées chez le singe Rhésus ont permis de montrer que l'immunité suscitée par la présence de vers adultes s'exerce non pas contre ces mêmes formes adultes mais seulement contre le jeune stade larvaire ou schistosomule (SMITHERS et TERRY, 1969). Cette immunité dite concomitante empêche une réinfection de l'hôte tout en maintenant chez celui-ci une charge parasitaire relativement stable. Ceci explique pourquoi les parasites survivent aussi longtemps chez un hôte immunocompétent sans qu'il y ait de surcharge parasitaire fatale. L'immunité concomitante existe également dans la schistosomiase humaine puisque MAC CULLOUGH et BRADLEY (1973) ont pu

montrer une remarquable stabilité du nombre d'oeufs émis au cours du temps chez un groupe d'enfants atteints par S. haematobium. Chez le rat, l'immunité apparaît au moment du rejet des vers c'est à dire à partir de la quatrième semaine d'infection (MADDISON et coll., 1970). On peut penser que le développement de l'immunité à la réinfection chez le rat soit la conséquence d'une libération massive d'antigènes résultant de la lyse des vers.

* L'immunité acquise présente des caractéristiques très particulières tant sur le plan humoral que cellulaire. Une forte production d'anticorps est observée au cours de l'infection. Cette réponse humorale est effectivement un facteur essentiel de l'immunité (SHER et coll., 1975) (BAZIN et coll., 1980) (CAPRON et coll., 1980) mais nécessite pour induire une protection significative la participation de cellules effectrices. On retrouve comme dans d'autres infections par helminthes au cours de la schistosomiase expérimentale ou humaine une importante production d'immunoglobulines de classe IgE (OGILVIE et coll., 1966) (SADUN et GORE, 1970). Parmi celles-ci seul un faible pourcentage correspond à des anticorps spécifiques du parasite (DESSAINT et coll., 1975) (ROUSSEAU et coll., 1978, 1980). Une corrélation est néanmoins observée entre le développement de l'immunité à la réinfection et la réponse IgE spécifique du parasite (ROUSSEAU et coll., 1978). Parmi les antigènes responsables de l'induction de la réponse IgE, deux molécules de 22 et 26 kDa présentes dans les produits d'incubation des schistosomules induisent la production d'IgE impliquées dans l'immunité protectrice (AURIAULT et coll., 1985). Une protéine de 28 kDa antigène de S. mansoni et considérée actuellement comme le meilleur candidat pour le vaccin induit également une réponse IgE protectrice (BALLOUL, communication personnelle).

Les IgE sont normalement produites en quantités limitées et sont soumises à un contrôle très strict qui est en partie spécifique de l'isotype. Il existe un premier niveau de contrôle génétique démontré par l'existence de

lignées de souris et de rats bonnes productrices ou mauvaises productrices d'IgE (LEVINE, 1971). Ce caractère bon ou mauvais producteur serait lié à l'existence plus ou moins développée de cellules T suppressives spécifiques de l'isotype IgE, dont la mission est de maintenir la production d'IgE à des taux faibles (WATANABE et coll., 1976). La synthèse des IgE par les lymphocytes B portant des IgE de surface est sous le contrôle des lymphocytes T. De nombreux facteurs solubles d'origine T contrôlant la synthèse des IgE ont été décrits (ISHIZAKA, 1984) (KATZ, 1980). Certains de ces facteurs ont une affinité pour l'IgE comme les "IgE-binding factor" décrits par ISHIZAKA. Les "IgE binding factor" auront une activité suppressive ou potentialisatrice suivant leur degré de glycosylation, cette dernière étant régulée aussi par d'autres facteurs d'origine T (revue par ISHIZAKA, 1984). Une lymphokine produite par les lymphocytes T CD-4 + appelée IL-4 possède aussi une activité amplificatrice de la réponse IgE (COFFMAN et coll., 1986). L'activité stimulante de l'IL-4 est totalement supprimée en présence d'interféron γ produit par une autre sous-population de lymphocytes T CD-4+ (COFFMAN et CARTY, 1986). On comprend donc l'extrême dépendance de la réponse IgE par rapport aux lymphocytes T. La production massive d'IgE au cours des helminthiases est le résultat d'une dysrégulation de ce système de contrôle. Il y aurait potentialisation de toutes les réponses IgE préexistantes à l'infection, ce qui expliquerait le faible pourcentage d'IgE de spécificités parasitaires par rapport à l'ensemble des IgE produites. Lorsque l'on infecte par Nippostrongylus brasiliensis des rats préalablement immunisés vis-à-vis d'un antigène non parasitaire, on déclenche une réponse IgE de type secondaire vis-à-vis de cet antigène (ORR et BLAIR, 1969) (JARRETT et STEWART, 1972). Des produits d'origine parasitaire seraient responsables de la potentialisation de la réponse IgE (STROMBERG, 1980). Une activité potentialisatrice modérée est observée avec des produits d'incubation de vers adultes de schistosomes (ROUSSEAU et coll., 1982). Une activité beaucoup plus marquée est retrouvée avec des produits d'incubation de schistosomules (VERWAERDE et coll., 1986). Il

s'agit de sérine protéases à activité de type kallikréine. Un des facteurs de stimulation de la glycolysation des "IgE binding factor", produit par des lymphocytes T, est également une enzyme de type kallikréine (IWATA et coll., 1983). La production par le parasite de facteurs capables de se substituer à des facteurs d'origine cellulaire pourrait expliquer la dysrégulation du système de contrôle de l'IgE.

* Des réactions d'hypersensibilité retardée contre des antigènes parasitaires ont pu être mises en évidence à certaines périodes de l'infection. Ces réactions peuvent s'observer vis-à-vis des schistosomules au niveau de la peau notamment mais elles ont particulièrement été étudiées au niveau hépatique où les oeufs suscitent la formation de granulomes inflammatoires responsables des manifestations pathologiques (DOMINGO et WARREN, 1967, 1968).

2.2. Les mécanismes effecteurs spécifiques

De multiples aspects de la réponse immunitaire apparaissent thymodépendants. Les animaux à fonction thymique déficiente, infectés par S. mansoni présentent une très faible résistance à la réinfection. Ceci s'accompagne d'une diminution des réactions d'hypersensibilité retardée, de l'hyperéosinophilie et de la production d'anticorps notamment de classe IgE (CAPRON M. et coll., 1983) (PHILIPPS et coll., 1983). Néanmoins, contrairement aux infections bactériennes et virales, les lymphocytes T ne semblent pas impliqués dans des mécanismes de cytotoxicité (BUTTERWORTH et coll., 1979). Bien que les schistosomules puissent acquérir à leur surface les antigènes du système majeur d'histocompatibilité nécessaires pour que les lymphocytes cytotoxiques (CTL) soient efficaces (SHER et coll., 1978), ceux-ci sont capables d'adhérer aux schistosomules mais pas de les tuer (BUTTERWORTH et coll., 1979) (VADAS et coll., 1979). Cette absence de cytotoxicité pourrait être due soit à une absence de génération des CTL, soit à une diminution de leur pouvoir cytolytique, soit à la nature de la cible, le schistosomule qui rendrait inefficace ou serait lui-même

réfractaire au mécanisme de cytolyse par CTL. Aucun argument expérimental ne permet pour l'instant de trancher en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses. ELLNER et coll. (1982) décrivent la capacité de lymphocytes périphériques de sujets sains stimulés par la phytohémagglutinine A de tuer les schistosomules. Il s'agirait d'une activité de type LAK ("Lymphocyte Activated Killer Cell") c'est à dire de cellules lymphocytaires à activité cytotoxique non spécifique. Ce travail est très critiqué et n'a pu être reproduit dans aucun autre laboratoire.

Par contre, des mécanismes de cytotoxicité tout à fait originaux dépendants d'anticorps ont été décrits. L'originalité de ces observations repose à la fois sur le type de cellules impliquées (cellules de l'inflammation et plaquettes) et sur le type d'anticorps concerné (anticorps anaphylactiques de classe IgE ou IgG_{2a} chez le rat). Ces mécanismes de cytotoxicité dont la cible est le stade larvaire ou schistosomule (revue par CAPRON et DESSAINT, 1985a) font donc intervenir:

- * des macrophages ou des monocytes en association avec des anticorps de classe IgE.

Des macrophages de rat sain incubés avec du sérum de rat immun adhèrent aux schistosomules et sont capables de les tuer. Par des expériences d'immunoabsorption la nature IgE des anticorps impliqués dans ce mécanisme a pu être démontrée (CAPRON et coll., 1975) (CAPRON et coll., 1977). Ces travaux suggéraient pour la première fois l'existence de récepteurs pour le Fc des IgE sur d'autres cellules que les mastocytes et les basophiles. Des études ultérieures ont effectivement permis de caractériser ce récepteur et de montrer que l'interaction de l'IgE avec son récepteur sur le macrophage conduit à l'activation de celui-ci (DESSAINT et coll., 1979a,b). Des monocytes humains ainsi que des macrophages de babouins incubés avec des sérums de sujets bilharziens sont également capables de tuer les larves (JOSEPH et coll., 1978).

- * des éosinophiles en coopération avec des mastocytes et des anticorps de classe IgE ou IgG.

Des éosinophiles humains incubés en présence d'anticorps IgG présents dans les sérums de sujets bilharziens, tuent les schistosomules (BUTTERWORTH et coll., 1975). Chez le rat, le même mécanisme a été décrit par M. CAPRON et coll. (1978). Deux types d'anticorps peuvent être incriminés, les IgG_{2a} qui représentent la seconde classe d'anticorps anaphylactiques chez le rat, et les IgE (CAPRON M. et coll., 1981a). De plus les mastocytes jouent le rôle de cellules accessoires dans ce système (CAPRON M. et coll., 1978). La dégranulation des mastocytes provoquée par leur interaction avec les anticorps anaphylactiques libère des facteurs dont certains comme le tétrapeptide ECFA ("eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis") sont activateurs des éosinophiles (CAPRON M. et coll., 1981b). L'existence d'un mécanisme de cytotoxicité dépendant d'IgE a maintenant été confirmée dans la schistosomiase humaine (CAPRON M., 1984) ainsi que les caractéristiques du récepteur de l'IgE sur les éosinophiles humains (CAPRON M. et coll., 1986a).

- * des plaquettes en association avec de l'IgE.

Plus récemment JOSEPH et coll. (1983) ont décrit le rôle cytotoxique que peuvent jouer les plaquettes vis-à-vis des schistosomules. Là encore, les anticorps IgE sont impliqués et ce mécanisme fonctionne aussi bien chez le rat que chez l'homme. Ces travaux tout à fait originaux ont conduit à la description d'un récepteur pour le Fc des IgE à la surface des plaquettes (CINES et coll., 1986) (JOSEPH et coll., 1986).

De plus, alors que les plaquettes semblaient surtout impliquées dans les processus de coagulation, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de ces cellules dans l'immunité (CAPRON et coll., 1985b) et en particulier dans certaines pathologies comme l'asthme à l'aspirine (AMEISEN et coll., 1985).

La participation de ces mécanismes in vivo dans l'immunité anti-parasitaire a été suggérée par un certain nombre de travaux. Des anticorps monoclonaux IgG_{2a} et IgE spécifiques d'antigènes de S. mansoni sont capables de conférer aux animaux receveurs une protection significative à une réinfection (GRYZCH et coll., 1982) (VERWAERDE et coll., 1987). Les cellules effectrices (macrophages, éosinophiles, plaquettes) prélevées chez des animaux infectés portent à leur surface les anticorps IgE ou IgG_{2a} et induisent par transfert passif des niveaux de protection significatifs chez les animaux receveurs (revue par M. et A. CAPRON, 1986b).

Toutes ces observations sur les mécanismes effecteurs ont obligé les immunologistes à reconsidérer le rôle des anticorps anaphylactiques qui était jusqu'alors limité à l'hypersensibilité immédiate. De plus, elles ont conduit à la description du récepteur de type II pour l'IgE sur les cellules inflammatoires et sur les lymphocytes (revue par CAPRON et coll., 1986), ce qui a permis de souligner l'importance insoupçonnée de certaines cellules (macrophages, éosinophiles et plaquettes) non seulement dans l'immunité anti-parasitaire mais également dans des processus immunopathologiques comme l'allergie. Par exemple, les macrophages possédant des récepteurs pour le Fc des IgE sont activés par des complexes immuns à IgE et libèrent de l'interleukine 1 (IL-1). Celle-ci a in vitro, par un mécanisme de rétrocontrôle positif, un effet stimulant sur la synthèse d'IgE (MAZINGUE et coll., 1987). Ce mécanisme pourrait constituer une boucle d'amplification d'une synthèse d'IgE précédemment induite. Dans des situations à haut taux d'IgE (parasitose ou allergie) des complexes à IgE pourraient activer le macrophage, ce qui conduirait à la libération d'IL-1 et à la stimulation de la synthèse d'IgE.

2.3. L'immunité non spécifique

A côté de ces mécanismes dit spécifiques car faisant intervenir des anticorps de spécificité parasitaire, il existe des mécanismes dit non spécifiques. Les macrophages sont capables de tuer des schistosomules sans l'intervention d'anticorps IgE s'ils ont été préalablement activés par une lymphokine appelée MIF ou "Macrophage Inhibitory Factor" (BOUT et coll., 1981). D'autres immunostimulants tels que le BCG ou le muramyl-dipeptide peuvent induire une forte résistance à l'infection ou à la réinfection (BOUT et coll., 1977) (MAHMOUD et coll., 1979). Ces mécanismes d'immunité non spécifique ont été particulièrement mis en évidence chez la souris. Leur importance dans l'infection humaine reste encore à démontrer.

L'activation du complément par la voie alterne au niveau de la membrane du schistosomule est responsable d'un effet schistosomicide (MACHADO et coll., 1975) (SANTORO et coll., 1979). Cet effet cytocide est amplifié lorsque des cellules possédant un récepteur pour le C3b, comme les éosinophiles, sont activés en présence de complément (OTTESEN et coll., 1977) (RAMALHO-PINTO et coll., 1978).

Des mécanismes de cytotoxicité faisant intervenir des cellules NK ("natural killer") ont été décrits chez la souris (ABE et coll., 1983) (ATTALAH et coll., 1980). Ces mécanismes n'ont jamais pu être mis en évidence chez le rat. De plus une forte diminution de l'activité NK est observée chez les patients atteints de bilharziose (FELDMEIER et coll., 1985).

Enfin, les plaquettes dont on a vu précédemment qu'elles pouvaient être activées par de l'IgE, peuvent aussi être rendues cytotoxiques in vitro vis-à-vis des larves sous l'action de la protéine C-réactive (protéine de l'inflammation) (BOUT et coll., 1986) ou sous l'action de lymphokines en particulier d'interféron γ (PANCRE et coll., 1987). La participation de ce mécanisme in vivo est probable car

des cellules T "helper" (CD-4+) d'animaux infectés ou de sujets bilharziens produisent ces lymphokines après interaction avec de l'antigène de S. mansoni. De plus, des plaquettes de rat incubées avec de l'interféron γ puis transférées à un animal infecté confèrent à celui-ci une immunité protectrice (PANCRE, communication personnelle).

Cette brève description des mécanismes de l'immunité dans la schistosomiase amène quelques réflexions. Même si les informations données par les études réalisées in vitro restent fragmentaires, il n'en demeure pas moins qu'elles ont permis d'analyser précisément ces mécanismes. Par ailleurs de nombreux arguments expérimentaux laissent penser que ces mécanismes in vitro sont le reflet de ce qui se passe réellement au cours de l'infection. La connaissance de ces mécanismes a permis d'analyser les antigènes de la surface du schistosomule reconnus par les anticorps anaphylactiques, ces antigènes cibles des mécanismes effecteurs étant par définition des antigènes potentiellement vaccinaux. Nous ne décrivons pas ici ces antigènes dont certains sont déjà en phase d'expérimentation vaccinale chez les primates et les bovidés. Cependant, l'étude de l'immunité ne serait pas complète si elle ne tenait pas compte de l'existence de mécanismes de régulation qui vont permettre au parasite de se défendre contre la réponse immunitaire de son hôte.

3. MECANISMES DE DEFENSE DU PARASITE

Malgré la diversité et l'efficacité des mécanismes effecteurs précédemment décrits, le parasite de première infection survit chez son hôte souvent pendant de très nombreuses années. Ceci est probablement le résultat d'un équilibre subtil entre les mécanismes effecteurs élaborés par l'hôte et des mécanismes de défense mis en oeuvre par le parasite pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Les parasites présentent par rapport aux autres agents infectieux certaines particularités qui peuvent expliquer cette survie prolongée.

Certains parasites ont une localisation intracellulaire ou à l'intérieur d'un kyste tandis que d'autres ont une structure membranaire très complexe, ce qui dans les deux cas les protège des réactions immunitaires. Des produits d'excrétion et de sécrétion parasitaire (antigéniques ou non) contribuent à la modulation du système immunitaire de l'hôte. Les structures antigéniques des parasites sont par ailleurs soumises à des variations au cours du cycle évolutif se traduisant par exemple chez les helminthes par l'expression d'antigènes spécifiques de stade.

Dans le cas des schistosomes, certains des mécanismes de défense du parasite ont pour but de neutraliser les mécanismes effecteurs spécifiques ou non spécifiques de façon à permettre le développement des schistosomules après leur pénétration tandis que d'autres mécanismes permettent la survie du parasite adulte en affectant sa susceptibilité aux mécanismes effecteurs et/ou la réactivité globale du système immunitaire de l'hôte.

3.1. Acquisition d'antigènes d'hôte

Les observations initiales réalisées par DAMIAN (1964,1967) puis par CAPRON et coll. (1965) ont montré l'existence de déterminants antigéniques communs entre le schistosome et leur hôte vertébré. L'acquisition de ces antigènes se fait chez le schistosomule dans les quinze jours qui suivent la pénétration des larves chez leur hôte (CLEGG et SMITHERS, 1971). Des antigènes de groupe sanguin en particulier des glycolipides, des glycoprotéines, l' α 2 macroglobuline, des immunoglobulines ainsi que des déterminants du système majeur d'histocompatibilité ont pu ainsi être caractérisés à la surface du parasite (DEAN et SELL, 1972) (DEAN, 1974) (GOLDRING et coll. 1976) (DAMIAN et coll., 1973) (KEMP et coll., 1977) (SHER et coll., 1978).

Le mécanisme d'acquisition de ces antigènes n'est pas clairement démontré. Diverses hypothèses ont été avancées mais aucune démonstration

expérimentale n'a pu confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses. On peut cependant comprendre que la présence de ces antigènes à la surface du parasite puisse le protéger des réactions immunitaires de l'hôte. L'acquisition des antigènes d'hôte est d'ailleurs en corrélation avec l'acquisition de la résistance aux mécanismes effecteurs (CLEGG et SMITHERS, 1972).

3.2. Présence de récepteurs ou d'accepteurs à la surface des schistosomules.

La présence à la surface des schistosomules d'un accepteur pour le Fc des IgG a été montré par des techniques de rosette (TORPIER et coll., 1979). Cette observation s'est avérée particulièrement intéressante puisque la fixation des IgG sur cet accepteur est suivie d'une protéolyse des IgG par des enzymes d'origine parasitaire, une sérineprotéase et une aminopeptidase (AURIAULT et coll., 1981a). Les peptides libérés lors de cette protéolyse ont une activité inhibitrice des fonctions macrophagiques se traduisant par une diminution de la libération des enzymes lysosomales, de l'incorporation de glucosamine, de la génération d'anion superoxyde et de la phagocytose. Ils sont en particulier capables d'inhiber la cytotoxicité des macrophages dépendante d'IgE (AURIAULT et coll., 1980)(AURIAULT et coll., 1981b). L'activité inhibitrice de ces produits de clivage est essentiellement due à un tripeptide de structure Thr-Lys-Pro (TKP) contenu dans le second domaine constant des IgG (AURIAULT et coll., 1983b). Par sa capacité d'inhibition des fonctions macrophagiques, ce tripeptide pourrait participer à la régulation de mécanismes effecteurs spécifiques et non spécifiques dans l'environnement direct des schistosomules. Il représente également un exemple de molécules d'origine parasitaire dont on peut espérer élargir le champ d'action et trouver des applications pharmacologiques. L'utilisation du TKP comme agent anti-inflammatoire est actuellement en cours d'étude.

3.3. Récepteurs pour le complément

La présence d'accepteurs pour le C1q (SANTORO et coll., 1980) (OUASSI et coll., 1981) et le C3b (OUASSI et coll., 1980) à la surface du stade larvaire a été caractérisée. Ces structures disparaissent très rapidement au cours de l'évolution des schistosomules. Elles ne sont déjà plus détectables au moment où les schistosomules sont au niveau du poumon (DIAS DA SILVA et KAZATCHKINE, 1980). Les schistosomules sont par ailleurs capables d'activer le complément à la fois par la voie classique et par la voie alterne (SANTORO et coll., 1980) mais sans que ces récepteurs soient impliqués. Par contre, FEARON (1980) attribue un rôle inhibiteur de la cascade d'activation du complément aux récepteurs, ce qui pourrait représenter une possibilité de régulation des mécanismes effecteurs dépendants du complément.

3.4. Régulation de la fonction des mastocytes

Les mastocytes n'ont pas de fonction effectrice directe sur les schistosomules, mais l'histamine libérée lors de la dégranulation mastocytaire a une fonction régulatrice de sous-populations lymphocytaires possédant le récepteur correspondant (ROCKLIN et coll., 1979). Des médiateurs libérés par les mastocytes sont également nécessaires à l'activation des éosinophiles qui pourront alors tuer les schistosomules (CAPRON M. et coll., 1978). Les taux d'IgE produites au cours de l'infection sont considérables et leur interaction avec les mastocytes devrait être responsable de réactions anaphylactiques permanentes, ce qui serait d'ailleurs incompatible avec une survie de l'hôte. Au contraire, peu de manifestations allergiques sont observées chez les sujets parasités. Une association négative entre le parasitisme et l'allergie dans les zones d'endémie a même été décrite (ANDERSON, 1974) (GODFREY, 1975). Les études épidémiologiques sont assez contradictoires sur ce sujet, mais il apparaît clairement qu'il n'y a en tout cas pas d'incidence plus élevée des réactions anaphylactiques dans les zones endémiques (revue par JARRETT et MILLER,

1982). Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation soit au niveau de l'interaction entre l'IgE et les récepteurs sur les cellules effectrices de l'hypersensibilité immédiate, soit au niveau de l'efficacité des cellules effectrices elles-mêmes. Une compétition entre les IgE de différentes spécificités pour la fixation sur les récepteurs mastocytaires est l'une des hypothèses envisagées. JARRETT et coll. (1971) ont montré que des réactions cutanées passives sont inhibées par préincubation avec des sérums de rats infectés par Nippostrongylus brasiliensis. Cependant les mêmes auteurs ont obtenu des résultats opposés en travaillant non plus en sensibilisation passive, mais directement chez des animaux immunisés (JARRETT et coll., 1980). Dans cette situation plus proche de la réalité, des animaux hyperimmunisés vis-à-vis d'un allergène ne sont pas protégés des réactions cutanées ou du choc anaphylactique par les IgE non spécifiques induites par l'infection parasitaire. La présence d'anticorps bloquants IgG a été aussi évoquée (OTTESEN et coll., 1981) mais ils agiraient plus en complexant les antigènes dans la circulation qu'en entrant en compétition avec les IgE à la surface du mastocyte. Cette hypothèse nous semble peu vraisemblable car les quantités d'antigène nécessaires pour faire dégranuler les mastocytes sont minimales. Enfin, une diminution de la réactivité mastocytaire pourrait aussi être un moyen de contrôler l'amplitude des réactions anaphylactiques. Nous verrons qu'un facteur d'origine parasitaire peut inhiber la dégranulation mastocytaire (MAZINGUE et coll., 1980). Le phénomène de désensibilisation doit aussi être pris en ligne de compte. Il s'agit après une exposition à l'antigène d'une période transitoire pendant laquelle le mastocyte n'est pas capable de dégranuler (SOBOTKA et coll., 1979). Ceci a été attribué soit à une endocytose ou une élimination des IgE à la surface des cellules, soit à une perturbation temporaire des flux calciques (DEMBO et GOLDSTEIN, 1980). Dans le cas d'une infection parasitaire, la constante exposition aux allergènes parasitaires pourrait effectivement entraîner cette désensibilisation endogène.

3.5. Regulation de la fonction des éosinophiles

Lors de la mise en évidence du mécanisme de cytotoxicité faisant intervenir les éosinophiles en association avec des anticorps de classe IgE ou IgG_{2a}, il est apparu que ce mécanisme était plus ou moins efficace à différentes périodes de l'infection (CAPRON M. et coll., 1979). L'incapacité des éosinophiles de rats infectés depuis 10 semaines à tuer les schistosomules a pu être reliée au blocage de leurs récepteurs pour le Fc des immunoglobulines par des complexes immuns. Au cours de la schistosomiase humaine, des complexes immuns peuvent aussi inhiber le mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles et d'IgG (BUTTERWORTH et coll., 1977).

L'existence d'anticorps bloquants capables d'inhiber la cytotoxicité des éosinophiles a été démontrée à la fois chez le rat et chez l'homme, mais il semblerait que dans ces deux modèles, les isotypes des anticorps bloquants ne soient pas les mêmes. Un anticorps monoclonal de rat d'isotype IgG_{2c} spécifique d'un antigène 38 kDa de la surface du schistosomule, non cytotoxique par lui-même, bloque l'activité cytotoxique de l'anticorps IgG_{2a} de même spécificité (GRYZCH et coll., 1984). Cet effet inhibiteur de l'IgG_{2c} est confirmé in vivo car l'injection de cet anticorps inhibe fortement la protection induite par le traitement avec l'IgG_{2a}. Chez l'homme, une étude réalisée chez un groupe d'enfants bilharziens a montré que deux catégories peuvent être individualisées suivant l'état de leur immunité. Après traitement certains enfants présentent une forte sensibilité à la réinfection, tandis que d'autres y sont relativement résistants (BUTTERWORTH et coll., 1984, 1985). La cytotoxicité des éosinophiles induite par incubation avec des sérums bilharziens est très variable suivant les donneurs. Cependant un travail récent montre que la déplétion de sérums bilharziens en IgM permet de restaurer la cytotoxicité des éosinophiles. La quantité d'anticorps bloquants d'isotype IgM est plus importante dans les sérums d'enfants sensibles que dans les sérums d'enfants résistants. Il semblerait donc

que l'immunité existe dans les deux groupes mais que son expression soit bloquée chez les sujets sensibles par la présence de ces anticorps (KHALIFE et coll., 1986). Il est possible que d'autres isotypes aient aussi un pouvoir bloquant mais ceci reste à démontrer. Ces résultats ont une importance considérable car dans le cadre d'une vaccination, il faudra orienter la réponse humorale vers la production d'anticorps effecteurs et limiter la production d'anticorps bloquants.

Par contre, des produits d'excrétion du schistosomule ont une activité stimulante sur les éosinophiles en augmentant à la fois l'expression des récepteurs pour le Fc des IgG et leur activité cytotoxique vis-à-vis des schistosomules. Une activité protéasique de type collagénase présente également chez le ver adulte est le support de cet effet amplificateur (AURIAULT et coll., 1983a).

3.6. Régulation de la fonction des plaquettes

Une lymphokine (PASL ou Platelet Activation Suppressive Lymphokine) libérée lors de l'activation de lymphocytes T CD-8+ possède une activité inhibitrice de la cytotoxicité plaquettaire (PANCRE et coll., 1986). Cette inhibition s'exerce aussi bien sur des plaquettes activées par des anticorps IgE que par de l'interféron γ . L'activité globale d'un surnageant de cellules T non fractionnées en CD4 et CD8 est d'ailleurs inhibitrice, ce qui montre que l'activité PASL domine l'activité interféron γ . Des plaquettes de rats infectés (prélevées au moment où elles sont cytotoxiques) incubées in vitro avec de la PASL puis transférées à des animaux infectés ne confèrent pas de protection contrairement à des plaquettes non traitées (PANCRE, communication personnelle).

Les mécanismes de régulation décrits précédemment visent à diminuer l'efficacité des mécanismes effecteurs, soit par la modification de la surface de la cible que constitue le schistosomule, soit en diminuant le pouvoir cytotoxique des cellules effectrices. A côté de ces mécanismes, on peut observer chez

l'hôte parasité un état d'immunosuppression qui affecte de façon générale le système immunitaire. Etant donné que mes travaux personnels concernent l'immunosuppression, une description plus détaillée de ce processus au cours de différentes infections parasitaires sera abordée dans le chapitre suivant.

4. ETABLISSEMENT DE L'IMMUNOSUPPRESSION

L'existence d'un état d'immunosuppression chez l'hôte parasité a été observée au cours de multiples infections parasitaires (CAPRON et coll., 1977b) (revue par TERRY et HUDSON, 1982). Il ne s'agit pas ici de faire une étude exhaustive de l'immunosuppression dans toutes les infections parasitaires. Nous avons seulement décrit ici les faits les plus marquants, qui permettent d'illustrer les divers mécanismes mis en jeu. L'immunosuppression est particulièrement prononcée au cours de la malaria et de la trypanosomiase mais s'observe également dans les infections à helminthes et en particulier dans les schistosomiasis expérimentales et humaines. La méthodologie employée pour caractériser l'immunosuppression est la même dans tous les modèles d'infection. La production d'anticorps vis-à-vis d'un antigène homologue ou hétérologue est suivie chez l'animal infecté. Des tests cutanés in vivo et des tests de prolifération lymphocytaire in vitro permettent d'apprécier la réponse à médiation cellulaire. La capacité de rejeter des greffes allogéniques ou de faire une réponse de type greffon contre hôte constituent également des critères d'appréciation de l'immunosuppression. Enfin la résistance d'un animal parasité vis-à-vis d'une autre infection parasitaire, bactérienne ou virale ou du développement de tumeurs est souvent étudiée. Nous décrirons dans un premier temps les manifestations connues de l'immunosuppression au cours de diverses infections parasitaires. Nous nous limiterons aux modèles qui ont permis d'en analyser les mécanismes et en insistant sur l'immunodépression dans la schistosomiase. Puis nous tenterons d'analyser les mécanismes qui peuvent être responsables de l'altération de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

4.1. Caractéristiques de l'immunosuppression

4.1.1. Immunosuppression associée aux infections par Plasmodium

Une faible réponse humorale à divers antigènes est observée dans les populations infectées par Plasmodium ainsi que expérimentalement chez les souris infectées en phase chronique (MAC GREGOR et BARR, 1962) (SALAMAN et coll., 1969) (revue par TERRY et HUDSON, 1982).

La diminution de l'immunité à médiation cellulaire apparaît variable selon l'agent infectant, l'infection par Plasmodium berghei ayant un effet plus marqué que l'infection par Plasmodium yoelii. Une diminution de la réponse lymphocytaire à la PHA a été observée au cours des infections par P. berghei chez la souris (JAYAWARDENA et coll., 1975) et le rat (SPIRA et coll., 1976). Les réactions d'hypersensibilité retardée ainsi que l'hypersensibilité de contact sont également affectées (JAYAWARDENA et coll., 1975) (LIEW et coll., 1979).

Les souris infectées par P. yoelii ou P. berghei présentent une sensibilité accrue au développement de sarcomes (SALAMAN et coll., 1969) et de lymphomes (WEDDERBURN, 1970) (BOMFORD et WEDDERBURN, 1973) (JERUSALEM, 1968). Un retard dans le rejet de greffes cutanées est également observé chez ces animaux (SENGERS et coll., 1971). De plus, l'étude histologique de différents organes lymphoïdes montre une diminution du nombre de cellules T et B et une augmentation des cellules "nulles" (KRETTLI et NUSSENWEIG, 1974). Enfin, l'infection par Plasmodium est associée à une susceptibilité accrue vis-à-vis d'infections concomitantes à trypanosomes (COX, 1975) (COX, 1976).

4.1.2. Immunosuppression associée aux infections par trypanosomes

L'immunodépression au cours de la trypanosomiase africaine se manifeste par une diminution de la réponse anticorps aux xénoantigènes (GOODWIN et coll., 1972) (FREEMAN et coll., 1973) (MURRAY et coll., 1973) (LONGSTAFFE, 1974). L'altération de l'immunité à médiation cellulaire semble plus difficile à mettre en

évidence bien qu'une diminution de la réponse proliférative aux mitogènes T et B ait pu être observée (JAYAWARDENA et WAKSMAN, 1977) (CORSINI et coll., 1977). Une immunodépression sévère a été montrée chez des patients infectés par Trypanosoma gambiense agent de la maladie du sommeil, avec en particulier une très forte réduction des réactions d'hypersensibilité retardée (GREENWOOD et coll., 1973).

La situation est très comparable dans la trypanosomiase américaine dont l'agent est Trypanosoma cruzi. Les altérations observées sont les suivantes: diminution de la réponse des lymphocytes T et B aux mitogènes (ROWLAND et KUHN, 1978) (RAMOS et coll., 1979), diminution de la réponse aux antigènes thymodépendants et indépendants (CLINTON et coll., 1975) (SCHMUNIS et coll., 1977) CUNNINGHAM et coll., 1978) RAMOS et coll., 1978), dépression de l'immunité à médiation cellulaire (REED et coll., 1977).

4.1.3. Immunodépression au cours des trichinoses

L'infection de la souris par Trichinella spiralis entraîne une diminution de la réponse anticorps au virus de l'encéphalite japonaise B (CYPES et coll., 1973) et aux globules rouges de mouton (FAUBERT et TANNER, 1971) ainsi qu'une survie prolongée des greffes allogéniques cutanées (SVET-MOLDAVSKY et coll., 1970) (CHERNYAKHOVSKAYA et coll., 1972).

4.1.4. Immunodépression au cours de la schistosomiase

Une diminution de la réponse anticorps suivant une immunisation par des globules rouges de mouton (MOTA-SANTOS et coll., 1976) ou par de la toxine tétanique (BRITO et coll., 1976) est observée chez les souris infectées par Schistosoma mansoni. De même la capacité de produire des anticorps vis-à-vis d'antigènes thymodépendants est altérée chez les patients en phase chronique de la maladie (NASH et coll., 1978).

La réponse à médiation cellulaire apparaît également modulée au cours de l'infection. Chez la souris, la réactivité des cellules T à des mitogènes non spécifiques est diminuée à partir de la troisième semaine d'infection (PELLEY et coll., 1976). Ceci est associé avec une diminution de la fonction "helper" des lymphocytes T (RAMALHO-PINTO et coll., 1976). Des observations similaires ont été réalisées dans la schistosomiase expérimentale du rat. Une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes aux mitogènes et à différents antigènes est observée à partir de la quatrième semaine d'infection. Les réactions d'hypersensibilité retardée sont également diminuées à partir de cette période (CAMUS et coll., 1979). Chez l'homme, il faut distinguer les phases aiguë et chronique de la maladie. Alors que des lymphocytes de sujets en phase aiguë répondent de façon intense aux antigènes parasitaires, les cellules de patients en phase chronique présentent peu ou pas de réponse vis-à-vis des mêmes préparations antigéniques (OTTESEN et coll., 1976) (OTTESEN et coll., 1978). Cependant des résultats contradictoires montrent certes une diminution de la réactivité lymphocytaire vis-à-vis de l'antigène d'oeuf mais aussi une augmentation de la réactivité à l'antigène de ver adulte et de cercaire proportionnelles avec la durée de l'infection (COLLEY et coll., 1977a). Ceci peut s'expliquer par la très grande variabilité individuelle de la réactivité lymphocytaire ainsi que par la difficulté de connaître de façon précise les conditions d'infection et l'état clinique de certains patients. Une étude réalisée sur 29 enfants soudanais fortement infectés par Schistosoma mansoni et Schistosoma haematobium montre l'existence chez ces enfants d'un syndrome immunodéficitaire acquis important. Le compartiment lymphocytaire T est numériquement réduit alors que le compartiment lymphocytaire B augmente. La réponse proliférative à la Concanavaline A ainsi que le rapport OKT-4/OKT-8 (T helper/ T suppresseur+ T cytotoxique) diminuent (GASTL et coll., 1984). Une déficience dans la production d'interleukine 2 par ces lymphocytes ainsi qu'une diminution de l'activité des cellules "natural Killer" ont pu être caractérisées

(FELDMEIER et coll., 1985a et b). Chez les sujets fortement infectés par Schistosoma haematobium (WILKINS et BROWN, 1977) ou Schistosoma mansoni (KAMAL et HIGASHI, 1982), l'hypersensibilité retardée cutanée à différents antigènes et la réactivité des lymphocytes in vitro à la phytohémagglutinine (PHA) sont fortement diminuées et témoignent d'une atteinte de l'immunité cellulaire.

L'une des réactions d'hypersensibilité retardée les plus caractéristiques au cours de la schistosomiase est constituée par la formation de granulomes autour des oeufs de schistosomes. Ces formations sont le résultat d'une interaction entre des cellules immunocompétentes et les oeufs de schistosomes (WARREN et coll., 1967). Les composants histologiques de ces granulomes sont principalement des macrophages, des lymphocytes, des cellules épithéliales et fibroblastiques et une quantité importante d'éosinophiles (VON LICHTENBERG, 1962) (MOORE et coll., 1976). L'intensité de la réponse de l'hôte vis-à-vis des oeufs de parasite diminue fortement dans la phase chronique de la maladie, ce qui se traduit par une réduction de la taille du granulome (BOROS et coll., 1975). La modulation du granulome observée à la fois chez la souris et l'homme est le reflet non pas d'une modification de l'antigénicité des oeufs mais bien d'un changement du statut immunitaire de l'hôte.

L'altération des défenses immunitaires de l'hôte parasité et en particulier la diminution de l'immunité à médiation cellulaire laissent penser que la survie de greffes allogéniques doit être prolongée chez un sujet parasité. CAPRON et coll. (1972) ont ainsi pu montrer que des greffes tumorales se développent de façon plus importante chez des hamsters infectés par Schistosoma mansoni, à condition que l'infection soit antérieure à l'administration des cellules tumorales. De même des greffes de peau allogéniques sont facilitées chez des individus présentant une schistosomiase chronique (ABOUL-ENEIN et coll., 1982).

L'augmentation de la sensibilité aux infections parasitaires, bactériennes ou virales représente une autre conséquence de l'altération du système immunitaire de l'hôte parasité. Cette hypothèse a été illustrée de façon tout à fait originale par les expériences de HAQUE et coll. (1981). Le rat est normalement un hôte résistant à l'infection par la filaire Dipetalonema viteae. Les larves n'atteignent jamais le stade adulte et aucune microfilarémie sanguine ne peut être détectée dans ces conditions. Par contre chez des rats athymiques ainsi que chez des rats préalablement infectés par Schistosoma mansoni, on observe le développement de vers adultes et l'apparition de microfilaires dans la circulation. Il faut pour obtenir ce résultat faire coïncider la période d'immunosuppression induite par l'infection par Schistosoma mansoni avec la maturation sexuelle des larves de filaires. Les infections à Plasmodium berghei (YOELI, 1956), à Trypanosoma cruzi (KLOETZEL et coll., 1973), à Listeria (COLLINS et coll., 1972) sont également favorisées chez les animaux atteints de schistosomiase.

4.2. Les mécanismes de l'immunosuppression

Plusieurs mécanismes sont suggérés pour expliquer l'immunodépression. Suivant les infections, les mécanismes seront différents et il est même probable que plusieurs mécanismes soient impliqués au cours d'une même infection.

4.2.1. Compétition antigénique

La compétition antigénique entraîne la suppression d'une réponse immune à un antigène par l'administration préalable d'un autre antigène non apparenté. Lors d'une infection parasitaire, il est évident que la décharge antigénique est considérable et que la nature des antigènes libérés par le parasite varie avec l'évolution de celui-ci chez son hôte (antigènes de stade pour les métazoaires ou variation antigénique pour certains protozoaires). Peu d'arguments expérimentaux permettent d'impliquer le phénomène de compétition antigénique dans

l'établissement de l'immunosuppression. Cependant une déficience des macrophages dans leur capacité de présenter l'antigène a été observée au cours du paludisme (LOOSE et coll., 1972) (WARREN et WEIDANZ, 1976) et de la trypanosomiase (MURRAY et coll., 1974) (BAGASRA et coll., 1981). Cette déficience pourrait être liée à une compétition pour la présentation des antigènes à la surface du macrophage.

4.2.2. Stimulation de cellules suppressives non spécifiques

L'existence de cellules T suppressives non spécifiques ou de macrophages supprimeurs, responsables de l'altération de l'immunité a été décrite au cours de différentes infections. Les études effectuées sur le paludisme humain et expérimental ont surtout montré une stimulation de macrophages ayant une fonction suppressive (CORREA et coll., 1980) (PLAYFAIR, 1980). La participation de macrophages supprimeurs est également évoquée dans l'infection par T. cruzi (CUNNINGHAM et KUHN, 1980a et b) et par T. brucei (CORSINI et coll., 1977) (GROSSKINSKY et ASKONAS, 1981). La libération par ces macrophages activés de substances immunomodulatrices pourrait expliquer leur fonction suppressive. En effet, des taux élevés d'interféron α sont retrouvés chez des animaux infectés par P. berghei (HUANG et coll., 1968) ou par T. cruzi (RYTEL et MARSDEN, 1970). Les prostaglandines E2 (BANCROFT et ASKONAS, 1982) ainsi que l'interleukine 1 (WYLER, 1979) (CLARK et coll., 1981) pourraient également être impliquées dans la suppression macrophagique. D'autres auteurs montrent au contraire l'implication de cellules T suppressives (JAYAWARDENA et WAKSMAN, 1977). Une déficience de la fonction T "helper" a été caractérisée au cours de la trypanosomiase à T. cruzi (REED et coll., 1984) liée à une incapacité des cellules T d'animaux infectés à produire et à répondre à l'interleukine 2 (HAREL-BELLAN et coll., 1983). Des populations suppressives non spécifiques peuvent être induites in vitro sous l'action d'antigènes d'Onchocerca volvulus (OUASSI et coll., 1983). Enfin, des cellules T suppressives capables de supprimer une réponse

anticorps ont été observées chez des souris infectées par T. spiralis (JONES et coll., 1976).

Au cours de la schistosomiase, PELLEY et coll. (1976) pensent que la ponte des oeufs qui coïncide avec le début de la suppression de la prolifération lymphocytaire T, représenterait un fort stimulus antigénique capable d'induire la formation d'une population de cellules T suppressives. Chez des sujets atteints de la forme hépatosplénique de la maladie, des cellules spléniques T suppressives ont également été caractérisées (ELLNER et coll., 1980). Des cellules suppressives adhérentes peuvent aussi jouer un rôle dans l'établissement de l'immunosuppression (TODD et coll., 1979) (OTTESEN, 1979). Certains antigènes parasitaires induisent une libération d'histamine qui in vitro tout au moins inhibe la prolifération lymphocytaire (HOFSTETTER et coll., 1983).

Les populations cellulaires impliquées dans la modulation du granulome chez la souris seraient des lymphocytes T possédant les marqueurs Lyt 2+ Ia+ I-J+ et sensibles à l'action de la cyclophosphamide (COLLEY, 1976) (COLLEY et coll., 1979a) (CHENSUE et BOROS, 1979) (GREEN et COLLEY, 1981). Cette population suppressive présente chez la souris en phase chronique de la maladie inhiberait la production du facteur inhibiteur de la migration (MIF) nécessaire au recrutement des macrophages au site inflammatoire (CHENSUE et coll., 1980) (CHENSUE et coll., 1983). L'activité suppressive est supportée par un facteur soluble à spécificité anti-idiotypique (ABE et COLLEY, 1984). En réalité des interactions complexes entre différents types de cellules suppressives seraient responsables de la modulation du granulome (CHENSUE et coll., 1981). Des cellules portant des récepteurs pour l'histamine (lymphocytes et macrophages) présentes dans le granulome pourraient aussi exercer une activité suppressive après activation via le récepteur correspondant (WEINSTOCK et coll., 1983). Par ailleurs, des lymphocytes T de patients bilharziens en phase chronique sont restimulables in vitro par les idiotypes portés par des anticorps dirigés contre des antigènes d'oeufs de S. mansoni. Une population lymphocytaire à spécificités

anti-idiotypiques se développe donc au cours de l'infection (LIMA et coll., 1986). La fonction de cette population reste à déterminer.

Au cours de la schistosomiase expérimentale du rat, la présence d'une population T suppressive a été démontrée à partir de la quatrième semaine d'infection, ce qui correspond à la période de non réactivité lymphocytaire des rats infectés (CAMUS et coll., 1979). Outre des cellules suppressives, diverses expériences montrent la présence de facteurs sériques supprimeurs inhibant spécifiquement la réponse aux antigènes parasitaires (COLLEY et coll., 1977b) (OTTESEN et POINDEXTER, 1980). Certains de ces facteurs pourraient être des complexes immuns (ROCKLIN et coll., 1980).

4.2.3. Activation polyclonale des lymphocytes B

Alors que dans la plupart des infections parasitaires évoquées précédemment la capacité de produire des anticorps vis-à-vis d'antigènes non parasitaires est fortement diminuée, paradoxalement une hyperimmunoglobulinémie est souvent constatée au cours de ces infections (HOUBA et ALLISON, 1966). Il s'agit d'une production massive d'immunoglobulines de spécificité non parasitaire, IgM au cours de la trypanosomiase, IgG et IgM au cours de la malaria et IgE au cours des helminthiases (COHEN, 1974). Certains de ces anticorps réagissent en particulier avec des antigènes homologues mais en dépit de la présence de ces autoanticorps, l'incidence des maladies auto-immunes n'est pas plus grande dans les zones endémiques. GREENWOOD (1974) suggère que l'hyperglobulinémie soit le résultat d'une activation polyclonale des lymphocytes B. Une substance mitogène d'origine parasitaire stimulerait les lymphocytes B, ce qui conduirait à une synthèse désordonnée d'immunoglobulines. Des activités mitogéniques ont effectivement été retrouvées dans les surnageants de globules rouges humains infectés par P. falciparum (GREENWOOD et VICK, 1975) et dans des extraits de T. brucei et de T. congolense (ESURUOSO, 1976) (MANSFIELD et coll., 1976). Le phénomène d'expansion polyclonale des lymphocytes B est en

relation étroite avec l'immunosuppression car la phase de synthèse anarchique d'immunoglobulines est suivie d'un épuisement des cellules B réactives qui seraient alors incapables de répondre aux stimuli antigéniques (CORSINI et coll., 1977). En effet, MOLLER (1977) a montré que l'action simultanée de deux mitogènes à des doses optimales pouvait résulter en une absence de stimulation.

4.2.4. Modulation de la réponse immunitaire par des facteurs d'origine parasitaire.

Peu d'exemples de facteurs ayant une activité suppressive directe sur la production d'anticorps sont connus dans les infections par protozoaires. Un métabolite du tryptophane, le tryptophol (indole-3-ethanol) synthétisé par les trypanosomes inhibe la production d'anticorps chez des souris immunisées par des globules rouges (ACKERMAN et SEED, 1976). Des fractions solubles de T. musculi et T. lewisi peuvent également jouer un rôle immunomodulateur bien que la cible de ces facteurs, lymphocyte T ou B ou macrophage, ne soit pas identifiée (ALBRIGHT et coll., 1977) (ST CHARLES et coll., 1981). Une activité suppressive de la prolifération lymphocytaire induite par un mitogène a été mise en évidence dans les cultures de leishmanies (FARAH et coll., 1976). Des facteurs sériques supprimeurs sont retrouvés au cours de l'infection par T. cruzi (CUNNINGHAM et KUHN, 1980a et b) mais l'origine strictement parasitaire de ces facteurs reste à démontrer.

Le concept d'une modulation de la réponse immunitaire par des facteurs d'origine parasitaire est certainement mieux illustré dans les infections par métazoaires. Une diminution de la réponse anticorps peut être obtenue chez des souris saines en injectant soit du sérum de souris parasitées par T. spiralis ou un extrait salin de larves (FAUBERT et TANNER, 1971, 1974a). Ce facteur cytotoxique libéré seulement par le stade larvaire du parasite pourrait expliquer en partie l'immunosuppression observée au stade de la migration larvaire ainsi

que la destruction de la corticale et des centres germinatifs des ganglions lymphatiques (FAUBERT et TANNER, 1974b). Des substances inhibitrices de la prolifération lymphocytaire produites par les filaires de Dipetalonema viteae pourraient aussi être impliquées dans l'immunosuppression observée au cours de ces infections (CUNA, 1982).

Dans le cas de la schistosomiase, l'activation des cellules suppressives présentes chez les patients infectés par Schistosoma mansoni peut être réalisée avec de l'antigène d'adulte (COLLEY et coll., 1978) ou de l'antigène d'oeuf (ROCKLIN et coll., 1981). Certaines préparations antigéniques ainsi que des produits d'excrétion-sécrétion des différents stades du parasite sont capables de reproduire chez des animaux non infectés certaines caractéristiques de l'immunosuppression. L'exposition de lymphocytes de sujets sains à de l'antigène d'oeuf ou de cercaire induit une suppression de la réponse proliférative à la PHA (COLLEY et coll., 1979b). L'injection d'une préparation antigénique de vers adultes induit une suppression de la réponse anticorps et de l'hypersensibilité retardée chez des souris immunisées avec des globules rouges de mouton (MOTA-SANTOS et coll., 1977). Au cours de la transformation in vitro des cercaires en schistosomules, des fragments de membranes et de glandes sont libérés dans le milieu de culture. Ce matériel a une activité inhibitrice de la prolifération lymphocytaire et pourrait jouer un rôle de défense pour le parasite en diminuant les réactions anti-schistosomule juste après la pénétration (VIERA et coll., 1986). De même lors de l'éclosion des oeufs de schistosome in vitro, le liquide libéré inhibe la prolifération de lymphocytes de hamsters stimulés par des mitogènes (WRIGHT et coll., 1982). Le facteur inhibiteur n'est pas cytotoxique et le même effet est observé sur des cellules d'animaux sains ou infectés. Enfin un facteur suppresseur libéré par les vers adultes a été décrit dans notre laboratoire (DESSAINT et coll., 1977). Ce facteur appelé SDIF ou Schistosome Derived Inhibitory Factor fait l'objet d'un paragraphe spécial (4.4.) car l'ensemble de ce mémoire est consacré à l'étude des propriétés biologiques du SDIF.

4.3. Conséquences de l'immunosuppression

Les conséquences de l'immunosuppression associée à une infection parasitaire sont considérables. Tout d'abord, par l'affaiblissement de son système immunitaire, l'hôte est moins efficace dans sa lutte contre le parasite. De plus l'augmentation de la vulnérabilité aux autres infections de quelque nature que ce soit favorise les infections concomitantes. L'immunosuppression est aussi un paramètre dont il faut tenir compte dans le cadre d'une vaccination qui risque d'être moins efficace chez un sujet immunodéprimé. Ceci a effectivement été observé à maintes reprises aussi bien dans les modèles animaux qu'au cours d'infections humaines (MAC GREGOR et BARR, 1962) (WILLIAMSON et GREENWOOD, 1978).

4.4. Le SDIF

En 1977, le concept de facteurs immunorégulateurs d'origine parasitaire commençait à trouver quelque réalité, en particulier avec les travaux de FAUBERT et TANNER sur l'infection par Trichinella spiralis (1975). DESSAINT et coll. (1977) ont donc exploré cette hypothèse et ont testé l'effet d'incubats de vers adultes de Schistosoma mansoni sur la prolifération lymphocytaire. Pour obtenir ces incubats, les vers adultes sont placés dans une solution hypotonique, ce qui provoque la régurgitation du contenu du tube digestif. Ils montrent qu'une activité inhibitrice de la prolifération lymphocytaire est retrouvée dans la fraction dialysable de l'incubat (P.M.<10000). Une activité similaire est retrouvée dans les surnageants de culture de vers adultes, donc dans des conditions plus physiologiques. Cet effet inhibiteur s'exerce sur des lymphocytes d'espèces différentes (rat- homme- souris) stimulés par des mitogènes ou par un antigène et n'est pas dû à une activité cytotoxique. Par filtration sur des membranes de dialyse, le poids moléculaire de ce facteur apparaît se situer entre 300 et 2000, compte tenu de l'imprécision de ce type de technique. L'activité est thermostable

(chauffage 100°C, 5 minutes). Ce facteur fut appelé par la suite SDIF pour "Schistosome Derived Inhibitory Factor". Nous avons poursuivi ce travail qui visait à définir les propriétés biologiques du SDIF in vitro et in vivo, à caractériser la ou les molécules et à analyser leur participation dans l'immunosuppression chez l'hôte parasité. Les diverses activités biologiques que nous allons exposer sont peut-être attribuables à différentes molécules, mais nous avons regroupé sous le terme SDIF l'ensemble des activités contenues dans la fraction dialysable de l'incubat de vers adultes de Schistosoma mansoni.

RESULTATS

RESULTATS

1. INDUCTION D'UNE IMMUNOSUPPRESSION IN VIVO

Etant donné les résultats obtenus in vitro par DESSAINT et coll. (1977) sur l'inhibition de la prolifération lymphocytaire par le SDIF, la première démarche consistait à savoir si le SDIF est capable d'induire in vivo une immunosuppression comparable à celle observée chez l'animal infecté. Les critères choisis pour apprécier cette immunosuppression sont la réactivité lymphocytaire et l'hypersensibilité retardée. En complément, des expériences réalisées par HAQUE et coll. (1981) sur l'augmentation de la susceptibilité à d'autres infections après traitement par le SDIF seront analysées dans la discussion.

1.1. Réponse lymphocytaire après traitement in vivo par le SDIF

1.1.1. Effet du SDIF sur la prolifération induite par la ConA

Des rats Fischer reçoivent 200 μ l de SDIF par voie intrapéritonéale pendant 4 jours de suite, le groupe contrôle recevant le même volume de sérum physiologique. Les cellules spléniques de ces animaux sont prélevées trois jours après la dernière injection de SDIF et cultivées in vitro en présence de concanavalin A (ConA). Un marquage avec de la méthyl-thymidine tritiée permet d'apprécier la prolifération. La Figure 1 montre les courbes dose-réponse des cellules d'animaux sains et traités par le SDIF. Alors que les cellules d'animaux sains prolifèrent en présence de ConA (dose optimale 0,1 μ g/ml), les cellules provenant d'animaux traités par le SDIF sont incapables de répondre quelle que soit la concentration de ConA utilisée.

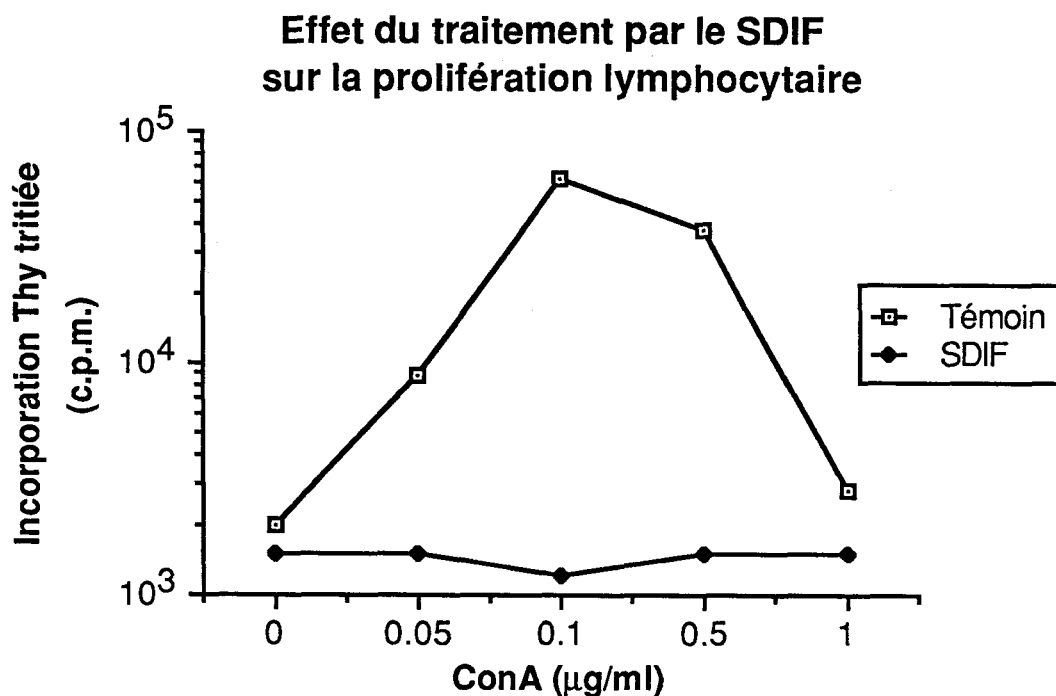


FIGURE 1: Des rats sains reçoivent 200 µl de SDIF quotidiennement pendant quatre jours. Les cellules spléniques sont prélevées trois jours après la dernière injection de SDIF. Les lymphocytes sont stimulés par la ConA et la prolifération appréciée après 48 heures de culture par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. (Les coefficients de variation sont inférieurs à 10%).

1.1.2. Effet du SDIF sur la réponse spécifique vis-à-vis de *S.mansoni*

La même expérience que précédemment est cette fois réalisée avec des rats Fischer infectés par *S. mansoni* de façon à pouvoir étudier la réponse proliférative vis-à-vis de l'antigène homologue après traitement par le SDIF. Les rats sont infectés au jour 0 et reçoivent 200 µl de SDIF aux jours 4, 5, 6 et 7. Les animaux contrôles infectés reçoivent du sérum physiologique à la place du SDIF. Les cellules spléniques sont prélevées 10 jours après le début de l'infection et cultivées en présence d'antigène de ver adulte de *S. mansoni*. A cette période de l'infection, les cellules des animaux infectés répondent encore bien aux mitogènes et à l'antigène puisque l'immunosuppression s'installe seulement après la

troisième semaine d'infection (CAMUS et coll., 1979). Comme précédemment, les cellules d'animaux ayant reçu du SDIF sont incapables de répondre à l'antigène alors que les cellules du groupe contrôle (animaux seulement infectés) prolifèrent en présence de l'antigène (Figure 2).

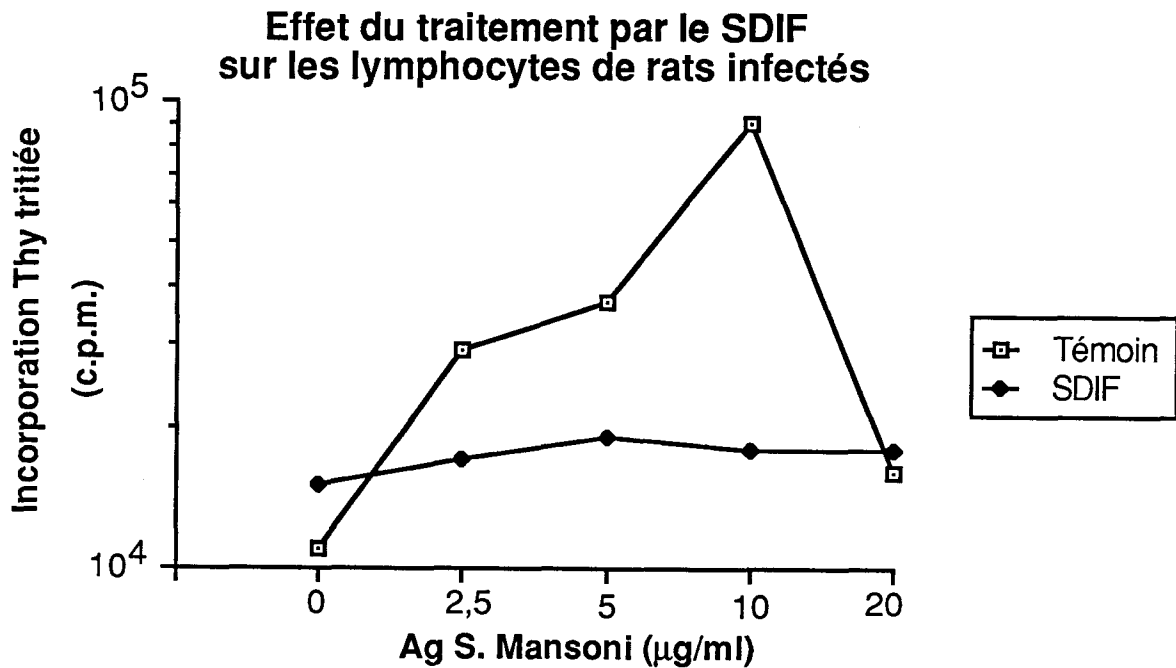


FIGURE 2: Des rats Fischer sont infectés par 500 cercaires de *S. mansoni*. Les rats reçoivent 200 µl de SDIF aux jours 4, 5, 6 et 7 après l'infection. Les cellules spléniques prélevées 10 jours après l'infection sont cultivées en présence de différentes concentrations d'antigène de *S. mansoni*. La prolifération est mesurée 5 jours plus tard par l'incorporation de thymidine tritiée. (Les coefficients de variation sont inférieurs à 10%).



1.1.3. Existence d'une population suppressive après traitement par le SDIF

Les macrophages peuvent être éliminés d'une population cellulaire par adhérence au plastique. Par contre il existe une sous-population de cellules T suppressives qui n'adhèrent pas au plastique mais sont retenues par passage sur

laine de nylon. La déplétion en une population adhérente à la laine de nylon des cellules de rats non infectés traités par le SDIF permet de restaurer la réponse proliférative à la ConA. Par contre l'élimination des cellules adhérentes au plastique n'est pas suffisante (Figure 3). Ceci suggère la présence d'une population suppressive non spécifique adhérente à la laine de nylon.

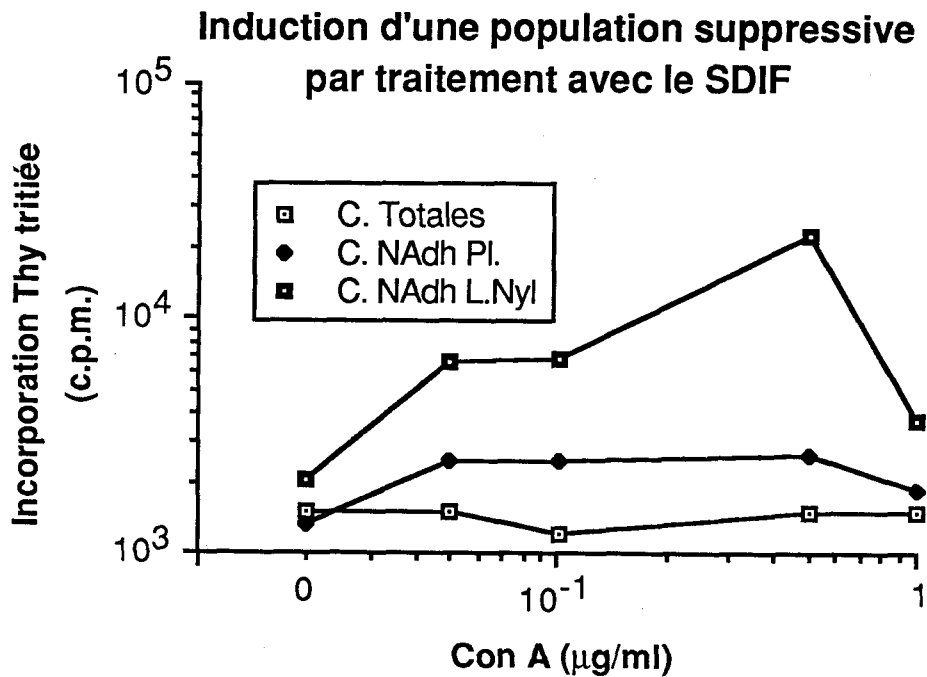


FIGURE 3: Des rats sains reçoivent 200 µl de SDIF pendant quatre jours. Les cellules spléniques sont prélevées trois jours plus tard et les cellules adhérentes au plastique ou à la laine de nylon sont éliminées. Ces différentes populations sont stimulées par la ConA et la prolifération mesurée après 48 heures de culture par l'incorporation de thymidine tritiée. (Les coefficients de variation sont inférieurs à 10%).



Pour confirmer l'existence de cette population, des expériences de cocultures ont été réalisées. Des cellules non adhérentes à la laine de nylon d'animaux traités par le SDIF sont capables comme nous venons de le voir de répondre à la ConA. Lorsque ces cellules sont cultivées en présence de cellules

totales du même groupe, on observe une abolition totale de la réponse à la ConA. La coculture réalisée avec des cellules d'animaux sains n'a pas d'effet sur la prolifération (Figure 4). Il existe donc bien dans les splénocytes d'animaux traités par le SDIF une population adhérente à la laine de nylon à activité suppressive non spécifique.

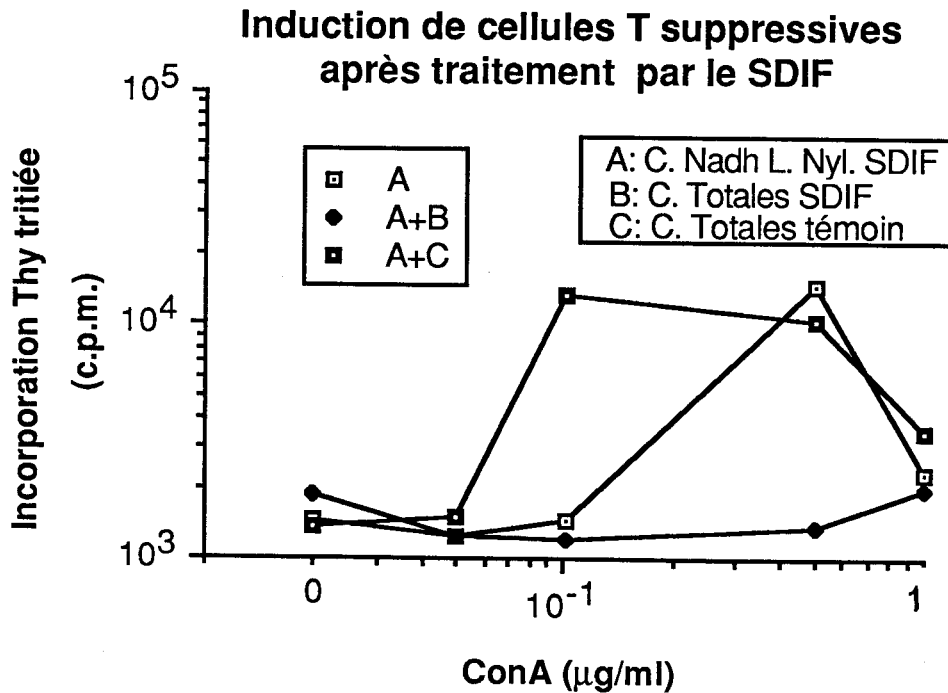


FIGURE 4: Des cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon d'animaux traités par le SDIF sont cultivées en présence de cellules spléniques totales des mêmes animaux. La réponse proliférative des cellules vis-à-vis de la ConA est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée après 48 heures de culture. (Les coefficients de variation sont inférieurs à 10%).

La même activité suppressive non spécifique est observée avec des cellules d'animaux infectés traités par le SDIF. Le passage sur laine de nylon permet de restaurer la réactivité de ces cellules vis-à-vis de la ConA. Cependant l'élimination de la population suppressive par passage sur laine de nylon ne permet pas de rétablir la réponse proliférative vis-à-vis de l'antigène de S.

mansoni par passage sur laine de nylon (Figure 5). On peut supposer l'existence de deux types de cellules suppressives après traitement par le SDIF, l'un étant constitué de cellules non spécifiques adhérant à la laine de nylon et l'autre de cellules spécifiques d'antigènes de S. mansoni et non adhérentes à la laine de nylon.

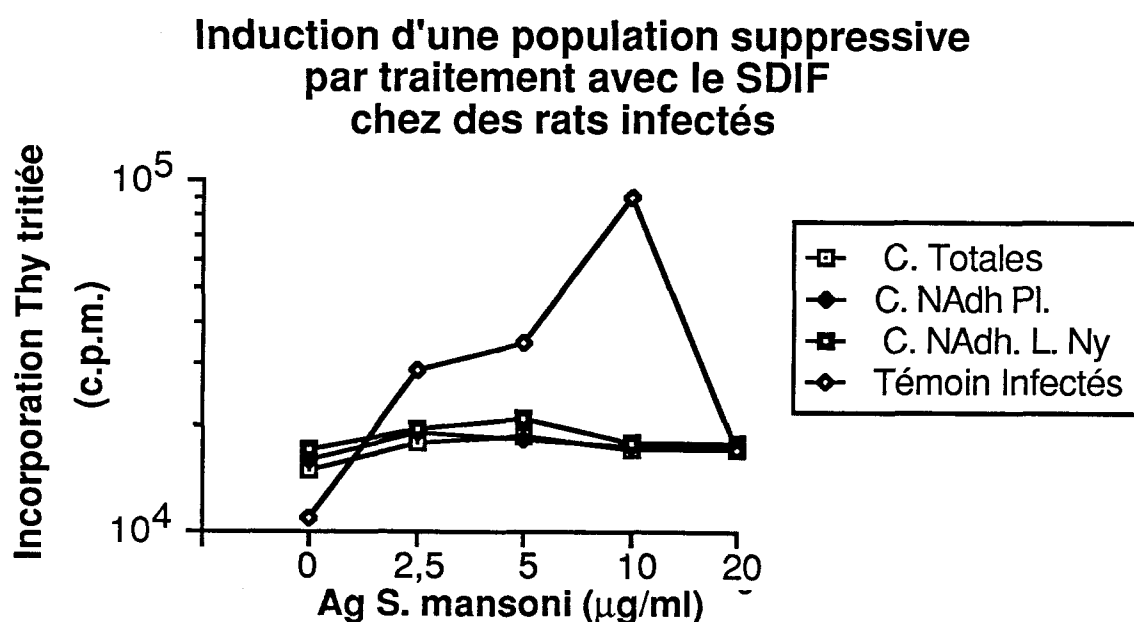


FIGURE 5: Des cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon d'animaux infectés et traités par le SDIF sont cultivées en présence de cellules spléniques totales des mêmes animaux. La réponse proliférative de ces cellules vis-à-vis de l'antigène *S. mansoni* est mesurée après 5 jours de culture in vitro par l'incorporation de thymidine tritiée. (Les coefficients de variation sont inférieurs à 10%).

1.2. Effet du SDIF sur une réaction d'hypersensibilité retardée

Des souris C57Bl/6 sont sensibilisées par injection intraveineuse de globules rouges de mouton. Quatre jours plus tard, une injection du même antigène au niveau des coussinets plantaires permet de déclencher une réaction

d'hypersensibilité retardée. La mesure du gonflement de la patte permet d'apprécier l'intensité de cette réaction. Pour étudier l'effet du SDIF, plusieurs protocoles ont été utilisés:

- * injection de SDIF 3 h avant la sensibilisation pour tester l'effet du SDIF sur la phase d'induction.
- * injection de SDIF 10 ou 5 h avant l'injection déclenchante pour tester l'effet du SDIF sur l'expression de l'hypersensibilité retardée.

Dans tous les cas, le SDIF injecté par voie intrapéritonéale inhibe le gonflement de la patte, ce qui suggère que ce facteur est efficace aussi bien au stade de l'induction que de l'expression de l'hypersensibilité retardée (Figure 6). Aucune inhibition n'est observée chez les animaux recevant du sérum physiologique à la place du SDIF.

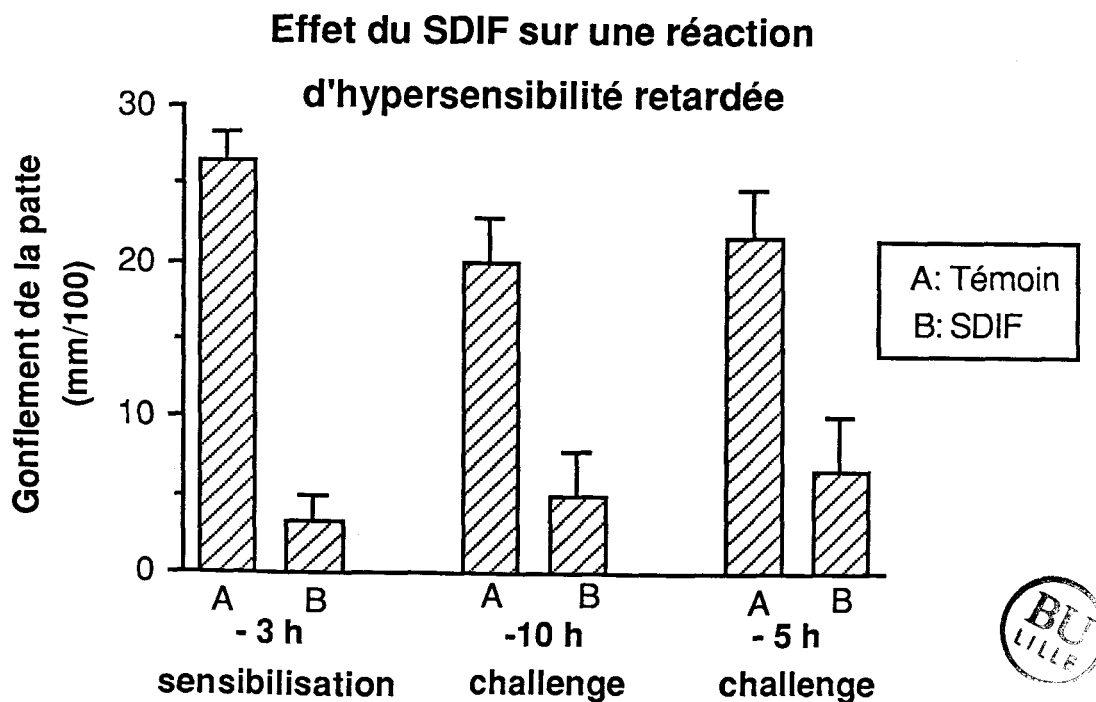


FIGURE 6: Des souris sont sensibilisées par injection intraveineuse de 10^5 globules rouges de mouton au jour 0. Au jour 4, une injection de rappel de 20 μ l d'une suspension de globules rouges à 10% est faite dans l'un des coussinets plantaires tandis que l'autre reçoit 20 μ l de solution saline. Le diamètre des coussinets plantaires est mesuré 24 heures plus tard. Les résultats sont exprimés en moyenne de la différence entre les diamètres des deux coussinets plantaires \pm écart-type. L'injection de SDIF est faite par voie intrapéritonéale (200 μ l) avant la sensibilisation ou l'injection de rappel.

1.3. Discussion

L'injection de SDIF in vivo est suivie d'une altération du système immunitaire de l'hôte, se traduisant en particulier par une diminution de la capacité des lymphocytes à proliférer en présence de stimuli spécifiques et non spécifiques et par une réduction des réactions d'hypersensibilité retardée. Par ailleurs HAQUE et coll. (1981) ont pu après traitement par le SDIF rendre susceptibles des rats normalement résistants à l'infection par Dipetalonema viteae (Tableau 1).

TABLEAU 1
SUSCEPTIBILITE DES RATS A L'INFECTION PAR DIPETALONEMA VITEAE
APRES INFECTION PAR S.MANSONI OU APRES TRAITEMENT PAR LE SDIF

Traitement	Microfilarémie (moyenne +/- écart-type)			Nombre de vers adultes	
	J 60	J 80	J 100	J 60	J 90
Contrôle	0	0	0	0	0
Infection par <i>S. mansoni</i> ^a	30 +/- 12	40 +/- 15	36 +/- 14	18 +/- 8	16 +/- 9
SDIF ^b	40 +/- 16	64 +/- 14	32 +/- 12	24 +/- 12	22 +/- 11

a: les rats sont infectés par *S. mansoni* 14 jours avant l'infection par *D. viteae*.

b: le SDIF est injecté 4 fois du jour 8 au jour 11 après l'infection par *D. viteae*.

(D'après HAQUE et coll., 1981).



Ces résultats rejoignent les observations réalisées chez le rat infecté par S. mansoni. A partir de la quatrième semaine d'infection, la réactivité lymphocytaire aux antigènes et aux mitogènes ainsi que l'intensité des réactions

d'hypersensibilité retardée diminuent (CAMUS et coll., 1979). Une population à activité suppressive non spécifique adhérente à la laine de nylon a également été mise en évidence. L'élimination de cette population permet de retrouver une réponse proliférative normale vis-à-vis des mitogènes mais ne permet pas de rétablir la réponse aux antigènes de S. mansoni exactement comme dans le cas du SDIF. Il est possible que le passage sur laine de nylon n'élimine pas la totalité des cellules suppressives et qu'une faible quantité de ces cellules soit suffisante pour inhiber la prolifération des cellules réactives aux antigènes de S. mansoni alors que l'inhibition de la prolifération lymphocytaire induite par la ConA nécessite une plus grande quantité de cellules suppressives. On peut aussi imaginer que l'injection de SDIF a un effet inhibiteur direct sur les cellules qui se trouvent engagées dans le cycle cellulaire. Nous verrons par la suite lors de l'étude du mécanisme d'action du SDIF que c'est effectivement le cas. Ceci expliquerait que les cellules réactives aux antigènes de S. mansoni soient les premières inhibées par l'injection de SDIF.

L'inhibition de l'hypersensibilité retardée pourrait également être attribuée à la présence de ces cellules suppressives. Lors des réactions d'hypersensibilité retardée, des lymphocytes sont engagés dans le cycle cellulaire. L'inhibition de leur prolifération par le SDIF pourrait également rendre compte de la diminution des réactions d'hypersensibilité retardée observée après traitement par le SDIF. D'autres mécanismes peuvent aussi être envisagés comme l'inhibition par le SDIF de la production de lymphokines ou de l'effet des lymphokines sur les cellules effectrices de l'hypersensibilité retardée. Enfin un effet direct du SDIF sur les cellules effectrices ne peut être exclu. En effet nous verrons par la suite que le SDIF peut agir sur d'autres cellules que les lymphocytes.

Les observations coïncident également en ce qui concerne l'augmentation de la susceptibilité aux autres infections. En effet la thymectomie, le traitement

par le SDIF ou l'infection par S. mansoni rendent le rat sensible à l'infection par la filaire Dipetalonema viteae (HAQUE et coll., 1981) (ces résultats sont exposés dans le chapitre 4.1.4. de l'introduction). Ces traitements sont efficaces si l'on fait coïncider l'état d'immunosuppression avec le développement des larves en vers adultes. Le fait que le même phénomène soit observé chez des animaux athymiques renforce le rôle des lymphocytes T dans la résistance naturelle du rat à l'infection par la filaire et suggère que le traitement par le SDIF ainsi que l'infection par S. mansoni sont responsables de modifications de l'immunité T dépendante.

Au cours des expériences réalisées in vitro par DESSAINT et coll. (1977), le SDIF ne semblait pas induire la libération de facteurs suppresseurs dans le milieu de culture, alors que nous avons observé que l'injection de SDIF in vivo serait responsable de la génération d'une population suppressive. Il est toutefois difficile de comparer des mécanismes d'action in vitro et in vivo. Les mêmes divergences ont déjà été décrites pour d'autres molécules immunosuppressives comme la cyclophosphamide. Celle-ci a un effet inhibiteur sur les cellules en division. Les lymphocytes B y sont particulièrement sensibles mais l'immunité à médiation cellulaire est également affectée par cet agent. En particulier certains travaux montrent l'élimination de sous-populations de cellules T suppressives par la cyclophosphamide (revue par SHAND et coll., 1979) alors que d'autres relatent l'induction de cellules suppressives (McINTOSH et coll., 1982). Un travail réalisé à partir de lymphocytes d'animaux traités à la cyclophosphamide montre par ailleurs la difficulté d'analyser in vitro la réactivité lymphocytaire d'animaux traités in vivo (MILTON et coll., 1976).

Cette première série de résultats permet de montrer que le SDIF, lorsqu'il est injecté à un animal, reproduit chez celui-ci les caractéristiques de l'immunosuppression observée chez l'animal infecté par S. mansoni. Ceci ne représente bien entendu que des arguments indirects quant à la réelle

participation du SDIF dans l'immunosuppression de l'hôte infecté. La présence d'un facteur dialysable inhibiteur de la prolifération lymphocytaire dans les sérums de rats infectés depuis 4 semaines pourrait constituer un argument en faveur d'une libération de SDIF au cours de l'infection (DESSAINT et coll., 1977). Cependant il est connu que des facteurs inhibiteurs de la prolifération lymphocytaire et en particulier des peptides existent également dans les sérums de sujets sains, ce qui rend l'interprétation de ces résultats difficile (OCCHINO et coll., 1973). D'autre part, les quantités de vers adultes utilisées pour préparer le SDIF sont difficilement compatibles avec une charge parasitaire normale. On ne peut cependant exclure la possibilité que le SDIF soit libéré de façon permanente en quantité infime dans un micro-environnement où il serait efficace. D'autre part, chez le rat l'expulsion massive des vers lors de la quatrième semaine d'infection pourrait entraîner une libération importante de SDIF. Ceci correspond effectivement à la période où l'immunosuppression apparaît.

Pour élucider le rôle joué par le SDIF dans l'immunosuppression de l'hôte parasité ainsi que pour étudier les mécanismes mis en jeu, il semblait difficile d'aller plus loin en utilisant du SDIF non purifié. De plus, l'infection parasitaire représente un modèle très complexe à analyser et il nous a paru judicieux pour étudier les propriétés biologiques du SDIF de sortir du contexte de l'infection parasitaire. Le chapitre suivant est donc consacré à la purification du SDIF qui a été réalisée dans un premier temps par nous-mêmes puis confiée à l'industrie pharmaceutique.

2. PURIFICATION DU SDIF

2.1. Travaux réalisés à l'Institut d'Immunologie clinique de Berne

Des études préliminaires ont montré que la composition globale du SDIF est extrêmement complexe.

Composition globale du SDIF produit par 10000 vers.

Poids sec: 16 mg

Protéines: 5,2 mg

Saccharides: 4,7 mg

Na: 0,8 mg

K: 0,3 mg

Cl: 0,5 mg

Triglycérides: 1 mg

L'analyse d'acides aminés et des monosaccharides montre la présence dans le SDIF de tous les amino-acides et monosaccharides courants.

La stratégie de purification du SDIF doit tenir compte de la nécessité d'utiliser un test biologique pour suivre les fractionnements. Pour être testées en activité biologique, les fractions doivent donc être débarrassées des composés toxiques et ceci ne peut être réalisé par dialyse, étant donné le poids moléculaire du SDIF. Les séparations doivent donc être faites dans l'eau ou dans des tampons volatiles, ce qui limite le choix des méthodes biochimiques utilisables.

La structure et même la nature chimique du SDIF étant inconnue, une densité optique de 206 nm ou de 229 nm (suivant les appareils utilisés) a été choisie pour suivre les fractionnements.

La prolifération de différentes lignées lymphocytaires T est inhibée par le SDIF (cf chapitre 3). Nous avons donc choisi comme moyen de suivre l'activité SDIF au cours des fractionnements la mesure de l'inhibition de la prolifération de lignées lymphocytaires (lignée CTL-L dépendante d'IL-2 ou lignée Jurkat indépendante d'IL-2).

2.1.1. Chromatographie de gel filtration

Les premiers essais de séparation sur membrane Amicon avaient montré une localisation de l'activité inhibitrice de la prolifération dans la fraction de P.M. entre 500 et 1000 (DESSAINT et coll., 1979). Une gel filtration sur une colonne CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) TSK-2000 a été réalisée avec du matériel brut repris dans de l'eau. La Figure 7 (page suivante) montre le profil de cette CLHP et l'activité biologique des fractions correspondantes. Nous avons remarqué que le SDIF brut absorbe à 375 nm. Nous avons donc également suivi le profil de fractionnement à cette longueur d'onde. L'activité biologique se retrouve effectivement dans les fractions avoisinant un poids moléculaire de 500. De plus, à ce stade l'absorption à 375 nm est toujours associée à l'activité biologique. Ces fractions ont été rassemblées, lyophilisées et utilisées pour le fractionnement suivant.

2.1.2. CLHP en phase inversée

La colonne utilisée était une colonne de silice greffée C-18. L'élution se faisait par un gradient linéaire de 0 à 50% d'acétonitrile. Deux fractions correspondant à des temps de rétention de 1 min (SDIF-A) et 14 min (SDIF-B) montrent une activité inhibitrice de la prolifération des CTL-L (Figure 8). Il faut remarquer que les zones d'activité SDIF-A et SDIF-B correspondent aux deux pics d'absorption à 375 nm. L'analyse des pentes des courbes dose-réponse du SDIF-A et du SDIF-B montre que la pente correspondant au SDIF-A est plus proche de celle du SDIF brut. La courbe dose-réponse du SDIF-B présente par contre une

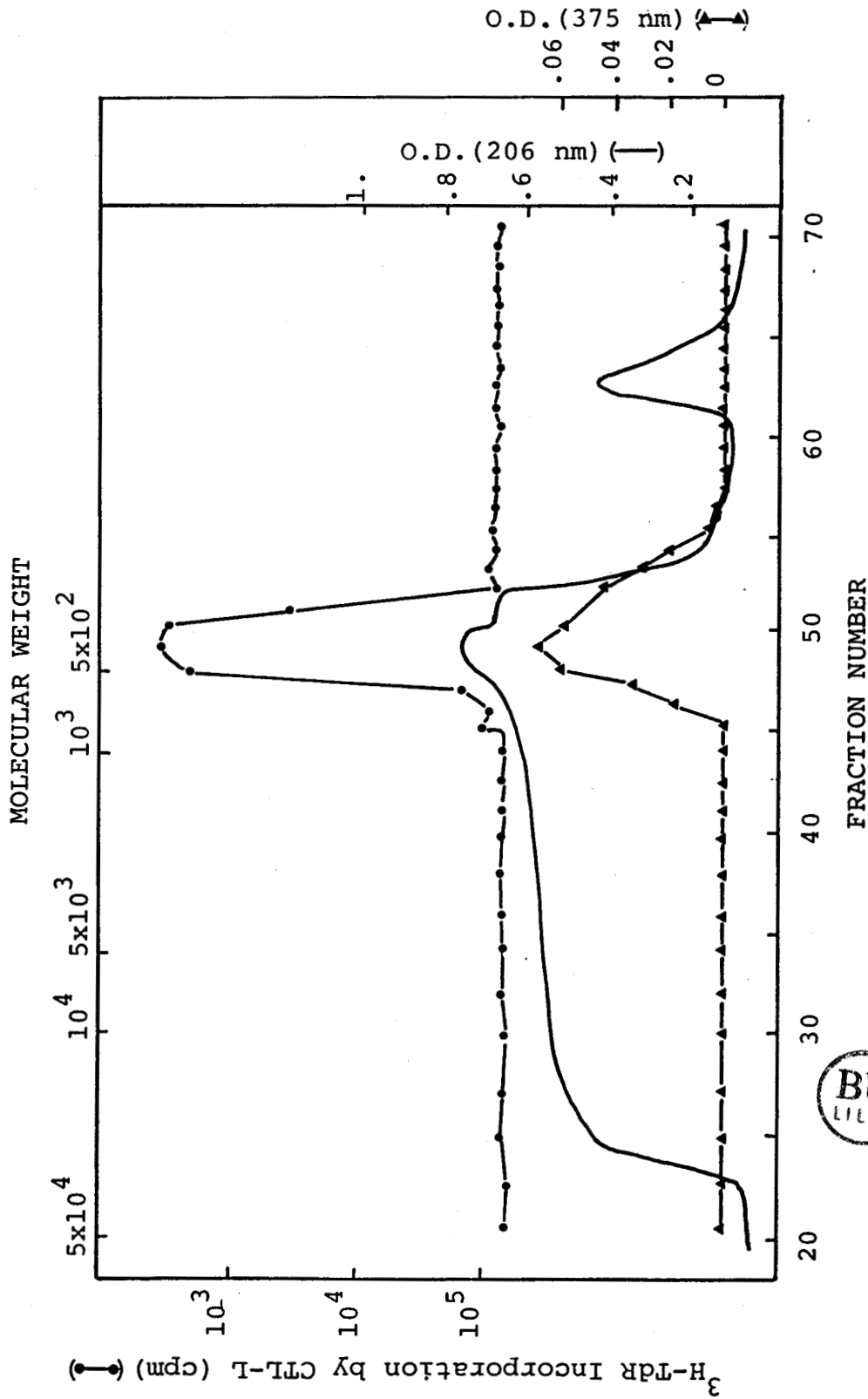


FIGURE 7: Inhibition de la prolifération lymphocytaire des cellules T par des fractions de gel filtration. Le SDIF brut est injecté sur une colonne CLHP TSK-2000 équilibrée dans de l'eau. Les fractions (0.5 ml) sont testées à une dilution de 1/10 sur la prolifération de cellules de la lignée CTL-L. **L'axe des Y est inversé de façon à visualiser l'inhibition.** La colonne a été calibrée avec de la sérumalbumine bovine (67000 Da), de l'ovalbumine (43000 Da), du chymotrypsinogène A (25000 Da), de la ribonucléase (13700 Da), un décapeptide synthétique (1300 Da) et de la rutine (600 Da).



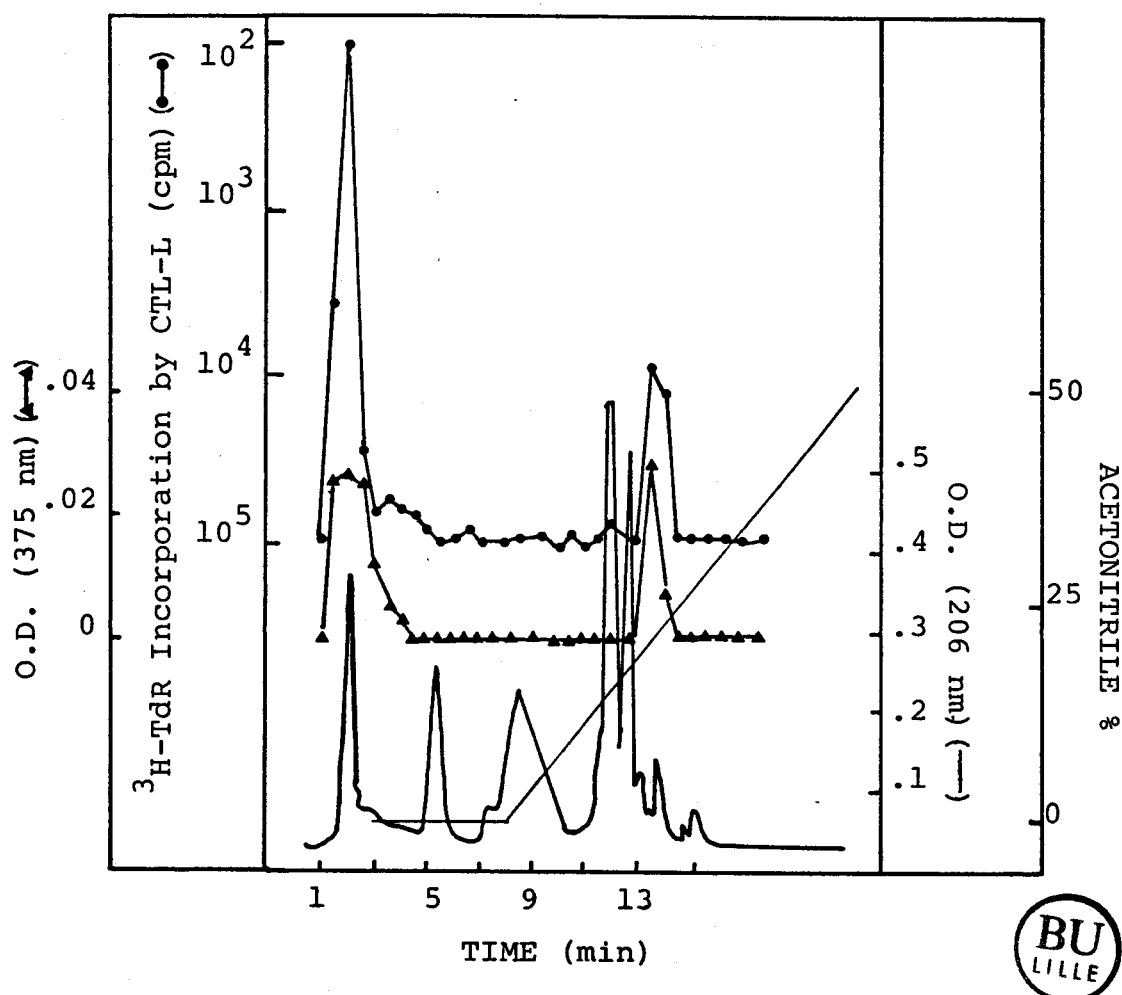


FIGURE 8: Inhibition de la prolifération lymphocytaire T par des fractions de CLHP en phase inversée. Les fractions actives obtenues après gel filtration sont rassemblées et injectées sur une colonne de silice greffée RP-18 équilibrée dans l'eau. L'élution est réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 50 %. Les fractions (1 ml) sont lyophilisées, reconstituées au volume original dans du RPMI additionné de 1 % de sérum de veau foetal et testées sur la prolifération des CTL-L à une dilution finale du 1/4. L'axe des Y est inversé pour visualiser l'activité inhibitrice.

pente plus faible (Figure 9). En fait, nous avons observé que le rapport (en D.O.) SDIF-B/SDIF-A augmente avec la durée du stockage du SDIF brut, même sous forme lyophilisée. En se basant sur la D.O. à 206 nm, le SDIF-A représente environ 2,6 % du matériel brut et le SDIF-B 0,9 %.

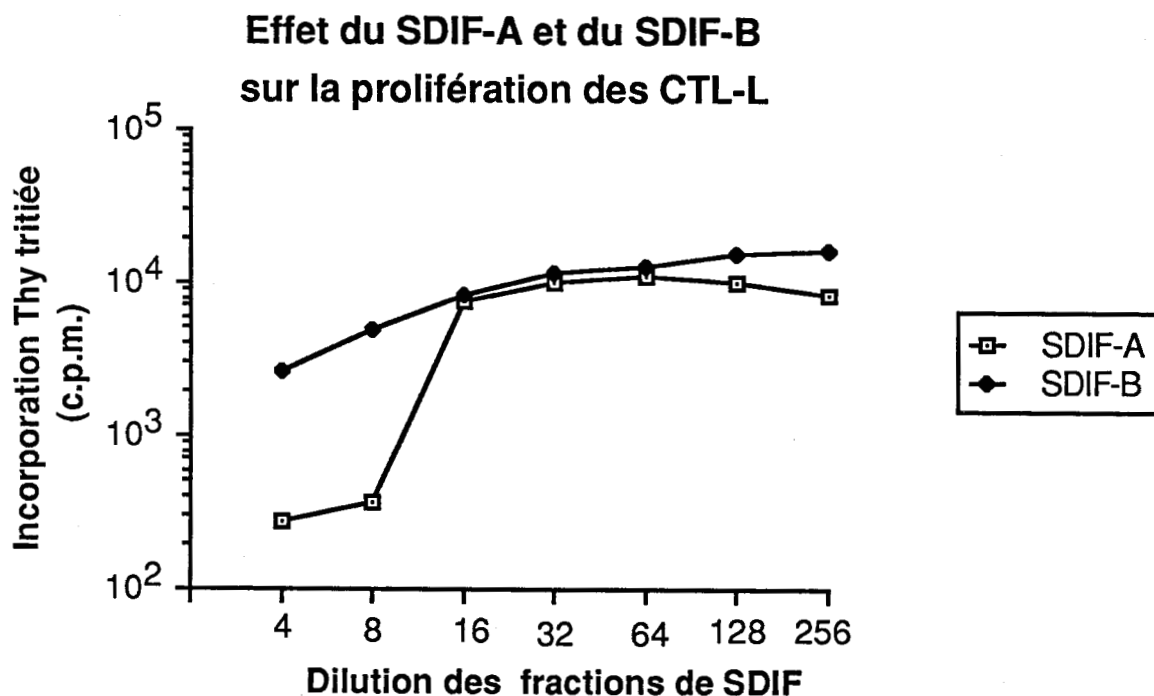


FIGURE 9: Des cellules de la lignée CTL-L sont cultivées en présence de différentes dilutions de SDIF-A ou de SDIF-B. La prolifération des cellules est mesurée à 48 heures par l'incorporation de thymidine tritiée.

2.1.3. Discussion



Après gel filtration et CLHP en phase inversée, nous avons obtenu deux fractions inhibitrices de la prolifération lymphocytaire. L'une des fractions (SDIF-A) est très hydrophile, tandis que l'autre est plus hydrophobe puisque retenue sur une colonne de C18. Ces deux préparations, tout comme le SDIF brut présentent une coloration jaune et absorbent à 375 nm. De plus, le fait que la quantité de SDIF-B augmente avec la durée de stockage du SDIF brut suggère

qu'il puisse y avoir un processus de conversion du SDIF-A en SDIF-B. Cependant, les pentes des courbes dose-réponse ne sont pas les mêmes et une perte d'activité est liée à cette conversion. Pour comprendre les relations entre SDIF-A et SDIF-B, il faudrait connaître les structures de ces deux molécules.

Le SDIF-A qui possède la majorité de l'activité biologique (si l'on utilise des préparations de SDIF brut récentes) n'est pas retenu sur la colonne de C18. Par la suite, nous avons utilisé une colonne C8 semi-préparative. Là encore, le SDIF-A n'est pas retenu. D'autres essais en chromatographie d'échange d'ions (anions ou cations) n'ont pas permis de retenir l'activité SDIF-A quelles que soient les conditions de pH ou de force ionique. De ce fait, le SDIF-A est certainement encore un mélange très hétérogène et la caractérisation chimique ne pouvait être abordée avec cette préparation. Nous avons donc utilisé cette fraction semi-purifiée pour un certain nombre d'expériences biologiques tandis que la purification et la détermination de la structure était confiée à la firme Rhône-Poulenc Santé.

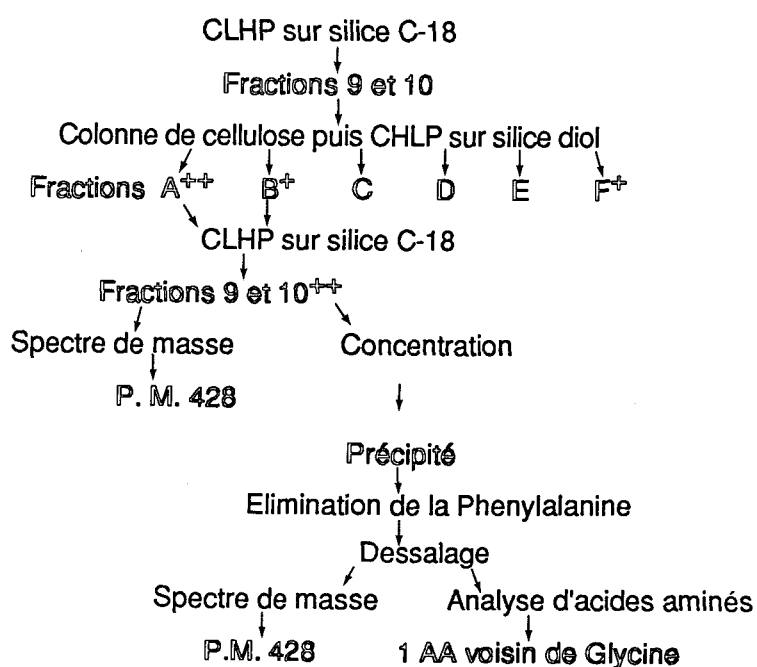
2.2. Travaux réalisés par la firme Rhône-Poulenc

Le matériel brut était préparé dans notre laboratoire et envoyé sous forme lyophilisée. Les tests biologiques ont été réalisés chez Rhône-Poulenc, mais nous avons personnellement confirmé la localisation de l'activité biologique dans certains des fractionnements.

La séquence de purification apparaît dans le tableau 1. La première étape est une CLHP en phase inversée sur colonne de C18. Paradoxalement, l'activité SDIF est retenue sur cette colonne, alors que nous n'avions jamais pu obtenir ce résultat. En réalité, ce comportement apparaît tout à fait spécifique de cette colonne, puisque des chromatographies réalisées chez Rhône-Poulenc avec d'autres colonnes ont confirmé l'absence de rétention du SDIF sur les colonnes de phase-inversée. En particulier, la Phenylalanine en tant qu'acide aminé libre doit

normalement ne pas être retenue sur une colonne C18. Or la phénylalanine est également retenue sur cette colonne et éluée en même temps que le SDIF. On verra d'ailleurs par la suite que la grande quantité de Phénylalanine libre contenue dans le SDIF brut a gêné le fractionnement. On peut suspecter la présence d'un contaminant sur cette colonne qui retiendrait un certain nombre de composés dont le SDIF et Phénylalanine. Ceci a représenté une chance car cette première étape de purification permet d'éliminer un grand nombre de contaminants. D'autre part, un fractionnement réalisé sur cette colonne et suivi à 375 nm montre que le pic d'absorption maximum se trouve dans la fraction 8 alors que l'activité biologique se trouve dans les fractions 9 et 10. Ce résultat permet donc d'éliminer l'hypothèse d'une activité SDIF associée à un composé chromophore.

TABLEAU 2
SEQUENCE DE PURIFICATION DU SDIF



La deuxième chromatographie est réalisée sur une colonne de cellulose suivie d'une CHLP sur silice diol. L'activité biologique se retrouve majoritairement dans la fraction A et un peu dans la fraction B. De plus, une activité inhibitrice est retrouvée dans la fraction F, mais la pente de la courbe dose-réponse est plus faible. On peut se demander si cette fraction F ne correspondrait pas au SDIF-B que nous avons trouvé lors des fractionnements précédents. Malheureusement, aucune détermination de structure n'a été faite sur cette fraction F. Les fractions A et B ont été chromatographiées à nouveau sur silice C18. L'activité biologique se retrouve effectivement dans les fractions 9 et 10. En concentrant ces fractions, un précipité contenant à la fois le SDIF et de la Phenylalanine s'est formé. Le SDIF ne présentant pas de groupement amine libre, la Phenylalanine a pu être éliminée par action du phénylisothiocyanate qui transforme les acides aminés en dérivés phénylthiocarbamylés (PTC-AA). Par cette technique, une préparation de SDIF homogène a pu être obtenue. Son activité biologique a été vérifiée. Bien qu'il ne soit pas possible de mesurer la quantité de SDIF présente, il semblerait que celui-ci soit actif à de très faibles doses.

Le spectre de masse réalisé sur cette préparation montre l'existence d'un composé de P.M. 428. L'analyse d'acides aminés réalisée après hydrolyse acide ne permet pas de détecter la présence d'acides aminés hormis un acide aminé dont le comportement est très voisin de celui du glycocholate. De plus, l'analyse du spectre de masse laisse penser que le SDIF est un composé extrêmement hydrophile, ce qui rejoint les observations sur le comportement chromatographique de cette molécule. Aucune structure de famille chimique connue ne peut être reliée à celle du SDIF.

Pour déterminer la structure du SDIF, il faudrait avoir recours à des techniques comme la résonance magnétique nucléaire ou la spectroscopie infra-rouge après transformation de Fourier. A priori, cela suppose de disposer

d'une quantité de fraction purifiée à l'homogénéité non compatible avec les quantités de SDIF brut que l'on peut produire de façon raisonnable. Cependant, le rendement de fractionnement n'est certainement pas optimisé. De plus, il doit exister des techniques miniaturisées plus adaptées à notre problème. Ces résultats sont bien entendu décevants dans la mesure où ils ne permettent pas de donner la structure du SDIF. Cependant ils ont le mérite de démontrer que l'activité inhibitrice de la prolifération est supportée par au minimum une molécule de P.M. 428. Le comportement inhabituel de cette molécule en chromatographie et le fait que son spectre de masse ne puisse être associé à celui des composés de familles chimiques connues renforce encore l'intérêt porté à cette molécule. Il s'agit peut-être d'une structure tout à fait originale qui pourrait expliquer les activités biologiques observées.

L'ordre choisi pour exposer les résultats de cette thèse ne correspond pas forcément à l'ordre dans lequel ont été réalisées les expériences. Ceci explique pourquoi certaines des expériences qui vont suivre ont été faites avec du SDIF brut tandis que d'autres l'ont été avec du matériel purifié par nos soins suivant le protocole décrit précédemment et que nous appellerons RP-SDIF. Le RP-SDIF correspond en fait au SDIF-A obtenu après gel filtration et CLHP en phase inversée. Le SDIF-B n'a pas été utilisé car son activité est moindre surtout si le SDIF brut est de fabrication récente.

Nous avons dans un premier temps tenté d'approcher le mécanisme d'inhibition de la prolifération lymphocytaire par le SDIF, puis nous verrons quelles fonctions lymphocytaires peuvent être altérées sous l'action du SDIF. Enfin, nous verrons que les activités d'autres cellules immunocompétentes peuvent aussi être modulées par ce facteur.

3. APPROCHE DU MECANISME D'ACTION DU SDIF

3.1. Etude de la spécificité de la cible

Les expériences décrites dans ce chapitre ont été réalisées à la fois avec du SDIF brut et avec de la fraction semi-purifiée (RP-SDIF). Les résultats obtenus dans les deux cas sont identiques. Nous ne mentionnerons ici que ceux obtenus avec le RP-SDIF. Nous avons testé l'effet inhibiteur du SDIF sur la prolifération de différentes lignées cellulaires. L'origine de ces lignées est indiquée dans le Tableau 3.

TABLEAU 3
ORIGINE DES LIGNEES CELLULAIRES

LIGNEE	ESPECE	PARTICULARITES
CTL-L	Souris	Lymphome T dépendant d'IL-2
EL-4	Souris	Lymphome T, produit de l'IL-2
HSB-2	Homme	Lymphome T, produit de l'IL-2
JURKAT	Homme	Lymphome T, produit de l'IL-2
K562	Homme	Lignée myelomonocytaire
L929	Souris	Fibroblastes
P3	Souris	Myelome B
RM-1	Homme	Myelome B
TH-P	Homme	Lignée monocytaire
U-266	Homme	Plasmocytome, produit des IgE
U-937	Homme	Lignée monocytaire
WEHI-3b	Souris	Lignée myelomonocytaire, produit de l'IL-3
WIL-2	Homme	Lymphome B, exprime des récepteurs FcE



Des lymphomes T, des lymphomes B et un plasmocytome, des lignées macrophagiques et des fibroblastes de différentes espèces ont été utilisés. Le

SDIF était ajouté au début de la culture et la prolifération appréciée à 24 et 48 heures de culture par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. La Figure 10 montre les courbes dose-réponse des lignées dont la prolifération est inhibée par le SDIF tandis que la Figure 11 montre celles des lignées non affectées par le SDIF. Quatre des cinq lignées dont la prolifération est fortement inhibée par le SDIF sont des lymphomes T. Les lignées Jurkat, EL-4 et HSB-2 peuvent produire de l'IL-2 (GILLIS et coll., 1980) (FARRAR et coll., 1980) (STADLER et coll., 1981) tandis que les CTL-L sont dépendantes d'IL-2 (BAKER et coll., 1979). Le fait que la prolifération de ces quatre lignées soit inhibée montre que l'inhibition de la prolifération des lignées T par le SDIF est un phénomène indépendant de l'IL-2. La cinquième lignée est la Wehi-3b, qui est une lignée myelomonocytaire mais qui possède l'antigène Thy-1 et pourrait ainsi présenter certaines relations avec les lignées lymphocytaires T (LEE et coll., 1982). La courbe dose-réponse est linéaire dans une faible gamme de concentrations, des dilutions sérielles de 2 en 2 faisant très rapidement disparaître l'effet inhibiteur.

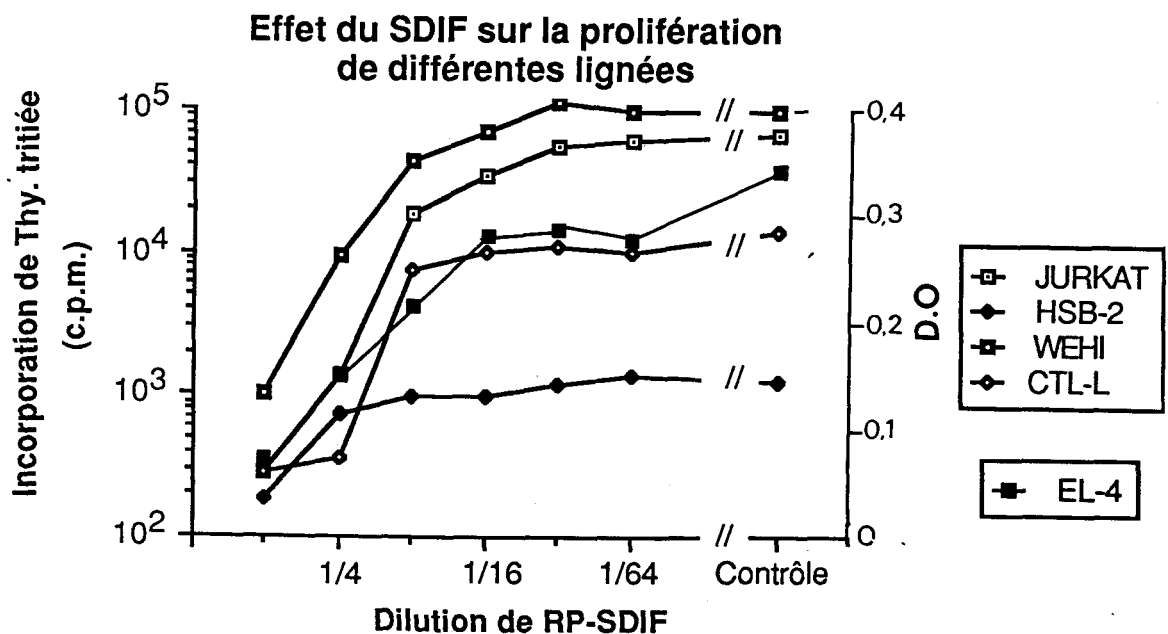


FIGURE 10: Courbes dose-réponse des lignées sensibles à l'action du SDIF. 2×10^4 cellules dans 0,1 ml de RPMI-5 % de SVF sont incubées avec 0,1 ml de différentes dilutions de SDIF-A en RPMI-1% de SVF. L'incorporation de thymidine tritiée (pour les Jurkat, Wehi-3b, HSB-2 et CTL-L) ou la dégradation enzymatique du MTT (pour l'EL-4) sont mesurées après 48 heures de culture.

Les autres lignées cellulaires testées sont d'origine lymphocytaire B, macrophagique ou fibroblastique. Pour ces lignées, l'incorporation de thymidine tritiée mesurée après 48 h de culture en présence de SDIF est la même que dans les cultures témoins (Figure 11). Cependant, lorsque la prolifération était mesurée après 24 h de culture, nous avons observé pour certaines lignées une légère inhibition de l'incorporation de thymidine dans les cultures réalisées en présence de SDIF. Cet effet était transitoire et ne pouvait plus être détecté à 48 hr. On peut donc penser que le SDIF peut aussi agir sur ces cellules mais qu'il s'agit seulement d'un retard dans la prolifération alors que l'effet inhibiteur est irréversible pour les lignées T.

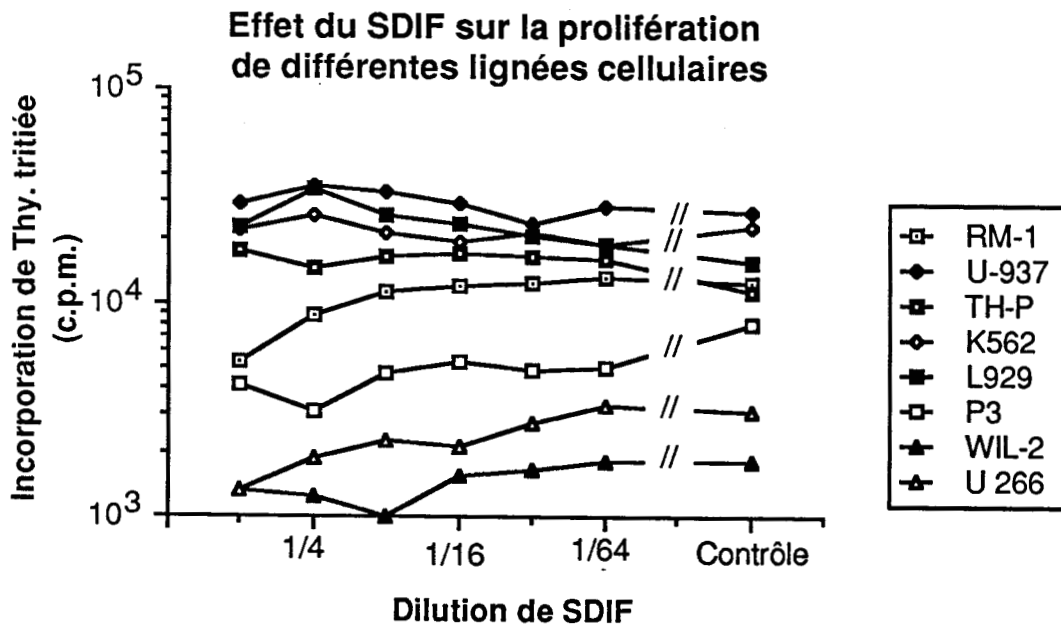


FIGURE 11: Courbes dose-réponse des lignées insensibles à l'action du SDIF. 2×10^4 cellules dans 0,1 ml de RPMI-5 % de SVF sont incubées avec 0,1 ml des différentes dilutions de SDIF-A en RPMI-1 % de SVF. L'incorporation de thymidine tritiée est mesurée après 48 heures de culture.

3.2. Absorption du SDIF par les cellules

Ne possédant ni une préparation homogène de SDIF ni la possibilité de marquer cette molécule, nous ne pouvions aborder l'étude d'un récepteur pour le SDIF. Cependant, quelques expériences préliminaires ont été faites pour savoir si l'activité SDIF peut être absorbée par certaines cellules.

Différentes lignées cellulaires ont été incubées avec du RP-SDIF pendant 3 heures à 4°C ou à 37°C. Après centrifugation, les surnageants sont testés sur la prolifération de la lignée Jurkat. L'établissement de courbes dose-réponse de ces surnageants avant et après incubation avec les lignées cellulaires permet de calculer le pourcentage d'absorption de l'activité SDIF. Lorsque nous avons réalisé ces expériences avec des lignées comme la Wil-2 ou K562, nous nous sommes aperçus que en dehors de la présence du SDIF les surnageants de ces lignées pouvaient par eux-mêmes avoir une activité inhibitrice de la prolifération des Jurkat. Le facteur inhibiteur présent dans ces surnageants étant de poids moléculaire très supérieur à celui du SDIF, nous l'avons éliminé par passage sur Sephadex-G25. Les fractions de petit poids moléculaire ont ensuite été testées de la même façon sur la prolifération des cellules Jurkat. Après 3 heures d'incubation avec la lignée T Jurkat, on constate qu'environ 70% de l'activité SDIF a disparu. Le même résultat a été obtenu que l'incubation soit faite à 37°C ou à 4°C (Tableau 4).

TABEAU 4
ABSORPTION DU SDIF PAR LES CELLULES DE LA LIGNEE JURKAT

T ¹ °C	SDIF ²	Cellules utilisées pour l'absorption ³	Dilutions de surnageants testées ⁴				% Absorption ⁵
			1/8	1/16	1/32	1/64	
4	-	-	45809				
	+	-	381	2284	12657	26352	
	+	Jurkat	6574	20218	23125	36921	69
37	+	-	689	4222	12417	19878	
	+	Jurkat	10329	18144	26528	33125	73

1: Température d'incubation de l'expérience d'absorption. Les cellules utilisées pour l'absorption sont préincubées seules 1 h soit à 4°C soit à 37°C.

2: RP-SDIF en solution dans du RPMI-1 % SVF.

3: Un culot de 10^7 cellules est incubé avec 0,8 ml de RP-SDIF pendant 3 h.

4: Les surnageants sont testés sur la prolifération des cellules de la lignée Jurkat. 2×10^4 cellules sont cultivées pendant 24 h et la prolifération mesurée par incorporation de thymidine tritiée.

5: Le calcul du pourcentage d'absorption est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (§ 3.14).

Les différentes lignées testées Jurkat, Wil-2 et K562 ne montrent pas de différence dans leur capacité d'absorber l'activité SDIF alors que seule la lignée Jurkat voit sa prolifération inhibée par le SDIF (Tableau 5).

TABEAU 5
ABSORPTION DU SDIF SUR DES LIGNEES CELLULAIRES NON T

SDIF ¹	Cellules utilisées pour l'absorption ²	Dilutions de surnageants testées ³				% Absorption ⁴
		1/4	1/8	1/16	1/32	
-	-	74699				
+	-	180	2400	56545	71368	
-	K562	71531	72704	72196	ND	
+	K562	98	11840	49457	ND	67
-	WIL-2	74960	72966	71292	ND	
+	WIL-2	607	37622	67006	ND	73

ND= non déterminé

1: Préparations de RP-SDIF en RPMI-1 % SVF

2: Les cellules utilisées pour l'absorption et le RP-SDIF sont préincubés séparément à 4°C pendant 1 h. Un culot de 10⁷ cellules est incubé avec 0,8 ml de SDIF pendant 3 h.

3: Les surnageants sont chromatographiés sur Sephadex-G25 et les fractions de petit poids moléculaire testées sur la prolifération de cellules de la lignée Jurkat. 2x10⁴ cellules sont cultivées en présence des surnageants pendant 24 h. La prolifération est mesurée par incorporation de thymidine tritiée.

4: Le calcul du pourcentage d'absorption est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (§ 3.14).

La cinétique d'absorption de l'activité SDIF a été suivie à 4°C avec la lignée Jurkat. Une absorption rapide de l'activité est observée pendant les trente premières minutes d'incubation. Pratiquement aucune différence n'est ensuite observée entre 1 h et 3 h d'incubation (Figure 12).



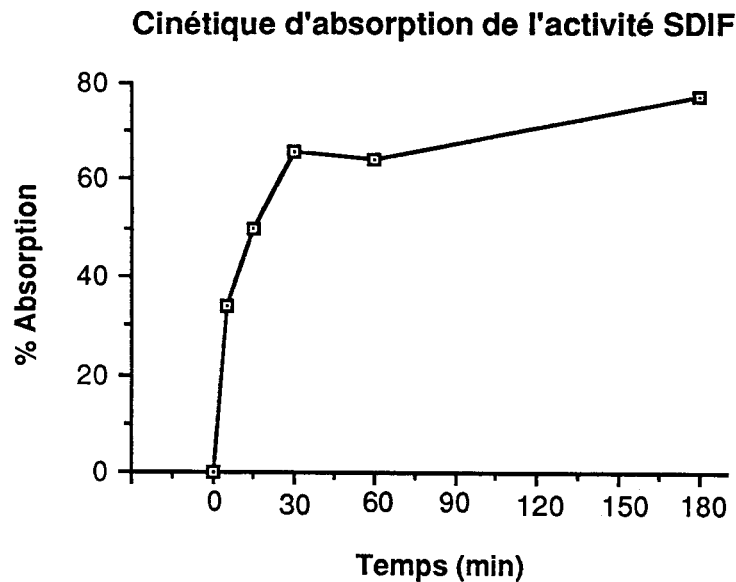


FIGURE 12: Cinétique de l'absorption de l'activité SDIF par les cellules de la lignée Jurkat. 10^7 cellules sont remises en suspension dans 0,8 ml de SDIF-A et incubées à 4°C pendant différentes périodes. Les surnageants de ces cultures sont ensuite testés sur la prolifération des cellules Jurkat et l'incorporation de thymidine mesurée à 24 heures. Le calcul du pourcentage d'absorption est décrit dans le chapitre Matériel et méthodes (§ 3.14).



Nous avons vu dans le chapitre 3.1. que la courbe dose-réponse de l'effet inhibiteur du SDIF sur la lignée Jurkat était linéaire seulement dans une très faible gamme de concentrations (Figure 10). Le même effet a été observé en ce qui concerne le phénomène d'absorption. Pour des concentrations en cellules variant de 10×10^6 à 1×10^6 , 70% de l'activité SDIF était absorbée. Une concentration en cellules cinq fois plus faible (0.2×10^6) n'est plus capable d'absorber suffisamment de SDIF pour lever l'inhibition de la prolifération des Jurkat (Figure 13). Les expériences d'absorption ont été réalisées à 4°C, ce qui ralentit fortement les phénomènes d'endocytose mais ne les bloque pas

complètement. Pour éliminer cette hypothèse, il faudrait compléter ces expériences par des mesures de l'absorption de l'activité SDIF sur des cellules fixées à la glutaraldehyde, traitées par de la trypsine ou encore sur des extraits membranaires.

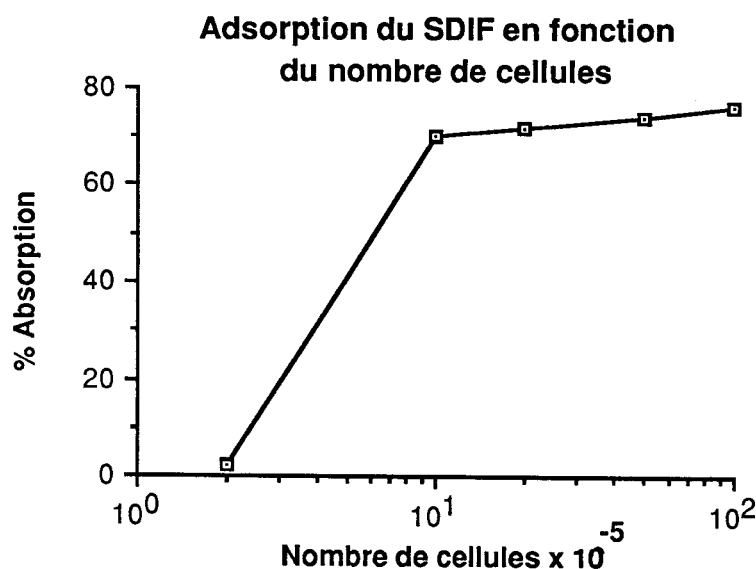


FIGURE 13: Des aliquots de 0,8 ml de SDIF-A sont incubés avec des suspensions de cellules Jurkat à différentes concentrations pendant 3 heures à 4°C. Les surnageants de ces cultures sont ensuite testés sur la prolifération des cellules Jurkat et l'incorporation de thymidine tritiée mesurée à 24 heures. Le calcul du pourcentage d'absorption est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (§ 3.14).



3.3. Effet du SDIF sur le cycle cellulaire des lymphocytes T

Nous avons montré précédemment que l'inhibition de la prolifération par le SDIF s'exerce préférentiellement sur des lymphocytes T. Nous avons cherché à savoir si cet effet se traduit par un blocage des cellules en un point précis du

cycle cellulaire. Pour cela nous avons donc analysé un certain nombre de paramètres d'activation du lymphocyte.

3.3.1. Cinétique de l'inhibition de la prolifération par le SDIF

Des lymphocytes périphériques humains sont cultivés en présence de PHA et le RP-SDIF est ajouté à différents temps avant ou après l'addition de PHA. Lorsque les lymphocytes sont préincubés 24 heures avec le SDIF, puis lavés et mis en contact avec la PHA, aucune inhibition de la prolifération n'est observée, ce qui suggère que le SDIF n'a pas d'action sur des lymphocytes quiescents (Tableau 6). De plus, cette observation confirme l'absence d'effet cytotoxique direct du SDIF sur les cellules.

TABLEAU 6
EFFET DU SDIF SUR LES LYMPHOCYTES QUIESCENTS

Expérience	Incorporation de ^3H -Thymidine cpm, moyenne +/- écart-type
Témoin	61359 +/- 7805
SDIF 1:10	67050 +/- 3382
SDIF 1:20	68307 +/- 9170
SDIF 1:40	72089 +/- 9160

Des lymphocytes périphériques de sujets sains sont incubés pendant 24 heures avec du SDIF ou du milieu, lavés et cultivés en présence de PHA pendant 48 heures. L'incorporation de thymidine est mesurée après un marquage de 6 heures.

Si le SDIF est ajouté en même temps que la PHA ou 24 heures après, on observe un effet inhibiteur important sur la prolifération. Par contre lorsque le SDIF est ajouté plus tard, l'effet inhibiteur ne s'exerce plus (Tableau 7). Le SDIF ne semble donc pas avoir d'action sur les lymphocytes quiescents mais interfère

avec le processus d'activation qui conduit la cellule à la phase S du cycle cellulaire.

TABLEAU 7
CINETIQUE D'INHIBITION DE LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE PAR LE SDIF

Temps d'addition du SDIF	Expérience	Incorporation de ^3H -Thymidine tritiée (c.p.m., moyenne +/- écart-type)	
		48 heures	72 heures
0 h	Témoin	764 +/- 318	1005 +/- 282
	PHA	67044 +/- 4419	79580 +/- 5565
	SDIF 1:10	30314 +/- 5250	38088 +/- 6099
	SDIF 1:20	55222 +/- 3884	50996 +/- 6039
24 h	Témoin	851 +/- 640	1032 +/- 231
	PHA	73215 +/- 7610	86981 +/- 6627
	SDIF 1:10	63669 +/- 5139	65725 +/- 5932
	SDIF 1:20	63869 +/- 11863	75469 +/- 6560
48 h	Témoin		1507 +/- 543
	PHA		79268 +/- 10215
	SDIF 1:10		74302 +/- 7761
	SDIF 1:20		78643 +/- 6598



Des lymphocytes périphériques de sujets sains sont cultivés en présence de PHA (dilution finale 1:4000). Le SDIF est ajouté à différents temps après l'addition de PHA. L'incorporation de thymidine tritiée est mesurée à 48 et 72 heures après un marquage de 6 heures.

3.3.2. Effet du SDIF sur des événements associés au cycle cellulaire

Toujours en utilisant des lymphocytes humains stimulés par la PHA, nous avons déterminé par cytofluorométrie la proportion de cellules en phase G1 du cycle cellulaire en présence ou non de SDIF. Une coloration à l'acridine orange permet d'apprécier la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Lorsque nous avons utilisé des concentrations en lectines induisant une prolifération optimale, l'effet inhibiteur du SDIF était beaucoup moins évident. C'est pourquoi dans toutes ces expériences, nous avons utilisé des concentrations suboptimales. Le Tableau 8 montre qu'avec de telles concentrations en lectines, un pourcentage relativement faible de cellules passe en phase G1. Même lorsque le SDIF est ajouté au début de la culture, aucune différence dans le pourcentage de cellules passant en phase G1 n'a pu être notée. Par contre l'incorporation de thymidine réalisée avec les mêmes cellules est inhibée de 86% pour une dilution de SDIF au 1/5 et 65% pour une dilution au 1/10. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition n'est pas due à une diminution du nombre de cellules entrant dans le cycle sous l'action du mitogène.

TABLEAU 8
EFFET DU SDIF SUR L'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE

Temps de l'analyse	Expérience	Pourcentage de cellules en		
		G0	G1	S,G2, M
24 h	PHA	77	23	0
	+ SDIF 1:5	80	20	0
	+ SDIF 1:10	76	24	0
48 h	PHA	75	22	3
	+ SDIF 1:5	78	20	2
	+ SDIF 1:10	72	27	4
72 h	PHA	67	27	6
	+ SDIF 1:5	68	25	7
	+ SDIF 1:10	61	33	3



Des lymphocytes périphériques de sujets sains sont cultivés en présence de PHA (dilution finale 1:4000) et de SDIF. Après 24, 48 et 72 heures de culture, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est analysée au cytofluorographe après coloration à l'acridine orange.

Au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, un certain nombre de marqueurs apparaissent à la surface de la cellule. Les récepteurs pour l'interleukine 2 (CD25) apparaissent relativement tôt (BETTENS et coll., 1984) tandis que les récepteurs pour la transferrine (CD9) sont détectables en fin de phase G1 (HERCEND et coll., 1981). De même que nous n'avions pas détecté de différence dans le contenu en ARN entre les cultures faites en présence ou non de SDIF, de même aucune différence n'apparaît en ce qui concerne le pourcentage de cellules portant des récepteurs pour l'IL-2 et la transferrine (Tableau 9). La densité des récepteurs estimée par l'intensité de fluorescence des cellules marquées n'est pas modifiée non plus.

TABLEAU 9
EFFET DU SDIF SUR L'EXPRESSION DES RECEPTEURS POUR L'IL-2 ET LA TRANSFERRINE.

Temps de l'analyse	Expérience	Pourcentage de cellules positives	
		Anti-Tac *	Anti-Transferrine
24 h	PHA	31	25
	+ SDIF 1:5	32	32
	+ SDIF 1:10	24	25
48 h	PHA	35	36
	+ SDIF 1:5	40	41
	+ SDIF 1:10	33	33



Des lymphocytes périphériques de sujets sains sont cultivés en présence de PHA (dilution finale 1:4000) et de SDIF pendant 24 ou 48 heures. Les résultats sont donnés en pourcentage de cellules positives. Le bruit de fond des cellules cultivées sans PHA est déduit.

* Anti-Tac: anticorps monoclonal reconnaissant le récepteur pour l'IL-2.

La production d'IL-2 se fait également par des lymphocytes activés au cours de la phase G1. Il y a consommation autocrine de l'IL-2 produite en phase G1 par les cellules en phase S du cycle cellulaire. STADLER et coll. (1981) ont montré que des agents comme l'hydroxyurée qui ont la propriété de bloquer la prolifération dans la transition G1-S provoquent une accumulation de l'IL-2 dans le surnageant par manque de consommation de l'IL-2 en phase S. Nous avons donc testé cette hypothèse en dosant l'activité biologique de l'IL-2 présente dans des surnageants de cultures de lymphocytes stimulés par la PHA en présence ou non de SDIF. Là encore, la concentration en PHA utilisée est suboptimale de façon à se placer dans des conditions de faible production d'IL-2. L'addition d'hydroxyurée accroît d'un facteur 10 le taux d'IL-2 dans les surnageants (Tableau 10). On constate que le SDIF est aussi responsable d'un accroissement de la quantité d'IL-2 contenue dans les surnageants. Il est probable que le même mécanisme soit mis en jeu pour ces deux molécules, à savoir une production normale d'IL-2 mais une diminution de la consommation de l'IL-2 en phase S conduisant à une accumulation d'IL-2 dans le surnageant.

TABLEAU 10
EFFET DU SDIF SUR LA PRODUCTION D'IL-2

Expérience	IL-2 (U/ml) dans les surnageants de		
	24 h	48 h	72 h
PHA	26 +/- 7	26 +/- 8	0
PHA + SDIF 1:5	125 +/- 40	111 +/- 158	200 +/- 106
PHA + SDIF 1:10	35 +/- 8	29 +/- 10	29 +/- 7
PHA + HU	264 +/- 42	258 +/- 48	207 +/- 21

Des lymphocytes périphériques de sujets sains sont cultivés en présence de PHA et de SDIF ou de 2 mM d'hydroxyurée (HU). Les surnageants sont prélevés à différentes périodes de culture, dialysés et testés en activité IL-2 sur la prolifération de cellules de la lignée CTL-L.

Ces observations ont été confirmées par le fait qu'un excès d'IL-2 n'est pas capable de lever l'inhibition exercée par le SDIF sur une prolifération dépendante d'IL-2. Nous avons utilisé deux types de populations cellulaires pour ces expériences. On peut à partir d'une culture lymphocytaire mixte (MLC) (lymphocytes cultivés en présence de cellules d'un donneur histoincompatible) dériver des lignées dont la prolifération sera à la fois dépendante de la restimulation par l'antigène (en l'occurrence il s'agit d'un alloantigène) et par de l'IL-2 (DAVIDSON, 1977) (LARSSON et coll., 1980). La deuxième population est constituée de blastes issus de la stimulation de splénocytes de souris par la ConA. Après 72 h de culture en présence de ConA et lavage, les blastes ne sont plus réactifs à la ConA mais sont par contre sensibles à l'IL-2 (ANDERSSON et coll., 1979). Ces cellules sont d'ailleurs souvent utilisées comme cibles pour le dosage de l'activité biologique de l'IL-2. Ces deux populations ont donc été cultivées en présence de quantités croissantes d'IL-2 et l'effet du SDIF sur la prolifération de ces cellules a été mesuré par l'incorporation de thymidine tritiée. Les Figures 14 et 15 montrent effectivement un effet inhibiteur du SDIF sur la prolifération de ces cellules.

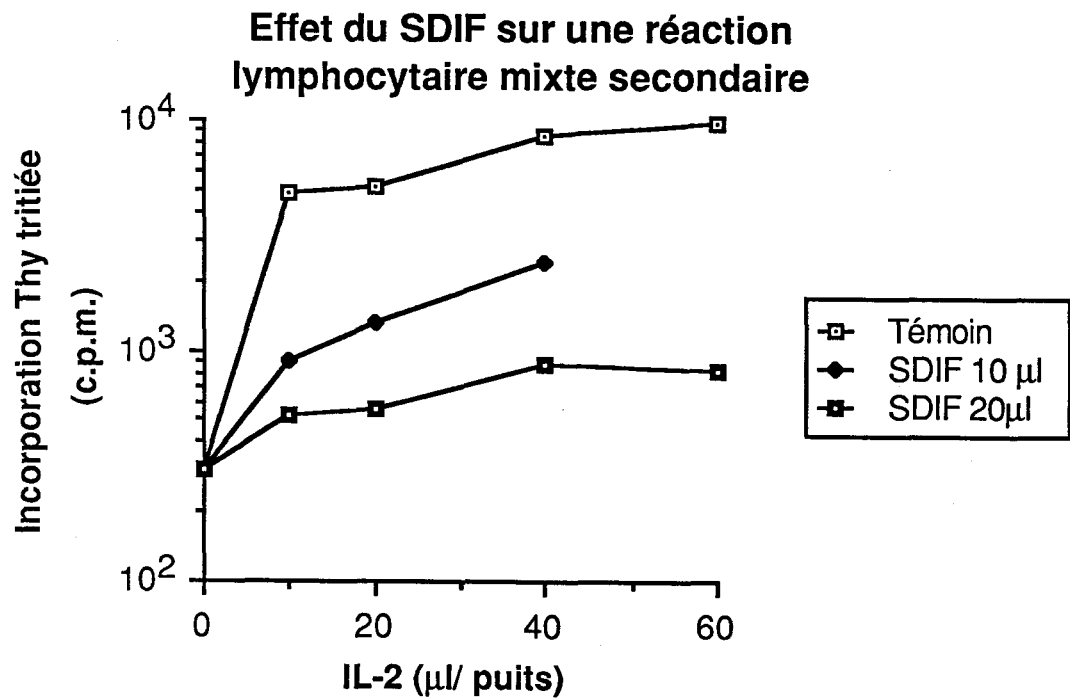


FIGURE 14: Des CTL obtenus après culture lymphocytaire mixte de 12 jours sont cultivés en présence de différentes concentrations d'IL-2 et de SDIF. La prolifération est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée à 24 heures.



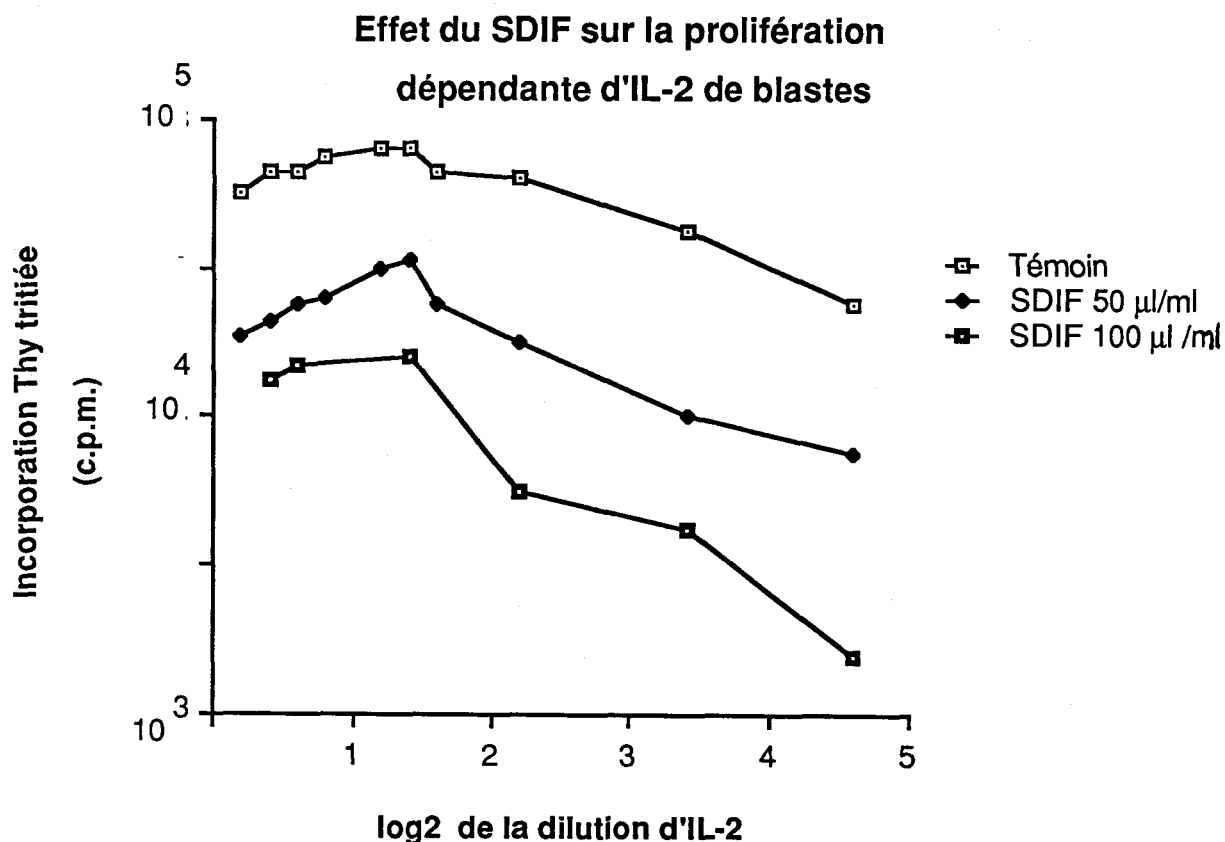


FIGURE 15: Des lymphoblastes obtenus par préculture de cellules spléniques 72 heures avec de la ConA sont cultivés en présence de différentes concentrations d'IL-2 et de SDIF. La prolifération est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée à 24 heures.



Pour les plus fortes concentrations en IL-2, on observe dans les cultures réalisées en absence de SDIF soit un plateau dans le cas des lignées MLC, soit une diminution de la prolifération dans le cas des blastes, ce qui témoigne d'un excès d'IL-2 dans le milieu. Même en présence de ce large excès, la prolifération des cellules est inhibée par le SDIF, ce qui suggère que cet effet inhibiteur est indépendant du signal délivré par l'IL-2.

3.3.3. Recherche d'un point d'arrêt dans le cycle cellulaire

Nous avons vu précédemment que le SDIF n'a pas d'activité sur les cellules en G0 ni sur plusieurs paramètres de la phase G1. Une autre technique permet d'analyser l'effet du SDIF sur des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Il s'agit d'un procédé de centrifugation qui sélectionne les cellules en fonction de leur taille. Or ce paramètre varie au cours du cycle cellulaire. Une suspension cellulaire de la lignée Jurkat a été séparée par cette méthode. Les différentes fractions ont été analysées au cytofluorographe après coloration à l'acridine orange.

TABEAU 11
SEPARATION DES CELLULES JURKAT PAR ELUTRIATION

N°	Vitesse (rpm)	Distribution des cellules ¹			Incorporation des cellules ³ H-Thy (cpm) ²			
		G1a	G1b	S,G2,M	0->2 h	2->4 h	4->6 h	6->18 h
1	2420	26	69	5	943	1720	3741	68358
2	2300	9	87	4	1491	3164	7045	104195
3	2200	12	81	7	3179	6726	11386	115490
4	2150	11	81	8	4078	8405	13252	94764
5	2100	3	83	14	4928	7809	11761	56188
6	2050	4	71	25	8744	12725	18064	72120
7	1900	6	40	54	13565	16745	16068	69904
8	1700	3	22	75	6082	5149	4711	96824

1: Des aliquots des différentes fractions obtenues par élutriation sont analysées au cytofluorographe après coloration à l'acridine orange.

2: Après élutriation, les cellules des différentes fractions sont mises en culture. Des marquages à la thymidine tritiée sont réalisés aux différents temps indiqués.

L'analyse du tableau 11 montre que différentes populations cellulaires enrichies en cellules en phase G1 (fraction 1 à 4) ou en cellules en phase S,G2,M (fraction 8) peuvent être obtenues par cette technique. Ces populations cellulaires ont été mises en culture en présence ou non de RP-SDIF et l'incorporation de thymidine tritiée est mesurée après différentes périodes de culture. Les résultats de l'incorporation de thymidine correspondant aux marquages des différentes populations cellulaires cultivées en l'absence de SDIF sont donnés dans le Tableau 11.

Le premier marquage (de 0 à 2 heures de culture) confirme les résultats obtenus par cytofluorométrie. La fraction 7 qui est la plus enrichie en cellules début de phase S est la fraction qui incorpore le plus alors que la fraction 1 a besoin de plus de 6 heures pour commencer à synthétiser de l'ADN. On peut noter que certaines cellules de la fraction 8 entrent dans un second cycle au cours du dernier marquage (6 à 18 heures de culture). En présence de SDIF, on observe une inhibition de l'incorporation de thymidine variable suivant les populations cellulaires et leur évolution dans le cycle cellulaire (Figure 16). C'est la prolifération des cellules de la fraction 1 qui est la plus affectée par le SDIF tandis que les cellules de la fraction 8 ne le sont pratiquement pas au cours du marquage de 2 à 6 heures; elles ne sont inhibées que lorsqu'elles reviennent dans la phase S du second cycle. Ces résultats montrent que la plus grande inhibition est observée lorsque les cellules sont traitées par le SDIF peu de temps avant de passer de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Lorsque la majorité des cellules a effectué la transition G1-S, l'effet inhibiteur du SDIF est alors minimal. En conclusion, il semble que le SDIF agisse sur les cellules en fin de phase G1 ou en début de phase S. On peut imaginer que le blocage de la prolifération se fasse au niveau de la transition G1-S comme dans le cas de l'hydroxyurée.

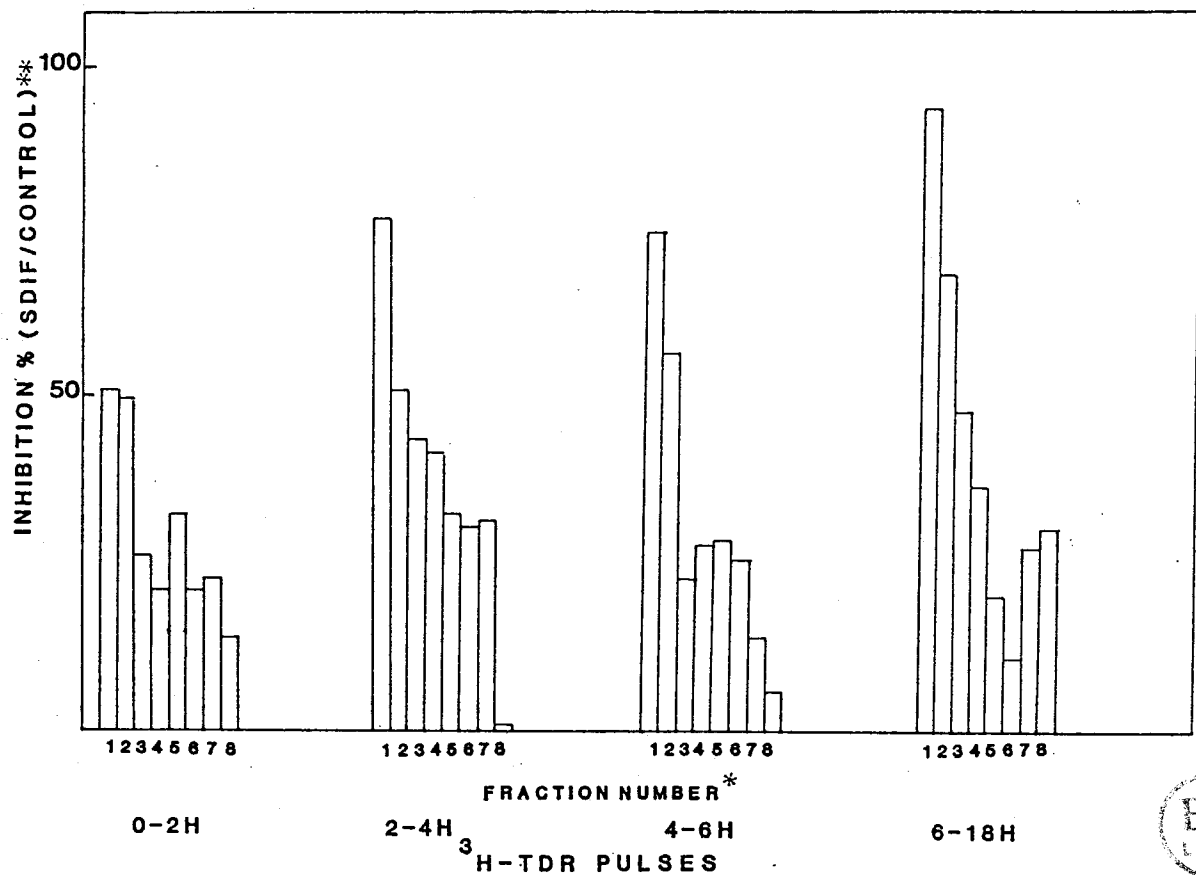


FIGURE 16: Effet du SDIF sur le cycle cellulaire des cellules Jurkat. Différentes fractions cellulaires obtenues par élutriation sont cultivées en présence ou non de SDIF. Les numéros des fractions correspondent à ceux qui figurent dans le Tableau 11. Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cultures faites en présence de SDIF par rapport aux cultures témoins.

3.4. Discussion

Les premiers travaux réalisés sur le SDIF par DESSAINT et coll. (1977) avaient montré une inhibition de la prolifération des lymphocytes. Il s'agissait alors de populations lymphocytaires périphériques ou provenant d'organes lymphoïdes, c'est à dire de populations hétérogènes contenant non seulement différentes sous-populations lymphocytaires mais également d'autres cellules comme des macrophages. De façon à pouvoir déterminer si le SDIF exerce un effet inhibiteur sélectif de certaines populations cellulaires, nous avons utilisé des cellules cultivées in vitro en lignées continues. Nous avons vérifié que l'inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée observée pour certaines lignées n'est pas due à un effet cytotoxique. Il est évident que si l'on dépasse un certain seuil, le SDIF peut être cytotoxique comme la plupart des molécules à activité biologique. Cependant nous avons utilisé pour cette étude comparative sur les lignées les mêmes concentrations non cytotoxiques de SDIF par rapport à un même nombre de cellules. Nous avons également vérifié que la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée n'est pas due à un phénomène de dilution isotopique due à la présence de thymidine froide dans les préparations de SDIF. En effet, une corrélation est observée entre la réduction du nombre de cellules appréciée par observation microscopique et la diminution de l'incorporation de thymidine. Pour certaines lignées nous avons apprécié la prolifération par la mesure d'une activité enzymatique et avons pu également observer un effet inhibiteur du SDIF.

La prolifération de toutes les lignées cellulaires T testées jusqu'à présent est inhibée par le SDIF. Cet effet est observé aussi bien sur des lignées dépendantes d'IL-2 que sur des lignées indépendantes. D'autres éléments confirment par ailleurs que l'inhibition exercée par le SDIF n'a pas de rapport direct avec le signal délivré par l'IL-2 puisque nous avons montré que ce facteur ne modifie ni la production d'IL-2 ni l'acquisition des récepteurs pour l'IL-2 au

cours du cycle cellulaire. De plus, un excès d'IL-2 ne permet pas de lever l'inhibition de la prolifération de cellules dépendantes d'IL-2. Parmi les lignées testées, la prolifération de la lignée Wehi-3b est affectée par le SDIF. Cette lignée dont la particularité est de produire de façon constitutive de l'IL-3 (LEE et coll., 1982) est d'origine myelomonocytaire (KOREN et coll., 1975) mais la présence de l'antigène Thy-1 sur cette lignée pourrait la rapprocher des lignées lymphoïdes. Etant donné le nombre limité de lignées que nous avons testées, ces résultats n'excluent d'ailleurs pas que d'autres lignées non T puissent être sensibles à l'action du SDIF.

Avec les autres lignées que nous avons testées l'effet inhibiteur du SDIF était tout à fait différent. Durant les seize premières heures de culture en présence de SDIF, nous avons souvent observé une phase de latence prolongée mais cet effet était transitoire et suivi d'une période où l'incorporation de thymidine était même parfois supérieure à celle des cultures contrôles. Un effet similaire a été montré avec un agent pharmacologique le phorbol myristate acétate (PMA). Cet agent inhibe temporairement la progression des cellules dans le cycle en bloquant les cellules en phase G1 (MOSES et coll., 1980). Ce blocage temporaire accroît la synchronicité des cellules et est suivi d'une augmentation du nombre de cellules entrant en phase S (TOMEI et coll., 1981). Alors que la prolifération induite par le LPS (activateur polyclonal plus ou moins thymodépendant des lymphocytes B) est inhibée par le SDIF (DESSAINT et coll., 1977), nous montrons ici que la prolifération de lignées lymphocytaires B est peu ou pas affectée par le SDIF. On peut difficilement comparer la prolifération de cellules tumorales avec la prolifération d'une sous-population lymphocytaire B normale stimulée par un activateur polyclonal, d'autant plus que l'activation par le LPS peut être thymodépendante. Pour expliquer ces divergences, il faudrait connaître les exigences métaboliques de ces populations cellulaires ainsi que le(s) point(s) d'impact du SDIF sur les événements métaboliques associés au cycle

cellulaire. Ces résultats apparemment contradictoires peuvent être rapprochés de ce qui a été observé pour une autre molécule immunosuppressive, la cyclosporine A qui est maintenant largement utilisée en transplantation pour limiter le rejet des greffes. Cette molécule a un effet très puissant sur la prolifération lymphocytaire T (WIESINGER & BOREL, 1979) et pendant plusieurs années un effet sélectif sur les lymphocytes T a été attribué à cette molécule (revue par SHEVACH, 1985). En réalité la cyclosporine A peut aussi avoir des effets sur les lymphocytes B (KUNKL & KLAUS, 1980), effets qui sont d'ailleurs variables en fonction de la nature de la stimulation et de l'état de maturation des lymphocytes B (KLAUS & HAWRYLOWICZ, 1984).

La sélectivité d'action du SDIF sur certaines populations cellulaires aurait pu s'expliquer par la présence ou l'absence d'un récepteur pour le SDIF à la surface des cellules. Malheureusement nous n'avons pas les moyens de faire une véritable étude sur le récepteur du SDIF. Cependant les expériences d'absorption sur des culots cellulaires montrent que l'on peut absorber l'activité SDIF sur des cellules, que ce soit à 4°C ou à 37°C. Ce processus est dépendant du nombre de cellules et présente une cinétique comparable à celle de la fixation de l'IL-2 sur son récepteur (ROBB et coll., 1981). Nous avons tout à fait conscience de la précarité de ces informations mais pour démontrer la présence d'un récepteur, il faudrait bien évidemment disposer d'une molécule marquée. Cependant le fait que l'activité SDIF soit absorbée sur des cellules qu'elles soient inhibées ou non par le SDIF montre que la sélectivité d'action ne peut probablement pas s'expliquer par une différence dans la capacité de fixer le SDIF. Ceci a déjà été observé pour la cyclosporine A. Des clones sélectionnés pour leur résistance ou leur sensibilité à la cyclosporine possèdent tous le même récepteur (KOPONEN & LOOR, 1983).

L'analyse des événements associés au cycle cellulaire montre que le SDIF agit sur les cellules qui sont dans le cycle et n'a pas d'action directe sur les

cellules en phase G0. Il semble que le blocage se fasse en fin de phase G1 ou en tout de début de phase S puisque la progression des cellules en phase G1 se fait normalement. Le contenu en ARN, l'acquisition des récepteurs pour l'IL-2 et pour la transferrine ainsi que la production d'IL-2 se font normalement. En sélectionnant des populations cellulaires de la lignée T Jurkat enrichies en différentes phases du cycle cellulaire, nous avons confirmé que le blocage s'effectue au niveau de la transition G1-S. A l'époque où nous avons réalisé ces expériences, l'analyse au cytofluorographe ne nous permettait pas de distinguer les cellules en phase S des cellules en phase G2 ou M. On ne peut donc pas exclure que sous l'action du SDIF un second point d'arrêt existe en phase G2 ou M. Il est connu que la transition G1-S est un des points de restriction du cycle cellulaire. Dans le cas des lymphocytes B, il existe trois points de restriction dont un en phase G2 (MELCHERS et coll., 1985). Il apparaît aussi que lorsque le SDIF est ajouté à des cellules qui sont en fin de phase S ou en G2,M, l'effet inhibiteur du SDIF sur l'incorporation de thymidine des cellules entrant dans le second cycle est moindre. Ceci pourrait être relié à un accroissement du nombre des cellules ayant pour conséquence une absorption du SDIF répartie sur un plus grand nombre de cellules et donc une efficacité moindre. Outre l'effet d'absorption, il est possible aussi que le SDIF soit rapidement inactivé in vitro. Nous avons d'ailleurs observé dans des cultures de splénocytes de souris stimulés par la ConA que la prolifération était fortement inhibée pendant 48 à 72 heures et que après cette période l'effet inhibiteur disparaissait sauf si l'on rajoutait à la culture du SDIF frais. Ce phénomène d'inactivation est observé seulement en présence de cellules et l'activité SDIF ne disparaît pas si l'on incube le SDIF dans le milieu de culture pendant 48 heures à 37°C. Nous ne savons pas quelle est la part de l'absorption du SDIF par les cellules dans ce processus d'inactivation. L'emploi d'inhibiteurs enzymatiques pourrait peut-être apporter des éclaircissements à ce sujet.

Les lymphocytes T normaux produisent la plupart de leurs lymphokines au cours de la phase G1 du cycle cellulaire. Ce processus n'est donc pas inhibé par le SDIF. Néanmoins, comme le SDIF inhibe l'expansion clonale des lymphocytes T, on peut supposer que cette molécule aura des effets inhibiteurs in vitro et in vivo sur les réponses T dépendantes nécessitant une prolifération des lymphocytes. Nous allons voir au cours du chapitre suivant trois exemples de l'effet du SDIF sur des réponses T dépendantes. Le premier est la génération de lymphocytes cytotoxiques in vitro, le second la prolifération d'un lymphome T in vivo, et le troisième la production d'anticorps et notamment d'anticorps IgE in vivo.

4. EFFET DU SDIF SUR CERTAINES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES T

4.1. Effet du SDIF sur les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

Au cours des expériences initiales réalisées par DESSAINT et coll. (1977), il est apparu que la prolifération lymphocytaire induite dans une réaction lymphocytaire mixte est inhibée par le SDIF. Il est connu que des lymphocytes cytotoxiques peuvent être induits au cours des réactions lymphocytaires mixtes. Nous avons recherché si l'inhibition de la prolifération se traduit par une diminution de la génération des effecteurs cytotoxiques, ainsi que les relations avec la génération de cellules suppressives. L'effet du SDIF sur l'expression de la fonction cytotoxique a également été analysé.

4.1.1. Effet du SDIF sur la génération de CTL

Des cellules spléniques de souris C57/B16 dont les haplotypes sont H-2^b sont cultivées en présence de cellules spléniques de souris DBA/2 (H-2^d) préalablement irradiées. Une culture faite en présence de cellules syngéniques irradiées sert de contrôle. Après 5 jours de culture, les lymphocytes sont prélevés, lavés et le nombre de cellules viables compté. Leur activité cytotoxique est testée sur des cibles marquées au ⁵¹Cr provenant de souris DBA/2. Au bout des 5 jours de culture, le même nombre de cellules viables a été observé que les cellules stimulantes soient syngéniques ou allogéniques. De même la présence du SDIF ne modifie pas le nombre de cellules viables en fin de culture. Il semble donc que ce nombre de cellules mesuré après 5 jours de culture ne reflète pas la prolifération. Par contre, une diminution d'environ 50% de l'activité cytolytique est observée lorsque la culture lymphocytaire mixte a été faite en présence de SDIF (Tableau 12).

TABEAU 12
EFFET DU SDIF SUR LA GENERATION DE CTL

Cellules effectrices ^a	Cellules stimulantes ^a	% cell. viv. ^b	% libération de ⁵¹ Cr		
			20:1 ^c	5:1 ^c	1,25:1 ^c
incubées avec					
Milieu	C57BL/6	23	12 +/- 1,8	5,8 +/- 1,8	0
Milieu	DBA/2	29	50 +/- 4,6	45 +/- 2,1	26 +/- 2,7
SDIF	DBA/2	25	27 +/- 3,7 ^d (46 %) ^e	21 +/- 1,9 ^d (54 %) ^e	10 +/- 1,9 ^d (52 %) ^e

a: Des cellules spléniques de souris C57BL/6 (6×10^6) sont cultivées en présence de cellules stimulantes irradiées (3×10^6) pendant 5 jours. Un aliquot de SDIF est ajouté chaque jour (concentration finale = 100 µl/ml).

b: Pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules totales au jour 5.

c: Rapport cellules effectrices: cellules cibles (basé sur le nombre de cellules viables).

d: $p < 0,005$.

e: % inhibition de l'activité cytotoxique.

Lorsque l'on utilise comme précurseurs des CTL des thymocytes, la génération des CTL est dépendante de l'addition d'une source de lymphocytes T helper radiorésistants (BAUM & PILARSKI, 1978). Ces cellules "helper" produisent de l'IL-2 nécessaire à la génération des CTL. Nous avons utilisé ce système expérimental pour analyser l'effet du SDIF directement sur les précurseurs des CTL. Les populations "helper" sont obtenues par cocultures de cellules spléniques de souris C57/Bl6 et de cellules irradiées de souris DBA/2. Après 48 heures de culture, ces cellules sont irradiées pour empêcher toute prolifération ultérieure et ajoutées à une culture lymphocytaire mixte contenant cette fois des

thymocytes de souris C57Bl/6 comme cellules effectrices et des splénocytes irradiés de souris DBA/2 comme cellules stimulantes. Après cinq jours de culture, l'activité cytotoxique de ces cellules est testée comme précédemment. Comme le montre le Tableau 13, la génération d'une activité cytotoxique est obtenue seulement lorsque les cellules "helper" sont présentes dans le système. Cette génération est pratiquement totalement inhibée lorsque la seconde réaction lymphocytaire mixte est réalisée en présence de SDIF. L'addition des cellules T "helper" dans ce système est nécessaire comme source d'IL-2 car les thymocytes ne sont pas capables d'en produire suffisamment pour induire la prolifération des précurseurs CTL.

TABEAU 13

EFFET DU SDIF SUR LA GENERATION DE CTL EN PRESENCE DE CELLULES T HELPER

Cellules effectrices ^b incubées avec	Cellules stimulantes ^b	Cellules Helper ^a	% Cellules viables ^c	% Libération ⁵¹ Cr	
				A ^d	B ^d
Milieu	C57Bl/6	+	16	0	0
Milieu	DBA/2	-	16	5 +/- 1	3,1 +/- 1,9
Milieu	DBA/2	+	30	66 +/- 12	42 +/- 2
SDIF	DBA/2	+	31,5	12,5 +/- 1,3 ^e	7,5 +/- 1,6 ^f

a: Les cellules helper sont obtenues par cocultures de 8×10^6 cellules spléniques de souris C57Bl/6 et de 8×10^6 cellules spléniques irradiées de souris DBA/2 pendant 48 h.

b: Des thymocytes de souris C57Bl/6 (cellules effectrices) sont cultivées en présence de 1×10^6 cellules helper irradiées et de 5×10^6 cellules stimulantes de souris DBA/2 irradiées pendant 5 jours.

c: Pourcentage de cellules viables au jour 5.

d: A et B = 2×10^6 et $0,5 \times 10^6$ thymocytes ajoutés à 2×10^4 cellules cibles.

e: $p < 0,02$

f: $p < 0,005$

Nous avons vu au cours du chapitre précédent que le SDIF n'affecte pas la production d'IL-2. L'effet que nous observons ici pourrait s'expliquer par un effet sur les précurseurs des CTL soit direct soit médié par une population à activité suppressive. Cette deuxième hypothèse a été envisagée et testée dans le système expérimental suivant.

4.1.2. Effet du SDIF sur la génération de cellules suppressives non spécifiques

On peut obtenir par culture pendant 3 à 7 jours de cellules spléniques in vitro une génération de cellules suppressives non spécifiques. Ces cellules ont la propriété lorsqu'elles sont ajoutées à une culture lymphocytaire mixte de supprimer la génération des CTL (HODES & HATHCOCK, 1976). Nous avons donc réalisé une culture lymphocytaire mixte dans les conditions décrites précédemment en y ajoutant des cellules spléniques issues d'une préculture de 7 jours faite en présence ou non de SDIF. A l'issue des 5 jours de culture la cytotoxicité des cellules issues de la culture lymphocytaire mixte est testée de la même manière que précédemment. Dans le Tableau 14 figure le pourcentage de cellules viables récupérées à la fin de la culture lymphocytaire mixte de 5 jours en présence ou non de cellules suppressives. La Figure 17 montre le pourcentage de cytotoxicité correspondant pour ces différentes populations. Lorsque la préculture a été faite en l'absence de SDIF, ces cellules peuvent exprimer leur pouvoir supprimeur puisqu'aucune génération de CTL n'est obtenue au cours de la culture lymphocytaire mixte. Par contre, lorsque la préculture a été faite en présence de SDIF, on observe une génération de CTL pratiquement similaire à celle d'une culture lymphocytaire mixte normale, ce qui montre que la présence du SDIF a empêché le développement de l'activité suppressive. Cet effet n'est pas dû à une cytotoxicité du SDIF sur les cellules puisque le même nombre de cellules viables est obtenu à la fin de la préculture de 7 jours en présence ou en absence de SDIF. Ceci confirme l'observation réalisée au cours de la génération

TABLEAU 14
EFFET DU SDIF SUR LE DEVELOPPEMENT DE CELLULES
SUPPRESSIVES NON SPECIFIQUES

Cellules suppressives ^a (1×10^6) Préculture faite avec:		% Cellules ^b viables à J5
-		140
1:	Milieu	49
2:	SDIF 50 μ l/ml	89
3:	SDIF 100 μ l/ml	98
4:	Cellules spléniques fraîches	140



a: Des cellules spléniques de souris C57BL/6 sont précultivées 7 jours avec ou sans SDIF et ajoutées à une culture lymphocytaire mixte.

b: Une culture mixte est réalisée par coculture de 4×10^6 cellules effectrices de souris C57BL/6 et de 1×10^6 cellules stimulantes irradiées de souris DBA/2. Les cellules suppressives issues de la préculture sont ajoutées au jour 0. Les cellules sont comptées à la fin de la culture de 5 jours et testées en activité cytotoxique.

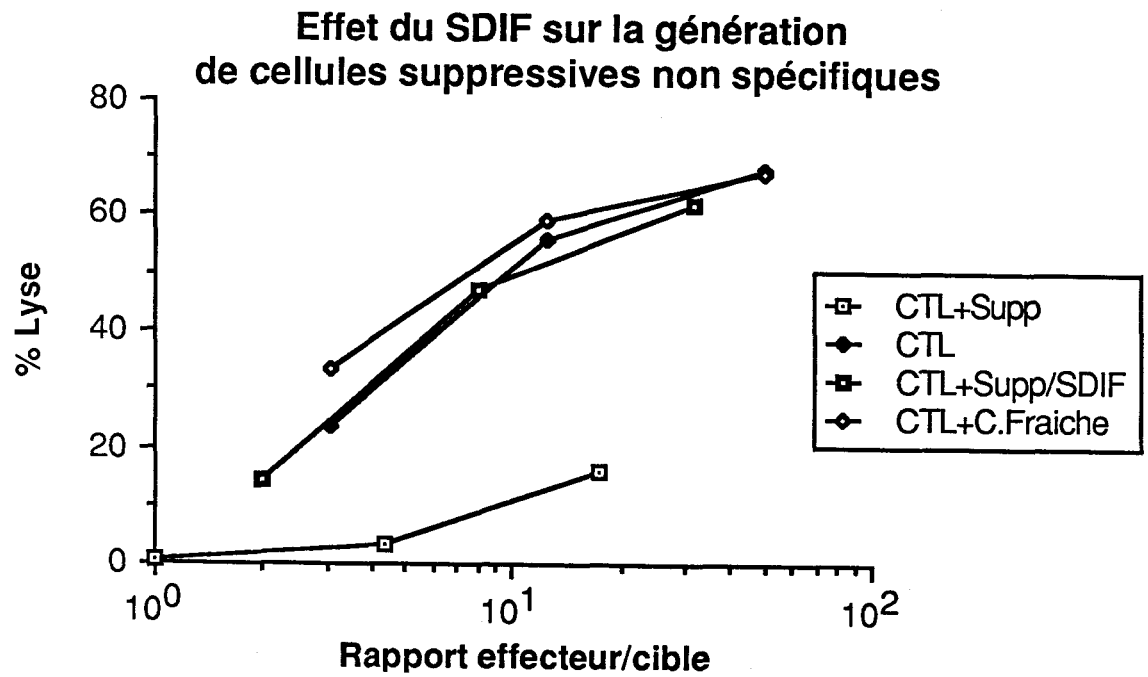


FIGURE 17: Les caractéristiques des populations cellulaires concernées sont indiquées dans le tableau 12. La cytotoxicité de ces cellules est testée au jour 5 sur 2×10^4 cellules cibles L1210. La lyse des cellules cibles contrôles (EL-4) est inférieure à 10 %.



des CTL en culture lymphocytaire mixte où l'effet du SDIF apparaissait net au niveau de la génération des CTL alors que le nombre de cellules ne reflétait pas cet effet.

4.1.3. Effet du SDIF sur l'expression de la cytotoxicité des CTL

Le SDIF est cette fois ajouté dans le test de cytotoxicité. Quand les effecteurs cytotoxiques sont préincubés avec le SDIF 1 heure avant l'addition des cibles une inhibition de l'activité cytolytique dépendante de la dose de SDIF est observée (Figure 18). Par contre, lorsque le SDIF est ajouté en même temps que les effecteurs et les cellules cibles, l'effet inhibiteur est très réduit et n'est observé que pour les plus fortes concentrations de SDIF. De même une inhibition modérée est obtenue si les effecteurs sont préincubés avec le SDIF puis lavés et mis en contact avec les cibles.

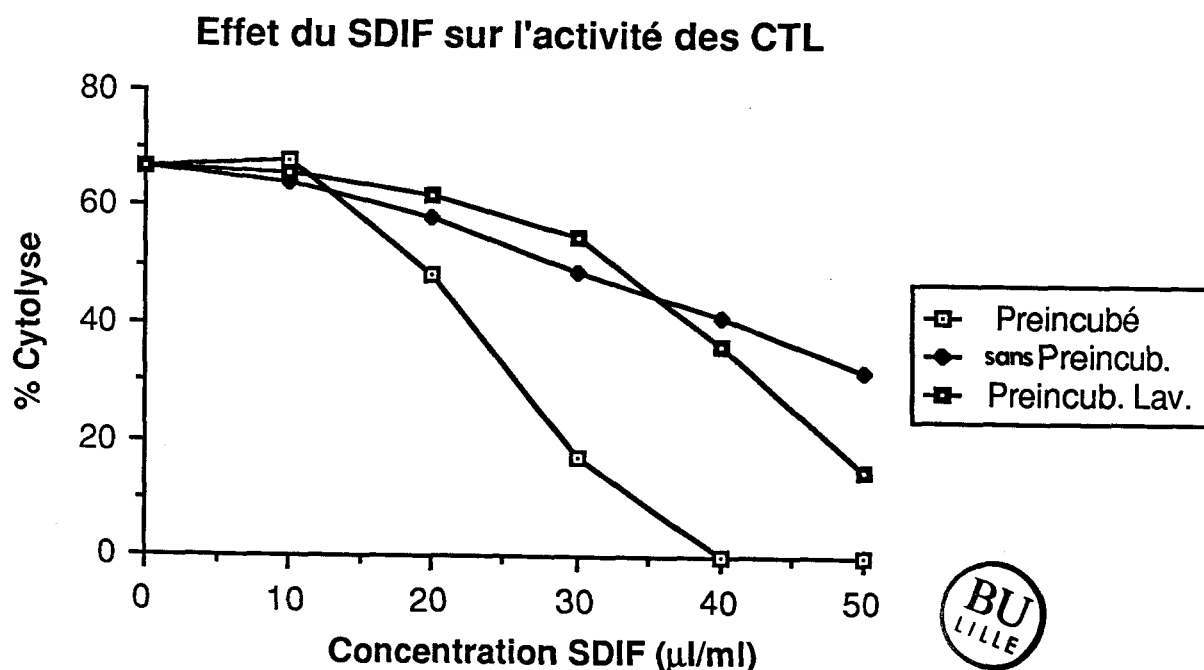


FIGURE 18: L'activité cytotoxique des cellules effectrices (4×10^5 /puits) est testée sur des cibles (2×10^4 /puits) en présence de SDIF. Les effecteurs sont préincubés ou non avec le SDIF comme l'indique la légende.

4.1.4. Discussion

La génération de lymphocytes cytotoxiques au cours d'une réaction lymphocytaire mixte est dépendante de deux signaux, l'un délivré par l'alloantigène présent sur la cellule stimulante et le second étant l'IL-2 produite par des cellules T "helper" (TEH & TEH, 1980). Ce processus implique une prolifération des précurseurs des CTL ainsi que celle des cellules produisant l'IL-2. Il était donc probable que le SDIF soit capable d'inhiber la génération de CTL d'autant plus que nous savions déjà que le SDIF inhibe la prolifération au cours d'une réaction lymphocytaire mixte (DESSAINT et coll., 1977). Nous avons effectivement observé une inhibition de la génération des CTL en présence de SDIF. Ce facteur n'ayant pas d'activité sur la production d'IL-2, il s'agit probablement d'un effet direct sur la prolifération et peut-être sur la différenciation des précurseurs des CTL. Une autre hypothèse aurait pu être l'induction de cellules suppressives par le SDIF. Nous avons vu qu'in vivo l'injection de SDIF était suivie d'une absence de réactivité lymphocytaire due à la présence d'une population à activité suppressive. Par contre in vitro il n'a jamais été possible de montrer l'induction par le SDIF d'une population suppressive. Cependant nous avons testé cette hypothèse dans le cadre de la génération des CTL. On peut par culture de cellules spléniques in vitro sans stimulation exogène observer le développement de cellules suppressives capables ensuite d'inhiber la génération de CTL au cours d'une culture lymphocytaire mixte (HODES & HATHCOCK, 1976). Bien que le mécanisme de ce phénomène ne soit pas connu, les cellules suppressives ont été identifiées comme des lymphocytes T et leur génération est dépendante d'IL-1 et d'IL-2 (DUCLOS et coll., 1986). Cette dépendance laisse penser que des événements associés au cycle cellulaire ont lieu au cours de la génération des cellules suppressives. Dans ces conditions, il semble normal que le SDIF exerce un effet inhibiteur sur le développement de ces cellules. La particularité du système expérimental utilisé ici ne permet pas de

généraliser ces observations à d'autres populations suppressives, ceci d'autant plus que la notion de cellules suppressives reste encore mal définie.

L'inhibition de l'activité cytotoxique des CTL par le SDIF représente la seule observation d'un effet inhibiteur sur un lymphocyte qui n'est pas en prolifération. En effet l'expression de l'activité cytolytique d'un CTL est indépendante de la phase du cycle cellulaire dans lequel il se trouve (SEHALY et coll., 1981). Cependant il doit exister des événements métaboliques communs entre le cycle mitotique et la délivrance du coup léthal d'un CTL. La quercitine qui est un agent pharmacologique voisin du cromoglycate de sodium ainsi que certains anticorps monoclonaux (revue par BONAVIDA et coll., 1982) inhibent à la fois la prolifération des lymphocytes T et leur activité cytolytique (SCHWARTZ et coll., 1982). En particulier le cytosquelette qui est bien entendu impliqué au cours de la mitose est aussi un élément majeur dans l'expression de la cytotoxicité (KUPFER et DENNER, 1984) (YANELLI et coll., 1986). La participation du cytosquelette dans ces deux phénomènes pourrait être un argument en faveur d'un effet du SDIF à ce niveau. Nous développerons cette hypothèse au cours de la discussion finale.

Nous avons décrit l'existence au cours de la schistosomiase de mécanismes effecteurs faisant intervenir des cellules de l'inflammation et surtout l'absence de mécanismes de cytotoxicité impliquant des CTL. Il serait évidemment tentant de relier cette absence avec l'effet du SDIF sur les CTL. Cependant il est probable que le SDIF soit libéré en faibles quantités et qu'il ne soit actif que dans le microenvironnement du parasite. Il faut aussi garder en mémoire le fait que le SDIF est libéré par les vers adultes. Il est donc possible que le SDIF participe à la régulation des CTL dirigés contre les schistosomes mais ceci reste à démontrer. Si cela était vérifié, ce serait un nouvel exemple d'un mécanisme de défense permettant au parasite d'échapper à la réponse immunitaire de son hôte.

Le SDIF ayant un effet in vitro sur les CTL, il aurait été particulièrement intéressant d'étudier son effet in vivo sur le rejet de greffes allogéniques. On sait en effet que les CTL sont les cellules effectrices de ces rejets (revue par CERROTTINI et BRUNNER, 1974). Nous avons projeté de faire cette étude lorsqu'une molécule synthétique serait disponible car l'utilisation du SDIF en transplantation représente une des applications pharmacologiques envisageables. Malheureusement, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 2, nous n'avons pas pu disposer de cette molécule.

4.2. Effet du SDIF sur la survie de souris porteuses d'un lymphome T

4.2.1. Résultats

Etant donné la sensibilité particulière des lymphomes T in vitro à l'action du SDIF, il nous a semblé intéressant de vérifier cet effet in vivo. Pour cela, des souris C57Bl/6 reçoivent des cellules de la lignée EL-4. Normalement, les souris meurent entre le quinzième et le vingtième jour après l'injection des cellules (Figure 19). Lorsque les souris reçoivent du SDIF durant les jours qui suivent l'injection des cellules, leur survie est prolongée de quelques jours (5 jours pour le groupe 2). Le meilleur protocole est celui où le SDIF est injecté aux jours 0, 1, 2 et 3. Les injections multiples de SDIF sont nécessaires probablement car le SDIF est rapidement éliminé dans l'organisme. Par contre si l'on prolonge le traitement quotidien par le SDIF, on provoque chez la souris une immunosuppression qui contrebalance l'effet inhibiteur du SDIF sur la prolifération des cellules tumorales (résultats non figurés).

Figure 19

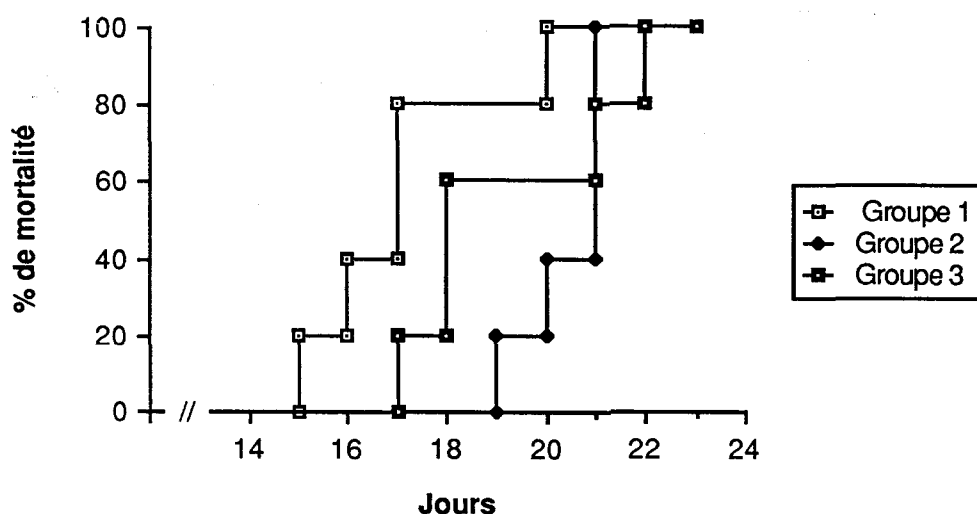


FIGURE 19: EFFET DU TRAITEMENT PAR LE SDIF SUR LA SURVIE DE SOURIS PORTEUSES D'UN LYMPHOME T

Chaque groupe expérimental contient 5 souris qui reçoivent au jour 0 par voie intrapéritonéale 10^5 cellules de la lignée EL-4.

Groupe 1: Contrôle

Groupe 2: SDIF (Jours 0-1-2-3)

Groupe 3: SDIF (Jours 0-2-4-6)



4.2.2. Discussion

Ces résultats préliminaires montrent que le SDIF peut exercer un effet inhibiteur de la prolifération de lymphomes T in vivo. Il est évident qu'une prolongation de la survie de 5 jours peut paraître dérisoire, mais il faut prendre en compte que la prolifération du lymphome était fulgurante puisqu'elle aboutit à la mort de l'animal en 20 jours. La réduction du nombre de cellules injectées associée à la surveillance de la croissance tumorale par d'autres paramètres que la simple mortalité devrait permettre d'affiner ces expériences et de trouver un protocole de traitement par le SDIF qui soit efficace. D'autre part ces résultats montrent aussi que le SDIF est bien une molécule immunosuppressive car dans les protocoles qui consistaient à injecter de petites doses de SDIF répétées, nous avons observé un effet inverse à savoir une facilitation de la croissance

tumorale. Dans le cas où l'on veut éviter cet effet immunosuppresseur, il faudra probablement d'une part espacer les injections de SDIF tout en augmentant les quantités injectées, et d'autre part un traitement local pourrait aussi limiter les effets immunosuppresseurs de cette molécule.

4.3. Effet du SDIF sur la production d'anticorps

Au cours de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la production d'anticorps de classe IgE, ceci pour plusieurs raisons. Des molécules immunosuppressives comme la cyclophosphamide peuvent exercer suivant les doses ou les protocoles utilisés un effet inhibiteur ou stimulant de la réponse IgE (TANIGUCHI & TADA, 1971). Or, on observe au cours de la schistosomiase une production massive d'IgE. Nous avons vu que la potentialisation de la réponse IgE est liée à la libération de facteurs solubles par les parasites. Il était donc intéressant de voir si le SDIF en tant que facteur immunosuppresseur a un effet sur la réponse IgE.

4.3.1. Effet du SDIF sur une réponse IgE primaire

Deux souches de rat, le Lewis et le Brown-Norway, ont été choisies en fonction de leur capacité à faire respectivement une faible ou forte réponse IgE. Ces deux groupes d'animaux sont immunisés avec 10 ug d'antigène ovalbumine dinitrophénylée (DNP-OVA) et 10 mg d'hydroxyde d'alumine comme adjuvant. Le taux d'IgE spécifiques anti-DNP est mesuré par un test de fixation sur billes recouvertes de l'antigène et révélation par utilisation d'un anticorps anti-IgE radiomarké.

Dans le cas des rats Lewis, le SDIF est injecté au cours des jours qui précédent ou suivent l'immunisation. Comme le montre la Figure 20, la réponse IgE devient détectable 8 jours après l'immunisation, atteint son maximum au douzième jour et redescend ensuite.

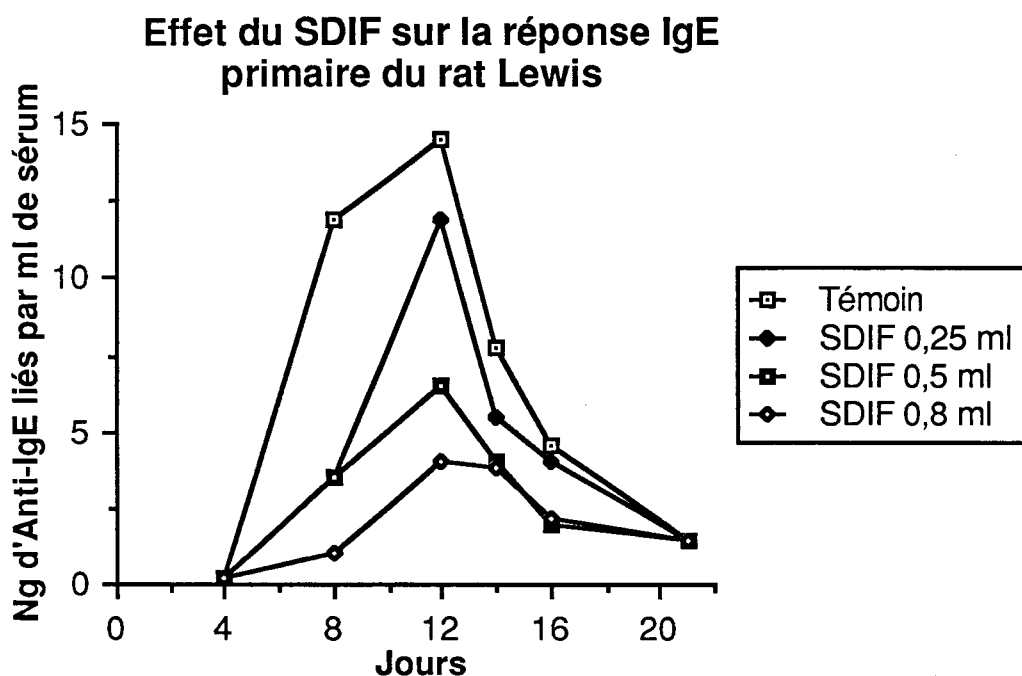


FIGURE 20: Les rats Lewis sont immunisés avec 10 μ g de DNP-OVA et 10 mg d'AL(OH)₃. Le traitement par le SDIF a lieu aux jours 1, 3 et 4 après l'immunisation. Les groupes d'animaux témoins reçoivent du sérum physiologique à la place du SDIF.



Aucun effet du SDIF n'est observé lorsque celui-ci a été injecté avant l'immunisation (résultats non figurés). Par contre, une inhibition dépendante de la dose de SDIF est observée lorsque ce facteur a été injecté aux jours 1, 3 et 4 après l'immunisation. Au maximum de la réponse IgE (jour 12) l'inhibition est de 51 et 71 % pour des doses respectives de 0.5 et 0.8 ml.

En ce qui concerne les rats Brown-Norway, le même protocole a été suivi. En plus, un groupe de rats reçoit du SDIF en une dose unique en même temps que l'antigène. L'amplitude de la réponse IgE obtenue chez ces rats est 10 fois supérieure à celle obtenue avec les rats Lewis (Figure 21).

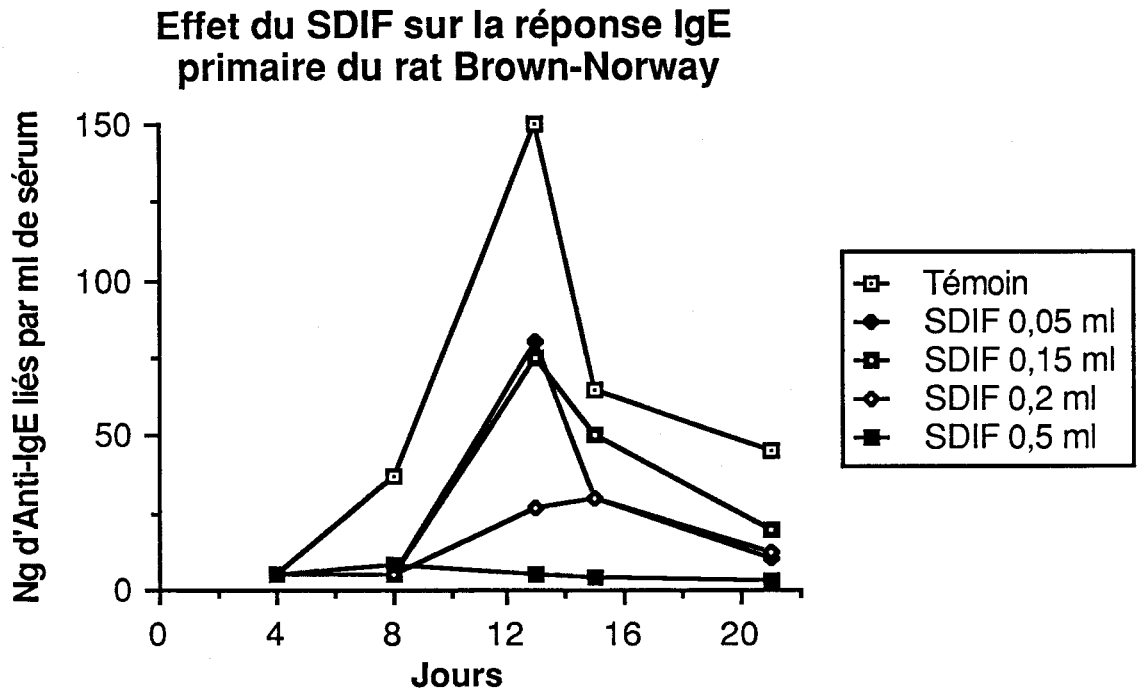


FIGURE 21: Les rats Brown-Norway sont immunisés avec 10 μ g de DNP-OVA et 10 mg d'AL(OH)₃. Le traitement par le SDIF a lieu aux jours 1,3 et 4 suivant l'immunisation sauf pour la dose de 0,5 ml administrée en une fois au jour 0.



Là encore, une inhibition dépendante de la dose est obtenue. Dans le cas où le SDIF a été injecté en une fois en même temps que l'antigène, la suppression de la réponse IgE est pratiquement totale. Il faut aussi remarquer que les doses de SDIF nécessaires pour inhiber la réponse IgE d'un rat Brown-Norway sont moindres que pour un rat Lewis, alors que la réponse IgE est plus importante dans le premier que dans le second cas.

4.3.2. Effet du SDIF sur la réponse IgG

Les sérums des animaux utilisés dans les expériences précédentes ont été analysés dans un test de FARR (MENDEN et FARR, 1973) qui permet d'apprécier à la fois l'affinité et la capacité des anticorps obtenus à fixer l'antigène. La production maximale d'anticorps anti-DNP est obtenue au jour 16. Le test a également été réalisé au jour 28 car c'est à cette période que sont produits les anticorps de plus forte affinité. Le traitement par le SDIF ne modifie pas l'affinité des anticorps produits, mais par contre la capacité de fixer l'antigène est réduite de 42 % (jour 16) et 40 % (jour 28) chez les animaux traités par le SDIF (Tableau 15).

TABLEAU 15
EFFET DU SDIF SUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS IgG ANTI-DNP

	Jour 16	Jour 28
Témoins	$K_a = 1,78 \times 10^{14}$ $\pm 0,27 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ $ABC_{33}^{(a)} = 5,31 \times 10^{-10}$ $\pm 0,37 \times 10^{-10}$	$K_a = 4,3 \times 10^{14}$ $\pm 0,66 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ $ABC_{33} = 2,84 \times 10^{-10}$ $\pm 0,15 \times 10^{-10}$
SDIF	$K_a = 1,92 \times 10^{14(b)}$ $\pm 0,37 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ $ABC_{33} = 3,05 \times 10^{-10(c)}$ $\pm 0,29 \times 10^{-10}$	$K_a = 4,6 \times 10^{14(b)}$ $\pm 0,82 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ $ABC_{33} = 1,7 \times 10^{-10(c)}$ $\pm 0,12 \times 10^{-10}$



Des rats Brown-Norway immunisés vis-à-vis de DNP-OVA sont saignés au jour 16 et 28 après l'immunisation. Le SDIF (0,5 ml) est injecté aux jours 1, 3 et 4 après l'immunisation. L'affinité des anticorps et la capacité de fixer l'antigène (ABC_{33}) sont mesurées par un test de Farr.

(a): ABC mesurée à 33 % de saturation (nmoles de DNP liées /ml de sérum)

(b): Non significativement différent du témoin

(c): $p < 0,0001$

4.3.3. Effet du SDIF sur une réponse IgE secondaire

Nous avons d'abord cherché à savoir si l'effet du SDIF injecté lors d'une immunisation primaire persiste au moment du rappel. Les différents groupes de rats Brown-Norway utilisés pour les expériences précédentes ont donc subi une injection de rappel de 1 μ g de DNP-OVA. La réponse IgE secondaire est mesurée 5 jours plus tard. Les animaux traités par le SDIF au moment de l'immunisation sont capables comme les animaux non traités de faire une réponse IgE secondaire (Tableau 16). Cependant lorsque la réponse primaire a été fortement perturbée (95 % d'inhibition pour le groupe SDIF 0.5 ml au jour 0), la réponse secondaire est également réduite (environ 50 %).

TABLEAU 16
REPONSE IgE SECONDAIRE CHEZ DES RATS AYANT RECU DU SDIF LORS DE
L'IMMUNISATION PRIMAIRE

Traitement par le SDIF (jour 0)	% Inhibition IgE spécifiques (Jour 13)	Taux d'IgE spécifiques (Jour 29)	Taux d'IgE spécifiques (Jour 34)
-		29 +/- 15	102 +/- 17
SDIF 0,05 ml ^a	43	5 +/- 3	103 +/- 16
SDIF 0,1 ml ^a	52	23 +/- 21	117 +/- 8
SDIF 0,25 ml ^a	75	36 +/- 12	108 +/- 7
SDIF 0,8 ml ^a	78	16 +/- 10	84 +/- 6
SDIF 0,5 ml ^b	95	21 +/- 16	54 +/- 11



Des rats Brown-Norway sont immunisés avec du DNP-OVA au jour 0. Ils reçoivent en plus du SDIF aux jours 1, 3 et 4 (a) ou au jour 0 (b). L'antigène est injecté à nouveau au jour 29 et la réponse IgE secondaire mesurée au jour 34. Les taux d'IgE sont exprimés en ng/ml d'anti-IgE fixés (moyenne +/- écart-type).

Par contre, l'injection de SDIF au jour 29 en même temps que l'injection de rappel de l'antigène entraîne une réduction importante de la réponse IdE secondaire. Les doses nécessaires pour inhiber la réponse secondaire sont plus faibles que pour la réponse primaire (Figure 22).

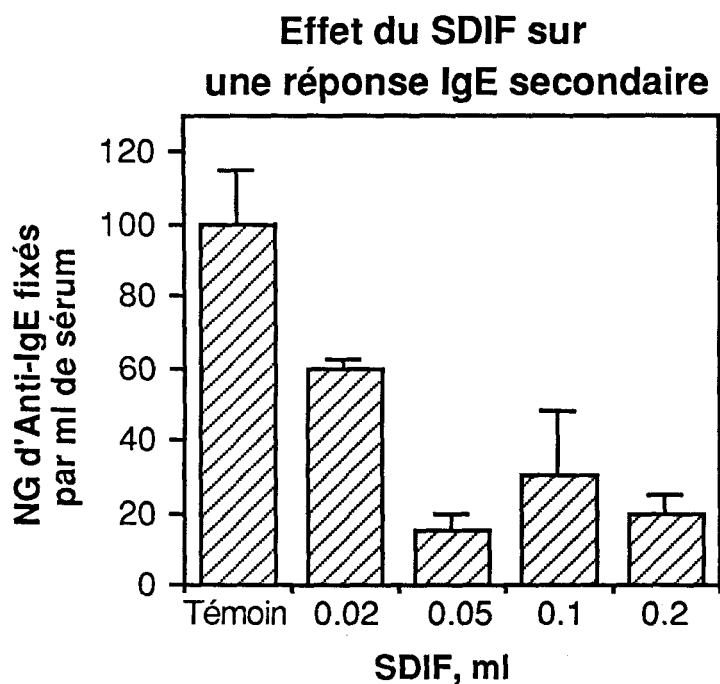


FIGURE 22: Des rats Brown-Norway sont immunisés avec du DNP-OVA. Une injection de rappel est faite au jour 29 en même temps que différentes doses de SDIF. La réponse IgE secondaire spécifique est mesurée au jour 34.

4.3.4. Discussion

Etant donné que les immunosuppresseurs peuvent suivant les cas exercer des effets positifs ou négatifs sur une réponse IgE, nous ne savions pas à priori quel serait l'effet du SDIF. C'est pourquoi nous avons réalisé cette étude sur deux souches de rat l'une de phénotype bon répondeur IgE et l'autre de phénotype faible répondeur. Avec les protocoles que nous avons utilisés, le traitement par le SDIF a un effet inhibiteur sur la production des anticorps IgE s'il est fait dans les jours qui suivent l'immunisation. Le même traitement fait dans les jours qui précèdent l'immunisation n'a pas d'effet. Nous avons vu que le SDIF est in vitro un agent inhibiteur de la prolifération lymphocytaire. On peut penser que son activité s'exerce in vivo sur la prolifération des cellules réactives à l'antigène. Son inefficacité quand il est injecté avant l'antigène pourrait être attribuée à une inactivation rapide de la molécule soit par dégradation soit par absorption par les cellules. Ce résultat est un argument en faveur d'une absence de cytotoxicité du SDIF sur les cellules lymphoïdes puisque la réponse IgE obtenue dans ces conditions est d'amplitude égale à celle des animaux non traités. Ceci est aussi confirmé par le fait que des animaux traités par le SDIF lors de l'immunisation primaire font une réponse secondaire normale.

De plus petites quantités de SDIF sont nécessaires pour inhiber la réponse IgE d'un rat Brown-Norway que celle d'un rat Lewis. La régulation de la réponse IgE fait intervenir des cellules suppressives dont l'activité est plus importante chez les sujets de phénotype faible répondeur IgE (CHIORAZZI et coll., 1977). Le SDIF ayant une action sur les cellules en prolifération, la différence de sensibilité des réponses IgE du rat Lewis et du rat Brown-Norway pourrait s'expliquer par un plus grand nombre de cellules activées (à la fois "helper" et surtout suppressives) chez le rat Lewis. L'inhibition de populations suppressives et en même temps de populations "helper" par le SDIF aurait des effets neutralisants, ce qui expliquerait que pour observer une inhibition comparable à

celle observée chez le rat Brown-Norway, il faille des quantités de SDIF plus importantes.

L'inhibition de la production d'anticorps n'est pas sélective de l'isotype IgE, puisque le test de Farr montre une inhibition de la capacité de fixer l'antigène des sérums d'animaux traités par le SDIF. L'effet du SDIF sur la production d'anticorps non IgE (40 % d'inhibition) apparaît cependant moins dramatique que sur la réponse IgE (95 % d'inhibition). Par contre l'affinité des anticorps n'est pas modifiée, ce qui peut s'expliquer par le fait que le SDIF exercerait un effet sur la prolifération des lymphocytes T "helper" avec pour conséquence une diminution de la quantité d'anticorps produits, mais pas d'effet sur leur avidité. Le mécanisme de cette inhibition n'étant pas connu, il est difficile d'analyser ces résultats, mais l'on peut supposer que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par le SDIF participe à la modulation de la réponse anticorps. La réponse IgE étant strictement thymodépendante, on comprend pourquoi elle se trouve particulièrement affectée par le SDIF.

Le fait qu'il y ait une production massive d'IgE au cours de la schistosomiase est à priori en défaveur d'un rôle joué par le SDIF au cours de l'infection. Il est effectivement possible que le SDIF ne joue pas de rôle au cours de l'infection ou qu'il ait une action très locale sans effet sur la réponse anticorps. On peut toutefois remarquer que les doses de SDIF utilisées pour ces expériences sont tout à fait incompatibles avec les quantités qui pourraient être libérées chez un hôte même infecté de façon sévère. Or la cyclophosphamide exerce un effet amplificateur de la réponse IgE seulement à très faibles concentrations. Il est possible que le SDIF administré aussi en très faibles quantités mais de façon répétée ait un effet amplificateur sur la réponse IgE. On sait que la production d'IgE spécifiques vis-à-vis d'un allergène est réduite chez des animaux qui portent une parasitose au moment de l'induction de cette réponse (JARRETT et coll., 1980) (ORR et BLAIR, 1980). La potentialisation de la réponse

IgE s'observe par contre avec des animaux chez qui la réponse IgE anti-allergène est déjà induite et qui sont ensuite infectés. La régulation de la réponse IgE au cours des infections parasitaires apparaît donc comme un phénomène très complexe et multifactoriel. Des activités potentialisatrices (sérineprotéase décrite par VERWAERDE et coll., 1986) ainsi qu'inhibitrices (SDIF) de la production d'IgE libérées par le parasite ont été décrites, mais leur implication au cours de l'infection reste encore à démontrer.

Ces résultats permettent comme dans le cas précédent d'envisager pour cette molécule des applications pharmacologiques extrêmement intéressantes dans le domaine de l'allergie. Nous verrons dans le chapitre suivant que le SDIF a non seulement un effet sur la production des anticorps responsables des phénomènes allergiques mais est capable aussi d'inhiber les fonctions effectrices de deux cellules impliquées dans les manifestations allergiques, les mastocytes et les plaquettes. On peut donc penser que l'association de ces deux propriétés conduirait à l'obtention d'un agent pharmacologique très puissant.

5. EFFET DU SDIF SUR LES FONCTIONS EFFECTRICES D'AUTRES CELLULES

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que le SDIF exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T et que ceci a pour conséquence une altération des fonctions immunitaires T dépendantes. En terme de prolifération, nous avons vu également qu'il existe une relative sélectivité d'action du SDIF vis-à-vis des lymphocytes T. Cependant cela n'exclut pas à priori un effet du SDIF sur d'autres phénomènes que la prolifération et sur d'autres cellules que les lymphocytes. Il nous est apparu intéressant de tester l'effet du SDIF sur les cellules impliquées dans les mécanismes effecteurs de la schistosomiase c'est à dire les macrophages, mastocytes, éosinophiles et plaquettes. Dans les systèmes expérimentaux que nous avons utilisés, il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet direct du SDIF sur les fonctions macrophagiques ni sur les éosinophiles. Par contre, la dégranulation des mastocytes et l'activation plaquettaire sont sensibles à l'action du SDIF. Nous développerons donc les résultats concernant ces deux populations cellulaires.

5.1. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes

5.1.1. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes in vitro

Des mastocytes péritonéaux de rat sont sensibilisés passivement in vitro avec du sérum provenant d'animaux immunisés par de l'ovalbumine (OVA). La présence d'IgE anti-OVA dans ces sérums a été vérifiée au préalable. La dégranulation mastocytaire induite par addition de l'antigène est appréciée par la mesure de la libération de sérotonine marquée préalablement incorporée dans les mastocytes. La préincubation des mastocytes avec le SDIF 30 minutes avant la sensibilisation inhibe très significativement la dégranulation (Tableau 17).

TABLEAU 17

INHIBITION DE LA DEGRANULATION MASTOCYTAIRE PAR LE SDIF

Expérience	Préincubation avec	% Libération spontanée ^(a)	% Libération sérotonine	% Inhibition
Anti-OVA	Milieu	0	20,1 +/- 0,3	
+ OVA	SDIF 10 µl	0,03	9,2 +/- 0,4	54
	SDIF 20 µl	0,58	6,1 +/- 0,2	70
	SDIF 30 µl	1,86	9,8 +/- 2,1	51
Composé 48/80	Milieu		17,1 +/- 1,7	
	SDIF 10 µl		15,1 +/- 1,2	12 ^{NS}
	SDIF 20 µl		10,4 +/- 1,3	39
Polymyxine B	Milieu		29,7 +/- 0,3	
	SDIF 10 µl		19,5 +/- 1,8	34
	SDIF 20 µl		13,5 +/- 1,6	55

Des mastocytes péritonéaux de rats sont préincubés 30 min avec du SDIF à 37°C. La dégranulation est induite par incubation avec un sérum anti-OVA (50 µl) + OVA (50 µg), ou par 50 µl de composé 48/80 (10 µg/ml) ou par 50 µl de polymyxine B (100 µg/ml).

(a) Libération de sérotonine par les mastocytes incubés seulement en présence de SDIF.

(b) NS = Non significativement différent du témoin sans SDIF.



Le même pourcentage d'inhibition est obtenu avec du SDIF chauffé 1 heure à 100°C (46 % pour le SDIF non chauffé et 48 % pour le SDIF chauffé). Le SDIF seul n'induit pas de libération de sérotonine. Lorsque la dégranulation est induite par des composés chimiques comme le composé 48/80 ou la polymyxine B, on observe aussi un effet inhibiteur du SDIF (Tableau 17).

Après une préincubation des mastocytes avec le SDIF, les cellules sont lavées trois fois et remises en suspension dans le milieu de culture. La dégranulation est alors induite soit par la polymyxine B soit par une réaction IdE anti-OVA + OVA. Dans ces conditions, l'effet inhibiteur du SDIF sur la dégranulation persiste même après lavage des cellules (Tableau 18).

TABLEAU 18

INHIBITION DE LA DEGRANULATION MASTOCYTAIRE PAR LE SDIF APRES LAVAGE

Préincubation avec	Lavage	Anti-OVA + OVA		Polymyxine B	
		% Libération sérotonine	% Inhibition	% Libération sérotonine	% Inhibition
Milieu	-	30,3 +/- 1,4		26,2 +/- 0,9	
SDIF 10 µl	-	19,5 +/- 0,8	36	19,9 +/- 0,2	25
Milieu	+	29,3 +/- 1,2		22,1 +/- 1,5	
SDIF 10 µl	+	19,8 +/- 0,5	32	12,7 +/- 1,7	43

Après préincubation des mastocytes avec le SDIF, les cellules sont lavées ou non avant le déclenchement de la dégranulation induite soit par une réaction OVA + Anti-OVA ou par la polymyxine B.



5.1.2. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes in vivo

On peut apprécier la dégranulation des mastocytes in vivo par la mesure du diamètre des réactions cutanées consécutives à l'anaphylaxie. Ces réactions cutanées sont dites passives (PCA=Passive Cutaneous anaphylaxis) lorsqu'elles

sont faites par injection locale d'un sérum contenant des IgE chez un animal sain. Elles sont dites actives lorsqu'elles sont effectuées chez un animal immunisé vis-à-vis d'un antigène. Dans les deux cas, l'injection de l'antigène par voie systémique ou de façon locale provoque une réaction visualisée chez l'animal par l'injection d'un colorant qui se lie aux protéines et dont la diffusion extravasculaire sera proportionnelle à l'intensité de la réaction anaphylactique. Enfin, on peut comme in vitro provoquer une dégranulation et donc une réaction cutanée par injection locale de composés chimiques comme le composé 48/80 et la polymyxine B.

Le SDIF est injecté localement 15 minutes avant le déclenchement de la réaction cutanée. Les animaux contrôles reçoivent le même volume de sérum physiologique. Dans les trois situations exposées précédemment, on observe une réduction très importante du diamètre des réactions cutanées après injection de SDIF (Tableau 19).

TABLEAU 19
EFFET DU SDIF SUR DES REACTIONS CUTANÉES CHEZ LE RAT

Test	Préinjection	Surface moyenne +/- Ecart-type	% Inhibition
A: Polymyxine	Sérum Phy.	66 +/- 16	
	SDIF	0	100
Composé 48/80	Sérum phy.	174 +/- 29	
	SDIF	31 +/- 5	82
B: Anti-OVA + OVA (ACA)	Sérum phy.	243 +/- 16	
	SDIF	52 +/- 1	79
C: (PCA)			
S. Mansoni	Sérum phy.	360 +/- 43	
	SDIF	0	100
Anti-OVA + OVA	Sérum phy.	115 +/- 21	
	SDIF	14 +/- 6	88
Contrôles			
SDIF seul		0	
Sérum phy seul		0	



Des réactions cutanées sont provoquées sur le dos de rats Wistar par injection soit:

A: d'agent chimique induisant directement la dégranulation: Polymyxine ou Composé 48/80 (100 µl par voie intradermique en même temps que l'injection intraveineuse de Bleu d'Evans).

B: d'ovalbumine (OVA) à des animaux immunisés préalablement par le même antigène. Il s'agit d'une réaction d'anaphylaxie cutanée active (ACA). L'injection de l'antigène se fait par voie intradermique en même temps que l'injection intraveineuse de colorant.

C: de sérum de rat immunisé contre l'ovalbumine (Anti-OVA) ou de sérum de rat infecté par *S. mansoni* (100 µl par voie intradermique 48 h avant l'injection déclenchante). La réaction cutanée est provoquée par injection intradermique de l'antigène correspondant (OVA ou Antigène de *S. mansoni*) au même site et d'injection intraveineuse de colorant. Il s'agit d'une réaction d'anaphylaxie cutanée passive (PCA).

Dans tous les cas le SDIF ou le sérum physiologique sont injectés au même site 15 min avant l'injection déclenchante.

Différentes dilutions de SDIF ont été testées sur une réaction anaphylactique passive. Un effet inhibiteur statistiquement significatif est observé seulement pour les deux plus fortes concentrations de SDIF. De même que nous l'avions observé pour l'inhibition de la prolifération lymphocytaire, l'effet inhibiteur sur la dégranulation disparaît rapidement par dilution du SDIF (Tableau 20).

TABLEAU 20
INHIBITION DE PCA PAR DIFFERENTES DOSES DE SDIF

Préinjection	Surface moyenne +/- écart-type (mm ²)	% inhibition	p
Sérum phy.	153 +/- 12	-	
SDIF 1:10	111 +/- 22	27	NS
SDIF 1:4	108 +/- 16	29	NS
SDIF 1:2	49 +/- 6	68	<0,001
SDIF 1:1	42 +/- 1	73	<0,001

100 µl de sérum contenant des IgE anti-OVA sont injectés par voie intradermique. La PCA est déclenchée par injection intraveineuse de 5 mg d'OVA et de 4 mg de bleu d'Evans. Le SDIF (100 µl des dilutions indiquées) est injecté localement 15 minutes avant le déclenchement de la réaction.



Le Tableau 21 montre les diamètres des réactions cutanées obtenus lorsque le SDIF est injecté à différents temps avant le déclenchement de la réaction d'anaphylaxie cutanée passive (PCA) par injection de l'antigène. Lorsque le SDIF est injecté 48 heures avant l'antigène, il n'y a pas d'inhibition de la PCA. L'inhibition maximale est observée quand le SDIF est injecté 3 heures ou 30 min avant l'ovalbumine. Un temps de contact avec le SDIF est cependant nécessaire puisque l'injection simultanée de l'antigène et du SDIF donne une réaction de PCA identique à celle du témoin (Tableau 21).

TABLEAU 21
INHIBITION DES REACTIONS CUTANÉES PAR INJECTION DE SDIF A
DIFFÉRENTS TEMPS AVANT LE DÉCLENCHEMENT DE LA RÉACTION

Temps	Surface moyenne +/- Ecart-type	% Inhibition	p
Témoin 30 min	215 +/- 12		
SDIF 48 h	215 +/- 24	0	NS
SDIF 24 h	146 +/- 10	33	< 0,005
SDIF 3 h	80 +/- 26	63	< 0,005
SDIF 30 min	89 +/- 23	62	< 0,005
SDIF 0	205 +/- 6	5	NS



Des réactions de PCA sont réalisées comme précédemment. Le SDIF est injecté à différents temps avant l'injection de l'antigène et du colorant (de - 48 h à 0 avant le déclenchement de la réaction).

5.1.3. Effet du SDIF sur le choc anaphylactique

Le cobaye est un animal extrêmement sensible aux réactions anaphylactiques. On peut chez cet animal, après sensibilisation vis-à-vis d'un allergène, déclencher un choc anaphylactique mortel par réintroduction de l'allergène. Des cobayes ont été immunisés avec de l'ovalbumine et séparés en deux groupes. Le premier (5 cobayes) reçoit du sérum physiologique et le second (3 cobayes) du SDIF 30 minutes avant l'injection d'ovalbumine responsable du déclenchement du choc anaphylactique. Les animaux témoins sont tous morts dans les 24 heures qui ont suivi l'injection d'ovalbumine alors que les animaux traités par le SDIF ont survécu sans exception. Il est difficile, vu le nombre d'animaux utilisés pour ces expériences d'affirmer le rôle protecteur du SDIF dans le choc anaphylactique, mais nous étions limités par la quantité de SDIF nécessaire pour traiter ces animaux.

5.1.4. Effet du SDIF sur les réactions anaphylactiques du singe

Bien que l'effet du SDIF n'ait pu être testé sur des réactions cutanées chez l'homme, son efficacité a cependant pu être vérifiée chez un primate Erythrocebus patas. La réaction cutanée est induite par l'injection d'un sérum de patient allergique et de l'allergène correspondant. Il existe des réactions croisées suffisamment importantes pour sensibiliser les cellules de singe avec des immunoglobulines humaines. L'injection de SDIF inhibe de façon dose-dépendante l'intensité de la réaction anaphylactique, exactement comme cela a été observé chez le rat (Tableau 22).

TABEAU 22

INHIBITION PAR LE SDIF DES REACTIONS CUTANEEES CHEZ LE SINGE

Test	Préinjection	Surface (mm ²)	% Inhibition
Sérum de patient allergique (1/16)	Sérum phy.	6,0	
	SDIF pur	3,4	42
+ allergène	1/2	5,5	8
	1/4	6,1	0
Sérum de patient allergique (1/32)	Sérum phy.	4,8	
	SDIF pur	1,3	73
+ allergène	1/2	3,3	32
	1/4	3,4	30

Différentes dilutions d'un sérum de patient allergique sont injectées par voie intradermique dans la peau de l'abdomen d'un singe *Erythrocebus patas*. 18 h plus tard, le SDIF ou du sérum physiologique sont injectés au même site que le sérum 15 min avant l'injection intraveineuse de l'allergène et du bleu d'Evans. La surface des taches est mesurée avec un planimètre.



5.1.5. Inhibition d'un mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles et de mastocytes.

L'un des mécanismes effecteurs décrits au cours de la schistosomiase fait intervenir des éosinophiles sensibilisés par des anticorps de classe IgE ou IgG_{2a}. Ce mécanisme requiert la participation des mastocytes (M. CAPRON et coll., 1978). Ceux-ci dégranulent par interaction des anticorps IgE ou IgG_{2a} fixés à leur surface avec des antigènes parasitaires. Certains produits de la dégranulation mastocytaire activent l'éosinophile et le rendent cytotoxiques.

Nous avons testé l'effet du SDIF sur la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis des schistosomules. Les résultats du Tableau 21 montrent une inhibition de 76 % de la cytotoxicité en présence de SDIF dans le cas d'une population mixte contenant environ 60 % d'éosinophiles et 15 % de mastocytes. Une population fortement enrichie en éosinophiles et dépourvue de mastocytes n'est pas capable de tuer les schistosomules sauf si on ajoute dans le système des mastocytes ou des produits de dégranulation mastocytaire. Dans le premier cas -addition de mastocytes- la présence de SDIF entraîne une forte réduction de la cytotoxicité alors que dans le second cas -addition de produits de dégranulation- le SDIF n'a aucun effet (Tableau 23). Ces résultats montrent que le SDIF n'interfère pas avec la fonction cytotoxique des éosinophiles mais est seulement capable d'inhiber la dégranulation mastocytaire.

TABLEAU 23
INHIBITION DU MECANISME DE CYTOTOXICITE DEPENDANT D'EOSINOPHILES
PAR LE SDIF

Cellules effectrices	% cytotoxicité +/- Ecart-type		% Inhibition
	sans SDIF	avec SDIF (10 µl)	
Population totale	56,7 +/- 8,2	13,7 +/- 2,8	76
Eosinophiles	8,8 +/- 1,4	12,2 +/- 2,9	0
Eosinophiles + 25 % mastocytes	37,1 +/- 5,3	19,2 +/- 1,2	48
Eosinophiles + surnageants de dégranulation mastocytaire	30,1 +/- 5,1	34,1 +/- 2,4	0

Chaque population de cellules effectrices est ajoutée dans le rapport 6000:1 à des schistosomules préalablement incubés dans du sérum de rat infecté. Les surnageants de dégranulation mastocytaire sont préparés par incubation de mastocytes de rats infectés avec un antisérum anti-IgE.

5.2. Effet du SDIF sur l'activation plaquettaire

L'un des mécanismes effecteurs connus au cours de la schistosomiase fait intervenir des plaquettes sanguines. Celles-ci peuvent être activées par des anticorps IgE en interaction avec l'antigène (JOSEPH et coll., 1983), par des lymphokines dont l'interféron (PANCRE et coll., 1987) ou encore par certains neuromédiateurs comme la substance P (DAMONNEVILLE, communication personnelle). Le SDIF ayant un effet inhibiteur sur deux processus d'exocytose, à savoir l'activité cytolytique des CTL et la dégranulation mastocytaire, son effet a été testé sur l'activation plaquettaire induite soit par des anticorps IgE soit par la substance P.

Des plaquettes de sujets sains sont préincubées 30 minutes avec le SDIF, puis mises en contact avec les schistosomules et activées soit par de la substance P, soit par du sérum de patient infecté par S. mansoni soit par du sérum de patient allergique au venin de guêpe en présence de l'allergène correspondant. Dans ces trois situations, le SDIF inhibe fortement la cytotoxicité des plaquettes sur les schistosomules (Figure 23 et 24). Le SDIF n' a pas d'effet sur les schistosomules en l'absence de plaquettes, de même qu'aucune cytotoxicité n'est observée en présence de SDIF lorsque les plaquettes ne sont pas activées. La préincubation des plaquettes avec le SDIF avant l'addition des schistosomules augmente le taux d'inhibition de la cytotoxicité, mais on peut quand même observer un effet du SDIF quand tous les réactifs sont ajoutés en même temps.

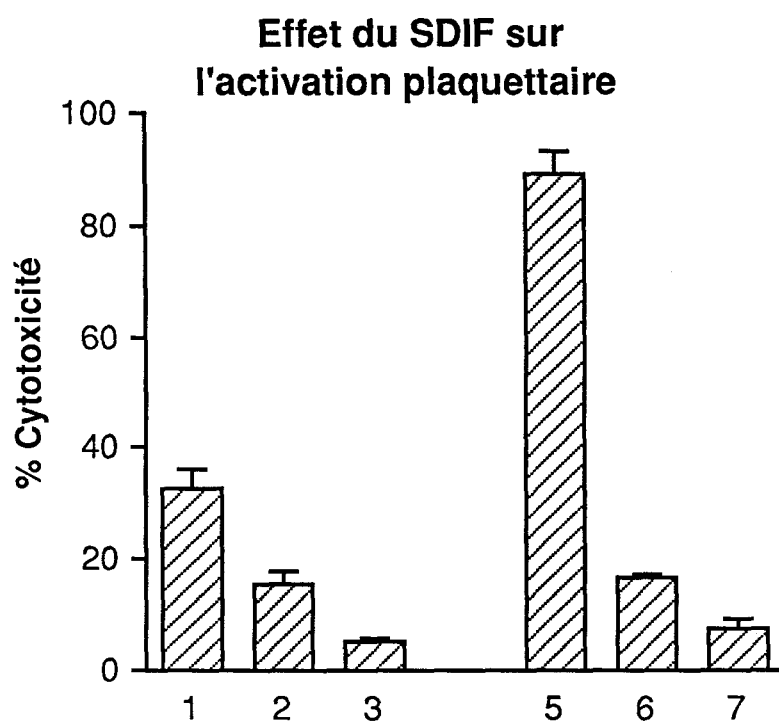


FIGURE 23: Des plaquettes de sujets sains sont préincubées 30 minutes avec du SDIF puis mises en contact avec de la substance P ou un sérum de patient infecté par *S. mansoni* et des schistosomules. La cytotoxicité est mesurée par observation microscopique à 24 h.

- 1: Substance P 10^{-9} M
- 2: " + SDIF 10 μ l
- 3: " + SDIF 20 μ l

- 5: Sérum de patient infecté par *S. mansoni*
- 6: " + SDIF 10 μ l
- 7: " + SDIF 20 μ l



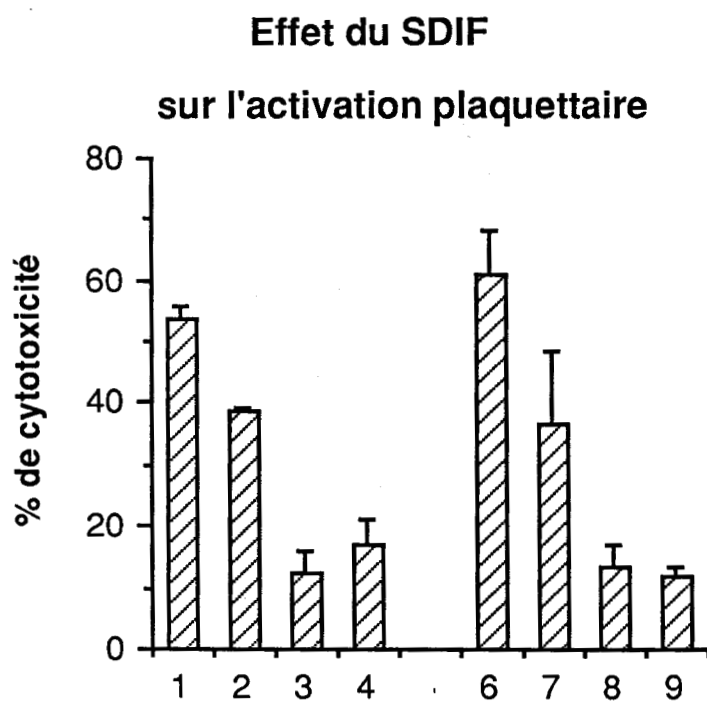


FIGURE 24: Des plaquettes de sujets sains sont préincubées avec du SDIF 30 minutes puis mises en contact avec du sérum de sujet allergique au venin d'hyménoptère, de l'allergène correspondant et de schistosomules. La cytotoxicité est mesurée par observation microscopique à 24 h.

- 1: Sérum de patient allergique + Allergène 1 ng/ml
- 2: " + SDIF 2 μ l
- 3: " + SDIF 10 μ l
- 4: " + SDIF 20 μ l

- 5: Sérum de patient allergique + Allergène 10 pg/ml
- 6: " + SDIF 2 μ l
- 7: " + SDIF 10 μ l
- 8: " + SDIF 20 μ l

5.3 Discussion

Les résultats que nous avons obtenus montrent un effet inhibiteur du SDIF sur la dégranulation mastocytaire in vitro et in vivo. In vitro, nous avons utilisé pour mesurer la dégranulation une méthode de mesure de la libération de sérotonine par des cellules préalablement marquées. Cette méthode donne des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus par observation morphologique de la dégranulation (MAZINGUE et coll., 1978). L'incubation des mastocytes avec du SDIF seul n'entraîne pas de libération de sérotonine, ce qui montre une absence de cytotoxicité du SDIF vis-à-vis de ces cellules. De plus, la présence de sérotonine froide dans les préparations de SDIF aurait entraîné un échange avec la sérotonine marquée incorporée dans les cellules, ce qui aurait provoqué une augmentation de la libération du marqueur dans le milieu. Le SDIF inhibe aussi bien la dégranulation mastocytaire induite par une réaction anaphylactique dépendante d'IgE ou d'IgG_{2a} que par des agents chimiques bien que dans le cas du composé 48/80 l'inhibition soit moins spectaculaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que la dégranulation induite par le composé 48/80 serait la conséquence d'un mécanisme différent de celui de l'activation classique (JOHNSON et coll., 1974) (DIAMANT, 1967) (KALINER et AUSTEN, 1974). Le fait que le SDIF inhibe la dégranulation mastocytaire induite par des composés chimiques permet de penser que ce facteur n'interfère pas avec la fixation de l'IgE sur son récepteur mais modifie plutôt un des événements métaboliques nécessaires à la dégranulation.

Ceci est d'ailleurs confirmé par les expériences réalisées in vivo. Là encore, les réactions cutanées induites par des agents chimiques sont inhibées de la même façon que celles induites par une réaction anaphylactique. De plus, dans le cas d'une réaction IgE anti-OVA + OVA, le SDIF est injecté après que les mastocytes soient sensibilisés par l'IgE. Ceci confirme que le SDIF n'interfère pas avec la fixation des IgE sur leur récepteur mastocytaire. Le même nombre d'injections a été effectué dans chacune des situations, de façon à éliminer

l'hypothèse d'une inhibition due au traumatisme de l'injection intradermique. Le SDIF seul n'induit pas de réaction positive, montrant ainsi qu'il n'a pas d'activité cytotoxique directe sur les mastocytes de la peau. Ce que nous avons observé à un niveau local a pu être confirmé d'une part chez le singe (ce qui permet d'espérer le même effet du SDIF sur des cellules humaines) et d'autre part au niveau de l'organisme puisque le choc anaphylactique mortel du cobaye est supprimé par injection préalable du SDIF. Les conditions dans lesquelles nous avons inhibé le choc anaphylactique ne sont probablement pas optimales, mais étant donné la lourdeur de ces expériences, il ne nous a pas été possible de tester différentes doses de SDIF ni différents protocoles.

Un des mécanismes effecteurs dans la schistosomiase fait intervenir des éosinophiles en coopération avec des mastocytes (M. CAPRON et coll., 1978). Nous montrons ici que le SDIF peut inhiber ce mécanisme non par un effet direct sur les éosinophiles mais en empêchant la libération de médiateurs mastocytaires nécessaires à l'activation des éosinophiles. Au cours de l'infection, ce mécanisme de cytotoxicité apparaît plus ou moins efficace suivant les périodes. M. CAPRON et coll. (1979) ont montré qu'il y a une modulation de l'activité des éosinophiles au cours de l'infection par des complexes immuns à S. mansoni. On peut aussi penser qu'il existe une régulation de l'activité mastocytaire et que le SDIF serait un de ces éléments régulateurs. Si ce facteur est capable de moduler l'activité mastocytaire au cours de l'infection, cela aurait des conséquences non seulement sur le mécanisme effecteur que nous venons de voir, mais cela pourrait aussi être une explication de la faible incidence des manifestations allergiques chez les sujets parasités. Comme dans le cas de la réponse lymphocytaire, nous n'avons cependant pas d'arguments directs pour affirmer cela. Il faudrait disposer d'un moyen de mesurer la libération de SDIF au cours de l'infection, ce qui est conditionné par la connaissance de la structure de la molécule de SDIF.

Un autre mécanisme effecteur de la schistosomiase fait intervenir les plaquettes qui peuvent être activées soit par des lymphokines soit par des anticorps IgE. Les schistosomules sont tués par des produits de dégranulation de la plaquette. Un contact direct schistosomule plaquette n'est pas nécessaire. Par contre, la plaquette doit être activée, car les produits d'une lyse de plaquettes non activées ne sont pas capables de tuer les schistosomules. Si le mécanisme de la lyse est actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire, on peut quand même supposer qu'il existe des similitudes entre la cytotoxicité plaquettaire et la dégranulation mastocytaire et que l'activité inhibitrice du SDIF s'exerce au même niveau pour ces deux types cellulaires. Nous discuterons plus en détail de cette hypothèse ultérieurement (chapitre Discussion). Comme dans le cas des mastocytes, l'activation plaquettaire est modulée au cours de la schistosomiase (JOSEPH et coll., 1983). Le taux d'IgE spécifiques et leur degré de complexation y est certainement pour quelque chose. L'équilibre entre la production d'interféron (PANCRE et coll., 1987) qui stimule les plaquettes et la production de PASL qui les inhibe (PANCRE et coll., 1986) est également un des éléments de cette régulation. Le SDIF par sa capacité d'inhiber l'activation plaquettaire, quelque soit l'agent activateur pourrait aussi participer à la modulation de ce mécanisme effecteur.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION et CONCLUSION

L'immunité des infections parasitaires et plus particulièrement de la schistosomiase est dominée par deux grandes perturbations de la réponse immunitaire:

- 1) une immunodépression caractérisée par une diminution des réponses aussi bien vis-à-vis des antigènes parasitaires que non parasitaires.
- 2) une hyperproduction d'IgE polyclonales. Les anticorps IgE spécifiques du parasite participent à des mécanismes effecteurs dirigés contre celui-ci. Ces mécanismes font intervenir des macrophages, des éosinophiles en association avec des mastocytes ou des plaquettes. La majorité des IgE produites n'a pas de spécificité parasitaire et leur rôle n'est pas connu, mais il est en tous cas associé à une augmentation des réactions anaphylactiques.

Notre étude a donc porté sur l'un des mécanismes par lequel le parasite lui-même induit des modifications de la réponse immunitaire de l'hôte. DESSAINT et coll. (1977) avaient décrit la libération par les vers adultes de S. mansoni d'un facteur inhibiteur de la prolifération lymphocytaire. Nous avons poursuivi ces travaux en recherchant les différentes cibles de ces facteurs regroupés sous le nom de SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor). Nous avons identifié jusqu'à présent trois cibles des activités SDIF : les lymphocytes T, les mastocytes et les plaquettes. Les activités biologiques du SDIF ont été précisées dans différents systèmes; certaines de ces activités sont en relation avec l'infection parasitaire, tandis que d'autres ont été étudiées en dehors du contexte de l'infection parasitaire.

1) in vivo:

- l'injection de SDIF à des animaux sains induit chez ces animaux une immunodépression traduite par une baisse de la réponse lymphocytaire aux antigènes et une diminution des réactions d'hypersensibilité retardée.
- cette immunodépression induite par le SDIF permet l'établissement d'une infection chez un hôte normalement non permissif.
- les réactions cutanées d'hypersensibilité immédiate chez le rat et le singe ainsi que le choc anaphylactique mortel du cobaye sont inhibés par l'injection préalable de SDIF.
- dans un système d'immunisation haptène-porteur, le SDIF inhibe les réponses IgE primaire et secondaire.
- la prolifération des lymphomes T chez la souris est inhibée par le SDIF.

2) in vitro:

- le SDIF inhibe la prolifération lymphocytaire induite par des activateurs spécifiques ou polyclonaux sans manifester d'effet cytotoxique.
- la prolifération de lignées non lymphoïdes ou de lignées lymphoïdes B n'est pas affectée par le SDIF alors que les cellules absorbent le SDIF.
- la génération de lymphocytes cytotoxiques en système de réaction lymphocytaire mixte est inhibée par le SDIF. Cet effet n'est pas dû à une inhibition de la production d'IL-2.
- l'effet inhibiteur s'exerce également sur la génération de cellules suppressives non spécifiques.

- l'activité inhibitrice du SDIF s'exerce sur les lymphocytes cytotoxiques non seulement au stade de leur génération, mais également au stade de l'expression de leur activité cytolytique vis-à-vis de leurs cibles.
- la dégranulation mastocytaire induite par des agents dégranulants ou par une réaction anaphylactique est inhibée par une préincubation des mastocytes avec le SDIF.
- le mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles dirigé contre les schistosomules et dans lequel le mastocyte joue le rôle de cellule accessoire est inhibé par le SDIF. L'action de cette molécule s'exerce directement sur le mastocyte en empêchant sa dégranulation et par conséquent l'activation de l'éosinophile par des produits de dégranulation mastocytaire.
- le mécanisme de cytotoxicité dépendant des plaquettes est également inhibé par le SDIF. Cette activité est observée aussi bien quand les plaquettes sont activées par interaction avec des anticorps IgE que sous l'action d'un neuromédiateur.

Nous nous sommes intéressés au SDIF, premièrement parce que ce facteur peut représenter un des moyens de défense du parasite contre l'hôte. Deuxièmement, le SDIF peut être utilisé comme sonde pour l'analyse des événements associés au cycle cellulaire (inhibition de la prolifération lymphocytaire), ainsi que pour l'analyse des signaux conduisant à l'exocytose (inhibition de l'activité CTL, de la dégranulation mastocytaire et de l'activation plaquettaire). Enfin, les propriétés de ce facteur nous laissent entrevoir des applications pharmacologiques intéressantes. Les tentatives de purification du SDIF ont permis d'aboutir à l'obtention d'une préparation homogène de P.M. 428 mais la structure de la molécule n'a pu être déterminée. Nous allons à présent discuter successivement ces différents points.

Des travaux réalisés dans notre laboratoire (CAPRON et coll., 1980) ainsi que par d'autres équipes ont montré que le parasite met en oeuvre toute une stratégie qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire de son hôte. L'induction d'une immunosuppression fait partie de ces moyens de défense. Comme nous l'avons montré dans l'introduction, de très nombreux travaux décrivent l'existence chez un hôte parasité d'un état d'immunosuppression. Ceci a été observé également dans la schistosomiase expérimentale et humaine. L'identification des mécanismes mis en jeu dans l'établissement de l'immunosuppression reste par contre beaucoup plus difficile. Parmi les diverses hypothèses envisagées, il a été suggéré que le parasite libère des molécules capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte. Nous apportons ici des arguments en faveur de cette hypothèse puisque le SDIF injecté à des animaux sains induit une immunosuppression dont les caractéristiques sont comparables à celles observées chez les animaux infectés. De plus, le SDIF, tout au moins in vitro, module l'activité effectrice de deux cellules impliquées dans l'immunité protectrice, à savoir les plaquettes et les mastocytes. Ces observations apportent des arguments indirects quant au rôle de ce facteur dans la modification de la réactivité de l'hôte infecté par les schistosomes. Il est vrai que les quantités de schistosomes utilisées pour mettre en évidence des effets in vitro sont incompatibles avec une charge parasitaire normale. Cependant, nous avons observé que les traitements in vivo nécessitaient comparativement de plus petites quantités, mais il fallait répéter les injections probablement à cause d'une demi-vie courte de cette molécule dans l'organisme. Par exemple, alors qu'in vitro une dose de 50 μ l de SDIF pour 10^6 cellules est nécessaire pour inhiber la prolifération lymphocytaire, in vivo quatre injections de 100 μ l suffisent (sans chercher à optimiser les conditions) pour induire une immunosuppression, le nombre de cellules concernées pouvant être estimé à 2×10^8 par souris. On peut penser qu'une libération de SDIF en quantités infimes mais de façon continue au cours de l'infection pourrait être responsable de

certaines effets biologiques dans le microenvironnement des parasites. Le SDIF étant libéré par le ver adulte et non par le schistosomule, on peut penser que son activité s'exercera dans l'environnement de la veine porte où sont localisés les schistosomes. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer, pendant la période d'immunosuppression chez un animal infecté, la réactivité lymphocytaire de cellules d'organes lymphoïdes proches ou plus éloignés des parasites. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour véritablement démontrer la participation du SDIF à la genèse de l'immunosuppression, sa responsabilité dans l'établissement du polyparasitisme et dans la modulation de certains mécanismes effecteurs, et pour déterminer si la résistance des vers adultes à la réponse immunitaire de l'hôte peut en partie être liée à la libération de SDIF par celui-ci. Bien que nous ayons montré expérimentalement un effet inhibiteur du SDIF sur la réponse IgE, il faudrait déterminer dans les conditions de l'infection si le SDIF a un effet positif ou négatif sur la réponse IgE. Pour cela, il faudrait pouvoir disposer de la molécule et d'anticorps spécifiques du SDIF. Un dosage du SDIF par anticorps marqués permettrait peut-être de déterminer si ce facteur est effectivement libéré au cours de l'infection. Le transfert passif d'anticorps anti-SDIF compléterait cette étude en montrant les conséquences de la neutralisation du SDIF sur le déroulement de l'infection.

Les schistosomes ne représentent pas un exemple unique de production de facteur immunosuppresseur. Nous avons vu dans l'introduction que d'autres parasites produisent ce type de molécules. En réalité, on retrouve ce concept au niveau de l'immunité antivirale où les infections par le virus Herpes simplex sont associées à la production d'un facteur de petit poids moléculaire d'origine virale inhibiteur de l'activité de certaines lymphokines (SHERIDAN et coll., 1987). Un peptide synthétique homologue d'une protéine de l'enveloppe de rétrovirus HTLV-I et II possède des activités immunosuppressives (CIANCIOLO et coll., 1985). Un pigment d'origine bactérienne, la pyocyanine produite par Pseudomonas aeruginosa a des effets inhibiteurs sur la prolifération dépendante d'IL-2 des

lymphocytes T (MULHARDT et coll., 1986). Les champignons produisent de nombreuses molécules immunomodulatrices dont l'exemple le plus célèbre est la cyclosporine A découverte par BOREL et coll. (1976). Une altération du système immunitaire est souvent associée aux développements de tumeurs malignes. Des substances immunosuppressives sont effectivement produites par les cellules tumorales (ROTH et coll., 1982). Ces exemples (il en existe beaucoup d'autres) montrent que nos observations dans le modèle parasitaire de l'infection par schistosomes ne sont pas anecdotiques. Quelle que soit la nature de l'agression, il y a établissement d'un équilibre entre la réponse immunitaire de l'hôte et des mécanismes de défense élaborés par l'agent agresseur pour échapper à cette réponse. La production de substances immunosuppressives représente l'un de ces moyens.

Si dans le cas d'infections, l'immunosuppression s'avère néfaste pour l'individu, il existe des situations où l'induction d'une immunosuppression sera souhaitée. Avec l'avènement des techniques de transplantation d'organes, l'obtention d'agents pharmacologiques capables d'induire une immunosuppression s'est avérée d'une importance cruciale (revue par CARPENTER et STROM, 1984). Dans le but de limiter les rejets de greffes, il fallait trouver des agents capables de diminuer les défenses immunitaires sans pour autant provoquer de réactions secondaires trop importantes. De même, dans le traitement de certaines maladies auto-immunes, l'utilisation d'agents pharmacologiques capables de réduire l'agressivité du système immunitaire tout en maintenant un niveau de surveillance normal pouvait être envisagé (revue par MIESCHER et BERIS, 1984). Notre propos n'est pas ici de donner toutes les activités des différents immunosuppresseurs, mais simplement de comparer au niveau du mécanisme d'action le SDIF aux autres molécules utilisées.

Les glucocorticoïdes ont été les premiers agents utilisés en transplantation. Ils sont encore très souvent administrés à faibles doses en

association avec d'autres molécules comme la cyclosporine A. Ces molécules ont de multiples effets et il n'est pas toujours facile de dissocier leur activité anti-inflammatoire de leur activité immunosuppressive. Le récepteur de ces agents est cytosolique, le complexe récepteur-stéroïde pénètre dans le noyau, se lie à l'ADN et modifie la transcription et par conséquent la traduction (revue par BACH, 1975).

Il existe ensuite des analogues de purines dont les plus couramment utilisés sont l'azathioprine et la 6-mercaptopurine. Ils bloquent la synthèse d'acide inosinique, précurseur de l'adénine et de la guanine et sont donc des inhibiteurs de la réplication de l'ADN en phase S du cycle cellulaire (BALIS et coll., 1958). Bien que ceci soit toujours l'objet de controverses, ces agents auraient une activité sélective sur les lymphocytes T quand ils sont administrés à faibles doses (revue par CARPENTER et STROM, 1984).

Les agents alkylants tels que la cyclophosphamide ont un effet de dénaturation de l'ADN par liaison avec la guanine. Les cellules sont alors bloquées en phase G2 du cycle cellulaire. Il existe des mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui fait que la durée du traitement et le protocole utilisé ont une énorme importance. Aux faibles doses, la cyclophosphamide aura une activité préférentielle sur les cellules à vie courte tandis qu'à fortes doses, l'effet sera beaucoup moins spécifique (SHAND, 1979). Ces molécules sont de moins en moins utilisées car elles ont comme inconvénient majeur d'avoir des effets mutagènes et donc de provoquer des leucémies (LOUIES et coll., 1980).

Le methotrexate bloque la conversion de l'acide déhydrofolique en acide tétrafolique. L'acide folique étant impliqué dans la synthèse des purines, l'inhibition de la prolifération se fait en phase S du cycle cellulaire. Cette drogue est difficilement utilisable à cause de la faible différence entre les doses toxiques et thérapeutiques (revue par NYDEGGER, 1985).

La cyclosporine A est une des drogues les plus utilisées actuellement. Son absence de cytotoxicité sur l'hématopoïèse conjuguée à un potentiel immunosuppresseur puissant distingue clairement cette molécule des précédentes (revue par HESS et coll., 1986). Cette substance extraite de champignons est un peptide cyclique hydrophobe de masse moléculaire 1202 présentant un acide aminé jusque là inconnu. La cyclosporine a des effets à la fois sur l'immunité humorale et cellulaire. Les CTL y sont particulièrement sensibles, alors que les cellules suppressives sont relativement épargnées (revue par HESS et coll., 1985). L'effet majeur s'exerce par inhibition de la production de lymphokines et en particulier d'IL-2 par les lymphocytes CD-4+ (BUNJES et coll., 1981). On peut observer dans les cellules traitées par la cyclosporine A une absence de synthèse d'ARNm correspondant aux lymphokines dont la synthèse est inductible par activation cellulaire tandis que l'ARNm produit de façon constitutive n'est pas affecté (GRANELLI-PIPERNO et coll., 1984). L'inhibition par la cyclosporine A s'exerce donc plus tôt dans le cycle cellulaire que celle du SDIF. Nous avons montré que le SDIF inhibe la transition G1-S du cycle cellulaire ou bloque les cellules en début de phase S. Etant donné la cinétique d'inhibition du cycle cellulaire par le SDIF, il est possible que le SDIF interfère avec le métabolisme des purines ou des pyrimidines nécessaires à la réplication de l'ADN. Son activité au niveau du cycle cellulaire ressemblerait plutôt à celle des agents alkylants ou des analogues de purines, alors que la cyclosporine A agit au début de la phase G1. Ceci a des conséquences en termes de production de lymphokines, puisque dans le cas du SDIF, leur synthèse se fait normalement, tout au moins in vitro, alors que dans le cas de la cyclosporine A la production de lymphokines nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire est inhibée. En réalité, in vivo la production de lymphokines est associée à un processus d'expansion clonale. Lors de traitements in vivo, ou in vitro lorsqu'une expansion clonale est nécessaire, le blocage de la prolifération par le SDIF pourra avoir finalement des conséquences comparables à celles induites par la cyclosporine A. De plus, dans le cas de la cyclosporine A, la

production d'IL-2 est inhibée mais ni les proliférations dépendantes d'IL-2 ni l'acquisition des récepteurs pour l'IL-2 ne sont affectées (HESS, 1985) (MIYAWAKI et coll., 1983). Lors d'un traitement par la cyclosporine A en dose d'entretien, s'il existe suffisamment d'IL-2 produite après stimulation par des antigènes de l'environnement, il pourra y avoir expansion clonale de CTL et déclenchement du rejet de greffes (HESS et TUSCHKA, 1980). Par contre, le SDIF inhibe à la fois la prolifération et l'expression de l'activité des CTL. De plus, ces deux molécules ayant des effets séquentiels complémentaires sur le cycle cellulaire, on peut penser que le traitement par une association SDIF-cyclosporine A devrait être d'une grande efficacité dans la survie de greffes allogéniques.

Les événements métaboliques qui conduisent une cellule de l'état quiescent à la mitose commencent à être connus (revue par ROZENGURT, 1986). L'entrée dans le cycle cellulaire se fait généralement par interaction d'un ligand avec son récepteur bien que certains agents comme le PMA puisse activer la cellule sans l'intermédiaire du récepteur. Le ligand peut être par exemple l'antigène ou un facteur de croissance ou une hormone. La fixation de ces ligands aux récepteurs membranaires est suivie de la délivrance de signaux d'activation membranaires puis cytosoliques. Cependant la synthèse d'ADN commence seulement 10 à 15 h après l'addition du ligand, ce qui montre la complexité des événements métaboliques mis en jeu. Nous avons vu que le SDIF inhibe la prolifération cellulaire assez tardivement dans le cycle cellulaire. Ceci veut dire que les signaux précoces d'activation tels que l'activation de la protéine Kinase C, le turn-over lipidique ou les changements de flux ioniques ne sont pas affectés. Il se peut que cette molécule ait un effet sur le métabolisme des purines ou des pyrimidines ou de tout autre métabolite impliqué dans la réplication de l'ADN. Etant donné que nous avons également observé des effets inhibiteurs de la dégranulation mastocytaire, de l'activation plaquettaire et d'activité cytolytique des CTL, on peut se demander quel pourrait être le point

commun expliquant l'inhibition par le SDIF de ces différents processus cellulaires. L'activité cytolytique des CTL passe par un mécanisme d'exocytose de granules qui vont provoquer des lésions membranaires au niveau des cellules cibles (PODACK, 1985). L'un des constituants de ces granules est une protéine appelée perforine, dont la particularité est de se polymériser pour former des complexes tubulaires qui vont perforer la membrane de la cible. Il y a donc une dégranulation localisée orientée vers la zone de contact entre la cellule effectrice et la cellule cible. Ceci suppose une mobilisation des microtubules et du cytoquelette en général (KUPFER et DENNER, 1984) (YANELLI et coll., 1986). Dans le cas de la dégranulation mastocytaire, les microtubules sont également impliqués. L'utilisation de drogues comme la colchicine ou la vinblastine entraîne des changements morphologiques importants des microtubules des mastocytes de rats (PADAWER et GORDON, 1955) et inhibe leur dégranulation. Par contre, dans le cas de la plaquette, nous ne connaissons pas encore le mécanisme de la cytotoxicité. La plaquette contient effectivement des granules mais aucun argument ne permet de d'affirmer que leur dégranulation soit impliquée dans la cytotoxicité. En ce qui concerne l'inhibition de la prolifération, des drogues comme la colchicine ou la vinblastine induisent une dépolymérisation des microtubules et ont un effet stimulant sur la synthèse d'ADN de fibroblastes induite par des facteurs de croissance (FRIEDKIN et coll., 1979) (WANG et ROZENGURT, 1983). Au contraire les agents qui stabilisent les microtubules inhibent l'initiation de la synthèse d'ADN (CROSSIN et CARNEY, 1981). Il serait tentant de penser que le SDIF agit au niveau des microtubules, ce qui permettrait d'expliquer les différentes activités apparemment contradictoires que nous avons observées avec cette molécule. Il serait intéressant de déterminer exactement le ou les événements métaboliques concernés, d'autant plus que si cette hypothèse était vérifiée, l'utilisation de cette drogue apporterait peut-être des renseignements sur l'importance des microtubules à la fois dans l'initiation de la phase S du cycle cellulaire et dans les processus d'exocytose. D'autres

hypothèses peuvent aussi être envisagées, comme un blocage du métabolisme énergétique de la cellule ou une modification de l'utilisation des cations bivalents entraînant des altérations du potentiel membranaire. Ces deux dernières hypothèses nous semblent néanmoins peu probables du fait de l'action tardive du SDIF sur le cycle cellulaire alors que ces événements sont impliqués dans l'initiation de l'activation lymphocytaire.

La compréhension du mécanisme d'action du SDIF permettrait peut-être aussi d'analyser pourquoi certaines cellules (lymphocytes T par exemple) sont plus sensibles que d'autres à l'action du SDIF. Nous avons montré qu'il existe une certaine sélectivité dans l'inhibition de la prolifération de lignées cellulaires mais que cette sélectivité ne peut être reliée à la capacité d'absorber ou non l'activité SDIF. Cette capacité pourrait être reliée soit à la présence d'un récepteur membranaire ou cytosolique, soit à une captation de la molécule par endocytose. Diverses hypothèses pourraient expliquer la sélectivité d'action du SDIF sur certaines lignées cellulaires. Dans le cas d'un récepteur membranaire, il faudrait admettre que le SDIF se fixe sur toutes les cellules mais que le signal d'inhibition n'est pas transmis de la même façon. Dans l'hypothèse d'une pénétration du SDIF à l'intérieur de la cellule, l'existence ou non d'un récepteur cytosolique ou le blocage d'une voie métabolique spécifique de certaines cellules pourrait expliquer les effets sélectifs du SDIF. On peut supposer que la sélectivité d'action du SDIF soit liée à une dépendance plus ou moins forte des cellules vis-à-vis d'une réaction métabolique qui reste à déterminer.

Les effets du SDIF sur les réponses humorales particulièrement IgE et sur la dégranulation mastocytaire conduisent tout naturellement à aborder l'étude pharmacologique du SDIF en relation avec l'hypersensibilité immédiate. De plus, les mastocytes ne sont plus les seules cellules impliquées dans les phénomènes d'hypersensibilité immédiate. Les plaquettes en particulier sont impliquées dans certaines pathologies comme l'asthme à l'aspirine (AMEISEN et coll., 1985). Une

molécule comme le SDIF ayant à la fois une activité sur la production des anticorps et sur les fonctions effectrices des cellules impliquées dans les phénomènes d'allergie pourrait constituer un outil pharmacologique puissant.

Nous avons décrit les propriétés immunosuppressives du SDIF et nous avons discuté précédemment de son mécanisme d'action. L'avantage présenté par le SDIF par rapport à d'autres molécules immunosuppressives agissant au même moment dans le cycle cellulaire est sa relative sélectivité vis-à-vis des lymphocytes T, encore que ceci ait été démontré seulement avec des lignées cellulaires tumorales. L'activité SDIF apparaît complémentaire de celle de la cyclosporine A et une utilisation de ces deux molécules en association pourrait peut-être aboutir à des effets spectaculaires dans le traitement des rejets de greffes ou de maladies auto-immunes.

Lorsque nous avons commencé à étudier les propriétés biologiques du SDIF, très rapidement s'est posée la question de la nature chimique de cette molécule. Les premiers essais de caractérisation biochimique ont montré que l'activité inhibitrice de la prolifération lymphocytaire était supportée par un facteur de faible poids moléculaire (< 2000). Etant donné la complexité du mélange initial (fraction dialysable de l'incubat) et l'obligation de suivre les fractionnements en testant une activité biologique, nous nous sommes très vite heurtés à un problème délicat. Les techniques utilisées pour la séparation des macromolécules n'étaient pas applicables. Nous avons vu qu'en CLHP, l'activité SDIF n'est pas retenue sur les colonnes que nous avons utilisées, ce qui ne nous a pas permis d'obtenir des préparations suffisamment homogènes pour aborder l'étude structurale. De plus, ce comportement chromatographique laissait supposer que le SDIF n'est pas un peptide ou tout au moins pas une structure peptidique classique. Des traitements de la fraction dialysable de l'incubat par des enzymes de type trypsine ou subtilisine ont été réalisés. Les résultats étaient difficiles à interpréter car des traces d'enzymes ont perturbé le test biologique mais il

semblait toutefois que l'activité SDIF n'était pas abolie par le traitement enzymatique. Pendant ce temps, nous avons montré que le SDIF présente des propriétés biologiques suffisamment intéressantes pour envisager des applications pharmacologiques. C'est pourquoi des négociations avec l'industrie pharmaceutique ont été entreprises, dans le but de leur confier l'analyse structurale du SDIF et l'exploitation éventuelle de la molécule. Après de nombreuses tractations, la firme Rhône-Poulenc Santé a accepté de prendre en charge la purification et l'analyse structurale du SDIF. Leurs résultats confirment que cette molécule est extrêmement hydrophile et que sa structure n'est pas peptidique. Le spectre de masse réalisé donne une masse moléculaire de 428 mais ne permet pas de donner une structure, ni même de classer le SDIF dans une famille chimique connue. En terme de rentabilité, il est évident que le SDIF n'est intéressant à exploiter que s'il peut être préparé par synthèse chimique. Il n'est pas envisageable de continuer à le préparer à partir de schistosomes même avec un protocole de purification simple et optimisé. Dans le cas de la cyclosporine A, agent immunosuppresseur produit par des champignons, la synthèse chimique est réalisable mais très coûteuse et la production se fait industriellement à partir des champignons. La différence est que ceux-ci sont cultivables en fermenteurs alors que les schistosomes ne sont mêmes pas cultivables in vitro et que le cycle de S. mansoni doit être obligatoirement maintenu par passage chez l'animal. Ceci explique pourquoi les industriels n'ont pas voulu procéder à une analyse structurale plus poussée. On ne peut pourtant pas exclure que même si la structure n'est pas peptidique, elle n'en soit pas pour autant synthétisable. On peut aussi imaginer que les schistosomes ne sont pas les seuls organismes à produire ce type de molécules et que d'autres sources puissent être trouvées, mais ceci est bien entendu conditionné par la connaissance de la structure du SDIF.

Il faut aussi remarquer que tous les essais de purification du SDIF ont porté sur l'identification de la molécule inhibitrice de la prolifération

lymphocytaire. Or nous avons décrit plusieurs activités biologiques avec la fraction dialysable de l'incubat de schistosomes, sur les lymphocytes, mastocytes et plaquettes. Pour des raisons de commodité nous avons regroupé ces activités sous le terme SDIF. En réalité, nous n'avons pas la certitude que toutes les activités observées soient dues à cette molécule de P.M. 428. Nous avons en fait décidé de faire ce pari et de vérifier avec la molécule synthétique ou tout au moins avec une préparation homogène que les différentes activités sont supportées par une seule molécule. Ceci n'a pu être fait car les quantités de SDIF purifié obtenues ont permis seulement de vérifier l'activité inhibitrice de la prolifération lymphocytaire et de faire le spectre de masse.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence la libération par le parasite d'un facteur à activité immunomodulatrice dont les cibles connues sont les lymphocytes T, les mastocytes et les plaquettes. Ces résultats apportent une contribution à la compréhension des relations hôte-parasite et montrent que la production de facteurs solubles à activités immunomodulatrices fait partie de la stratégie élaborée par le parasite pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. L'ensemble de ce travail déborde du cadre de l'immunologie parasitaire car les propriétés de ce facteur permettent d'envisager d'une part de l'utiliser comme sonde dans l'analyse des mécanismes de l'activation cellulaire, et d'autre part laissent entrevoir des applications pharmacologiques intéressantes. Les difficultés rencontrées dans la mise en évidence de la structure de ce facteur ne nous ont pas permis de répondre jusqu'à présent à un certain nombre de questions fascinantes quant à son mécanisme d'action, sa participation réelle à l'immunité au cours de l'infection et son utilisation potentielle comme agent pharmacologique. Néanmoins, l'intérêt porté par plusieurs firmes pharmaceutiques aux propriétés de cette molécule permet d'espérer que la détermination de la structure pourra se faire et que les questions restées en suspens pourront finalement être résolues.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL D'ORIGINE PARASITAIRE

1.1. Le cycle parasitaire

Une souche porto-ricaine de Schistosoma mansoni est maintenue au laboratoire chez son hôte intermédiaire Biomphalaria glabrata et un hôte définitif le hamster doré Mesocricetus auratus.

1.2. Préparation de l'incubat de vers adultes

Les vers adultes sont obtenus par perfusion de la veine porte des hamsters 40 jours après l'infection. 10000 vers sont incubés pendant 3 h à 30°C dans 10 ml d'eau distillée. Après décantation des vers, l'incubat est filtré sur une membrane Millipore (0.22 µm) (Millex GS, Molsheim, France) et dialysé contre de l'eau distillée. La fraction dialysable est concentrée par évaporation sous vide et lyophilisée. Cette préparation est reprise dans 1 ml de sérum physiologique ou de milieu de culture. Elle représente entre 20 et 30 mg de matériel en poids sec.

1.3. Préparation des schistosomules

Les schistosomules sont préparés par pénétration transcutanée de cercaires selon la méthode de CLEGG et SMITHERS (1972).

1.4. Préparation de l'incubat de schistosomules

Les schistosomules sont obtenus par agitation mécanique des cercaires selon la technique décrite par RAMALHO-PINTO et coll. (1974). Les schistosomules sont ensuite incubés 4 h dans du PBS additionné de glucose à 1 % pour éliminer la majorité des enzymes cercariales et lavés 6 fois en PBS. Ils sont

ensuite incubés 16 h à 37°C en PBS stérile. L'absence de contamination bactérienne est contrôlée.

1.5. Préparation des antigènes parasitaires.

La préparation antigénique de Schistosoma mansoni est réalisée suivant la technique décrite par CAPRON et coll. (1968).

2. PURIFICATION DU SDIF

Une chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est réalisée sur une colonne TSK-2000 (7.5x600 mm) (LKB, Lucerne, Suisse) équilibrée dans de l'eau bidistillée. Le débit est de 0,5 ml/min et la détection est faite à 206 nm. Des fractions de 0,5 ml sont collectées et testées en activité biologique. Les fractions actives sont rassemblées, lyophilisées et injectées sur une colonne de CLHP en phase inversée (RP-18) (250 x 5 mm) (Waters, Paris, France) équilibrée dans de l'eau. Le débit est de 2 ml/min et l'élution se fait avec un gradient linéaire de 0 à 50 % d'acétonitrile. Des fractions de 0,5 ml sont collectées, lyophilisées pour éliminer l'acétonitrile et testées en activité biologique.

3. ANIMAUX

Des rats Lewis males (180-200 g) et des rats Brown-Norway males (160-180 g) (CNRS, Orléans, France) sont utilisés pour l'étude de la réponse IgE. Des rats Fischer males (200-240 g) provenant de notre animalerie sont utilisés pour les réactions d'anaphylaxie cutanée passive (PCA) et pour les infections par S. mansoni. Les rats sont infectés par voie transcutanée par 500 ou 1000 cercaires. Des rats Hooded-Lister (180-200 g) (Animal suppliers, Londres) sont utilisés pour l'obtention de sérums riches en IgE.

Des souris C57Bl/6 et DBA/2 (6-12 semaines) (CNRS) sont utilisées pour les expériences concernant les lymphocytes cytotoxiques (CTL). Des cobayes tricolores sont utilisés pour les études sur le choc anaphylactique.

4. CULTURES CELLULAIRES IN VITRO

4.1. Milieux de culture

Pour toutes les cultures, le milieu de base est le milieu RPMI-1640 additionné de 5×10^{-5} M de 2-mercaptoethanol, 2mM de glutamine et 1 mM de pyruvate de sodium. Suivant les cultures, 1, 5 ou 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté par chauffage 1/2 h à 56 °C, sont ajoutés dans le milieu de culture.

4.2. Préparation des lymphocytes

La rate, les ganglions ou le thymus de souris ou de rats sont prélevés et dilacérés dans une solution tamponnée de Hanks (Hank's Buffered Salt Solution ou HBSS). La suspension cellulaire est passée à travers un filtre de nylon et dans le cas de cellules spléniques traitée par une solution de NH_4Cl 0.15 M 5 min à 4°C pour éliminer les hématies. Dans certains cas, les cellules adhérentes au plastique sont éliminées par incubation de 2 heures sur des boîtes de Pétri en plastique (Nunc, Roskilde, Danemark). Dans d'autres expériences, un passage sur laine de nylon est réalisé suivant la technique de GREAVES et coll. (1976).

Pour obtenir des lymphocytes humains, des prélèvements sanguins sont réalisés chez des donneurs sains sur 100 U/ml d'héparinate de sodium (Roche Diagnostica, Bale, Suisse). Les cellules mononuclées sont isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll-Roncapon 440 (densité 1.077) (Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla, Suède) 30 min à 800xg. L'interphase contenant les cellules mononuclées est recueillie, lavée 3 fois avec du HBSS, et remise en suspension dans du RPMI-5% SVF.

4.3. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont maintenues en culture continue dans du RPMI-10% SVF. Les repiquages sont effectués une ou deux fois par semaine suivant les lignées.

4.4. Tests de prolifération

Pour les tests effectués sur les lignées cellulaires, 0.1 ml de suspension cellulaire en RPMI-5% SVF contenant 2×10^4 cellules est incubé avec 0.1 ml de SDIF à différentes dilutions en RPMI-1% FCS en microplaque de 96 puits à fond plat (Nunc). Après 18 h ou 36 h d'incubation, les cultures sont incubées en présence de 18.5 kBq de méthyl thymidine tritiée (185 GBq/ mmol) (C.E.A., Gif sur Yvette, France) 6 h avant la récolte. L'incorporation de thymidine est déterminée après filtration des cultures sur filtres de verre avec un collecteur de cellules (Titertek harvester, Skatron, Lirbyen, Norvège) et comptage des filtres dans un compteur à scintillation liquide. Dans le cas de la lignée EL-4 qui n'était pas capable d'incorporer la thymidine alors que les cellules étaient en prolifération, nous avons utilisé un autre test qui consiste à mesurer une activité enzymatique proportionnelle au nombre de cellules vivantes (GREEN et coll., 1984). Après 24 ou 48 heures de culture, 25 μ l d'une solution à 10 mg/ml de bromure de 3(4,5-diméthyl-thiazovl-2-yl) 2,5-diphényltetrazolium (MTT) (Sigma, St. Louis, Mo) en PBS sont ajoutés dans les puits de culture et incubés 4 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite centrifugées, les surnageants éliminés et 10 μ l d'isopropanol acidifié ajoutés dans les puits. Les plaques sont lues à 540 nm avec un appareil de lecture spécialement adapté (Titertek Elisa Reader).

Les lymphocytes normaux de rat, de souris, ou humains sont stimulés par des mitogènes: Phytohémaaglutinine (PHA) (Difco, Detroit, Mi) et Concanavaline A (Con A) (Difco). Les tests de prolifération sont réalisés en microplaque à fond plat: 100 μ l d'une suspension cellulaire ajustée à 2×10^6 cellules /ml sont cultivés

en présence de 100 ul de SDIF à différentes dilutions et de 50 ul de mitogène (concentrations indiquées dans le chapitre Résultats). La mesure de la prolifération est effectuée comme indiqué précédemment.

4.5. Production d'interleukine 2 (IL-2) dans les surnageants

Une suspension cellulaire de cellules mononuclées humaines (2×10^6 cellules /puits) est incubée en plaques de 24 puits (Costar, Cambridge, Ma) en présence de SDIF (dilution finale 1:5 ou 1:10) ou de 2 mM d'hydroxycortisone (Calbiochem, La Jolla, CA) et de PHA (dilution finale 1:500). Les surnageants sont recueillis après 24, 48 ou 72 heures de culture et dialysés une nuit contre du HBSS pour éliminer l'activité SDIF restante dans les surnageants.

4.6. Dosage biologique de l'activité IL-2

Ce dosage est réalisé par mesure de la prolifération de cellules de la lignée CTL-L dont la croissance est dépendante d'IL-2 (BAKER et coll., 1979). En plaque de microtitration 96 puits fond plat, 100 ul d'une suspension cellulaire contenant 5×10^3 cellules en RPMI-5% SVF sont cultivées en présence de 50 ul de standard IL-2 (100 U/ml) (préparation décrite par DUMONDE et PAPERMASTER, 1984) ou de surnageant à doser, en dilutions sérielles. Pour tester l'activité inhibitrice du SDIF sur la prolifération des CTL-L, 50 ul de différentes dilutions de SDIF sont ajoutés. Après 36 heures d'incubation, les cultures sont incubées en présence de 18.5 KBq de ^3H -methyl thymidine et filtrées 6 heures plus tard. La quantité d'IL-2 dans les surnageants est calculée d'après la méthode de STADLER et OPPENHEIM (1982).

4.7. Analyse des récepteurs pour la transferrine et pour l'IL-2

L'anticorps monoclonal Tac (LEONARD et coll., 1982) a été fourni par le Dr. T.A. WALDMAN et l'anticorps OKT9 par Ortho Diagnostics Systems (Johnson &

Johnson, Spreitenbach, Suisse). Du PBS additionné de 0.1% de NaN_3 et de 3% de SVF a été utilisé comme tampon pour la coloration. 1×10^6 cellules dans 50 μl de ce tampon sont incubées avec 5 μl d'OKT9 ou de Tac à des dilutions respectives de 1:100000 et 1:500 30 min. à 4°C, puis lavées 2 fois dans le tampon et à nouveau incubées avec une solution contenant des fragments F(ab)'_2 d'anticorps de chèvre anti-Immunoglobulines de souris conjugués à de la fluoresceine (Cappel, Malvern, PA) à une dilution finale de 1:200. La suspension cellulaire est ensuite lavée deux fois dans le tampon avant d'être analysée au cytofluorographe. Un témoin est réalisé en incubant seulement les cellules dans le conjugué fluorescent. Les analyses de fluorescence de membrane ont été réalisées avec le cytofluorographe (50H, Ortho instruments). 10000 cellules sont analysées et les résultats recueillis dans un ordinateur PDP 11 (Adcomp, AG, Dietikon Suisse). Le pourcentage de cellules fluorescentes mesuré dans les témoins a été soustrait des résultats expérimentaux.

4.8. Cultures lymphocytaires mixtes

Les cultures sont réalisées en plaques de culture 24 puits (Costar, Cambridge, Mass). Des splénocytes de souris C57Bl/6 (H2-b) sont utilisés comme cellules répondeuses et des splénocytes de souris DBA/2 (H2-d) comme cellules stimulantes. Les cellules répondeuses (6×10^6 cellules) sont cultivées 5 jours à 37°C en présence de 3×10^6 cellules stimulantes irradiées à 20 Grays avec une source de rayons X (10 Grays/min, 8 mA, 10 cm de la source, filtre Al 1,7 mm)(Massiot-Philipps, Argenteuil, France). Les cellules sont ensuite recueillies et testées pour leur activité cytotoxique.

4.9. Préparation de cellules T "helper"

Les cellules T "helper" sont obtenues par cocultures de 8×10^6 cellules répondeuses spléniques de souris C57Bl/6 et 8×10^6 cellules stimulantes

spléniques irradiées (20 Gy) de souris DBA/2 selon la technique décrite par BAUM et PILARSKI (1978). L'effet T "helper" de ces cellules est testé en cocultivant 1×10^6 cellules "helper" irradiées avec 4×10^6 thymocytes syngéniques et 5×10^6 cellules stimulantes allogéniques irradiées. Les cellules sont recueillies 5 jours plus tard et testées pour leur activité cytotoxique.

4.10. Obtention de cellules suppressives non spécifiques

Les cellules suppressives sont obtenues en cultivant 6×10^6 splénocytes de souris C57Bl/6 dans 2 ml de RPMI-5% SVF 7 jours à 37°C (HODES et HATHCOCK, 1976). L'activité suppressive de ces cellules est testée en cocultivant 1×10^6 cellules de la culture précédente avec 4×10^6 cellules syngéniques répondeuses et 1×10^6 cellules stimulantes allogéniques irradiées (cellules spléniques de souris DBA/2). Cinq jours plus tard, les cellules sont recueillies et testées pour leur activité cytotoxique.

4.11. Cellules cibles

Des blastes sont obtenues par cultures de 25×10^6 cellules spléniques dans 20 ml de RPMI-10% de SVF en présence de 40 ug de concanavalin A, 24 ou 48 heures à 37°C. Dans certaines expériences, les cellules tumorales L1210 d'origine DBA-2 et les cellules EL/4 d'origine C57Bl/6 sont également utilisées comme cellules cibles. Ces cellules sont incubées 90 minutes à 37°C dans 1 ml de RPMI-5% SVF contenant 3.7 MBq de ^{51}Cr (chromate de sodium, CEA, Gif/Yvette, France). Les cellules sont lavées 3 fois avant d'être utilisées dans le test de cytotoxicité.

4.12. Tests de cytotoxicité

Les tests sont réalisés dans des plaques de microtitration à puits en forme de V (Greiner, Nurtingen, RFA). Chaque puits contient 100 ul de cellules

effectrices à différentes concentrations et 100 μ l (5×10^4 par puits) de cellules cibles marquées au ^{51}Cr . La plaque est centrifugée 2 min à $20 \times g$, puis incubée 4 heures à 37°C , centrifugée à $100 \times g$ et 100 μ l de surnageant compté dans un compteur gamma (Intertechnique, Plaisir, France). Le pourcentage de libération de ^{51}Cr est exprimé suivant la formule:

$$\frac{\text{Valeur expérimentale} - \text{libération spontanée}}{\text{Libération totale} - \text{libération spontanée}} \times 100$$

La libération totale est déterminée après lyse des cellules cibles marquées par de l'HCl 1 M. La libération spontanée est obtenue en incubant les cellules cibles seules dans les mêmes conditions expérimentales.

4.13. Etudes du cycle cellulaire au cytofluorographe

Les suspensions cellulaires sont colorées par de l'acridine orange et analysées au cytofluorographe (modèle 50H, Ortho instruments) selon la technique décrite antérieurement (DARZYNKIEWICZ et coll., 1976) (STADLER et coll., 1980). Cette méthode permet d'analyser les fluorescences verte et rouge correspondant respectivement à l'ADN et à l'ARN. Les cellules mortes (faible contenu en ADN), et les doublets cellulaires sont exclus par ajustement des fenêtres du cytofluorographe. Le pourcentage de cellules en phase G0 et G1 du cycle cellulaire était calculé suivant la technique décrite antérieurement (DARZYNKIEWICZ et coll., 1976) (STADLER et coll., 1980) (KRISTENSEN et coll., 1983).

4.14. Absorption du SDIF sur les cellules

Différentes suspensions cellulaires sont incubées en présence de 0.8 ml de SDIF purifié à 37°C ou à 4°C . Les surnageants sont ensuite testés sur la prolifération de cellules de la lignée Jurkat. 0.1 ml de surnageant en dilution sérielle de 2 en 2 est cultivé avec 0.1 ml de suspension cellulaire contenant 5×10^4 cellules Jurkat. L'incorporation de ^3H -methyl Thymidine est mesurée comme

précédemment. Les surnageants de lignées B ou macrophagiques étaient souvent inhibiteurs par eux-mêmes de la prolifération des Jurkat. Dans ce cas, les surnageants étaient d'abord chromatographiés sur une colonne de Sephadex-G25 (PD-10, Pharmacia, Upsalla, Suède) équilibrée dans de l'eau distillée. Puisque le SDIF est de faible poids moléculaire, les fractions de petit poids moléculaire étaient lyophilisées, remises en suspension dans le volume original d'eau distillée et testées comme précédemment. Ces fractions de faible poids moléculaire étaient dépourvues de l'activité inhibitrice observée dans les surnageants initiaux. Comme contrôle, le même procédé était réalisé avec du SDIF seul. Pour déterminer le pourcentage d'absorption, des courbes dose-réponse ont été établies pour le SDIF seul et pour chaque surnageant. Une dilution donnant encore une inhibition dans le test biologique était choisie, et la valeur expérimentale correspondante était reportée sur la courbe dose-réponse du SDIF pour exprimer le pourcentage d'activité-SDIF résiduel.

4.15. Technique d'élutriation

Cette technique est réalisée avec une centrifugeuse J6-M Beckman en utilisant un rotor à élutriation J6. Il s'agit de séparer les cellules en fonction de leur taille. Les paramètres de la centrifugation sont les suivants: un débit de 18 ml/min est gardé constant. Le milieu utilisé est du PBS dépourvu de Ca^{++} et de Mg^{++} et contenant 0,01 % d'EDTA et 1 % de sérumalbumine bovine, ajusté à une osmolarité de 290 mOsm. La température est réglée à 10°C. La vitesse du rotor était réduite pas à pas de 2600 rpm à 1300 rpm. Des cellules T Jurkat (2×10^8 cellules) provenant d'une culture en phase exponentielle sont déposées dans la chambre. Quatorze fractions de 90 ml sont collectées, lavées et analysées au cytofluorographe selon la technique décrite précédemment. Des aliquots de chaque fraction sont cultivés en microplaques en présence de SDIF. 100 μl de suspension cellulaire contenant 5×10^4 cellules en RPMI-10 % de SVF sont cultivés avec 100 μl de SDIF (dilution finale de 1/10, 1/20 et 1/40). Des marquages à la thymidine

tritiée sont effectués de 0 à 2 heures, de 2 à 4 heures, de 4 à 6 heures et de 6 à 18 heures après la mise en culture. L'incorporation de thymidine est déterminée comme précédemment.

5. REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE

Une réaction d'hypersensibilité retardée aux globules rouges de mouton est induite chez des souris C57Bl/6 (KETTMAN, 1978). Une injection intraveineuse de 10^5 globules rouges est faite au jour 0. Au jour 4, un rappel est fait par injection dans l'un des coussinets plantaires de 20 μ l d'une suspension de globules rouges à 10 % dans de l'HBSS. L'autre patte reçoit le même volume d'HBSS. Le diamètre des coussinets plantaires est mesuré 24 heures plus tard en utilisant un micromètre (Mututoyo 7309, Japon). Le résultat donné correspond à la différence de diamètre entre les deux pattes.

6. PROLIFERATION DE LYMPHOMES T IN VIVO

Des souris C57Bl/6 reçoivent une injection intrapéritonéale de 10^4 cellules de la lignée EL-4 sous un volume de 0.5 ml de PBS. Le SDIF est injecté par voie intrapéritonéale sous un volume de 0.2 ml suivant différents protocoles mentionnés dans le chapitre Résultats (4.2.). Les souris contrôles reçoivent du sérum physiologique à la place du SDIF. Le nombre de jours de survie de chaque souris après l'injection des cellules tumorales est reporté sur le graphique (chapitre Résultats 4.2.).

7. ETUDE DE LA REPONSE IqE

7.1. Préparation de l'ovalbumine dinitrophénylée (DNP-OVA)

100 mg d'ovalbumine (Sigma, St Louis, Mo.) sont incubés avec 100 mg d'acide sulfonique 2,4-dinitrobenzène (DNBS) (Eastman Organic Chemicals, Rochester,

N.Y.) et 100 mg de carbonate de sodium dans 5 ml d'eau. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 16 heures. Le DNBS non couplé est éliminé par dialyse (EISEN et coll., 1953). La concentration en DNP est calculée à partir de l'absorbance à 360 et 280 nm. Nous avons utilisé des préparations de DNP-OVA contenant 9 groupements DNP par molécule d'OVA. La sérumalbumine bovine dinitrophénylée (DNP-BSA) est préparée de la même façon.

7.2. Immunisations

0.5 ml de sérum physiologique contenant 10 µg de DNP-OVA et 10 mg d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ sont injectés par voie intrapéritonéale à des rats Lewis ou Brown-Norway. Le SDIF est injecté par voie intrapéritonéale soit aux jours 7, 3 et 1 avant l'immunisation, soit en une injection en même temps que l'antigène, soit aux jours 1, 3 et 4 après l'immunisation.

Pour la réponse secondaire, 1 µg de DNP-OVA est injecté par voie intrapéritonéale dans 0.5 ml de sérum physiologique. Le SDIF est injecté simultanément.

7.3. Dosage des anticorps IgE anti-DNP

Les anticorps IgE anti-DNP sont mesurés par une technique de RAST (Radio Allergo Sorbent Test) (WIDE et coll., 1967). La phase solide est constituée de billes de polystyrène (Seroa, Monaco). 100 billes sont incubées avec 20 µg de DNP-BSA dans 100 µl de tampon carbonate 0.1M, pH 9.4 à température ambiante pendant 16 heures. Les billes sont lavées avec du sérum physiologique additionné de 0.04 % de Tween 20.

La fraction IgG d'un antiserum de mouton contenant des anticorps anti-IgE de rat (spécifiques du FcE) (donnés par le Dr H. BAZIN) est marquée par la méthode à la chloramine T (GREENWOOD et coll., 1963) avec 9.25 MBq d'iodure de

sodium (Amersham, Grande-Bretagne). Les anticorps anti-IgE marqués sont purifiés par chromatographie sur Sephadex G-25 (Pharmacia, Plaisir, France) et stockés à -20°C jusqu'à utilisation (activité spécifique de 259 kBq/ μg).

Les billes sont incubées avec les sérums de rat à différentes dilutions en PBS (PBS 0,05M, pH 7,4) contenant 3 % de polyéthylène glycol (PEG, Serva, Heidelberg, RFA). Le mélange est incubé pendant 8 heures à température ambiante sous agitation douce. Après trois lavages en sérum physiologique Tween 0,04 %, l'anti-IgE marqué est ajouté (50000 cpm/tube). Après une nuit d'incubation à température ambiante, les billes sont lavées et la radioactivité associée aux billes est comptée dans un compteur gamma (Intertechnique, Plaisir, France).

Les cpm obtenus par comptage des billes sont convertis en ng d'anti-IgE fixés sur la phase solide après déduction du bruit de fond obtenu en présence de sérum de rat sain.

Une relation linéaire ($r=0.939$, $p<0,001$) est trouvée entre la dilution du sérum et la quantité d'anti-IgE fixée, ce qui valide l'expression des résultats. Une corrélation significative entre la technique du RAST et la technique d'anaphylaxie cutanée passive (OVARY, 1958) a été obtenue ($r=0,965$, $n=10$).

7.4. Mesure des taux d'anticorps anti-DNP

Ceci a été réalisé par la technique de FARR (MENDEN et FARR, 1973) modifiée par COX et TAUBMAN (1983). Cette technique consiste à utiliser du DNP tritié pour mesurer l'avidité des anticorps et un deuxième traceur, du ^{32}P -phosphate disodique qui sert de marqueur de volume et permet de corriger les données.

7.5. Traitements statistiques

La distribution des IgE étant log normale, les résultats sont traités après transformation logarithmique par analyse de variance bidirectionnelle.

8. ETUDE DE LA DEGRANULATION MASTOCYTAIRE

8.1. Obtention de sérums riches en IgE

Des rats Hooded-Lister sont immunisés par injection intrapéritonéale de 10 ug d'ovalbumine (Miles, Bucks, England) et 5×10^9 Bordetella pertussis adsorbé sur hydroxyde d'alumine (Perthydral, Institut Pasteur, Paris) (JARRETT et STEWART, 1974). Les animaux sont saignés 14 jours plus tard et les sérums stockés à -70°C .

8.2. Réactions d'anaphylaxie cutanée passive (PCA)

100 ul de sérum anti-ovalbumine ou de sérum de rat infecté (Jour 42) sont injectés par voie intradermique à des rats Wistar mâles. 48 heures plus tard, les réactions de PCA sont déclenchées par injection dans la veine dorsale du pénis de 4 mg de bleu d'Evans (UCB, Bruxelles, Belgique) et de 5 mg d'ovalbumine ou de 2 mg d'antigène S. mansoni dans 1 ml de sérum physiologique. Les rats sont sacrifiés 30 minutes plus tard et les diamètres des taches bleues mesurés sur la face interne de la peau avec un planimètre.

8.3. Réactions d'anaphylaxie cutanée active

Des rats Wistar sont immunisés suivant le même protocole que les rats Hooded-Lister. 30 jours plus tard, une injection intradermique de 1 ug d'ovalbumine dans 100 ul de sérum physiologique est faite sur le dos de ces animaux. Simultanément, 4 mg de bleu d'Evans dans 1 ml de sérum physiologique

sont injectés par voie intraveineuse. Les réactions sont examinées comme précédemment.

8.4. Réactions cutanées induites par des agents chimiques

10 à 100 ng de composé 48/80 (Sigma Co, St Louis, Mo) ou 0.1 ug de Polymyxine B sulfate (Sigma) dans 100 ul de sérum physiologique sont injectés localement à des rats Wistar en même temps que l'injection intraveineuse de colorant. Les réactions sont examinées comme précédemment.

8.5. Effet du SDIF sur les réactions cutanées

100 ul de SDIF sont injectés au même site que l'antisérum ou les agents chimiques 30 minutes avant le déclenchement de la réaction. Un contrôle est fait avec seulement une injection de SDIF. 100 ul de sérum physiologique sont injectés à la place du SDIF pour les contrôles positifs.

8.6. Dégranulation mastocytaire in vitro

La technique consiste à mesurer la libération de sérotonine tritiée préalablement incorporée dans les mastocytes (MAZINGUE et coll., 1978). Des cellules péritonéales de rats Wistar sont incubées avec (G-³H)-5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (370 GBq/mmol) (Amersham, Versailles, France) à une dose de 74 kBq pour 10⁶ mastocytes. Le test est réalisé en plaques de microtitration fond plat (Linbro, Flow Lab, Ecosse). 50 ul de suspension cellulaire (5 x 10⁴ mastocytes par puits) sont incubés en milieu de Eagle (Minimum Essential Medium ou MEM) avec les agents chimiques (composé 48/80 ou polymyxine B) ou avec 50 ul de sérum de rat anti-ovalbumine et de 50 ul d'une solution d'ovalbumine à 1 mg/ml. Les cellules sont incubées 15 minutes à 37°C avec les agents chimiques, ou 2 heures avec le sérum puis 15 minutes avec l'ovalbumine. Les plaques sont centrifugées à 1000 x g pendant 10 minutes. 50 ul

de surnageant sont transférés dans des fioles de comptage. Pour mesurer la quantité de sérotonine marquée libérable par les mastocytes, les cellules sont lysées par 50 ul de diestine (Merck, Darmstadt, RFA). La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation (Nuclear, Chicago, Ill.). Le pourcentage de libération de sérotonine est exprimé suivant la formule:

$$\% = \frac{X-S}{T-S} \times 100$$

X est la radioactivité de l'échantillon; S la radioactivité correspondant à la libération spontanée et T à la libération totale par la diestine. S représente environ 1 à 5 % de T.

8.7. Test de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles

Des schistosomules sont sensibilisés pendant 1 nuit avec du sérum de rat infecté prélevé au jour 28 (dilution finale 1/16). Les schistosomules sont lavés et incubés avec des cellules péritonéales de rats sains, contenant 40 à 60 % d'éosinophiles et 7 à 15 % de mastocytes. Le rapport effecteur:cible est de 6000:1. Pour certaines expériences, les mastocytes sont ôtés de la population selon la technique de LYNCH et coll. (1978) par centrifugation sur coussin de sérualbumine (<1 % de mastocytes). Des mastocytes purifiés sont ajoutés à une concentration de 25 % à une population dépourvue de mastocytes.

Des surnageants de dégranulation mastocytaire sont obtenus par incubation de mastocytes de rats infectés (8 semaines d'infection) avec un antisérum anti-IgE de rat (donné par le Dr BAZIN) et ajoutés à raison de 50 ul dans les puits des tests de cytotoxicité. Le SDIF est ajouté en même temps que les cellules effectrices. La cytotoxicité est déterminée par lecture au microscope après 48 heures de contact entre les effecteurs et leurs cibles. Les schistosomules morts apparaissent opaques et sans mouvement, alors que les

vivants sont bien réfringents et mobiles. Le pourcentage d'inhibition de la cytotoxicité est calculé comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\% \text{ cytotoxicité en présence de SDIF}}{\% \text{ cytotoxicité en absence de SDIF}} \right) \times 100$$

8.8. Induction d'un choc anaphylactique chez le cobaye

Des cobayes sont immunisés par injection intrapéritonéale de 5 mg d'ovalbumine en solution dans 1 ml de vaccin anti-coquelucheux Perthydral (Institut Pasteur Production). Deux mois plus tard, le choc anaphylactique est déclenché par injection intrapéritonéale de 1 mg d'ovalbumine en solution dans 1 ml de sérum physiologique. 30 minutes avant le déclenchement du choc, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de 3 ml de SDIF ou de sérum physiologique pour les contrôles.

8.9. Réactions d'anaphylaxie cutanée passive chez le singe

Différentes dilutions d'un sérum humain de patient allergique aux acariens sont injectées par voie intradermique sous un volume de 0.1 ml sur l'abdomen d'un singe Erythrocebus patas. 18 h plus tard, le SDIF (0.1 ml) est injecté au même site, du sérum physiologique servant de contrôle. 15 min plus tard, une injection intraveineuse (10 ml) d'une solution de Bleu d'Evans à 0.1 % en sérum physiologique est réalisée, suivie 15 min après d'une injection (10 ml) d'une solution d'allergène (1 flacon d'allergène "Dpteronysinus", extrait 1%) (Laboratoire des Stallergènes, Fresnes, France). La surface des taches bleues est mesurée avec un planimètre.

9. MESURE DE LA CYTOTOXICITE PLAQUETTAIRE

9.1. Isolement des plaquettes

L'ensemble des manipulations est fait à température ambiante. Du sang de sujet sain est prélevé sur anticoagulant composé d'un mélange d'acide citrique, de citrate trisodique et de glucose (ACD-C) selon la formule de CAEN et coll. (1976) (6 volumes de sang pour un volume d'ACD-C) et centrifugé 15 minutes à $120 \times g$ en aliquots de 5 ml. Le plasma riche en plaquettes est rassemblé et centrifugé à $2000 \times g$ pendant 15 minutes. Les plaquettes sont remises en suspension et lavées trois fois en sérum physiologique additionné d'acide citrique (36 mM), de glucose (5 mM), de calcium (2 mM), de magnésium (1 mM), de BSA (0,35 %) et de prostaglandine E1 (100 nM) (PATSCHEKE, 1981). Les plaquettes sont comptées dans un hématocytomètre après dilution au 1/20 dans une solution d'oxalate d'ammonium à 1 %. La contamination leucocytaire n'a jamais excédé 10 leucocytes pour 10^6 plaquettes.

9.2. Test de cytotoxicité

Les plaquettes sont remises en suspension dans du MEM. 150×10^6 plaquettes dans 50 μ l de MEM sont incubées en plaques de microtitration fond plat (Nunc) avec 20 μ l de sérum de sujet sain, 50 μ l d'agent activateur (sérum de sujet infecté, ou sérum de sujet allergique + allergène, ou substance P) et 75 schistosomules dans 80 μ l de MEM. Après 24 heures de contact à 37°C, la cytotoxicité est appréciée par observation microscopique. Nous n'avons pas observé au cours de ces tests d'aggrégation plaquettaire.

REFERENCES

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

1. Articles originaux

- * C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT & A. CAPRON (1978) ^3H serotonin release: an improved method to measure mast cell degranulation. J. Immunol. Meth. 21:65.
- * M. CAPRON, J. ROUSSEAU, C. MAZINGUE, H. BAZIN & A. CAPRON (1978) Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to Schistosoma mansoni schistosomula. J. Immunol. 121:2518.
- * C. MAZINGUE, D. CAMUS, J.P. DESSAINT, M. CAPRON & A. CAPRON (1980) In vitro and in vivo inhibition of mast cell degranulation by a factor from Schistosoma mansoni. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 63:178.
- * D. CAMUS, A. NOSSEIR, C. MAZINGUE & A. CAPRON (1981) Immunoregulation by Schistosoma mansoni Immunopharmacology 3:193.
- * C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT, A.M. SCHMITT-VERHULST, J.C. CEROTTINI & A. CAPRON (1983) Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome derived inhibitory factor is independent of an inhibition of the production of interleukin 2. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 72:22.
- * C. LANGLET, C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT & A. CAPRON (1984) Inhibition of primary and secondary IgE-response by a schistosome-derived inhibitory factor. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 73:225.
- * C. MAZINGUE, B.M. STADLER, B. QUATANNENS, A. CAPRON & A. de WECK (1986) Schistosome Derived Inhibitory Factor: an immunosuppressive agent preferentially active on T lymphocytes. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 80:347.
- * C. MAZINGUE, C. WALKER, W. DOMZIG, A. CAPRON, A. de WECK & B.M. STADLER (1987) Effect of Schistosome Derived Inhibitory Factor on the cell cycle of T lymphocytes. Int. Archs Allergy appl. Immunol. , in press.

2. Ouvrages

- * A. CAPRON, C. AURIAULT, C. MAZINGUE, M. CAPRON & G. TORPIER (1980) Schistosome mechanisms of evasion, in "The host invader interplay". H. Van den Bossche ed. p217.
- * J.P. DESSAINT, A. CAPRON, C. AURIAULT & C. MAZINGUE (1983) Immunopharmacology of parasitic diseases. Adv. Immunopharmacol. 2:187.

3. Communications

- * C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT & A. CAPRON (1977) ^3H -Serotonin release: an improved method to measure mast cell degranulation. Grignon, International Congress on immunity in parasitic diseases.
- * C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT, D. CAMUS & A. CAPRON (1978) Modulation de la dégranulation mastocytaire dans la schistosomiase expérimentale du rat. S.F.I. Clermont-Ferrand. Ann. Immunol. 129c:754.
- * M. CAPRON, J. ROUSSEAU, C. MAZINGUE, H. BAZIN, A. CAPRON. (1979) Role of mast cells in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity in rat schistosomiasis. International symposium on Mast cells. Leicestershire.
- * A. CAPRON, C. MAZINGUE, D. CAMUS, J.P. DESSAINT, M. CAPRON (1980) In vitro and in vivo inhibition of mast cell degranulation by a Schistosome Derived Inhibitory Factor. 4th International congress of immunology, Paris.
- * C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT, A.M. SCHMITT-VERHULST & A. CAPRON (1982) Inhibition de l'activité interleukine 2 par un facteur soluble extrait de Schistosoma mansoni. S.F.I. Strasbourg.
- * C. AURIAULT, C. MAZINGUE, M. JOSEPH, M. CAPRON, R.J. PIERCE, C. LANGLET, J.P. DESSAINT, A. CAPRON (1982) Immunoregulation by Schistosoma mansoni. Congress of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Londres.
- * C. MAZINGUE, B.M. STADLER, A. CAPRON & A. de WECK (1984) Selective inhibition of T lymphocyte proliferation by a schistosome derived inhibitory factor. Effect on the cell cycle. 6th European Immunology Meeting, Interlaken.

4. Brevets

- * A. CAPRON, C. MAZINGUE, D. CAMUS & J.P. DESSAINT. Nouveau produit biologique extrait d'un trématode et son emploi comme médicament. 1979. N° 825-79. Bureau fédéral de la propriété intellectuelle de Berne. Suisse.
- * A. CAPRON & C. MAZINGUE. Peptide extrait des cultures d'un trématode, son procédé d'obtention et son emploi comme médicament. 1980. N° 8001694. Institut national de la propriété industrielle, Paris.
- * A. CAPRON, C. MAZINGUE & D. CAMUS. Novel peptide from culture of Schistosoma mansoni, a process for producing it and pharmaceutical compositions containing the same. 1981. N° 228994. United States patent & trademark office.

REFERENCES

Les références sont classées par ordre alphabétique et pour un même premier auteur par année.

ABE, T., FORBES, J.T., COLLEY, D.G. (1983) Natural Killer cell activity during murine schistosomiasis. *J. Parasitol.* 69:1001.

ABE, T., COLLEY, D.G. (1984) Modulation of Schistosoma mansoni egg-induced granuloma formation. III. Evidence for an anti-idiotypic, I-J positive, I-J restricted, soluble T suppressor factor. *J. Immunol.* 132:2084.

ABOUL-ENEIN, A., BUTT, K., ABOUD, A., KOTKATA, H. (1982) Prolonged skin allograft survival in chronic schistosomiasis. *Surgery* 91:425.

ACKERMAN, S.B., SEED, J.R. (1976) The effects of tryptophol on immune responses and its implication toward trypanosome-induced immunosuppression. *Experientia* 32:645.

ALBRIGHT, J.F., ALBRIGHT, J.W., DUSANIC, D.G. (1977) Trypanosome-induced splenomegaly and suppression of mouse spleen cell responses to antigen and mitogens. *J. Ret. End. Soc.* 21:21.

AMEISEN, J.C., CAPRON, A., JOSEPH, M., MACLOUF, J., VORGN, H., PANCRE, V., FOURNIER, E., WALLAERT, E., TONNEL, A.B. (1985) Aspirin-sensitive asthma: abnormal platelet response to drugs inducing asthmatic attacks. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 78:438.

ANDERSON, J., GRONVIK, K.O., LARSSON, E.L., COUTINHO, A. (1979) Studies on T lymphocyte activation. I. Requirements for the mitogen-dependent production of T cell growth factors. *Eur. J. Immunol.* 9:581.

ANDERSON, M.R. (1974) The epidemiological and allergic features of asthma in the New Guinea Highlands. *Clin. Allergy* 4:171.

ATTALAH, A.M., LEWIS, F.A., URRITIA-SHAW, A., FOLKS, T., YEATMAN, T.J. (1980) Natural Killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of Schistosoma mansoni infection. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 13:351.

AURIAULT, C., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., CAPRON, A. (1980) Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by schistosomula larvae proteases. *Immunology Letters* 2:135

AURIAULT, C., OUASSI, A., TORPIER, G., EISEN, H., CAPRON, A. (1981a) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of Schistosoma mansoni schistosomula. *Parasite Immunology* 3:33.

AURIAULT, C., PESTEL, J., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., CAPRON, A. (1981b) Interaction between macrophages and Schistosoma mansoni schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62:15.

AURIAULT, C., CAPRON, M., CAPRON, A. (1982) Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by Schistosoma mansoni schistosomula. *Cell. Immunol.* 66:59.

- AURIAULT, C., CAPRON, M., CESARI, I.M., CAPRON, A. (1983a) Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by S. mansoni: role of proteases. J. Immunol. 131:464.
- AURIAULT, C., JOSEPH, M., TARTAR, A., CAPRON, A. (1983b) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second domain of human immunoglobulin G. FEBS Lett. 153:11.
- AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, ., JOSEPH, M., CAPRON, M., VERWAERDE, C., BILLAUT, P., CAPRON, A. (1985) Defined antigens secreted by the larvae of schistosomes protect against schistosomiasis: induction of cytotoxic antibodies in the rat and the monkey. Eur. J. Immunol. 15:1168.
- BACH, J.F. (1975) The mode of action of immunosuppressive agents. North-Holland Publishing Co, Amsterdam Oxford.
- BAGASRA, O., SCHELL, R.F., LE FROCK, J.L. (1981) Evidence for depletion of Ia+ macrophages and associated immunosuppression in African Trypanosomiasis. Inf. Immun. 32:188.
- BAKER, P.E., GILLIS, S., D., SMITH, K.A. (1979) Monoclonal cytotoxic T cell lines. J. Exp. Med. 149:273.
- BALIS, M.E., HYLIN, V., COULTAS, M.K., HUTCHINSON, D.J. (1958) Metabolism of resistant mutants of Streptococcus faecalis. III. The action of 6-mercaptopurine. Cancer Res. 18:440.
- BANCROFT, G.J., ASKONAS, B.A. (1982) Regulation of antibody production in protozoal infections. Clin. Immunol. Allergy, 2:511.
- BAUM, L.L., PILARSKI, L.M. (1978) In vitro generation of antigen specific helper T cells that collaborate with cytotoxic T cell precursors. J. Exp. Med. 148:1579.
- BAZIN, H., CAPRON, A., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., PAUWELS, R. (1980) Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies on immunity to schistosomes (Schistosoma mansoni) in the rat. J. Immunol. 124:2373.
- BETTENS, F., KRISTENSEN, F., WALKER, C., BONNARD, G.D., De WECK, A. (1984) Lymphocyte regulation of human proliferation. Formation of resting (G0) cells by removal of interleukin 2 in cultures of proliferating T lymphocytes. Cell. Immunol. 86:337.
- BOMFORD, R., WEDDERBURN, N. (1973) Depression of immune response to Moloney leukemia virus by malarial infection. Nature 242:471.
- BONAVIDA, B., FAN, J., HISERODT, J.C. (1982) T cell membrane antigens associated with cytotoxic function. Immunol. Today 3:138.
- BOREL, J.G., FEURER, C., GUBLER, H.U., STAHELIN, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions 6:468.
- BOROS, D.L., PELLE, R.P., WARREN, K.S. (1975) Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 114:1437.
- BOUT, D., DUPAS, H., CARLIER, Y., AFCHAIN, D., CAPRON, A. (1977) High resistance induced by young live Bacillus Calmette Guerin (BCG) to Schistosoma mansoni infection. Ann. Immunol. 128C:811.

- BOUT, D., JOSEPH, M., DAVID, J.R., CAPRON, A. (1981) *In vitro* Killing of S. mansoni schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. J. Immunol. 127:1.
- BOUT, D., JOSEPH, M., PONTET, M., VORNG, H., DESLEE, D., CAPRON, A. (1986) Rat resistance in schistosomiasis: platelet mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. Science 231:153.
- BRITO, I.V., PEEL, M., REE, G.H. (1976) Immunological response to tetanus toxoid during a schistosomal infection in mice. J. Trop. Med. Hyg. 79:161.
- BUNJES, D., HARDT, C., ROLLINGHOFF, M., WAGNER, H. (1981) Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. Eur. J. Immunol. 8:657.
- BUTTERWORTH, A.E., VADAS, M.A., MARTZ, E., REES, P.H. (1975) Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula. Nature 256:727.
- BUTTERWORTH, A.E., REMOLD, H.G., HOUBA, V., DAVID, J.R., FRANKS, D., DAVID, P.H., STURROCK, R.F. (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of Schistosoma mansoni: mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. J. Immunol. 118:2230.
- BUTTERWORTH, A.E., VADAS, M.A., MARTZ, E., SHER, A. (1979) Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of Schistosoma mansoni, but fail to induce damage. J. Immunol. 122:1314.
- BUTTERWORTH, A.E., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., RICHARDSON, B.A., SIONGOK, T.K., STURROCK, R.F. (1984) Immunity after treatment of human schistosomiasis. I. Study design, pretreatment observations and the results of treatment. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78:103.
- BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, M., CORDINGLEY, J.S., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., KARIUKI, H.C., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., PRENTICE, M.A., RICHARDSON, B.A., SIONGOK, T.K., STURROCK, R.F., TAYLOR, D.W. (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79:393.
- CAEN, J.P., NURDEN, A.T., JEANNEAU, C. (1976) Bernard Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality. Its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the FVIII von Willebrand protein. J. Lab. Clin. Med. 87:586.
- CAMUS, D., DESSAINT, J.P., FISCHER, E., CAPRON, A. (1979) Nonspecific suppressor cell activity and specific cellular unresponsiveness in rat schistosomiasis. Eur. J. Immunol. 9:341.
- CAPRON, A., BIGUET, J., ROSE, F., 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. Past. 109:798.
- CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A., AFCHAIN, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol. 16:121.

CAPRON, A., WATTRE, P., CAPRON, M., LEFEBVRE, M.N. (1972) Influence du parasitisme à Dipetalonema viteae et à Schistosoma mansoni sur la croissance de tumeurs. C.R. Acad. Sc. Paris, 275:719.

CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D., PETITPREZ, A. (1974) Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase expérimentale et humaine. Etude in vitro de l'activité létale d'immunsérum sur les formes immatures et sur les adultes de Schistosoma mansoni. Int. J. Parasitol. 4:613.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BAZIN, H. (1975) Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to S. mansoni schistosomules. Nature 253:474.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., JOSEPH, M., ROUSSEAU, R., CAPRON, M., BAZIN, H. (1977) Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat: a new mechanism of macrophage activation. Eur. J. Immunol. 7:315.

CAPRON, A., CAMUS, D., DESSAINT, J.P., LE BOUBENNEC-FISCHER, E. (1977b) Altérations de la réponse immune au cours des infections parasitaires. Ann. Immunol. 128C:541.

CAPRON, A., AURIAULT, C., MAZINGUE, C., CAPRON, M., TORPIER, G. (1980) Schistosome mechanisms of evasion. in "The Host-Invader Interplay". Elsevier/North-Holland Biochemical Press. Amsterdam. p 217.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P. (1985a) Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. Ann. Rev. Immunol. 3:455.

CAPRON, A., AMEISEN, J.C., JOSEPH, M., AURIAULT, C., TONNEL, A.B., CAEN, J. (1985b) New functions for platelets and their pathological implications. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 77:107.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., JOSEPH, M., AMEISEN, J.C., TONNEL, A.B. (1986) From parasites to allergy: a second receptor for IgE. Immunol. Today 7:15.

CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D., JOSEPH, M. (1978) Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG_{2a} antibodies and role of mast cells. Eur. J. Immunol. 8:127.

CAPRON, M., TORPIER, G., CAPRON, A. (1979) In vitro Killing of S.mansoni schistosomula by eosinophils from infected rats : role of cytophilic antibodies. J. Immunol. 123:2220

CAPRON, M., BAZIN, H., TORPIER, G., JOSEPH, M., CAPRON, A. (1981a) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol. 126:1764.

CAPRON, M., CAPRON, A., GOETZL, E.J., AUSTEN, K.F. (1981b) Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. Nature 289:71.

CAPRON, M., CAPRON, A., ABDEL-HAFEZ, S.K., BAZIN, H., JOSEPH, M., PHILLIPS, S.M. (1983) Immunologic response of athymic rats to Schistosoma mansoni infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. J. Immunol. 131:1475.

CAPRON, M., SPIEGELBERG, H.L., PRIN, L., BENNICH, H., BUTTERWORTH, A.E., PIERCE, R.J., OUASSI, M.A., CAPRON, A. (1984) Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.

CAPRON, M., JOUAULT, T., PRIN, L., JOSEPH, M., AMEISEN, J.C., BUTTERWORTH, A.E., PAPIN, J.P., KUSNIERZ, J.P., CAPRON, A. (1986a) Functionnal study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (FcER2) of eosinophils, platelets and macrophages. *J. Exp. Med.* 164:72.

CAPRON, M., CAPRON, A. (1986b) Rats, mice and men. Models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today* 2:69.

CARPENTER, C.B., STROM, T.B. (1984) Immunosuppressive therapy for renal transplantation. *Springer Semin. Immunopathol.* 7:43.

CERROTTINI, J.C., BRUNNER, K.T. (1974) Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunol.* 18:67.

CHENSUE, S.W., BOROS, D.L. (1979) Modulation of granulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in Schistosoma mansoni infected mice. *J. Immunol.* 123:1409.

CHENSUE, S.W., BOROS, D.L., DAVID, C.S. (1980) Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. In vitro characterization of T lymphocyte subsets involved in the production and suppression of migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 151:1398.

CHENSUE, S.W., WELLHAUSEN, S.R., BOROS, D.L. (1981) Modulation of granulomatous hypersensitivity. II. Participation of Lyt1+ and Lyt2+ T lymphocytes in the suppression of granuloma formation and lymphokine production in Schistosoma mansoni infected mice. *J. Immunol.* 127:363.

CHENSUE, S.W., BOROS, D.L., DAVID, C.S. (1983) Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. II. T suppressor cell-derived I-C subregion-encoded soluble suppressor factor mediates regulation of lymphokine production. *J. Exp. Med.* 157:219.

CHERNYAKHOVSKAYA, I.Y., SHAGHISJAN, H.S., SLAVINA, E.G., SVET-MOLDAVSKY, G.J. (1972) Helminths and allotransplantation. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.* 17:395.

CHIORAZZI, N., FOX, D.A., KATZ, D.H. (1977) Hapten-specific IgE antibody responses in mice. VII. Conversion of IgE non-responder strains to IgE responders by elimination of suppressor T cell activity. *J. Immunol.* 118:48.

CIANCIOLO, G.J., COPELAND, T.D., OROSZLAN, S., SNYDERMAN, R. (1985) Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 230:453.

CINES, D.B., VANDERKEYL, H., LEVINSON, A.I. (1986) In vitro binding of an IgE protein to human platelets. *J. Immunol.* 136:3433.

CLARK, I.A., VIRELIZIER, J.L., CARSWELL, E.A., WOOD, P.R. (1981) Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Inf. Immun.* 32:1058.

CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. (1971) Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 1:43

CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. (1972) The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of S. mansoni during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.* 12:79.

CLINTON, B.A., ORTIZ-ORTIZ, L., GARCIA, W., MARTINEZ, T., CAPIN, R. (1975) Trypanosoma cruzi: early immune responses in infected mice. *Exp. Parasitol.* 37:417.

COFFMAN, R.L., CARTY, J. (1986) A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . *J. Immunol.* 136:949.

COFFMAN, R.L., OHARA, J., BOND, M.W., CARTY, J., ZLOTNIK, A., PAUL, W.E. (1986) B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* 136:4538.

COHEN, S. (1974) The immune response to parasites. in "Parasite in the immunized host: mechanisms of survival". Associated Scientific Publishers; Amsterdam, 3.

COLLEY, D.G. (1976) Adoptive suppression of granuloma formation. *J. Exp. Med.* 143:696.

COLLEY, D.G., COOK, J.A., FREEMAN, G.L., BARTHOLOMEW, R.K., JORDAN, P. (1977a) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. In vitro lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 53:420.

COLLEY, D.G., HIENY, S.E., BARTHOLOMEW, R.K., COOK, J.A. (1977b) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. III. Regulatory effect of patient sera on human lymphocyte blastogenic responses to schistosome antigen preparations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:917.

COLLEY, D.A., LEWIS, F.A., GOODGAME, R.W. (1978) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. IV. Induction of suppressor cell activity by schistosome antigen preparations and concanavalin A. *J. Immunol.* 120:1225.

COLLEY, D.G., LEWIS, F.A., TODD, C.W. (1979a) Adoptive suppression of granuloma formation by T lymphocytes and by lymphoid cells sensitive to cyclophosphamide. *Cell. Immunol.* 45:192.

COLLEY, D.G., TODD, C.W., LEWIS, F.A., GOODGAME, R.W. (1979b) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. VI. In vitro nonspecific suppression of phytohemagglutinin responsiveness induced by exposure to certain schistosomal preparations. *J. Immunol.* 122:1447.

COLLINS, F.M., BOROS, D.L., WARREN, K.S. (1972) The effect of Schistosoma mansoni infection on the response of mice to Salmonella entericus and Listeria monocytogenes. *J. Inf. Diseases* 125:249.

CORREA, M., NARAYANAN, P.R., MILLER, H.C. (1980) Suppressive activity of adherent cells from Plasmodium chabaudi infected mice. *J. Immunol.* 125:749.

CORSINI, A.C., CLAYTON, C., ASKONAS, B.A., OGILVIE, B.M. (1977) Loss of B cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei. *Clin. Exp. Immunol.* 29:122.

COX, D.S., TAUBMAN, M.A. (1983) A sensitive double isotope modification of the Farr assay using beta-particles emitters. *J. Immunoassay.* 4:99.

COX, F.E.G. (1975) Enhanced Trypanosoma musculi infections in mice with concomitant malaria. *Nature* 258:148.

COX, F.E.G. (1976) Increased virulence of trypanosome infections in mice with malaria or piroplasmiasis: immunological considerations. in "The biochemistry of Parasites and host-parasite relationships". 2nd international symposium. Janssen Pharmaceutica, Bersee, Belgium, 54.

CROSSIN, K.L., CARNEY, D.H. (1981) Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and epidermal growth factor. *Cell* 27:341.

CUNA, W. (1982) L'immunodépression dans la filariose expérimentale: participation de facteurs d'origine parasitaire. D.E.A. Biologie Animale, Lille I.

CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E., ROWLAND, E.C. (1978) Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice. *Inf. Immun.* 22:155.

CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E. (1980a) Trypanosoma cruzi -induced immunosuppression of the primary immune response in murine cell cultures to T-cell dependent and independent antigens. *J. Parasit.* 66:16.

CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E. (1980b) Trypanosoma cruzi -induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization. *J. Immunol.* 124:2122.

CYPESS, R.H., LUBIENICKI, A.S., HAMMON, W.M. (1973) Immunosuppression and increased susceptibility to Japanese B encephalitis virus in Trichinella spiralis infected mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 143:469.

DAMIAN, R.T. (1964) Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Amer. Naturalist.* 98:129.

DAMIAN, R.T. (1967) Common antigens between adult S. mansoni and the laboratory mouse. *J. Parasit.* 53:60.

DAMIAN, R.T., GREENE, N.D., HUBBARD, W.J. (1973) Occurrence of mouse 2-macroglobulin antigenic determinants on Schistosoma mansoni adults, with evidence on their nature. *J. Parasit.* 59:64.

DARZYNKIEWICZ, Z., TRAGANOS, T., SHARPLESS, T., MELAMED, M.R. (1976) Lymphocyte stimulation. A rapid parameter analysis. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 73:2881

DAVIDSON, W.F. (1977) Cellular requirements for the induction of cytotoxic T cells in vitro. *Immunol. Rev.* 35:263.

DEAN, D.A., SELL, K.W. (1972) Surface antigens on Schistosoma mansoni. II. Adsorption of a forssman-like host antigen by schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.* 12:525.

DEAN, D.A. (1974) Schistosoma mansoni: adsorption of human blood group A and B antigens by schistosomula. *J. Parasit.* 60:260.

DEMBO, M., GOLDSTEIN, B. (1980) A model of cell activation and desensitization by surface immunoglobulin: the case of histamine release from human basophils. *Cell* 22:59.

DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BOUT, D., CAPRON, A. (1975) Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels of patients with schistosomiasis (S. mansoni or S. haematobium). Clin. Exp. Immunol. 20:427.

DESSAINT, J.P., CAMUS, D., FISCHER, E., CAPRON, A. (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by Schistosoma mansoni. Eur. J. Immunol. 7:624

DESSAINT, J.P., TORPIER, G., CAPRON, M., BAZIN, H., CAPRON, A. (1979a) Cytophilic binding of IgE to the macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. Cell. Immunol. 46:12.

DESSAINT, J.P., CAPRON, A., JOSEPH, M., BAZIN, H. (1979b) Cytophilic binding of IgE to the macrophage. II. Immunologic release of lysosomal enzyme from macrophages by IgE and anti-IgE in the rat: a new mechanism of macrophage activation. Cell. Immunol. 46:24.

DIAMANT, B. (1967) The effect of compound 48/80 and distilled water on the adenosine triphosphate content of isolated rat mast cells. Acta Physiol. Scand. 71:283.

DIAS DA SILVA, W., KAZATCHKINE, M.D. (1980) Schistosoma mansoni: activation of the alternative pathway of human complement by schistosomula. Exp. Parasitol. 50:278.

DOMINGO, E.O. & WARREN, K.S. (1967) The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. II. Thymectomy. Am. J. Path. 51:757.

DOMINGO, E.O., WARREN, K.S. (1968) The inhibition of granuloma formation around S. mansoni eggs. III. Heterologous anti-lymphocyte serum. Am. J. Path. 52:613.

DUCLOS, H., MAILLOT, M.C., GALANAUD, P. (1986) Interleukin induction of non specific suppressor cells. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 137C:3.

DUMONDE, D.C., PAPERMASTER, B.W. (1984) Towards the standardisation of lymphokines: first report of the lymphokine standardisation subcommittee of the international union of immunological societies PAHO. Lymph. Res. 3:193.

EISEN, H.N., BELMAN, S., CARSTEN, M.E. (1953) The reaction of 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid with free amino groups of proteins. J. Am. Chem. Soc. 75:4583.

ELLNER, J.J., OLDS, G.R., KAMEL, R., OSMAN, G.S., EL KHOLY, A., MAHMOUD, A.A.F. (1980) Suppressor splenic T lymphocytes in human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 125:308.

ELLNER, J.J., OLDS, G.R., OSMAN, G.S., EL KHOLY, A., MAHMOUD, A.A.F. (1981) Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 126:309.

ELLNER, J.J., OLDS, G.R., LEE, C.W., KLEINHENZ, M.E., EDMONDS, K.L. (1982) Destruction of the multicellular parasite Schistosoma mansoni by T lymphocytes. J. Clin. Invest. 70: 369.

- ESUOROSO, G.O. (1976) The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic and cyclophosphamide-treated mice. Clin. Exp. Immunol. 23:314.
- FARAH, F.S., LAZARY, S., DE WECK, A. (1976) The effect of Leishmania tropica on stimulation of lymphocytes with phytohaemagglutinin. Immunology 30:629.
- FARRAR, J.J., FULLER-FARRAR, J., SIMON, P.L., HILFIKER, M.L., STADLER, B.M., FARRAR, W. (1980) Thymoma production of T cell growth factor. J. Immunol. 125:2555.
- FAUBERT, G.M., TANNER, C.E. (1971) Trichinella spiralis: inhibition of sheep hemagglutinins in mice. Exp. Parasitol. 30:120.
- FAUBERT, G.M., TANNER, C.E. (1974a) The suppression of sheep rosette forming cells and the inability of mouse bone marrow cells to reconstitute competence after infection with the nematode Trichinella spiralis. Immunology 27:501.
- FAUBERT, G.M., TANNER, C.E. (1974b) Enlargement of lymph nodes during infection, a preliminary histological study of this phenomenon in Trichinellosis. Proc. 3rd Int. Conf. on Trichinella. Ed. Kim C.W. in Text Educational Publishers New York, 353.
- FAUBERT, G.M., TANNER, C.E. (1975) Leukoagglutination and cytotoxicity of the serum of infected mice and of extracts of Trichinella spiralis larvae and the capacity of infected mouse sera to prolong skin allografts. Immunology 28:1041.
- FEARON, D.T. (1980) Identification of the membrane glycoprotein that is the receptor of human erythrocyte, polymorphonuclear leucocyte, B lymphocyte and monocyte. J. Exp. Med. 152:20.
- FELDMEIER, H., GASTL, G.A., POGGENSEE, U., KORTMANN, C., DAFFALLA, A.A., PETER, H.H. (1985a) Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. I. Lymphocyte subpopulations and specific antibody responses. Clin. Exp. Immunol. 60:225.
- FELDMEIER, H., GASTL, G.A., POGGENSEE, U., KORTMANN, C., DAFFALLA, A.A., PETER, H.H. (1985b) Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. II. NK cell activity and in vitro lymphocyte proliferation. Clin. Exp. Med. 60:234.
- FREEMAN, T., HUDSON, K.M., LONGSTAFFE, J.A., TERRY, R.J. (1973) Immunodepression in trypanosoma infections. Parasitology 67:XXIII.
- FRIEDKIN, M., LEGG, A., ROZENGURT, E. (1979) Antitubulin agents enhance the stimulation of DNA synthesis by polypeptide growth factors in 3T3 mouse fibroblasts. Proc. Natl Acad. Sci. USA 76:3909.
- GASTL, G.A., FELDMEIER, H., DOEHRING, E., KORTMANN, C., DAFFALLA, A.A., PETER, H.H. (1984) Numerical and functional alterations of lymphocytes in human schistosomiasis. Scand. J. Immunol. 19:469.
- GASTL, G.A., FELDMEIER, H., KORTMANN, C., DAFFALLA, A.A., PETER, H.H. (1986) Human schistosomiasis: deficiency of large granular lymphocytes and indomethacin-sensitive suppression of natural killing. Scan. J. Immunol. 23:319.

- GAZZINELLI, G.G., KATZ, N., ROCHA, R.S., COLLEY, D.G. (1983) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. VIII. Differential *in vitro* cellular responsiveness to adult worm and schistosomular tegumental preparations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:326.
- GAZZINELLI, G.G., LAMBERTUCCI, J.R., KATZ, N., ROCHA, R.S., LIMA, M.S., COLLEY, D.G. (1985) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *J. Immunol.* 135:2121.
- GILLIS, S., WATSON, J. (1980) Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. *J. Exp. Med.* 152:1709.
- GODFREY, R.C. (1975) Asthma and IgE levels in rural and urban communities of the Gambia. *Clin. Allergy* 25:201.
- GOLDRING, O.L., SHER, A., SMITHERS, S.R., MACLAREN, D.J. (1977) Host antigens and parasite antigens of murine Schistosoma mansoni. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:144.
- GOODWIN, I.G., GREEN, D.G., GUY, M.W., VOLLER, A. (1972) Immunosuppression during trypanosomiasis. *Br. J. Exp. Path.* 53:40.
- GRANELLI-PIPERNO, A., INABA, K., STEINMAN, R. (1984) Stimulation of lymphokine release from T lymphoblasts. Requirements for mRNA synthesis and inhibition by cyclosporin A. *J. Exp. Med.* 160:1792.
- GREAVES, M.F., JANOSSY, G., CURTIS, P. (1976) Purification of human T lymphocytes using nylon fiber columns. In *in vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity*. Eds BR Bloom and JR David. New York, Academic Press, p 217.
- GREEN, L.M., READE, J.L., WARE, C.F. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70:257.
- GREEN, W.F., COLLEY, D.G. (1981) Modulation of Schistosoma mansoni egg-induced granuloma formation: I-J restriction of T cell-mediated suppression in a chronic parasitic infection. *Immunol.* 78:1152.
- GREENWOOD, B.M., WHITTLE, H.C., MOLYNEUX, D.H. (1973) Immunosuppression in Gambian trypanosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67:846.
- GREENWOOD, B.M. (1974) Possible role of a B cell mitogen in hyper gammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* I:435.
- GREENWOOD, B.M., VICK, R.M. (1975) Evidence for a malaria mitogen in human malaria. *Nature* 257:592.
- GREENWOOD, F.C., HUNTER, W., GLOVER, J.S. (1963) The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89:114.
- GROSSKINSKY, C.M., ASKONAS, B.A. (1981) Macrophages as primary target cells and mediators of immune dysfunction in African trypanosomiasis. *Inf. Immun.* 33:149.
- GRYZCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H., CAPRON, A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG_{2a} monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J. Immunol.* 129:2739.

GRYZCH, J.M., CAPRON, M., DISSOUS, C., CAPRON, A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133:998.

HAGUE, A., CAMUS, D., OGILVIE, B.M., CAPRON, M., BAZIN, H., CAPRON, A. (1981) Dipetalonema viteae infective larvae reach reproductive maturity in rats immunodepressed by prior exposure to Schistosoma mansoni or its products and in congenitally athymic rats. *Clin. Exp. Immunol.* 43:1.

HAREL-BELLAN, A., JOSKOWICZ, M., FRADELIZI, D., EISEN, H. (1983) Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:3466.

HERCEND, T., RITZ, J., SCHLOSSMANN, S.F., REINHERZ, E.L. (1981) Comparative expression of T9, T10 and Ia antigens on activated human T-cell subsets. *Hum. Immunol.* 3:247.

HESS, A.D., TUTSCHKA, P.J. (1980) Effects of cyclosporine A on human lymphocyte responses in vitro. I. CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. *J. Immunol.* 124:2601.

HESS, A.D. (1985) Effect of interleukin 2 on the immunosuppressive action of cyclosporine Transplantation, 39:62.

HESS, A.D., COLOMBANI, P.M., HUSSEIN ESA, A. (1986) Cyclosporine and the immune response: basic aspects. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 6:123.

HODES, R.J., HATHCOCK, K.S. (1976) In vitro generation of suppressor cell activity: suppression of in vitro induction of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 116:167.

HOFSTETTER, M., FASANO, M.B., OTTESEN, E.A. (1983) Modulation of the host response in human schistosomiasis. IV. Parasite antigen induces release of histamine that inhibits lymphocyte responsiveness in vitro. *J. Immunol.* 130:1376.

HOUBA, V., ALLISON, A.C. (1966) M-antiimmunoglobulins (rheumatoid factor-like globulins) and other gammaglobulins in relation to tropical parasitic infections. *Lancet* I, 848.

HUANG, K.Y., SCHULTZ, W.W., GORDON, F.B. (1968) Interferon induced by Plasmodium berghei. *Science* 162:123.

ISHIZAKA, K. (1984) Regulation of IgE synthesis. *Ann. Rev. Immunol.* 2:159.

IWATA, M., MUNOZ, J.J., ISHIZAKA, K. (1983) Modulation of the biological activities of IgE binding factor. IV. Identification of glycosylation-enhancing factor as a Kallikrein-like enzyme. *J. Immunol.* 131:1954.

JARRETT, E.E., ORR, T.S.C., RILEY, P. (1971) Inhibition of allergic reactions due to competition for mast cell sensitization sites by two reagins. *Clin. Exp. Immunol.* 9:585.

JARRETT, E.E., STEWART, D.C. (1972) Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. *Immunol.* 23:749.

JARRETT, E.E., STEWART, D.C. (1974) Effect of dose of antigen on primary and secondary reaginic antibody responses. *Immunology* 27:365.

- JARRETT, E.E., MACKENZIE, S., BENNICH, H. (1980) Parasite-induced nonspecific IgE does not protect against allergic reactions. *Nature* 283:302.
- JARRETT, E.E., MILLER, H.R.P. (1982) Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog. Allergy* 31:178.
- JAYAWARDENA, A.N., TARGETT, G.A.T., LEUCHARS, E., CARTER, R.L., DOENHOFF, M.J., DAVIES, A.J.S. (1975) T cell activation in murine malaria. *Nature* 258:149.
- JAYAWARDENA, A.N., WAKSMAN, B.H. (1977) Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. *Nature*, 265:539.
- JERUSALEM, C. (1968) Relationship between malaria infection (Plasmodium berghei) and malignant lymphoma in mice. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 19:94.
- JOHNSON, A.R., MORAN, N.C., MAYER, S.E. (1974) Cyclic AMP content and histamine release in mast cells. *J. Immunol.* 112:511.
- JONES, J.F., CRANDALL, A.C., CRANDALL, R.B. (1976) T-dependent suppression of the primary antibody responses to sheep erythrocytes in mice infected with Trichinella spiralis. *Cell. Immunol.* 27:102.
- JOSEPH, M., CAPRON, A., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. (1978) Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: induction by immune complexes containing IgE and Schistosoma antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 33:48.
- JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H., VIENS, P. (1983) A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810.
- JOSEPH, M., CAPRON, A., AMEISEN, J.C., CAPRON, M., VORNG, H., PANCRE, V., KUSNIERZ, J.P., AURIAULT, C. (1986) The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16:306.
- KAGAN, I.G. (1958) Contribution to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice Inst. Pamph.* 45:151.
- KALINER, M., AUSTEN, K.F. (1974) Cyclic AMP, ATP and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells. *J. Immunol.* 112:664.
- KAMAL, K.A., HIGASHI, G.I. (1982) Depression of in vivo and in vitro cell-mediated immunity in schistosomiasis patients with splenomegaly. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5(suppl.):34.
- KATZ, D.H. (1980) Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man. *Immunology* 41:1.
- KEMP, W., MERRIT, S.C., BOGUCKI, M.S., ROSIER, J.G. (1977) Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of Schistosoma mansoni. *J. Immunol.* 119:5.
- KETTMAN J.R. (1978) Modulation of the acquisition and expression of immunity by tilorone. I. Delayed-type hypersensitivity responses. *Immunopharmacology* 1:21.
- KHALIFE, J., CAPRON, M., CAPRON, A., GRZYCH, J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W., OUMA, J.H. (1986) Immunity in human schistosomiasis. Regulation

of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. J. Exp. Med. 164:1626.

KLOETZEL, K., FALEIROS, J.J., MENDES, S.R., STANLEY, C.T., ARIAS, H.S. (1973) Concomitant infection of albino mice by Trypanosoma cruzi and Schistosoma mansoni: parasitological parameters. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 67:652.

KOPONEN, M., LOOR, F. (1983) Cyclosporin-binding sites of murine sensitive and resistant cell lines. Ann. Immunol. 134D:207.

KOREN, H.S., HANDWERSER, B.S., WUNDERLICH, J.R. (1975) Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. J. Immunol. 114:894.

KRETTLI, A.U., NUSSENWEIG, R. (1974) Depletion of T and B lymphocytes during malarial infection. Cell. Immunol. 13:440.

KRISTENSEN, F., WALKER, C., BETTENS, F., JONCOURT, F., DE WECK, A. (1983) Assessment of IL-1 and IL-2 effects on cycling and non cycling murine thymocytes. Cell. Immunol. 74:140.

KUNKEL, A., KLAUS, G.G.B. (1980) Selective effects of cyclosporin A on functionnal subsets in the mouse. J. Immunol. 125:2526.

KUPFER, A., DENNERT, G. (1984) Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. J. Immunol. 133:2762.

LAGUNOFF, D., CHI, E.Y. (1976) Effect of colchicine on rat mast cells. J. Cell. Biol. 71:182.

LARSSON, E.L., COUTINHO, A., MARTINEZ, C.A. (1980) A suggested mechanism for T lymphocyte activation, implications on the acquisition of functionnal reactivities. Immunol. Rev. 51:61.

LEE, J.C., HAPPEL, A.J., IHLE, J.N. (1982) Constitutive production of a unique lymphokine (IL-3) by the WEHI-3 cell line. J. Immunol. 126:2393.

LEONARD, W.J., DEPPER, J.M., UCHIYAMA, T., SMITH, K.A., WALDMANN, T.A., GREEN, W.C. (1982) A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T cell growth factor: partial characterization of the receptor. Nature 300:267.

LEVINE, B.B. (1971) Genetic factors in reagin production in mice. In Biochemistry of acute allergic reactions. ed. K.F. Austen, E.L. Becker, p 1.

LIEW, F.Y., DHALIWAL, S.S., TEH, K.L. (1979) Dissociative effects of malarial infection on humoral and cell-mediated immunity in mice. Immunology 37:35.

LIMA, M.S., GAZZINELLI, G., NASCIMENTO, E., CARVALHO PARRA, J., MONTESANO, M.A., COLLEY, D.G. (1986) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. Evidence for antiidiotypic T lymphocyte responsiveness. J. Clin. Invest. 78:983.

LONGSTAFFE, J.A. (1974) Immunodepression in trypanosomiasis: attempts to characterize the response of thymus dependent lymphocytes in infected guinea pigs. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 68:150.

- LOOSE, L.D., COOK, J.A., DI LUZIO, N.R. (1972) Malarian immunosuppression-a macrophage mediated defect. *Proc. Helminthol. Soc Washington*, 39:484.
- LOUIES, S., DAOUST, P.R., SCHWARTZ, R.S. (1980) Immunodeficiency and the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin. Oncol.* 7:267.
- LYNCH, S.M., AUSTEN, K.F., WASSERMAN, S.I. (1978) Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by non-cytolytic secretory stimuli. *J. Immunol.* 121:1394.
- MAC CULLOUGH, F.S., 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.
- MAC GREGOR, I.A., BARR, M. (1962) Antibody response to tetanus toxoid inoculation in malarious and non malarious Gambian children. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56:364.
- MACHADO, A.J., GAZZINELLI, G., PELLEGRINO, J., DIAS DA SILVA, W. (1975) Schistosoma mansoni: the role of the complement C3 activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp. Parasitol.* 38:20.
- McINTOSH, K.R., SEGRE, M., SEGRE, D. (1982) Characterization of cyclophosphamide-induced suppressor cells. *Immunopharmacol.* 4:279.
- MADDISON, S.E., NORMAN, L., GEIGER, S.J., 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.
- MAHMOUD, A.A.F., PETERS, P.A.S., CIVIL, R.H., REMINGTON, J.S. (1979) In vitro killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by BCG and C. parvum-activated macrophages. *J. Immunol.* 122:1655.
- MANSFIELD, J.M., CRAIG, S.A., STELTZER, G.T. (1976) Lymphocyte function in experimental african trypanosomiasis: mitogenic effects of trypanosome extracts in vitro. *Inf. Immun.* 14:976.
- MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P., CAPRON, A. (1978) ³H-serotonin release: an improved method to measure mast cell degranulation. *J. Immunol. Meth.* 21:65.
- MAZINGUE, C., CAMUS, D., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., CAPRON, A. (1980) In vitro and in vivo inhibition of mast cell degranulation by a factor from Schistosoma mansoni. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 63:178.
- MAZINGUE, C., CARRIERE, V., DESSAINT, J.P., DETOEUF, F., TURZ, T., AURIAULT, C., CAPRON, A. (1987) Regulation of IgE synthesis by macrophages expressing FcE-receptors: role of interleukin 1. *Clin. Exp. Immunol.* 67:587.
- MELCHERS, F., LERNHARDT, W. (1985) Three restriction points in the cell cycle of activated murine B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7681.
- MENDEN, P., FARR, R.S. (1973) In Weir, Handbook of experimental immunology (Blackwell Scientific, Oxford 1973).
- MIESCHER, P.A., BERIS, P. (1984) Immunosuppressive therapy in the treatment of autoimmune diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* 7:69.

MILTON, J.D., CARPENTER, C.B., ADDISON, I.E. (1976) Depressed T-cell reactivity and suppressor activity of lymphoid cells from cyclophosphamide-treated mice. *Cell. Immunol.* 24:308.

MIYAWAKI, T., YACHIE, A., OHZEKI, S., NAGAOKI, T., TANIGUCHI, N. (1983) Cyclosporin A does not prevent expression of TAC antigen, a probable TCGF receptor molecule on mitogen stimulated human T cells. *J. Immunol.* 130:2737.

MOLLER, G. (1970) Induction of DNA synthesis in human lymphocytes: interaction between non specific mitogens and antigens. *Immunol.* 19:583.

MOORE, D.L., GROVE, D.I., WARREN, K.S. (1976) The Schistosoma mansoni egg granuloma: quantitation of cell populations. *J. Path.* 121:41.

MOSES, H.L., PROPER, J.A., VOLKENANT, M.E., SWARTZENDRUBER, D.E. (1980) Growth arrest of AKR-2B cells maintained in the presence of epidermal growth factor or 12,12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: evidence for two separate G1 arresting points. *J. Cell. Phys.* 102:367.

MOTA-SANTOS, T.A., GAZZINELLI, G., RAMALHO-PINTO, F.J., PELLEGRINO, J., DIAS da SILVA, W. (1976) Immunodepression in mice following Schistosoma mansoni infection. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 18:246.

MOTA-SANTOS, T.A., TAVARES, C.A.P., GAZZINELLI, G., PELLEGRINO, J. (1977) Immunosuppression mediated by adult worms in chronic schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:727.

MUHLRADT, P.F., TSAI, H., CONRADT, P. (1986) Effects of pyocyanine, a blue pigment from Pseudomonas aeruginosa, on separate steps of T cell activation: interleukin 2 (IL-2) production, IL-2 receptor formation, proliferation and induction of cytolytic activity. *Eur. J. Immunol.* 16:434.

MURRAY, P.K., URQUHART, G.M., MURRAY, M., JENNINGS, F.W. (1973) The response of mice infected with T. brucei to the administration of sheep erythrocytes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67:267.

MURRAY, M. (1974) The pathology of african trypanosomiasis. In *Progress in Immunol.* II (Ed.) Brent, L. & Holborow, J. 4:181.

NASH, T.E., CHEEVER, A.W. (1977) Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:134.

NASH, T.E., OTTESEN, E.A., CHEEVER, A.W. (1978) Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. II. Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:944.

NYDEGGER, U.E. (1985) Suppressive and substitutive immunotherapy: an essay with a review of recent literature. *Immunol. Letts* 9:185.

OCCHINO, J.C., GLASGOW, A.H., COOPERBAND, S.R., MANNICK, J.A., SCHMID, K. (1973) Isolation of an immunosuppressive substance peptide fraction from human plasma. *J. Immunol.* 110:685.

OGILVIE, B.M., SMITHERS, S.R., TERRY, R.J. (1966) Reagin-like antibodies in experimental infections of Schistosoma mansoni and the passive transfer of resistance. *Nature* 209:1221.

ORR, T.S.C., BLAIR, A.M.J.N. (1969) Potentiated reagin response to egg-albumin and conalbumin in Nippostrongylus brasiliensis infected rats. Life Sci. 8:1073.

OTTESEN, E.A., STANLEY, A.M., GELFAND, J.A., GADEK, J.E., FRANK, M.M., PELLEY, R.P., RUFFIER, J.J., WARREN, K.S. (1976) Suppressive effect of a chronic helminth infection on the in vitro responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens phyto-haemagglutinin and concanavalin A. Inf. Immunity 13:1176.

OTTESEN, E.A., STANLEY, A.M., GELFAND, J.A., GADEK, J.E., FRANK, M.M., NASH, T.E., CHEEVER, A.W. (1977) Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:134.

OTTESEN, E.A., HIATT, R.A., CHEEVER, A.W., SOTOMAYOR, Z.R., NEVA, F.A. (1978) The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. Clin. Exp. Immunol. 33:38.

OTTESEN, E.A. (1979) Modulation of the host response in human schistosomiasis. I. Adherent suppressor cells that inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. J. Immunol. 123:1639.

OTTESEN, E.A., POINDEXTER, R.W. (1980) Modulation of the host response in human schistosomiasis. II. Humoral factors which inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:592.

OTTESEN, E.A., KUMARASWAMI, V., PARANJAPE, R., POINDEXTER, R.W., TRIPATHY, S.P. (1981) Naturally occurring blocking antibodies modulate immediate hypersensitivity responses in human filariasis. J. Immunol. 127:2014.

OUASSI, M.A., SANTORO, F., CAPRON, A. (1980) Interaction between Schistosoma mansoni and the complement system: receptors for C3b on cercariae and schistosomes. Immunol. Lett. 1:197.

OUASSI, M.A., AURIAULT, C., SANTORO, F., CAPRON, A. (1981) Interaction between Schistosoma mansoni and the complement system: role of IgG peptides in the activation of the classical pathway by schistosomes. J. Immunol. 127:1556.

OUASSI, M.A., DESSAINT, J.P., CORNETTE, J., DESMOUTIS, I., CAPRON, A. (1983) Induction of non-specific human suppressor cells in vitro by defined Onchocerca volvulus antigens. Clin. Exp. Immunol. 53:634.

OVARY, Z. (1958) Immediate reactions of the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interaction. Prog. Allergy 5:459.

PADAWER, J., GORDON, A.S. (1955) Effects of colchicine on mast cells of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88:522.

PANCRE, V., AURIAULT, C., JOSEPH, M., CESBRON, J.Y., KUSNIERZ, J.P., CAPRON, A. (1986) A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. J. Immunol. 137:585.

PANCRE, V., JOSEPH, M., MAZINGUE, C., WIETZERBIN, J., CAPRON, A., AURIAULT, C. (1987) Induction of platelet cytotoxicity functions by lymphokines: role of gamma interferon. J. Immunol., in press.

- PATSCHEKE, H. (1981) Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10:14.
- PELLEY, R.P., RUFFIER, J.J., WARREN, K.S. (1976) Suppressive effect of a chronic helminth infection on the in vitro responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens phytohaemagglutinin and concanavalin A. *Inf. Immunity* 13:1176.
- PHILLIPS, S.M., BENTLEY, A.G., LINETTE, G., DOUGHTY, B.L., CAPRON, M. (1983) The immunologic response of congenitally athymic rats to Schistosoma mansoni infection. I. In vivo studies of resistance. *J. Immunol.* 131:1466.
- PLAYFAIR, J.H.L. (1980) Vaccines against malaria. In: Vaccines against parasites (ed. A.E.R. Taylor & R. Muller). Symposia of the British Society for Parasitology, Blackwells, Oxford. 18:1.
- PODACK, E.R. (1985) The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunology Today* 6:21.
- RAMALHO-PINTO, F.J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A., PELLEGRINO, J. (1974) Schistosoma mansoni: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula in vitro. *Exp. Parasitol.* 36: 360.
- RAMALHO-PINTO, F.J., DE SOUZA, J.B., PLAYFAIR, J.H.L. (1976) Stimulation and suppression of response of mouse T cells to the schistosomules of Schistosoma mansoni during infection. *Nature* 259:603.
- RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J., SMITHERS, S.R. (1978) Complement-mediated killing of schistosomula of Schistosoma mansoni by rat eosinophil in vitro. *J. Exp. Med.* 147:147.
- RAMOS, C.I., LAMOYI, E., FEOLI, M., RODRIGUEZ, M., PEREZ, M., ORTIZ-ORTIZ, L. (1978) Trypanosoma cruzi: immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45:194.
- RAMOS, C., SCHADTLER-SIWON, I., ORTIZ-ORTIZ, L. (1979) Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi infected mice. *J. Immunol.* 122:1243.
- REED, S.G., LARSON, C.L., SPEER, C.A. (1977) Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenkd.* 52:11.
- REED, S.G., INVERSO, J.A., ROTERS, S.B. (1984) Heterologous antibody responses in mice with chronic T. cruzi infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J. Immunol.*, 133:1558.
- ROBB, R.J., MUNCK, A., SMITH, K.A. (1981) T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154:1455.
- ROCKLIN, R.E., GREINER, D.K., MELMON, K.L. (1979) Histamine induced suppressor factor (HSF): further studies on the nature of the stimulus and the cell which produces it. *Cell. Immunol.* 44:404.
- ROCKLIN, R.E., BROWN, A.P., WARREN, K.S., PELLEY, R.P., HOUBA, V., SIONGOK, T.K.A., OUMA, J., STURROCK, R.F., BUTTERWORTH, A.E. (1980) Factors that modify the cellular-immune response in patients infected by Schistosoma mansoni. *J. Immunol.* 125:1916.

ROCKLIN, R.E., TRACY, J.W., EL KHOLY, A. (1981) Activation of antigen-specific suppressor cells in human schistosomiasis mansoni by fractions of soluble egg antigens nonadherent to Con A sepharose. J. Immunol. 127:2314.

ROTH, J.A., GRIMM, E.A., GUPTA, R.K., AMES, R.S. (1982) Immunoregulatory factors derived from human tumors. I. Immunological and biochemical characterization of factors that suppress lymphocyte proliferative and cytotoxic responses in vitro. J. Immunol. 128:1955.

ROUSSEAU-PREVOST, R., CAPRON, M., BAZIN, H., CAPRON, A. (1978) IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against Schistosoma mansoni: a follow-up study of two strains of infected rats. Immunology 35:33.

ROUSSEAU, R., BOUT, D., BAZIN, H., CAPRON, A. (1980) Homocytotropic antibody responses during murine schistosomiasis. A follow-up study of both total immunoglobulins and Schistosoma mansoni specific antibodies. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 62:86.

ROUSSEAU-PREVOST, R., DESSAINT, J.P., CAPRON, A. (1982) Potentiated reagin response to ovalbumin in Schistosoma mansoni infected rats and in rats treated with a soluble metabolic product from adult worms. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 67:187.

ROWLAND, E.C., KUHN, R.E. (1978) Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. Inf. Immun. 20:393.

ROZENGURT, E. (1986) Early signals in the mitogenic response. Science 234:161.

RYTEL, M.W., MARSDEN, P.D. (1970) Induction of an interferon-like inhibitor by Trypanosoma cruzi infection in mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:929.

SADUN, E.H., GORE, T. (1970) Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium: homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. Expl. Parasit. 28:435.

SALAMAN, M.H., WEDDERBURN, N., BRUCE CHWATT, L.J. (1969) The immunodepressive effect of plasmodium and its interactions with murine oncogenic viruses. J. Gen. Microbiol. 59:383.

SANTORO, F., LACHMANN, P.J., CAPRON, A., CAPRON, M. (1979) Activation of the complement by Schistosoma mansoni schistosomula: Killing of parasites by the alternative pathway and requirement for classical pathway activation. J. Immunol. 123:1551.

SANTORO, F., OUASSI, M.A., PESTEL, J., CAPRON, A. (1980) Interaction between Schistosoma mansoni and the complement system: binding of C1q to schistosomula. J. Immunol. 124:2886.

SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., PESCE, U.J., GONZALES-CAPPA, S.M. (1977) The effect of acute infection by Trypanosoma cruzi upon the response of mice to sheep erythrocytes. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 19:323.

SCHWARTZ, A., SUTTON, S.L., MIDDLETON, J.E. (1982) Quercitin inhibition of induction and function of cytotoxic T lymphocytes. Immunopharmacology 4:125.

SEHALY, R.P., MAC DONALD, H.R., SAECH, P., GLASEBROOK, A.L., CEROTTINI, J.C. (1981) Cytolytic lymphocyte function is independent of growth phase and position in the mitotic cycle. *J. Exp. Med.* 154:575.

SENGERS, R.C.A., JERUSALEM, C.R., DOESBURG, W.H. (1971) Murine malaria. IV. Disturbed immunological responsiveness during Plasmodium berghei infection. *Exp. Parasitol.* 30:41.

SHAND, F.L. (1979) The immunopharmacology of cyclophosphamide. *Int. J. Immunopharmac.* 1:165.

SHER, A., SMITHERS, S.R., MCKENZIE, P. (1975) Passive transfer of acquired resistance to Schistosoma mansoni in laboratory mice. *Parasitology* 70:325.

SHER, A., HALL, B.F., VADAS, M.A. (1978) Acquisition of murine major histocompatibility gene products by schistosomula of Schistosoma mansoni. *J. Exp. Med.* 148:46.

SHERIDAN, J.F., BECK, M., SMITH, C.C., AURELIAN, L. (1987) Reactivation of herpes simplex virus is associated with production of a low molecular weight factor that inhibits lymphokine activity in vitro. *J. Immunol.* 138:1234.

SHEVACH, E.M. (1985) The effects of cyclosporin A on the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 3:397.

SMITHERS, S.R., TERRY, R.J. (1969) Resistance to experimental infection with Schistosoma mansoni in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61:517.

SPIRA, D.T., GOLENSER, J., GERY, I. (1976) The reactivity of spleen cells from malarious rats to non specific mitogens. *Clin. Exp. Immunol.* 24:139.

SOBOTKA, A.K., DEMBO, M., GOLDSTEIN, B., LICHSTENSTEIN, L.M. (1979) Antigen-specific desensitization of human basophils. *J. Immunol.* 122:511.

STADLER, B.M., KRISTENSEN, F., DE WECK, A.L. (1980) Thymocyte activation by cytokines: direct assessment of G0-G1 transition by flow cytometry. *Cell. Immunol.* 55:436.

STADLER, B.M., DOUGHERTY, J.J., FARRAR, J.J., OPPENHEIM, J.J. (1981) Relationship of cell cycle to recovery of IL-2 activity from human mononuclear cells, human and mouse T cell lines. *J. Immunol.* 127:1936.

STADLER, B.M., OPPENHEIM, J.J. (1982) Human interleukin-2: biological studies using purified IL-2 and monoclonal anti-IL-2 antibodies. *Lymphokines* 6:117.

ST CHARLES, M.H., FRANK, D., TANNER, C.E. (1981) The depressed response of spleen cells from rats infected by Trypanosoma lewisi in producing a secondary response in vitro to sheep erythrocytes and the ability of soluble products of the trypanosome to induce this depression. *Immunology* 43:441.

STROMBERG, B.E. (1980) Potentiation of the reaginic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from Ascaris suum. *J. Immunol.* 125:833.

SVET-MOLDAVSKY, G.J., SHAGHIJAN, H.S., CHERNYAKHOVSKAYA, I.Y., MKEIDZE, D.M., LITOVCHENKO, T.A., OZERETSKOSKAYA, N.N., KADAGHIDZE, Z.G. (1970) Inhibition of skin allograft rejection in trichinella infected mice. Transplantation, 9:69.

TANIGUCHI, M., TADA, T. (1971) Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. IV. Effects of various immunosuppressive drugs. J. Immunol. 107:579.

TEH, H.S., TEH, S.J. (1980) Direct evidence for a two-signal mechanism of cytotoxic T lymphocyte activation. Nature 285:163.

TERRY, R., HUDSON, K. (1982) Immunodepression in parasitic infections. Fortschritte der Zoologie, 27:125.

TODD, C.W., GOODGAME, R.W., COLLEY, D.C. (1979) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. V. Suppression of schistosome antigen-specific lymphocyte blastogenesis by adherent/phagocytic cells. J. Immunol. 122:1440.

TOMEI, L.D., CHENEY, J.C., WENNER, C.E. (1981) The effect of phorbol esters on the proliferation of C3H-10T1/2 mouse fibroblasts: consideration of both stimulatory and inhibitory effects. J. Cell. Physiol. 107:385.

TORPIER, G., CAPRON, A., OUASSI, M.A. (1979) Receptor for IgG (Fc) and human β_2 microglobulin on S. mansoni schistosomula surface. Nature 278:447.

VADAS, M.A., BUTTERWORTH, A.E., BURAKOFF, S., SHER, A. (1979) Major histocompatibility complex product restricts the adherence of cytolytic T lymphocytes to minor histocompatibility antigens or to trinitrophenyl determinant on schistosomula of Schistosoma mansoni. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1982.

VERWAERDE, C., AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., NEYRINCK, J.L., VENDEVILLE, C., CAPRON, A. (1986) Role of serine proteases of Schistosoma mansoni in the regulation of IgE synthesis. Scan. J. Immunol. 24:509.

VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R.J., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C., CAPRON, A. (1987) Functionnal properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for Schistosoma mansoni. J. Immunol., in press.

VIERA L.Q., GAZZINELLI, G., KUSEL, J.R., DE SOUZA, C.P.S., COLLEY, D.G. (1986) Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative responses by released materials from Schistosoma mansoni cercariae. Parasit. Immunol. 8:333.

VON LICHTENBERG, F. (1962) Host response to eggs of Schistosoma mansoni. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. Am. J. Path. 41:711.

WANG, Z., ROZENGURT, E. (1983) Interplay of cyclic AMP and microtubules in modulating the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. J. Cell Biol. 96:1743.

WARREN, K.S., DOMINGUO, E.O., COWAN, R.B.T. (1967) Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am. J. Path. 51:735.

WARREN, H.S., WEIDANZ, W.P. (1976) Malaria immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. Eur. J. Immunol. 6:816.

WATANABE, N., KOJIMA, S., OVARY, Z. (1976) Suppression of IgE antibody production in SJL mice. I. Non specific suppressor T cells. J. Exp. Med. 143:833.

WEDDERBURN, N. (1970) Effect of concurrent malarial infection on development of virus-induced lymphoma in Balb/c mice. *Lancet* II:1114.

WEINSTOCK, J.V., CHENSUE, S.W., BOROS, D.L. (1983) Modulation of granulomatous hypersensitivity. V. Participation of histamine receptor positive and negative lymphocytes in the granulomatous response of Schistosoma mansoni infected mice. *J. Immunol.* 130:423.

WIDE, L., BENNICH, H., JOHANSSON, S.G.O. (1967) Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* ii:1105.

WIESINGER, D., BOREL, J.F. (1979) Studies on the mechanism of action of cyclosporin A. *Immunobiology* 156:454.

WILKINS, H.A., BROWN, J. (1977) Schistosoma haematobium in a gambian community. II. Impaired cell-mediated immunity and other immunological abnormalities. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 71:59.

WILLIAMSON, W.A., GREENWOOD, B.M. (1978) Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet* i:1328.

WRIGHT, E.P., GUTHRIE, C.D., SALIM, D., HILDITCH, T.J.O., DAS, P.K. (1982) Inhibition of lymphocyte activation by hatching fluid from Schistosoma mansoni eggs. *Infect. Immun.* 36:419.

WYLER, D.J. (1979) Cellular aspects of immunoregulation in malaria. *Bull. W. H.O.*, 57:239.

YANELLI, J.R., SULLIVAN, J.A., MANDELL, G.L., ENGELHARD, V.H. (1986) Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J. Immunol.* 136, 377.

YOELI, M. (1956) Some aspects of concomitant infections of plasmodia and schistosomes. I. The effect of Schistosoma mansoni on the course of infection of Plasmodium berghei in the field vole (*Microtus guentheri*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5:988.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	6
RESUME	8
INTRODUCTION	11
1. <u>CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'INFECTION</u>	14
2. <u>MECANISMES DE L'IMMUNITE.</u>	15
2.1. Caractéristiques de l'immunité	15
2.2. Les mécanismes effecteurs spécifiques	18
2.3. L'immunité non spécifique	22
3. <u>MECANISMES DE DEFENSE DU PARASITE</u>	23
3.1. Acquisition d'antigènes d'hôte	24
3.2. Présence de récepteurs ou d'accepteurs à la surface des schistosomules	25
3.3. Role du complément	26
3.4. Régulation de la fonction des mastocytes	26
3.5. Régulation de la fonction des éosinophiles	28
3.6. Régulation de la fonction des plaquettes	29
4. <u>ETABLISSEMENT DE L'IMMUNOSUPPRESSION</u>	30
4.1. Caractéristiques de l'immunosuppression	31
4.1.1. Immunosuppression associée aux infections par Plasmodium .	31
4.1.2. Immunosuppression associée aux infections par trypanosomes	31

4.1.3. Immunosuppression au cours des trichinoses	32
4.1.4. Immunosuppression au cours de la schistosomiase	32
4.2. Les mécanismes de l'immunosuppression	35
4.2.1. Compétition antigénique	35
4.2.2. Stimulation de cellules suppressives non spécifiques	36
4.2.3. Activation polyclonale des lymphocytes B	38
4.2.4. Modulation de la réponse immunitaire par des facteurs d'origine parasitaire	39
4.3. Conséquences de l'immunosuppression	41
4.4. Le SDIF	41
RESULTATS	43
1. <u>INDUCTION D'UNE IMMUNOSUPPRESSION IN VIVO</u>	44
1.1. Réponse lymphocytaire après traitement in vivo par le SDIF . . .	44
1.1.1. Effet du SDIF sur la prolifération induite par la ConA . .	44
1.1.2. Effet du SDIF sur la réponse spécifique vis-à-vis de S. mansoni	45
1.1.3. Existence d'une population suppressive après traitement par le SDIF	46
1.2. Effet du SDIF sur une réaction d'hypersensibilité retardée . . .	49
1.3. Discussion	51

2. <u>PURIFICATION DU SDIF</u>	55
2.1. Travaux réalisés à l'Institut d'Immunologie clinique de Berne . .	55
2.1.1. Chromatographie de gel filtration	56
2.1.2. CLHP en phase réverse	56
2.1.3. Discussion	59
2.2. Travaux réalisés par la firme Rhône -Poulenc	60
3. <u>APPROCHE DU MECANISME D'ACTION DU SDIF</u>	64
3.1. Etude de la spécificité de la cible	64
3.2. Absorption du SDIF par les cellules	67
3.3. Effet du SDIF sur le cycle cellulaire des lymphocytes T	71
3.3.1. Cinétique de l'inhibition de la prolifération par le SDIF	72
3.3.2. Effet du SDIF sur des événements associés au cycle cellulaire	74
3.3.3. Recherche d'un point d'arrêt dans le cycle cellulaire . .	84
3.4. Discussion	84
4. <u>EFFET DU SDIF SUR CERTAINES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES T</u> .	89
4.1. Effet du SDIF sur les CTL	89
4.1.1. Effet du SDIF sur la génération des CTL	89
4.1.2. Effet du SDIF sur la génération de cellules suppressives non spécifiques	92
4.1.3. Effet du SDIF sur l'expression de la cytotoxicité des CTL	95
4.1.4. Discussion	96

4.2. Effet du SDIF sur la survie de souris porteuses d'un lymphome T .	98
4.2.1. Résultats	98
4.2.2. Discussion	99
4.3. Effet du SDIF sur la production d'anticorps.	100
4.3.1. Effet du SDIF sur une réponse IgE primaire	100
4.3.2. Effet du SDIF sur la réponse anticorps IgG	103
4.3.3. Effet du SDIF sur une réponse IgE secondaire	104
4.3.4. Discussion	106
5. <u>EFFET DU SDIF SUR LES FONCTIONS EFFECTRICES D'AUTRES</u>	
<u>CELLULES</u>	109
5.1. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes	109
5.1.1. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes in vitro	109
5.1.2. Effet du SDIF sur la dégranulation des mastocytes in vivo	111
5.1.3. Effet du SDIF sur le choc anaphylactique	116
5.1.4. Effet du SDIF sur les réactions anaphylactiques cutanées .	116
chez le singe	
5.1.5. Inhibition d'un mécanisme de cytotoxicité dépendant . . .	117
d'éosinophiles et de mastocytes	
5.2. Effet du SDIF sur l'activation plaquettaire	119
5.3. Discussion	122
DISCUSSION ET CONCLUSION	125

MATERIEL ET METHODES	140
1. <u>MATERIEL D'ORIGINE PARASITAIRE</u>	141
1.1. Le cycle parasitaire	141
1.2. Préparation de l'incubat de vers adultes	141
1.3. Préparation des schistosomules	141
1.4. Préparation de l'incubat de schistosomules	141
1.5. Préparation des antigènes parasitaires	142
2. <u>PURIFICATION DU SDIF</u>	142
3. <u>ANIMAUX</u>	142
4. <u>CULTURES CELLULAIRES IN VITRO</u>	143
4.1. Milieux de culture	143
4.2. Préparation des lymphocytes	143
4.3. Lignées cellulaires	144
4.4. Tests de prolifération	144
4.5. Production d'interleukine 2 dans les surnageants	145
4.6. Dosage biologique de l'activité IL-2	145
4.7. Analyse des récepteurs pour l'IL-2 et pour la transferrine	145
4.8. Cultures lymphocytaires mixtes	146
4.9. Préparation de cellules T "helper"	146
4.10. Obtention de cellules suppressives non spécifiques	147
4.11. Cellules cibles des tests de cytotoxicité	147
4.12. Tests de cytotoxicité	147
4.13. Etude du cycle cellulaire au cytofluorographe	148
4.14. Absorption du SDIF sur les cellules	148
4.15. Technique d'élutriation	149

5. <u>REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE IMMEDIATE</u>	150
6. <u>PROLIFERATION DE LYMPHOMES T IN VIVO</u>	150
7. <u>ETUDE DE LA REPONSE IgE</u>	150
7.1. Préparation de l'ovalbumine dinitrophénylée (DNP-OVA)	150
7.2. Immunisations	151
7.3. Dosage des anticorps IgE anti-DNP	151
7.4. Mesure des taux d'anticorps anti-DNP	152
7.5. Traitements statistiques	153
8. <u>ETUDE DE LA DEGRANULATION MASTOCYTAIRE</u>	153
8.1. Obtention de sérums riches en IgE	153
8.2. Réactions d'anaphylaxie cutanée passive	153
8.3. Réactions d'anaphylaxie cutanée active	154
8.4. Réactions cutanées induites par des agents chimiques	154
8.5. Effet du SDIF sur les réactions cutanées	154
8.6. Dégranulation mastocytaire in vitro	154
8.7. Test de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles	155
8.8. Choc anaphylactique du cobaye	156
8.9. Réactions anaphylactiques cutanées chez le singe	156
9. <u>MESURE DE LA CYTOTOXICITE PLAQUETTAIRE</u>	157
9.1. Isolement des plaquettes	157
9.2. Test de cytotoxicité	157
REFERENCES PERSONNELLES	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161