

50376
1987
299

50376
1987
299

N° d'ordre 154

Université des Sciences et Techniques Flandres-Artois

THESE DE DOCTORAT

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de docteur en Biochimie
par
Jean-Marc BALLOUL



**Identification, analyse biochimique, et clonage
moléculaire d'un antigène protecteur de
*Schistosoma mansoni***

présentée le 02 octobre 1987 devant la commission d'examen

Président	J. Montreuil
Rapporteurs	P. Kourilsky J.P. Lecocq G. Spik
Membre	A. Capron

A cet instant subtil où l'homme se retourne sur sa vie, Sisyphe, revenant vers son rocher, contemple cette suite d'actions sans lien qui devient son destin, créé par lui, uni sous le regard de sa mémoire et bientôt scellé par sa mort. Ainsi, persuadé de l'origine tout humaine de tout ce qui est humain, aveugle qui désire voir et sait que la nuit n'a pas de fin, il est toujours en marche. Le rocher roule encore. Je laisse Sisyphe au bas de la montagne! On retrouve toujours son fardeau. Mais Sisyphe enseigne la fidélité supérieure qui nie les dieux et soulève les rochers. Lui aussi juge que tout est bien. Cet univers désormais sans maître ne lui paraît ni stérile ni futile. Chacun des grains de cette pierre, chaque éclat minéral de cette montagne pleine de nuit, à lui seul forme un monde. La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un cœur d'homme. Il faut imaginer Sisyphe heureux.

Albert Camus, Le mythe de Sisyphe.

L'ensemble de ce travail a été réalisé :

au laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de

l'Institut Pasteur de Lille (INSERM U167 - CNRS 624)

1, rue du Pr. Calmette 59019

Lille Cédex

sous la direction de Mr Le Professeur André Capron

ainsi qu'au laboratoire de Biologie Moléculaire de la

Société Transgène 11, rue de Molsheim 67082

Strasbourg Cédex

sous la direction de Mr Jean-Pierre Lecocq

Nous remercions très sincèrement :

Monsieur Le Professeur A. Capron qui nous a accueilli
dans son laboratoire et qui a dirigé l'ensemble des
travaux présentés dans ce mémoire

Que les membres du Jury, soient assurés de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire

Nous exprimons notre reconnaissance à

J-M. GRZYCH, qui nous a apporté l'assistance dont nous avons besoin pour établir l'activité biologique des molécules que nous avons isolées, et qui nous a honoré de son amitié

R.J. PIERCE, M. JOSEPH, M. CAPRON pour leur précieuse collaboration scientifique

C.DISSOUS qui nous a apporté la formation scientifique sans laquelle ce travail n'aurait pu voir le jour

J. FONTAINE , J. TROLET, S. TORRES, et H. VORNG dont les compétences techniques furent un atout indispensable dans le bon développement de ce programme

Nous tenons à exprimer toute notre amitié

à P.SONDERMEYER, qui a réalisé le clonage des antigènes cibles de tous nos efforts ; ainsi qu'à l'ensemble des membres des laboratoires TRANSGENE pour leur collaboration à la réalisation de ce travail

RESUME

RESUME

Le fractionnement d'un homogénat de vers adultes, nous a permis en 1985 d'identifier une fraction antigénique de Schistosoma mansoni, d'une masse moléculaire relative de 28000 daltons (P28). Après des expériences de vaccination sur rongeurs (rats, souris, et hamsters), nous avons pu montrer que deux des polypeptides, contenus dans cette fraction protéique, étaient capables d'induire la production d'anticorps de classe IgG2a.

Ces deux polypeptides ont été analysés par électrophorèse bi-dimensionnelle. De points isoélectriques très proches 6.3-6.5, ces polypeptides ont été identifiés parmi les produits de traduction in vitro d'ARN messager du ver adulte et de la larve infestante: le schistosomule. De masse moléculaire et de points isoélectriques identiques à ce que nous avons obtenu avec les produits de métabolisme du ver adulte, ces deux polypeptides semblaient ne pas subir de modifications post-traductionnelles, et se trouvaient ainsi être des candidats de choix en vue de leur expression dans les modèles bactériens.

La présence de ces deux polypeptides à la surface de la larve infestante, cible des mécanismes de défense de l'hôte vertébré, lors des phases précoces de l'infection, a été mise en évidence après marquage à l'iode 125 des structures membranaires du schistosomule.

Des expériences de vaccination directe avec la fraction P28 de vers adultes de Schistosoma mansoni ont montré que ce groupe d'antigènes induisait un niveau de protection, contre l'infection parasitaire, de l'ordre de 70+10%.

Enfin, étudiant la spécificité d'espèce de cette fraction antigénique, il est apparu qu'elle était présente chez les autres formes majeures de schistosomes, aussi bien de la schistosomiase humaine (Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum) que de la schistosomiase animale (Schistosoma bovis).

En étroite collaboration avec les laboratoires Transgène, l'ADN complémentaire de l'ARN messager codant pour deux antigènes de la fraction P28, a été isolé, séquencé et exprimé sous forme fusionnée à la portion N-terminale produit codé par un fragment du gène cII du phage lambda. (recombinants P28.I et P28.II).

Une homologie de séquence, partielle, avec la famille des glutathion-S-transférases, a été mise en évidence, analyse confirmée par des tests enzymatiques réalisés avec l'antigène P28.I produit dans E.Coli, montrant une activité enzymatique de type GSH-transférase.

La séquence de l'ADNc de l'antigène P28.II montre quant à elle de fortes homologies avec les enzymes à activité phosphoglycérmutase.

L'analyse, in vitro, de l'activité de la réponse humorale anti-P28.I, a permis de démontrer sa nature

cytotoxique en présence de cellules effectrices. Deux classes d'anticorps sont produites: IgG et IgE. Alors que, la réponse humorale est retournée à son niveau de base, l'infection par Schistosoma mansoni induit, dès la première semaine, une nouvelle production d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'antigène P28.I attestant de l'existence d'une mémoire cellulaire, potentialisatrice de la réponse humorale.

Les pourcentages de protection induits par l'antigène recombinant ont été de l'ordre de $65 \pm 5.5\%$ chez le rat Fischer, et de $50 \pm 4\%$ chez le hamster, l'un des hôtes les plus permissif à l'infection par S.mansoni.

Une expérience de vaccination impliquant 8 babouins femelles a été réalisée dans notre laboratoire. Trois de ces babouins ont été utilisés en tant que contrôle, et immunisés avec des extraits membranaires de E.Coli, les autres étant vaccinés avec deux doses de P28.I recombinant.

L'analyse, in vitro, de la réponse humorale chez les primates, a permis de mettre une nouvelle fois en évidence, le rôle prioritaire des anticorps de classe E dans l'activation des cellules effectrices, ici des éosinophiles humains.

Les pourcentages de protection obtenus ont varié de 45 à 82%. D'autre part, l'étude anatomopathologique, effectuée sur les foies de tous les primates, a révélé que tous les animaux vaccinés avec l'antigène P28, présentaient une forte réduction (de 55 à 86% par rapport aux animaux contrôles) du nombre d'oeufs présents dans le tissu hépatique et auquel

sont associées les principales manifestations pathologiques liées à cette parasitose.

L'activité de l'antigène P28.II n'a pour l'heure pas encore été complètement explorée. Des expériences de transfert passif de sérums anti-P28.II ont néanmoins permis d'obtenir une réduction de la charge parasitaire de l'ordre de 70% chez le rat Fischer.

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

In vitro synthesis of a 28 kDa antigen present on the surface of the schistosomulum of Schistosoma mansoni

J-M. BALLOUL , R.J. PIERCE , J-M. GRZYCH , A. CAPRON
Mol. Biochem. Parasitol. (1985) 17, 105-114

Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes

J-M. BALLOUL , P. SONDERMEYER , D. DREYER , M. CAPRON ,
J-M. GRZYCH , R.J. PIERCE , J.P. LECOCQ , A. CAPRON
Nature (1987) 326, 149-153

A purified 28 kDa protein from Schistosoma mansoni adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis

J-M. BALLOUL, J-M. GRZYCH, R.J. PIERCE, A. CAPRON
J. Immunol. (1987) 138, 3448-3453

Vaccination of baboons with a P28 antigen of S.mansoni expressed in E.Coli

J-M. BALLOUL, P. SONDERMEYER , D. DREYER , M. CAPRON, J-M GRZYCH, R.J. PIERCE, D. CARVALLO, J.P. LECOCQ, and A. CAPRON
Molecular paradigms for eradicating Helminthic Parasites.
Alan R.Liss, Inc. Scientific, Medical, and Scholarly Publications, N.Y. USA. (en cours de publication)

T cells induced by a purified 28 kDa antigen of Schistosoma mansoni protects rats against infection

C. AURIAULT, J-M. BALLOUL, R.J. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, P. SONDERMEYER, A. CAPRON
Infection and Immunity (1987) 55,1163-1169

Protective antigens of schistosomes

C. DISSOUS, J-M. BALLOUL, R.J. PIERCE, A. CAPRON
Baillièrè's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases 2, Août 1987.

Protective antigens in experimental schistosomiasis
A. CAPRON, R. PIERCE, J-M. BALLOUL, J-M. GRZYCH, C. DISSOUS,
P. SONDERMEYER, J-P LECOCQ
Acta Tropica (1987) 44, Suppl.12, 63-69

Translation of Schistosoma mansoni antigens in Xenopus
oocytes microinjected with mRNA from adult worms
R.J. PIERCE, C. AIMAR, J-M. BALLOUL, M. DELARUE, D. GRAUSZ,
C. VERWAERDE, A. CAPRON
Molecular and Biochemical Parasitology (1985) 15, 178-188

Communications orales lors de congrès

J-M. BALLOUL, R.J. PIERCE, J-M. GRZYCH, A. CAPRON
Identification and properties of a 28 kDa schistosomulum
surface antigen of Schistosoma mansoni
Spring Meeting of the British society for parasitology (1985)
(Aberyswith) session Immunology of schistosomes 4A

A. CAPRON, J-M. GRZYCH, J-M. BALLOUL, C. DISSOUS, M. CAPRON,
C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, C. VERWAERDE, R.J. PIERCE
Protective antigens in experimental schistosomiasis Meeting
on the "Molecular Biology of Schistosomes"
Boston (Massachussetts) 1-4 décembre 1985

A. CAPRON, J-M. GRZYCH, J-M. BALLOUL, C. DISSOUS, M. CAPRON,
C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, C. VERWAERDE, R.J. PIERCE
Protective antigens in experimental schistosomiasis
"The Immunology and Molecular Biology of schistosomiasis
Londres 10 juin 1985

A. CAPRON, J-M. GRZYCH, J-M. BALLOUL, C. DISSOUS, M. CAPRON,
C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, C. VERWAERDE, R.J. PIERCE
New trends in vaccine development against schistosomiasis VII
Internatinal Conference on "The global impacts of applied
microbiology" Helsinki 12-16 août 1985

A. CAPRON, J-M. GRZYCH, J-M. BALLOUL, C. DISSOUS, M.
CAPRON, C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, C. VERWAERDE, R.J.
PIERCE
Role of serine proteases of Schistosoma mansoni in regulation
of IgE synthesis
TDR Meeting on "Immunological Intervention in Human
Schistosomiasis" O.M.S. Genève 9-11 octobre 1986

J.P. DESSAINT, J-M. GRZYCH, J-M. BALLOUL, C. DISSOUS, R.J.
PIERCE, C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, J. KHALIFE, M. CAPRON,
A. CAPRON
Defined antigen vaccine for schistosomiasis
Research coordination meeting on the use of radiation and
radionucleides in the development of a defined antigen
vaccine against schistosomiasis . Agence Internationale de
l'Energie Atomique Brisbane Australia 25-28 août 1986

A. CAPRON, J-M. BALLOUL, R.J. PIERCE, J-M GRZYCH, C. DISSOUS
Molecular approaches towards vaccine against schistosomes
International symposium "Parasitology and tropical diseases :
Present frontiers and future trends" Hambourg 4-5 septembre
1986

Molecular cloning of a protective antigen against
schistosomiasis
J-M. BALLOUL, P. SONDERMEYER, M. CAPRON, J-M. GRZYCH, J.P.
LECOCQ, A. CAPRON
Proceeding of the 28th Dutch Federation Meeting. Nijmegen 22-
23 Avril 1987

Perspectives vaccinales dans la bilharziose
J-M BALLOUL, P. SONDERMEYER, J-M GRZYCH, J-A GRIMAUD, D.
BOULANGER, M. CAPRON, J-P. LECOCQ, A. CAPRON
Journées Scientifiques de l'AUPELF. Santé, agronomie, et
recherche francophone. Université Laval, Québec. 31 août-2
septembre 1987

Vaccinating activity of a recombinant Schistosoma mansoni
antigen
J-M BALLOUL, P. SONDERMEYER, J-M GRZYCH, J-A GRIMAUD, D.
BOULANGER, M. CAPRON, J-P LECOCQ, M-P. KIENY, A. CAPRON
Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of
AIDS. Cold Spring Harbor, New York. 9-13 septembre 1987

Brevets d'invention

Peptide présentant des propriétés antigéniques isolé de la protéine 28 kD de S.mansoni et son procédé d'isolement, anticorps monoclonaux reconnaissant au moins un épitope dudit peptide et applications de celui-ci dans l'induction de la synthèse d'anticorps neutralisants

J-M BALLOUL, R.J. PIERCE, J-M. GRZYCH et A. CAPRON

Brevet n°86.09.663 (Institut Pasteur Lille et Institut Pasteur)

Protéine, séquence d'ADN, poxvirus, cellules et leur procédé de culture, ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant, utiles dans la prévention de la schistosomiase

P. SONDERMEYER, J-M. BALLOUL, R.J. PIERCE, J-M. GRZYCH, M.P. KIENY, G. LOISON, A. CAPRON, J.P. LECOCQ

Brevet n°86.11.986 (Transgène)

TABLE DES MATIERES		page
INTRODUCTION		22
GENERALITES		26
<u>I. CYCLE BIOLOGIQUE DE SCHISTOSOMA MANSONI</u>		27
1. Description générale du cycle		
2. Description des stades du parasite en contact avec l'hôte .		
2.1 La cercaire		
2.2 Le schistosomule		
2.3 Le ver adulte		
2.4 L'oeuf		
<u>II. IMMUNITE A SCHISTOSOMA MANSONI</u>		33
1. Immunité naturelle dans les modèles animaux		
1.1 Le hamster		
1.2 La souris		
1.3 Le rat		
1.4 Le primate		
2. Immunité acquise dans les modèles animaux		
2.1 Résistance contre la population parasitaire adulte au cours d'une primo-infection		
2.2 Résistance aux stades larvaires consécutive à une primo-infection		
3. Mécanismes immuns		
3.1 Mécanismes effecteurs non spécifiques		
3.2 Mécanismes effecteurs spécifiques		
a.L'éosinophile		
b.La plaquette		
c.Le macrophage		
<u>III. LA SCHISTOSOMIASE HUMAINE</u>		45
1. Le contexte géographique		
2. Aspects cliniques		
3. Traitement		

IV. LES ANTIGENES DE SCHISTOSOMES CONNUS IMPLIQUES 49
DANS L'IMMUNITE

1. Antigène de surface de masse relative 38000 de S.mansoni
2. Antigènes de masse relative 22-26000 de S.mansoni
3. Antigène de 97000 Da de S.mansoni
4. Antigène de 200000 Da
5. Antigènes de 53-155000 Da

EXPOSES DES TRAVAUX 55

I. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU STADE ADULTE DE 55
SCHISTOSOMA MANSONI

II. IMMUNISATION DE RATS FISCHER AVEC DES FRACTIONS 60
PROTEIQUES DE VERS ADULTES

1. Identification de fractions protéiques immunogènes
2. Etude de l'activité anti-schistosome des sérums dirigés contre les fractions P28, P78, et P85

III. ETUDE DES ANTIGENES DE LA FRACTION 28000 DALTONS 67
DE S.MANSONI

1. Analyse des antigènes reconnus par les anticorps de rats
2. Localisation "géographique" des antigènes de 28000 Daltons sur le ver adulte et le schistosomule de S.mansoni

<u>IV. ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTI-SCHISTOSOME DE LA REponse IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE LA FRACTION P28 DE S.MANSONI</u>	71
1. Etude cinétique de la réponse humorale anti-P28	
1.1 Immunisation par voie sous-cutanée	
1.2 Immunisation par voie intrapéritonéale	
2. Etude des isotypes impliqués dans la réponse humorale des animaux vaccinés avec la fraction P28 de <u>S.mansoni</u>	
3. Expériences de transfert passif de sérum anti-P28 à des rats Fischer sains.	
4. Expériences de vaccination sur Rongeurs avec la fraction P28 de <u>S.mansoni</u>	
3.1 Chez le rat (hôte semi-permissif)	
3.2 Chez la souris (hôte permissif)	
<u>V. CLONAGE DES ANTIGENES P28 DE S.MANSONI</u>	88
1. Sélection de clones phagiques exprimant des antigènes de la fraction P28	88
2. Nature et fonction de l'antigène P28.I produit dans <u>E.Coli</u>	91
2.1 Etude de la séquence de l'antigène P28.I	
2.2 Etude de la fonction de l'antigène P28.I	
2.3 Spécificité d'espèce de l'antigène P28.I	
2.4 Etude du rôle vaccinal de l'antigène P28.I	
3. Etude préliminaire de l'antigène P28.II	110
3.1 Etude de la séquence de l'antigène P28.II	
3.2 Activité in vitro et in vivo des sérums anti-P28.II	
DISCUSSION	116

MATERIELS ET METHODES	121
1. Les parasites	122
2. Fractionnement des protéines de vers adultes	124
3. Production des sérums polyclonaux	127
3.1 Immunisation de rat Fischer avec l'antigène fractionné	
3.2 Sérums d'infection expérimentale	
4. Extraction de l'ARN total des stades adultes et larvaires de <u>S.mansoni</u>	128
5. Préparation des antigènes radiomarqués	130
5.1 Marquage métabolique de vers adultes	
5.2 Production de polypeptides synthétisés <u>in vitro</u> en lysat de réticulocytes de lapin	
5.3 Marquage des protéines de surface du schistosomule	
6. "Western blotting"	133
7. Construction de la banque d'ADNc de <u>S.mansoni</u>	135
8. Protocole de vaccination des primates	138
 BIBLIOGRAPHIE	 139

INTRODUCTION

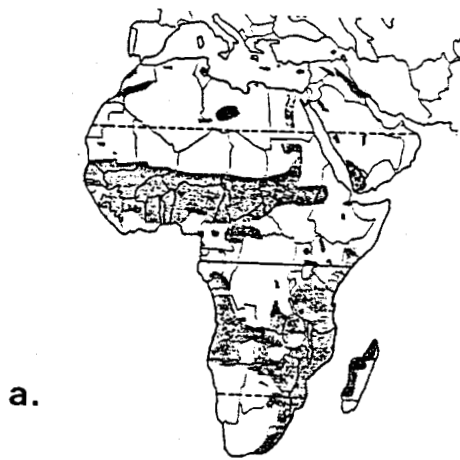
Le travail, présenté ici, se situe dans le contexte des recherches visant à l'élaboration d'un vaccin synthétique dans la schistosomiase.

Trois espèces : Schistosoma mansonii, agent de la schistosomiase intestinale, Schistosoma haematobium responsable de la schistosomiase urinaire, et Schistosoma japonicum qui touche plus particulièrement le système artérioveineux, affectent l'Homme sur les trois continents africain, sud-américain, et asiatique. (Fig. 1)

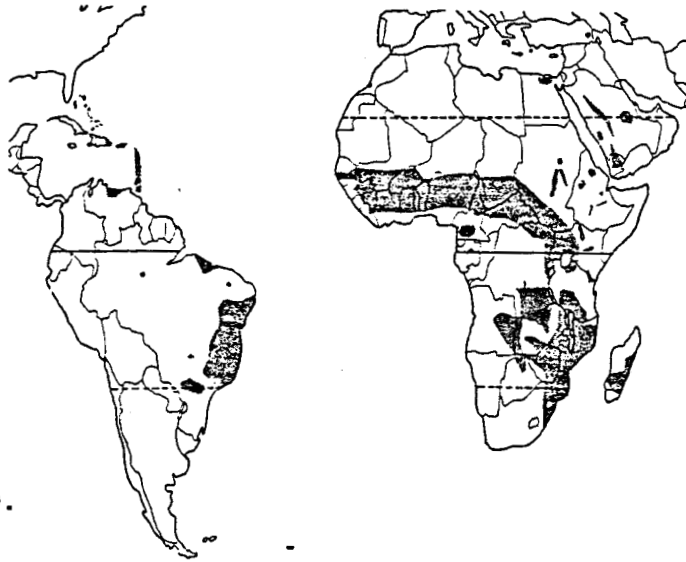
Une autre espèce Schistosoma bovis affecte le bétail et provoque d'importantes pertes économiques pour les pays localisés dans les zones d'endémies.

L'établissement de modèles d'infection expérimentale a permis d'analyser les relations existant entre le parasite et son hôte, la mise en évidence de mécanismes régissant concomitamment la destruction de nouvelles larves infestantes et le maintien de la population parasitaire adulte initialement établie, ainsi qu'une meilleure compréhension des manifestations, anatomopathologiques et immunopathologiques, déclenchées par la présence du parasite dans l'organisme hôte.

La mise au point de modèles in vitro de destruction du parasite faisant intervenir des systèmes de cytotoxicité dépendante de la présence d'anticorps spécifiques de Schistosoma mansonii ont révélé l'existence, à la surface



a.



b.



c.

Figure 1. Répartition géographique de la schistosomiase à travers le monde.

a) Schistosoma haematobium, agent de la schistosomiase urinaire; b) Schistosoma mansoni, agent de la bilharziose intestinale ; c) Schistosoma japonicum, qui affecte le système artério-veineux. D'après Ralph Muller . Worms and Disease. A manual of medical helminthology.1975

des larves infestantes, d'antigènes cibles, dont la réalité a été assise par l'analyse moléculaire.

Par ailleurs, les travaux effectués dans le domaine des manipulations génétiques durant ces dix dernières années ont permis une approche encore plus spécialisée des problèmes posés dans la lutte contre les dernières grandes endémies mondiales, telles que le paludisme et la schistosomiase, en permettant l'isolement, et la production massive d'antigènes impliqués dans l'induction d'une réponse humorale protectrice.

Nos travaux prennent leur source et s'appuient sur les nombreuses données scientifiques, qui se sont accumulées au cours des dernières décennies, se rapportant au parasite ainsi qu'à l'acquisition d'un état d'immunité. C'est donc par la présentation de cet héritage scientifique que nous commencerons avant que d'aborder notre propre contribution.

GENERALITES

I. CYCLE BIOLOGIQUE DE SCHISTOSOMA MANSONI

1. Description générale du cycle

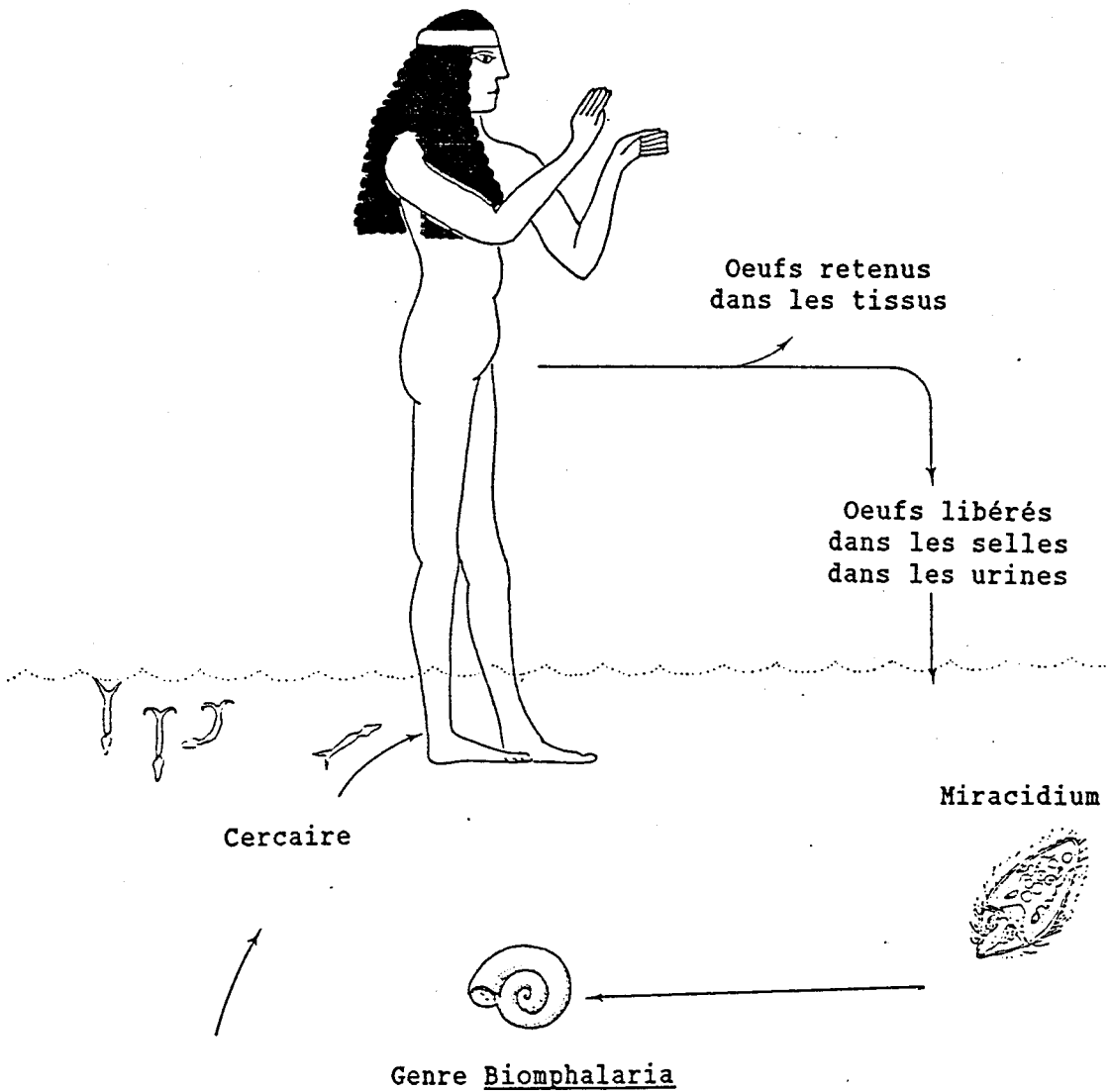
Schistosoma mansoni est un ver de la famille des trématodes qui sévit essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales des continents africains et sud-américain. Le cycle du parasite (Fig. 2) est assuré par des Planorbes du genre Biomphalaria. Lorsque certains paramètres de l'écosystème sont favorables, les mollusques aquatiques libèrent un grand nombre de larves infestantes dénommées cercaires. C'est cette forme aquicole du parasite qui infeste l'homme par voie trans-cutanée.

En traversant la peau de l'hôte, les cercaires perdent leur partie caudale et se transforment ainsi en schistosomules. Ceux-ci se dirigent progressivement vers les poumons, et poursuivent leur migration jusque dans le foie, où ils achèvent de se différencier en schistosomes mâles et femelles. Les femelles portant les oeufs s'installent dans les vaisseaux capillaires du système mésentérique, où elles libèrent leurs oeufs. Ceux-ci, munis d'un éperon latéral, traversent les tissus et plus particulièrement la paroi intestinale, événement qui précède leur élimination dans les selles.

Au contact de l'eau, l'oeuf éclôt et libère une larve ciliée ou miracidium, qui nageant rapidement, infeste le mollusque. Le miracidium se développe dans cet hôte intermédiaire, en sporocyste primaire dans lequel

Phase de reproduction sexuée

Homme



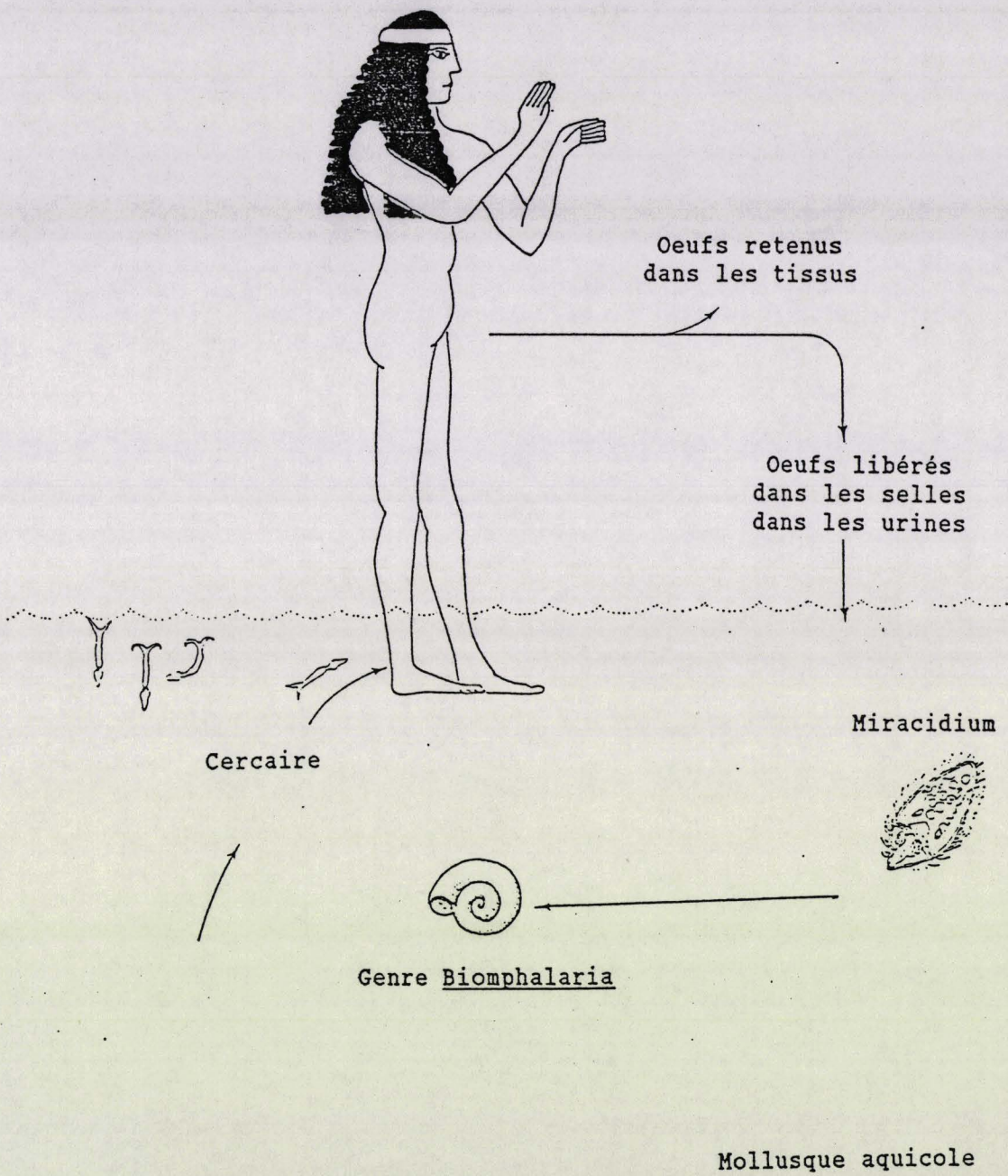
Phase de reproduction asexuée

Figure 2. Cycle biologique de Schistosoma mansoni

D'après Ralph Muller. Worms and Disease. A manual of medical helminthology. 1975

Phase de reproduction sexuée

Homme



Phase de reproduction asexuée

Figure 2. Cycle biologique de Schistosoma mansoni

D'après Ralph Muller. Worms and Disease. A manual of medical helminthology. 1975

bourgeonnent des sporocystes secondaires. Ces sporocystes se transforment à leur tour en cercaires infestantes pour l'hôte vertébré assurant la pérennité du cycle.

2. Description des stades du parasite en contact avec l'hôte vertébré

2.1 La cercaire

La cercaire ou "furcocercaire" est une larve communément appelée "tête", munie d'une queue bifide, dont la moyenne de vie varie entre 8 et 10 heures pour des températures de 20 à 24°C. La caractéristique majeure de ce stade est l'existence de glandes préacétabulaires qui libèrent, lors de la pénétration dans l'hôte vertébré, des enzymes destinées à lyser les tissus.

2.2 Le schistosomule

C'est au cours de la pénétration que la cercaire se transforme en schistosomule en perdant sa partie caudale. Queue et glycoalyx cercarien ont disparu. Le schistosomule s'allonge rapidement et migre vers les poumons qu'il gagne vers le 6ème jour.

2.3 Le ver adulte

Le schistosome adulte mesure de 6 à 17 mm, en moyenne, les femelles étant généralement plus grandes que les mâles. Celui-ci, plus trapu, possède un canal gynécophore dans lequel s'installe la femelle (Fig. 3). Hématophages, ces parasites vivent ancrés aux parois des vaisseaux, par l'intermédiaire d'une ventouse ventrale, résistant ainsi au courant sanguin.

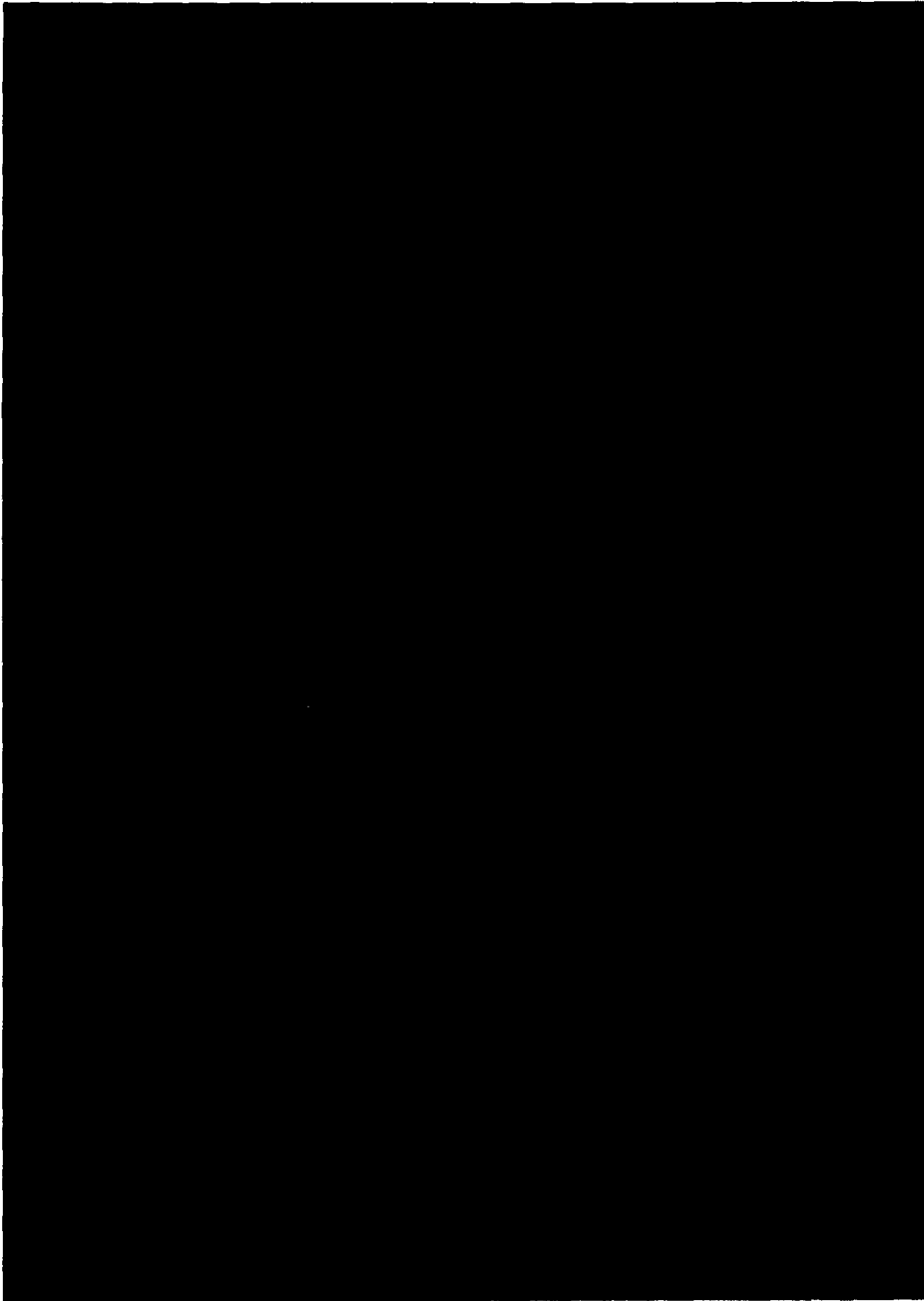


Figure 3. Couple de vers adultes de Schistosoma mansoni

Mâles et femelles vivent appariés dans la circulation veineuse hépatique de l'hôte vertébré. La femelle (a), plus fine et plus allongée que le mâle (b) se trouve lovée au sein du canal gynécophore de ce dernier (c). (X 43)

2.4 L'oeuf

Les oeufs munis d'un éperon latéral sont capables de résister au courant sanguin et de pénétrer au travers des tissus. Dans leur tentative d'évasion, nombre d'oeufs restent prisonniers des tissus de l'hôte, phénomène à l'origine de la formation des granulomes, et accompagné de réactions inflammatoires.

II. IMMUNITÉ A SCHISTOSOMA MANSONI

Rechercher des molécules synthétiques, à pouvoir vaccinant, c'est tout d'abord pouvoir disposer de modèles animaux dont les réactions immunitaires sont relativement bien connues, et aussi proches que possible de celles des organismes à vacciner. Dans le cas qui nous préoccupe ici, la schistosomiase, le degré de susceptibilité de l'hôte vis-à-vis du parasite se détermine par de multiples critères expérimentaux:

-Le pourcentage de cercaires pénétrant effectivement dans l'organisme par rapport au nombre de cercaires appliquées.

-L'importance de la charge parasitaire représentée par le nombre de vers adultes présents dans l'organisme infecté.

-Le nombre d'oeufs présents dans l'organisme ainsi que leur localisation.

Le nombre d'oeufs, présents dans les selles de l'hôte infecté est, encore à ce jour, le critère le plus utilisé dans les tests diagnostiques de "terrain", dans les zones d'endémie, pour déceler cette parasitose et en évaluer l'importance clinique.

1. Immunité naturelle dans les modèles animaux

1.1 Parmi les modèles animaux utilisés en laboratoire, le hamster est sans conteste le plus susceptible à l'in-

fection par S.mansoni. Cette espèce est utilisée dans les laboratoires pour assurer la pérennité du cycle parasitaire en conjonction avec un élevage de mollusques. Les adultes atteignent leur complète maturité entre 35-40 jours et pondent un grand nombre d'oeufs viables qui après leur éclosion en miracidium, sont utilisés pour infecter les mollusques. La permissivité de cet hôte est telle qu'une surinfection (≥ 1000 cercaires) engendre inévitablement la mort de l'animal 40 jours après l'infection.

1.2 La souris est également très utilisée comme modèle expérimental, principalement par l'école anglo-saxonne. Son degré de susceptibilité est sensiblement identique à celui du hamster, mais ne permet pas d'obtenir un nombre de vers adultes et d'oeufs aussi important que l'hôte précédent.

1.3 Le rat est un modèle particulier dans l'étude de la schistosomiase. En effet, le rat laisse pénétrer les cercaires et permet au parasite d'effectuer sa migration jusqu'au stade hépatique. A ce stade, aux alentours de la quatrième semaine, la charge parasitaire chute brutalement, et la majeure partie des parasites est éliminée à la sixième semaine (1, 2). Parallèlement, la réponse humorale se maintient et s'amplifie bien au-delà de la disparition des parasites, suggérant la persistance d'un nombre résiduel de vers, maintenant le stimulus antigénique.

1.4 Le singe Rhésus est également un hôte très susceptible à l'infection par S.mansoni, si ce n'est que le nombre d'oeufs pondus, ainsi que le nombre de vers adultes, décroît rapidement chez les singes soumis à une infection massive (3).

Dès 1958, Kagan (4) partage les populations hôtes du parasite en trois catégories reposant sur leur susceptibilité à l'infection:

- les hôtes résistants
- les hôtes partiellement résistants
- les hôtes susceptibles

Ces relations entre l'immunité naturelle de chaque espèce et le schistosome se trouvent compliquées à l'intérieur de chacune d'entre elles par les variations des caractéristiques phénotypiques pouvant se manifester dans une espèce donnée. Kagan (4) démontre ainsi que les souris C3H et DBA sont d'avantage susceptibles à l'infection que les souris CFI. La population de vers adultes est de 30% plus élevée chez les souris CFI que dans le cas des deux autres souches.

Les mécanismes de cette immunité naturelle s'expriment à différents niveaux:

- Au niveau de la barrière cutanée, où l'exemple extrême est celui du pigeon, chez lequel, les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme. Mais,

dans la plupart des cas, cette résistance au parasite s'exprime surtout dans l'établissement d'une population réduite de vers, ou l'élimination du parasite à des stades tardifs . Si, dans tous les cas, la pénétration des cercaires dépend de mécanismes enzymatiques (5), leur efficacité varie en fonction de l'hôte: chez le rat, 50% des cercaires sont détruites dans la peau alors que seulement 10% sont détruites à ce niveau chez le hamster (6).

-Au niveau du développement larvaire: une fois dans l'hôte, le parasite se heurte à de multiples facteurs de résistance qu'ils soient spécifiques ou non. Purnell (7) observe ainsi que les vers mâles sont mieux développés chez le hamster mâle que chez le hamster femelle. Cette hypothèse d'une action des hormones sexuelles de l'hôte sur la population parasitaire a été confirmée par le fait que l'injection de testostérone à des souris infestées réduit la capacité de ponte du parasite (8) et que l' injection d' antitestostérone (9) provoque des anomalies dans le développement des organes sexuels des vers mâles et femelles (disparition des testicules du mâle, régression des ovaires chez les femelles).

Plus surprenant est le cas du rat, ou encore du singe Rhésus, chez lesquels la majorité des parasites est brutalement éliminée après 4 à 7 semaines d'infection. Le fait que le pourcentage de vers détruits soit plus

faible chez des singes ayant subi une splénectomie (10) ou chez des rats thymectomisés (11), ne permet pas de restreindre aux seuls mécanismes immunitaires ce phénomène d'élimination "tardif" de la population parasitaire.

2. Immunité acquise dans les modèles animaux

A des degrés divers, de nombreuses espèces animales développent une résistance à la réinfection. Selon toutes vraisemblance cette immunité "acquise" s'élabore en deux temps : contre la population de vers adultes, au cours de la première infection, puis contre les stades larvaires au cours de la seconde infection. Le maintien de la population de vers adultes en dépit du caractère immun de l'hôte vis-à-vis des stades larvaires a été appelé par Smithers et Terry "immunité concomitante" (12).

2.1 Résistance contre la population parasitaire adulte au cours d'une primo-infection

Chez la souris, la production d'oeufs libérés dans les selles diminue rapidement à 60 jours environ après l'infection. Une analyse approfondie (13,14) montre que l'oviposition reste de fait constante jusqu'au 100^{ème} jour mais que les oeufs ne parviennent plus à quitter les tissus de l'hôte en direction de la lumière intestinale. Il semble que les réactions du système immunitaire vis-à-vis des enzymes libérées par les oeufs pour

traverser les tissus soient à l'origine de ce phénomène.

Nous avons précédemment abordé le cas du rat et son aptitude à éliminer la population parasitaire à un stade avancé de son développement. Il semble qu'après une phase de résistance naturelle, dont la barrière cutanée représente l'un des principes actifs, se développe rapidement une résistance née de l'infection même, réponse qui dépasse de loin celle observée dans d'autres espèces telles que le hamster, la souris, ou le singe dans les mêmes conditions d'infection (15).

2.2 Résistance aux stades larvaires consécutive à une primo-infection

Le cas le mieux étudié est celui du singe Rhésus. Ce dernier devient complètement résistant à la réinfection après une première infection. Cette résistance s'établit entre 16 semaines à 1 an après la primo-infection selon les auteurs (16,17,18). Les mécanismes de résistance mettent en jeu à la fois des mécanismes humoraux et des mécanismes cellulaires.

3. Mécanismes immuns

L'immunité à la réinfection dans la schistosomiase apparaît multifactorielle, impliquant des anticorps d'isotypes différents, les facteurs du complément et diverses populations cellulaires appartenant au système

immunitaire. L'une des principales difficultés de l'étude de ces différents éléments, et de leur interaction, réside dans la nature même de cette parasitémie qui est caractérisée par un processus dynamique de maturation du ver. La complexité du cycle rend difficile l'étude in vivo des mécanismes de défense impliqués dans la résistance au parasite et c'est grâce à la maîtrise de divers modèles développés in vitro que l'on doit aujourd'hui de mieux comprendre les interactions qui se développent entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte au cours de l'infection.

3.1 Mécanismes effecteurs non spécifiques

Les facteurs du complément sont en grande partie responsables de la destruction non spécifique du parasite. Le complément peut être directement activé au niveau de la membrane du schistosomule (19) et induire la destruction de la larve. Cette activité du complément peut être amplifiée lorsqu'on le combine à des cellules portant le récepteur C3b tels que des éosinophiles normaux.(20)

Certaines lymphokines, comme le MIF (21), sont capables d'activer des macrophages normaux et de provoquer la mort des larves .

Utilisant des macrophages de rats il a également été montré que ces cellules pouvaient être activées par des IgG agrégées non spécifiques de la cible parasitaire.(22)

3.2 Mécanismes effecteurs spécifiques

-Anticorps létiaux

Clegg et Smithers (23) ont observé que les anticorps IgG de sérums de singes Rhésus immuns étaient létiaux pour le parasite en présence de complément. Cette observation a par la suite été étendue à de nombreuses espèces dont le rat et la souris (24,25). Néanmoins, la signification biologique in vivo de cette classe d'anticorps n'est pour le moins pas réellement établie. Le transfert passif d'anticorps IgG (26), ayant montré une activité cytotoxique in vitro, n'a pas induit un pourcentage de protection similaire chez la souris.

-Coopération entre cellules effectrices et anticorps (ADCC: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)

Les deux principales caractéristiques des réactions d'ADCC contre le parasite sont qu'elles impliquent des cellules non-lymphoïdes telles que les éosinophiles, les macrophages, ainsi que les plaquettes, et que les anticorps dirigés contre le parasite, interagissant avec les récepteurs cellulaires, sont de classe E et dans certains cas de classe G principalement avec l' éosinophile.

-L'éosinophile

A. Butterworth (27,28,29) démontre que des éosinophiles humains normaux sont capables de tuer les schistosomules, in vitro, en présence d'anticorps IgG provenant de patients infectés par S. mansoni.

Bien qu'initialement décrit dans la schistosomiase humaine, la plupart des données relatives à l'activation, des éosinophiles par l'intermédiaire de la réponse humorale a été obtenue dans le modèle rat. L'activité des éosinophiles dépend d'au moins deux signaux l'un étant constitué par la liaison de l'anticorps au récepteur Fc de la cellule, l'autre produit par les facteurs libérés par les mastocytes lors de l'interaction entre ces cellules et les anticorps de classe anaphylactiques (30,31,32,33).

L'interaction entre IgG2a, principale sous-classe d'IgG chez le rat, et l'éosinophile (34) est produite essentiellement avant la 6ème semaine d'infection. Ces anticorps capables de stimuler les mastocytes peuvent interagir lorsqu'ils sont agrégés avec les récepteurs pour les IgE (35,36,37).

Si dans les stades précoces de l'infection, dans le modèle rat, la coopération entre IgG2a et éosinophiles constitue une barrière efficace contre l'invasion parasitaire, il n'en est plus de même vers la 10ème semaine, date à laquelle apparaît une autre sous-classe d'IgG, l'IgG2c qui, entrant en compétition avec les IgG2a

au niveau du récepteur cellulaire de l'éosinophile, bloque l'activité cytotoxique des éosinophiles de rat (38).

Dans le modèle rat, les anticorps de classe IgE sont massivement produits au cours de l'infection (39) et constituent la seconde classe d'anticorps apte à coopérer avec les éosinophiles. Après la 6ème semaine, l'activité cytotoxique des sérums de rats, lors d'expériences de coopération avec des éosinophiles normaux et en présence de la cible parasitaire, est principalement due aux anticorps de classe IgE. La nature IgE des facteurs d'activation des éosinophiles dans les sérums de rats prélevés après la sixième semaine d'infection, a été démontrée par des expériences de déplétion de cette sous-classe dans les sérums par passage sur colonne d'affinité ou par des expériences de préincubation des éosinophiles avec des IgE non-spécifiques (40).

-Les macrophages

Des populations enrichies en macrophages préincubées avec un sérum de rat immun, sont capables de détruire in vitro les schistosomules de S.mansoni. Le pré-chauffage du sérum à 56°C détruit simultanément sa capacité à induire l'adhérence des cellules à la surface du schistosomule et la cytotoxicité. D'autre part le passage du sérum sur une colonne d'affinité anti-IgE réduit de manière importante la

cytotoxicité induite (41). Ce rôle des anticorps de classe E, fut confirmé par des expériences d'inhibition, par des IgE myélomateuses agrégées par le dimethylsuberimide (42,43), de la cytotoxicité des macrophages, induite par des sérums d'infection

Cette interaction entre réponse humorale et macrophage est de plus compliquée par l' action modulatrice de certains peptides issus en particulier du clivage des anticorps de classe G par les enzymes protéolytiques du parasite (44). Les peptides issus de ce clivage réduisent de manière importante la cytotoxicité dépendante de l' interaction entre macrophages et anticorps de classe E, alors que les peptides produits lors de la protéolyse des anticorps de classe E n'ont aucune influence sur cette activité.

-Les plaquettes

Récemment, il a été démontré que des plaquettes prélevées chez des rats infectés par S.mansoni, utilisées à une concentration physiologique, exprimaient in vitro leur capacité à détruire le schistosomule (45,46). Cette activité est optimale lorsque le rat exprime son plus haut degré d'immunité à la réinfection. Les plaquettes d'animaux sains ne développent lors des mêmes tests aucune activité cytotoxique vis à vis de la larve, alors que la mise en contact au préalable de plaquettes "saines" avec

des sérums de rats immuns riches en IgE induit la destruction des parasites.

Cette fonction des plaquettes in vitro s'étend également au domaine de l'in vivo . Le transfert passif de plaquettes provenant d'animaux immuns à des animaux sains protègent ceux-ci contre l'infection tout du moins transitoirement alors que le transfert de plaquettes saines est inopérant.

L'ensemble de ces résultats indiquent que seule la stimulation du système immunitaire pris dans son entier permettra d'obtenir une protection efficace contre cette parasitose.

III. LA SCHISTOSOMIASE HUMAINE

1. Le contexte géographique

Les projets de développements hydriques et agricoles dans les 74 pays, où cette parasitose est endémique, contribuent aujourd'hui à son extension.

La stratégie, adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé (47), pour lutter contre cette parasitose consiste en premier lieu à réduire la morbidité.

Plusieurs raisons sont à l'origine de ce choix :

-L'homme est lui-même vecteur et contribue à l'extension de l'endémie en se comportant comme un hôte susceptible. Les schistosomes s'y maintiennent durant des périodes pouvant atteindre 20 ans. Dans les zones d'endémies, où les populations sont sans cesse exposées, le niveau d'infection reste stable chez la population adulte;

-Les enfants sont les plus touchés; l'intensité et la fréquence de l'infection par S.mansoni sont maximales au cours de la deuxième décennie de la vie (48);

-Les méthodes de destruction des hôtes aquicoles sont trop coûteuses et nécessitent, pour être efficaces, des interventions répétées sur de longues périodes.

Aujourd'hui la lutte sur le terrain se structure. Elle passe par une évaluation épidémiologique quantitative

pays par pays, le suivi des patients de manière périodique et l'éducation sanitaire des groupes humains les plus exposés .

Sans mettre en doute la volonté des Etats concernés, le succès de cette entreprise est largement subordonné au désir de ceux-ci de mettre en oeuvre les moyens humains, matériels, et financiers qu'elle exige.

2. Aspects cliniques

Nous nous bornerons ici à décrire, à titre d'exemple, les aspects cliniques de la bilharziose intestinale à Schistosoma mansoni.

La bilharziose intestinale évolue en plusieurs stades conséquence des différentes phases du développement parasitaire. Lors de l'infestation, la réaction cutanée reste discrète, demeurant, le plus souvent, silencieuse. Aucun symptôme n'est observé durant les 3 à 4 semaines qui suivent la contamination. Les symptômes associés dépendent bien évidemment du nombre de parasites infectants. On observe un malaise général accompagné d'une fièvre élevée de type rémittent, sueurs, céphalées. Des manifestations de type allergique (urticaire, oedèmes fugaces, myalgies et arthalgies), des troubles respiratoires et des signes gastro-intestinaux complètent la symptomatologie. Vers le quatrième mois on enregistre une hyperleucocytose (15000-20000) et une hyperéosinophilie de l'ordre de 30 à 50%, mais qui s'infléchit très rapidement. Lorsque les parasi-

tes atteignent le stade adulte et que la ponte commence, des poussées de diarrhée et des rectorragies discrètes apparaissent. Les oeufs véhiculés par le courant porte viennent en premier lieu thromboser les ramifications intra-hépatiques de la veine porte. Chaque oeuf provoquera la formation d'un granulome constitué autour de la thrombose et de l'endophlébite par un infiltrat lymphoplasmocytaire éosinophilique. Au niveau du foie, la présence des granulomes déclenche une fibrose hépatique, qui génère à son tour une hypertension portale et ses complications propres. Le foie augmente de volume (splénomégalie). Tardivement apparaissent une ascite et une circulation collatérale. Finalement des hémorragies digestives constituent le risque majeur de l'atteinte hépatique. Au niveau même de l'intestin peuvent se former des tumeurs conséquence de la présence d'un ver femelle pondant des oeufs dans une veinule. D'autres complications peuvent encore survenir soient au niveau pulmonaire du fait d'une endartérite fibreuse se formant autour des oeufs embolisés dans les branches des artères pulmonaires, soit encore au niveau du système nerveux central dûes à la présence d'oeufs ou de vers adultes, engendrant une néoformation intracrânienne ou une compression médullaire. Les formes aiguës peuvent prendre l'aspect d'une encéphalite ou d'une myélite transverse.

3. Traitement

La chimiothérapie est à l'heure actuelle le seul

outil dont nous disposons pour lutter contre cette parasitémie. Deux schistosomicides sont plus particulièrement employés: le praziquantel et l'oxamniquine. Une étude épidémiologique réalisée récemment après traitement à l'oxamniquine par l'équipe du Dr.A. Butterworth (49) a révélé que, dans des conditions d'exposition à la réinfection comparables, sur un échantillon déterminé d'enfants, le traitement ne permettait pas d'induire une résistance à la réinfection. Après traitement, les patients se partagent en deux groupes l'un considéré comme "immun" vis-à-vis de S.mansoni (nombre d'oeufs présents dans les selles < 30), l'autre considéré comme toujours susceptible (nombre d'oeufs présents dans les selles > 100). Deux isotypes semblent en particulier impliqués dans l'induction de cet état de non-immunité: l'un de nature IgM capable de bloquer la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps de classe G (50); l'autre de nature IgG et principalement dirigé contre les antigènes du stade oeuf du parasite (51).

Cette relation entre classe d'anticorps, nature des antigènes contre lesquels ils sont plus particulièrement dirigés, et l'état d'immunité ou de susceptibilité de l'hôte infecté, rend nécessaire une présentation des antigènes déjà décrits dans la littérature internationale au moment où nous présentons nos propres travaux.

IV. LES ANTIGENES DE SCHISTOSOME IMPLIQUES DANS L'IMMUNITE

Il serait fastidieux pour le lecteur, d'énumérer ici, tous les antigènes de schistosomes, ou plutôt toutes les molécules biologiques du parasite vues comme tels par le système immunitaire de l'hôte infecté.

Nous nous limiterons à décrire les antigènes majeurs, non pas tant par leur importance quantitative que par le potentiel vaccinant qu'ils représentent.

1. Antigène de surface de masse relative 38000 de S.mansoni (GP38)

C. Dissous et coll. (52,53) ont montré qu'un antigène de Mr 38000 était exposé à la surface de la cercaire et du schistosomule. Cet antigène majeur de surface, ou tout du moins celui qui est le plus accessible aux techniques de marquage des surfaces cellulaires, induit préférentiellement, dans le modèle rat, une réponse humorale composée d'IgG.

La production par J.M Grzych de deux anticorps monoclonaux de classe G mais d'isotypes différents a permis de disséquer l'activité immunologique de cet antigène. Le premier anticorps (54) de sous-classe IgG2a s'est révélé fortement cytotoxique pour le schistosomule, lors de tests in vitro impliquant des populations de cellules effectrices de rat enrichies en éosinophiles. Cet anticorps monoclonal IgG2a s'est montré protecteur contre S.mansoni

lors d'expériences de transfert passif. Le second anticorps monoclonal de classe IgG2c (38) était quant à lui capable de bloquer, tant in vitro qu' in vivo l'activité biologique de l' anticorps monoclonal IgG2a. La capacité des épitopes portés par l'antigène de 38000 Da à induire la production d'anticorps dont les activités biologiques sont antagonistes l'une de l'autre a également été mise en évidence chez l'homme par A.Butterworth et ses collaborateurs (49) au Kenya. Ainsi deux groupes de patients se sont dessinés suivant leur susceptibilité à la réinfection par S.mansoni. Des expériences de compétition ont démontré que la réponse humorale chez l'homme vis à vis de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal IgG2c est fortement exprimée par la population non immune. Chez l'homme ce sont des anticorps de classe IgM qui semblent jouer le rôle de l'IgG2c décrite dans le modèle rat. L'existence de cette classe est fortement liée à l'absence totale ou partielle d'immunité chez l'homme. Ces résultats renforcent l'utilité du modèle rat pour la compréhension de la réponse humorale dans la schistosomiase humaine.

Afin de contourner l'obstacle que constitue l'induction par l'antigène 38000 de la production d'immunoglobulines bloquants, l'anticorps monoclonal IgG2a (Ab1) a été utilisé afin de produire un anticorps monoclonal anti-idiotype (Ab2), c'est à dire l'image interne de l' épitope porté par l'antigène de 38000 Da, induisant une

réponse humorale protectrice (55).

Sélectionné pour sa capacité à inhiber la liaison entre l'antigène de 38000 Da et l'anticorps monoclonal IgG2a, cet anticorps Ab2 a permis de vacciner des rats, et d'obtenir dans ce modèle un haut degré de protection de l'ordre de 75%.

Tout récemment, l'épitope glycanique porté par l'antigène de 38000 a été identifié au sein de diverses souches de mollusques aquicoles dont la souche hôte utilisée dans notre laboratoire Biomphalaria glabrata et un mollusque marin Megatura crenulata. Cette observation va permettre de déterminer la structure de cet épitope et d'étudier plus précisément son rôle vaccinant (56).

2. Antigènes de masse relatives 22000-26000 de S.mansoni

Auriault et coll. (57) ont, utilisant les produits d'excrétion-sécrétion in vitro des schistosomules (SRP: Schistosomula Released Products), identifiés deux antigènes de masse moléculaire 22000 et 26000. Injecté chez le rat, le SRP induit une réponse humorale globalement cytotoxique pour le schistosomule ainsi que l'ont montré des expériences de cytotoxicité dépendante de cellules effectrices (principalement macrophages et plaquettes). L'isotype majeur responsable de cette activité est IgE. Les expériences de

"Western blot" ont montré que les anticorps IgE dans les sérums anti-SRP étaient principalement dirigés contre deux antigènes de masses apparentes 22000 et 26000 respectivement. Des expériences de vaccination menées sur le primate par ce même groupe, ont permis de démontrer que le SRP induisait une réponse anticorps chez le singe cytotoxique pour les schistosomules et que l'isotype impliqué était, là encore, de nature IgE (58).

3. Antigène de 97000 Da de S.mansoni

A. Sher et son équipe (59,60) viennent tout récemment d'identifier un antigène de masse apparente 97000 (P97), présent dans des extraits membranaires de vers adultes de S.mansoni. Cet antigène, reconnu par des sérums de souris vaccinées, par des cercaires irradiées, a été purifié par la technique de gel filtration et utilisé dans des expériences de vaccination chez la souris. Un fait original doit être noté : une réponse anticorps contre cet antigène n'a pu être obtenue chez la souris qu'en utilisant un adjuvant bactérien Mycobactérium bovis souche bacille Calmette et Guérin (BCG). Les fractions enrichies en P97 ont permis de protéger des souris contre S.mansoni à 40-50%. Tout dernièrement, l'ADN complémentaire pour cet antigène a été synthétisé et cloné dans un vecteur phagique lambda gt11. Sa séquence a été obtenue et a permis d'identifier cet antigène comme appartenant à la famille des protéines musculaires.

Décrit pour être la paramyosine du parasite, la structure de cette protéine est hautement conservée et présente un haut degré d'homologie avec une protéine musculaire de mollusque. (61)

A ce stade, il est intéressant de constater que, l'épitope glycanique porté par la GP38 et la P97, deux des antigènes identifiés comme des structures vaccinales contre le parasite, sont également des molécules proches ou identiques structurellement avec des molécules présentes chez l'hôte invertébré.

Aucune expérience de vaccination utilisant l'antigène "recombinant" n'a, à ce jour, été rapportée.

4. Antigène de 200000 Da

Selon une méthodologie identique à celle employée pour l'identification de l'antigène 38000, Hazdai et coll. (62) ont produit deux anticorps monoclonaux d'isotype IgG1. Ces anticorps monoclonaux se lient à un antigène multimérique, composé de deux chaînes polypeptidiques de masses relatives 30000 et 45000 liées entre elles par des ponts disulfures pour donner un complexe de 200000 Da. Ce complexe peut à son tour se dimériser par l'intermédiaire de liaisons non covalentes ce qui aboutit à la formation d'une macromolécule de 500000 Da. L'intérêt de cette structure réside dans l'activité biologique portée par les anticorps monoclonaux qui ont permis sa caractérisation.

Utilisés dans des expériences de transferts passifs, ces anticorps monoclonaux ont protégés des souris entre 40 et 80%. En outre, l'antigène purifié par immunoaffinité et utilisé dans des expériences de vaccination a donné de 17 à 30% de protection suivant les doses d'antigène injecté.

5. Antigènes de 53000 Da et 155000 Da

A peu près à la même époque, Clegg et Smith (63) ont purifié par immunoaffinité, grâce à deux anticorps monoclonaux d'isotype IgM et IgG3, deux antigènes de masse apparente 155000 et 53000. Ces deux antigènes ont permis de vacciner des primates, avec un niveau de protection de 41%, décrit comme statistiquement significatif par les auteurs. Ces antigènes ont donné des pourcentages de protection identiques chez la souris.

A cette multitude de candidats à l'élaboration d'un vaccin dans la schistosomiase nous allons ajouter une nouvelle famille d'antigènes à haut potentiel vaccinant. Les pages, qui vont suivre, vous en feront la description.

EXPOSE DES TRAVAUX

I. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU STADE ADULTE DE SCHISTOSOMA MANSONI

Ayant à l'esprit, la notion d'immunité concomitante (12) selon laquelle la population adulte maintient, dans l'organisme hôte, un stimulus antigénique propre à induire une relative résistance vis-à-vis d'une réinfection larvaire, nous avons entamé nos travaux sur l'identité des antigènes à potentiel vaccinant en prenant comme source antigénique la population de vers adultes.

Outre cette première hypothèse de travail, deux conditions supplémentaires s'imposaient à nous:

-le ou les antigènes vaccinaux devaient être inducteurs d'une réponse humorale détectable, et de nature à être analysée dans les tests de cytotoxicité cellulaire anti-parasitaire dépendante d'anticorps développés dans notre laboratoire;

-le ou les épitopes inducteurs de cette réponse humorale devaient être préférentiellement de nature protéique de sorte qu'ils puissent être produits de manière simple et quantitative par les techniques du génie génétique.

Cherchant à produire des sondes anticorps dirigées contre des structures épitopiques de nature peptidique, il était indispensable de détruire toute conformation ou association moléculaire immunogène qui ne pourrait être

reproduite par les techniques du génie génétique, nous entendons par là les modifications post-traductionnelles produites in vivo par le parasite, dont l'un des exemples est le pontage inter-catenae de chaînes polypeptidiques matures par l'intermédiaire de liaisons disulfures.

Notre objectif n'était cependant pas de démasquer en utilisant, par exemple, les techniques chimiques de déglycosylation, des épitopes protéiques voilés par des structures sucrées et qui de toutes les manières ne seraient pas accessibles, naturellement, en tant que cibles au système immunitaire lors de l'infection.

Il nous fallait obtenir un compromis entre la nécessaire dénaturation des protéines produites par le parasite de façon à obtenir des sondes immunologiques dirigées principalement contre des structures primaires et la reconnaissance de ces épitopes produits dans leur conformation native et vus par le système immunitaire au cours des premières phases de l'infection.

Nous avons donc fractionné les protéines de vers adultes, de S.mansoni, en gel de polyacrylamide en présence d'agents détergents (Sodium Dodécyl Sulfate) et d'agents réducteurs (β -mercaptoéthanol). La figure 4 présente les résultats de ce fractionnement.

Nous référant aux travaux réalisés dans notre laboratoire (64) indiquant que la majeure partie des antigènes peptidiques synthétisés in vitro avaient une

masse moléculaire relative comprise entre 20000 et 100000 daltons nous avons choisi de fractionner les protéines du parasite sur un gel de polyacrylamide 13%. Le profil obtenu figure 4 piste T montre la répartition sur ce type de gel des protéines de vers adultes. Les protéines sélectionnées en vue de leur purification ont été référencées en fonction de leur masse moléculaire apparente, déterminée dans les conditions de l'expérience.

Nous avons analysé 10 groupes de protéines de vers adultes de S.mansoni. La masse moléculaire de ces groupes de polypeptides est respectivement de 28, 37, 40, 43, 55, 66, 68, 73, 78 kDa ainsi qu'un doublet de masse moléculaire de 85-90 kDa. L'intégrité des fractions polypeptidiques électroéluées est démontrée figure 4 (pistes 1 à 10). Des rendements de l'ordre de 80% ont été obtenus lors du fractionnement en SDS-PAGE des protéines du ver adulte et ce sans dégradation apparente des structures moléculaires électroéluées, exception faite de la fraction 2 de 37 kDa.

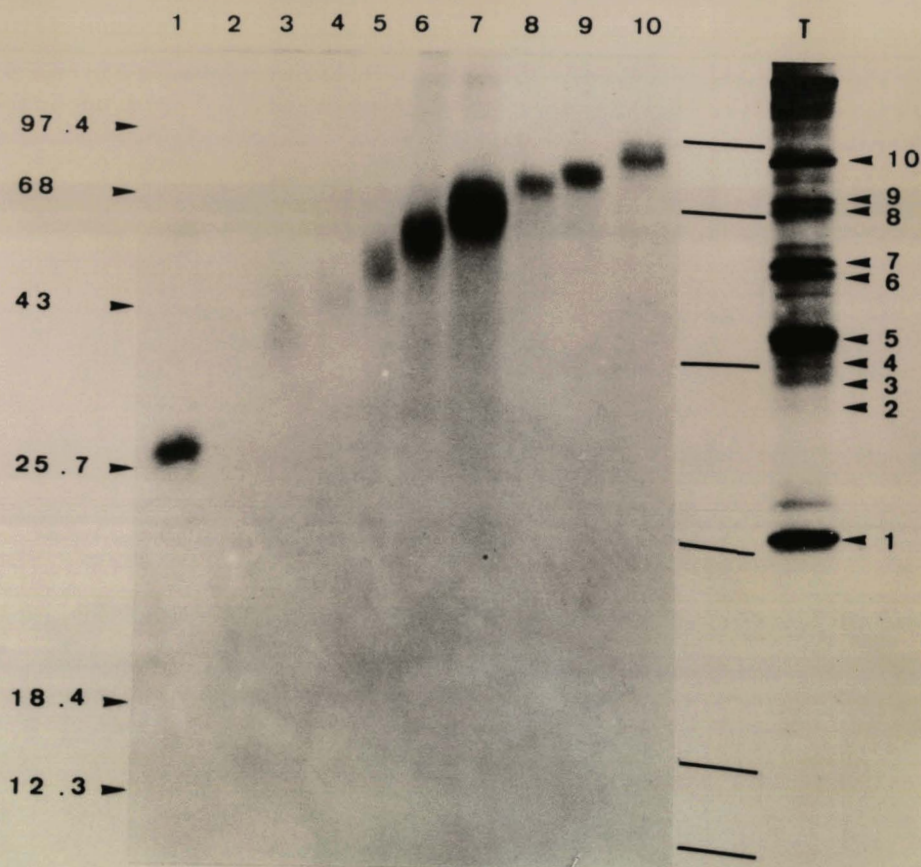


Figure 4. Fractionnement des protéines de vers adultes de Schistosoma mansoni

La piste T représente la répartition des polypeptides et des glycoprotéines du ver adulte après migration en gel de polyacrylamide 13% en conditions dénaturantes et réductrices (tampon d'échantillon : 3% Sodium Dodécyl Sulfate, 5% β - mercaptoéthanol, 62.5mM Tris-HCl pH 6.8) visualisées après coloration au Bleu de Coomassie Brillant R250. Les pistes 1 à 10 représentent les 10 fractions électroéluées à partir du profil T et réanalysées afin d'en contrôler l'intégrité avant que d'être utilisées afin d'immuniser des groupes de rats Fischer.

II. IMMUNISATION DE RATS FISCHER AVEC LES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DE S.MANSONI

1. Identification de fractions protéiques immunogènes

Après deux injections d'environ 50 µg de chacune des composantes constitutives du ver adulte de S.mansoni, les sérums des animaux ont été collectés et testés. Il est entendu que , recherchant des antigènes de nature polypeptidique et présents comme tels chez le parasite mature nous devons tester les sérums pour leur aptitude à reconnaître une ou plusieurs structures parmi les produits de traduction in vitro obtenus par expression de l'ARN messager du ver adulte ou de la larve infestante dans un lysat de réticulocytes de lapin. Nous devons également retrouver cet antigène parmi les protéines synthétisées par le parasite vivant. Le dernier volet de cette recherche en forme de triptique était d'identifier l'antigène de nature protéique à la surface de la larve infestante : le schistosomule, le transformant ainsi en une cible potentielle pour les défenses immunitaires de l'hôte infecté.

Les résultats de cette analyse sont montrés figure 5. Des dix fractions parasitaires, dénaturées, seules trois d'entre elles ont induit une réponse anticorps détectable de classe G de la part de l'animal immunisé. Il s'agit des fractions correspondant à des masses relatives apparentes de 28000, 78000, 85000 ainsi que le montre l'analyse des complexes immuns élués de la protéine A - sépharose, obtenus après incubation des

antigènes synthétisés par le ver adulte avec les différents sérums (Fig.5a). De ces trois antigènes seuls les antigènes de 28000 et 85000 Daltons ont été identifiés parmi les produits de traduction in vitro d'ARN de vers adultes (figure 5b.).

Finalement seule la fraction antigénique de 28000 daltons a pu être isolée à partir des molécules associées à la surface du schistosomule et sélectivement marquées à l'iode 125 (Figure 5c). Cette fraction antigénique co-migre avec les antigènes majeurs associés à la surface du schistosomule, identifiés par C.Dissous et coll. (52), possédant une masse moléculaire apparente en SDS-PAGE de 30-40 kDa.

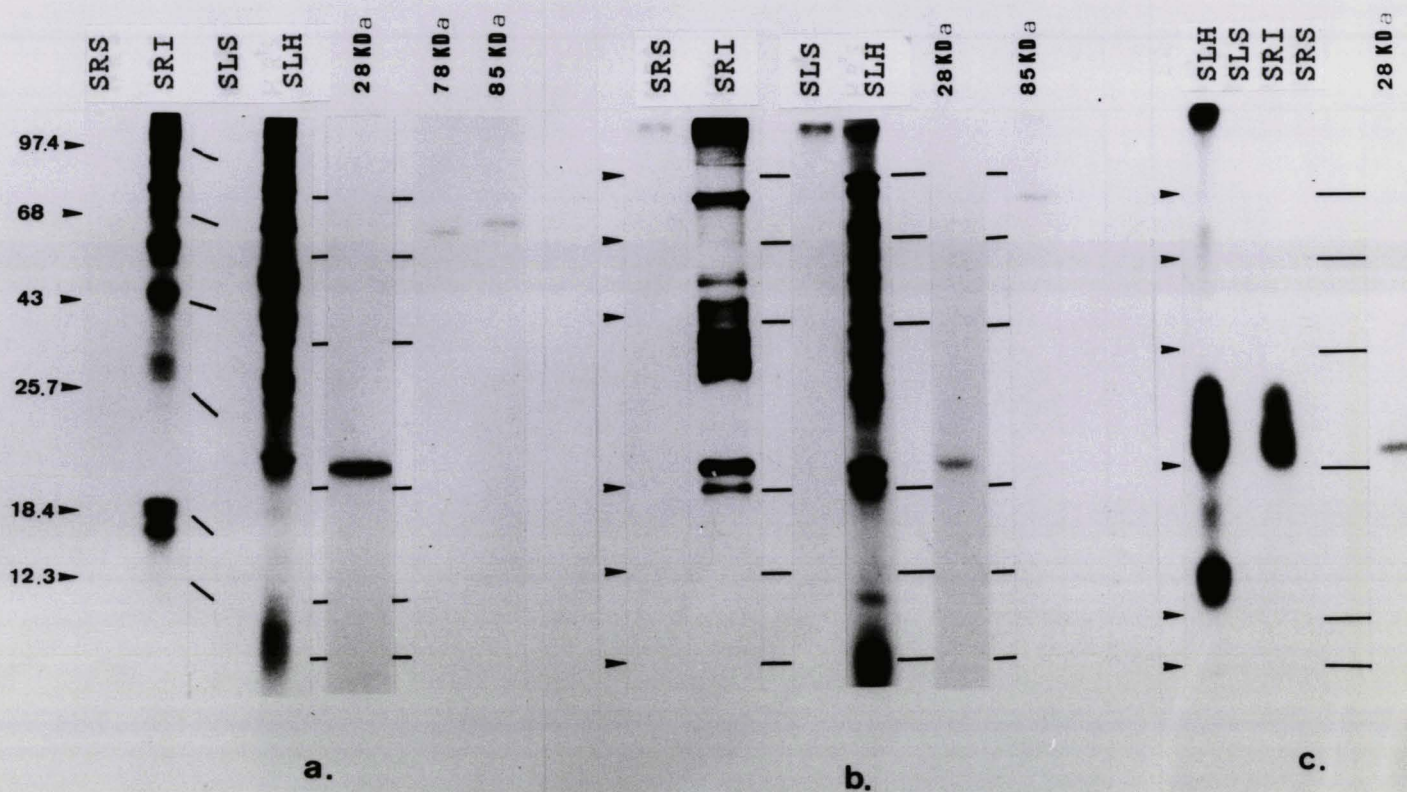


Figure 5. Analyse de la réponse anticorps après immunisation avec des fractions SDS-PAGE de S.mansoni

(a). Les complexes immuns, formés entre les anticorps, provenant de sérums d'infection ou d'immunisation, fixés à la protéine A couplée à la sépharose CL4B, et les protéines synthétisées in vitro par une population mixte de vers adultes maintenue en survie en présence de méthionine ^{35}S , ont été analysés sur gel de polyacrylamide 13% (SRS: sérum de rat normal, SRI: sérum de rat d'infection, SLS: sérum de lapin sain, SLH: sérum de lapin hyperimmun, 28kDa: sérum de rat immunisé avec la fraction de 28000 Daltons, 78kDa: sérum de rat immunisé avec la fraction de 78000 Daltons, 85 kDa: sérum de rat immunisé avec la fraction de 85000 Daltons. (b) Une analyse identique a été réalisée avec comme source d'antigènes les produits de traduction in vitro d'ARN total de ver adulte. (c) La source d'antigène est ici les composants de surface de la larve infestante le schistosomule préalablement marqués par l'iode 125.

Au vu du nombre d'antigènes, de masse moléculaire apparente comprise entre 20 et 100 kDa, reconnus par des sérums d'infection de rats Fischer (Fig. 6 a,b piste SRI) ou par des sérums de lapins hyperimmuns, vaccinés avec des doses massives d'homogénat brut de vers adultes de S.mansoni (Fig. 6 a,b piste SLH), il apparaît que l'isolement et la dénaturation des groupes de protéines considérées a affecté le pouvoir immunogène de ces dernières, restriction faite à ce que nous n'avons étudié ici que le versant humoral de la réponse immune.

D'emblée, les antigènes de la fraction P28 réunissent la plupart des caractéristiques que nous avons fixées:

- Présence simultanée aux deux stades clefs du parasite chez l'hôte vertébré: le schistosomule et le ver adulte
- Accessibilité des antigènes au niveau de la membrane larvaire
- Présence des antigènes de la fraction P28 parmi les produits de traduction in vitro d'ARN total de vers adultes

2. Etude de l'activité biologique anti-schistosome des sérums dirigés contre les fractions P28, P78 et P85

Le rôle potentiel de ces trois fractions antigéniques P28, P78, P85 dans de futures expériences de vaccination a été analysé par l'étude de leur aptitude à détruire in vitro, en coopération avec des cellules effectrices, la larve infestante, le schistosomule. Pour ce faire, en étroite collaboration avec le Dr. J-M Grzych, des populations d'éosinophiles de rats ont été purifiées puis incubées 48 heures en présence de chaque sérum et de schistosomules "peau" (figure 6).

Des trois sérums seul le sérum dirigé contre la fraction P28 a montré une capacité à détruire les schistosomules en coopération avec des cellules effectrices. Après 6 essais réalisés en double, l'activité létale du sérum anti-P28 s'est située entre 38.0 ± 10.0 et $65.5 \pm 5.5\%$. Ces valeurs n'ont de sens que rapprochées des valeurs obtenues avec des sérums d'infection lesquels ont induit, dans des conditions expérimentales similaires, 41.0 ± 10.0 à $85.5 \pm 5\%$ de mortalité parmi les schistosomules. L'activité des sérums dirigés contre les deux autres fractions antigéniques est restée du niveau de celle obtenue avec des sérums de rat immunisés avec de l'adjuvant complet de Freund seul soit de l'ordre de 0 à $10 \pm 5\%$ de mortalité larvaire.

D'autre part, l'incubation des parasites en présence des seuls sérums, préalablement décomplémentés, n'a pas

révéle une activité cytocide intrinsèque, confortant ainsi l'effet de coopération entre sérums et cellules effectrices.

Au-delà des variations d'activité, enregistrées entre chaque expérience, et associées dans la plupart des cas à des niveaux d'activité variables de la population éosinophile elle-même, ces premiers résultats indiquaient que tout ou partie de la fraction P28 isolée à partir d'un homogénat de vers adultes était capable d'induire une réponse anticorps létale pour le parasite.

C'est donc naturellement vers cette fraction antigénique du parasite qu'ont porté nos efforts de recherche.

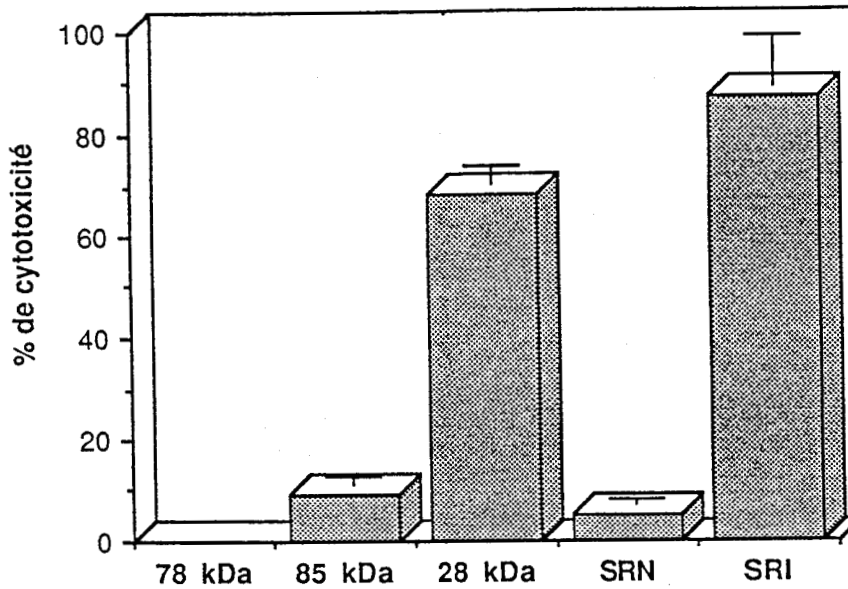


Figure 6. Activité biologique des sérums de rats Fischer anti-P28, P78, P85 en présence de populations de cellules effectrices, enrichies en éosinophiles, provenant de rats sains.

La réaction est réalisée à raison de 6000 cellules effectrices (cellules provenant du péritoine de rats LOU) pour un schistosomule durant 48 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Le pourcentage de cytotoxicité est exprimé comme un rapport du nombre de schistosomules morts sur le nombre total de schistosomules.

III ETUDE DES ANTIGENES DE LA FRACTION DE 28000 DALTONS DE S.MANSONI

1. Analyse des antigènes reconnus par les anticorps de rats

L'électrophorèse bidimensionnelle en conditions dénaturantes initiée par O'Farrell dès 1975 (65) consiste à réaliser successivement une focalisation isoélectrique en présence d'urée 9M suivi d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS. Des études en électrophorèse bidimensionnel des complexes immuns formés par l'incubation soit d'un homogénat de protéines de vers adultes marquées par la méthionine 35S (Fig. 7a), soit de polypeptides synthétisés en système acellulaire à partir d'ARN messenger de vers adultes (Fig. 7b), soit encore d'un extrait de la surface du schistosomule (Fig. 7c) avec des sérums de rats immunisés avec la fraction P28 isolée sur gel de polyacrylamide, montre l'existence de deux polypeptides. Leur masse moléculaire apparente est de 28000. Leurs points isoélectriques sont par ailleurs extrêmement proches et situés aux valeurs 6.3 et 6.5 du gradient de pH.

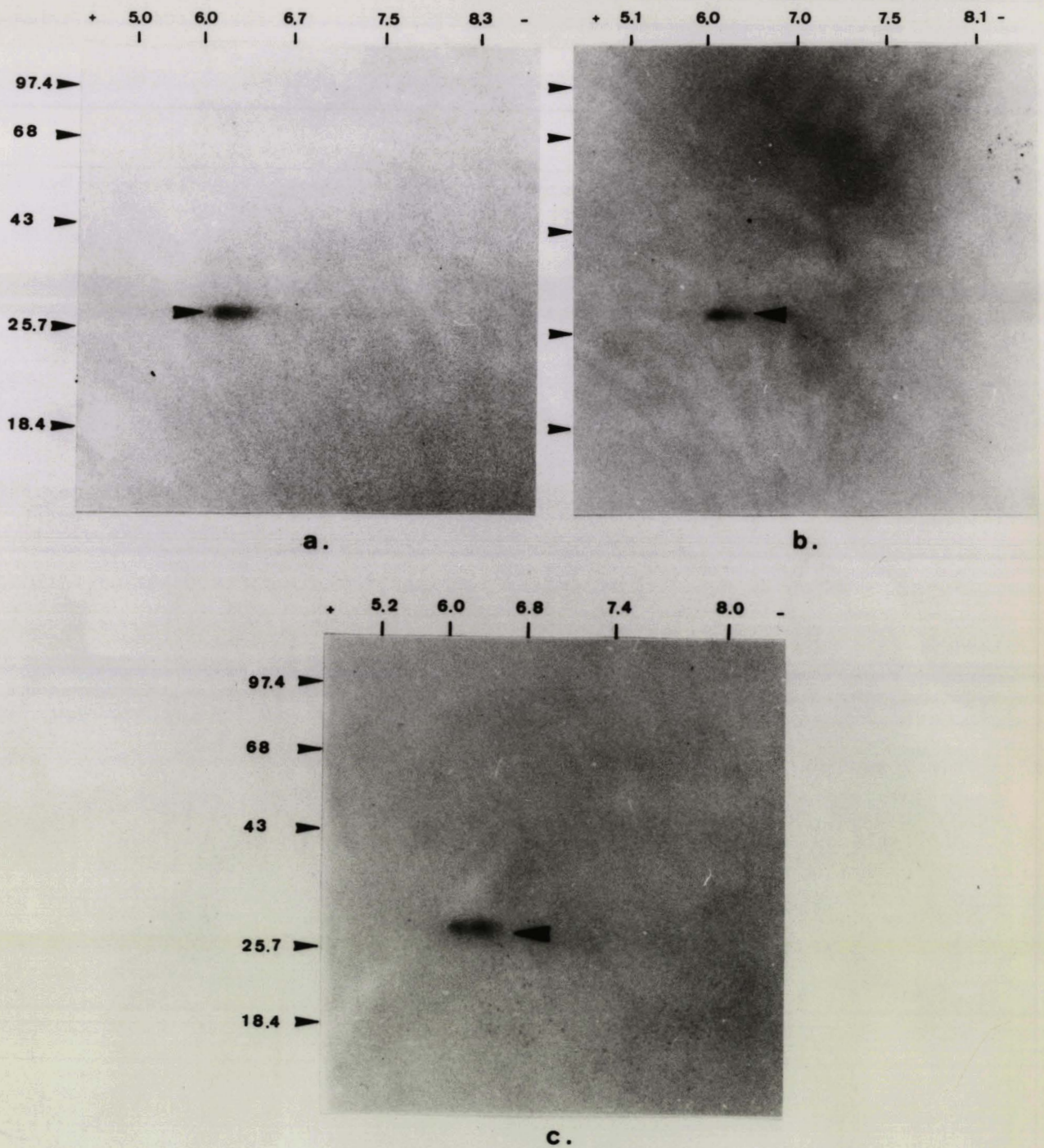


Figure 7. Analyse bi-dimensionnelle des composants immunogéniques de la fraction P28 de *S.mansoni*.

(a) Les antigènes isolés à partir des protéines totales de vers adultes préalablement marqués à la méthionine ^{35}S par 10 μl de sérum anti-P28 ont été séparés successivement par électrofocalisation (gradient de pH 4.8-9.0) puis électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS 13%. (b) antigènes isolés par 10 μl de sérum anti-P28 à partir de produits de traduction *in vitro* d'ARN total de vers adultes de *S.mansoni*. (c) antigènes isolés par 10 μl de sérum anti-P28 à partir des composants de surface de 10000 schistosomules préalablement marqués à l'iode 125 par la lactoperoxydase puis solubilisés à 0°C par du Nonidet P40 0.5%.

2. Localisation "géographique" des antigènes de 28000 Daltons sur le ver adulte et le schistosomule de Schistosoma mansoni

Une première expérience réalisée sur des parasites entiers (vers adultes ou schistosomule) n'a, à notre grande surprise, au vu des résultats obtenus lors du marquage à l'iode des téguments de la larve infestante, pas permis de mettre en évidence une fluorescence de surface positive significative.

Au niveau de coupes transversales de parasites (Fig. 8), il apparaît que la distribution des antigènes de la fraction P28 est ubiquitaire et parenchymateuse, que ce soit au niveau du ver adulte (Fig. 8 A) ou au niveau du schistosomule (Fig. 8 B). Toutefois, les antigènes se trouvent fortement concentrés au niveau des épines dorsales du parasite mature, lieu d'échanges privilégié avec le biotope (Fig. 8 A sp).

De fait, il nous fallait admettre, à ce stade, qu'un ou des antigènes qui ne sont pas, à proprement parler des antigènes de surface, se trouvent, par des mécanismes d'excrétion ou de sécrétion, exposés transitoirement à la surface de la larve, et que ce caractère "transitoire" est suffisamment "permanent" pour que ces antigènes soient reconnus comme cibles par les mécanismes effecteurs de l'hôte.

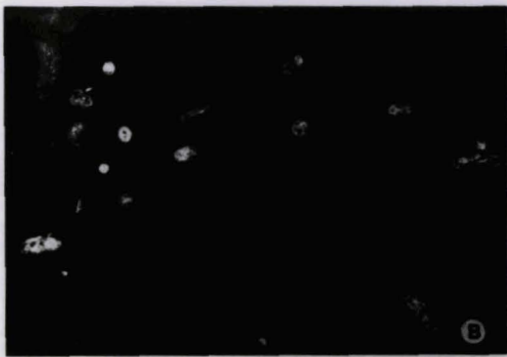
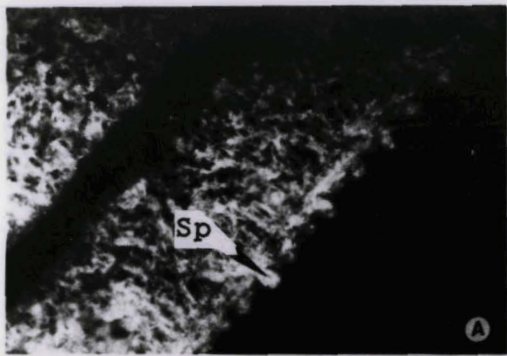


Figure 8. Localisation des antigènes de la fraction P28 de S.mansoni au niveau des tissus du parasite

Des coupes transversales de vers adultes (A,C) ou de schistosomules (B,D) sont incubées en présence de sérums de rats de spécificité restreinte à la fraction P28 (A,B) ou en présence de sérums de rats sains (C,D). Les complexes immuns constitués sont révélés par incubation avec des anticorps anti-immunoglobulines de rats marqués à la fluorescéine. Les antigènes de la fraction P28 se trouvent fortement concentrés au niveau des épines dorsales du parasite comme en atteste l'intensité de la fluorescence à ce niveau (A Sp.).

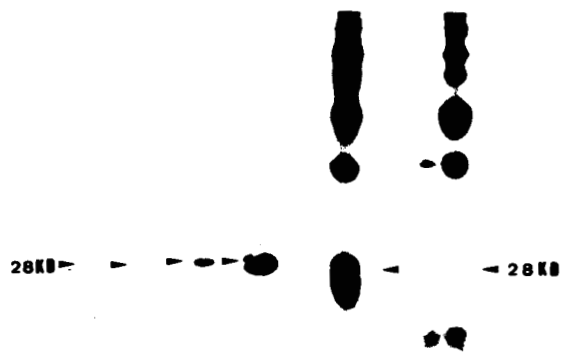
IV ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTI-SCHISTOSOME DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DIRIGEE CONTRE LA FRACTION P28 DE S.MANSONI

1. Etude cinétique de la réponse humorale anti-fraction P28

La fraction antigène ,préparée en gel de polyacrylamide SDS-PAGE, a été inoculée à des rats Fischer femelles en présence d'adjuvant complet de Freund soit en injection sous-cutanée, soit en injection intrapéritonéale. Après deux injections à 14 jours d'intervalle les animaux ont été saignés de manière hebdomadaire. La présence d'anticorps de classe G a été testée par incubation des sérums avec un homogénat de vers adultes préalablement marqués à la méthionine ³⁵S et de protéine A - sépharose préincubée avec des anticorps anti-IgG de rat. La spécificité de ces anticorps a été mise en évidence par l'analyse des complexes immuns constitués.

1.1 Les résultats d'immunisation par voie sous-cutanée sont montrés figure 9. La réponse anticorps de nature IgG (fixation sur protéine A-sépharose pré-incubée avec un sérum de lapin anti-IgG de rat) apparaît après deux injections de 100 µg chacunes à 15 jours d'intervalles et double en intensité après une quatrième injection (Fig. 9a). Au-delà l'injection répétée d'antigène provoque une suppression totale de cette réponse humorale. L'activité biologique de cette réponse anticorps a été analysée in vitro comme précédemment. L'activité

a.



b.

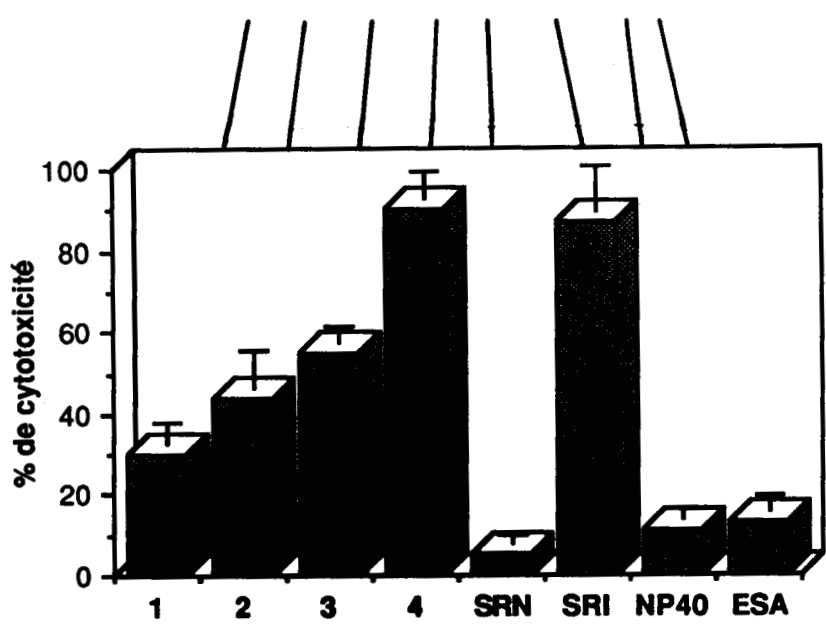


Figure 9. Etude de la réponse humorale déclenchée lors de l'injection de la fraction P28 par voie sous-cutanée.

a) Complexes immuns formés par incubation d'antigènes obtenus par marquage métabolique de vers adultes avec des sérums anti-P28 (1: une injection de 100µg, 2: deux injections à 15 jours d'intervalle, 3: trois injections, 4: quatre injections), un sérum de rat sain (SRN), un sérum d'infection de rat (SRI), ou des sérums dirigés contre soit un extrait NP40 de vers adultes, soit une fraction d'antigènes solubles de vers (ESA). b) Activité biologique in vitro des sérums précités caractérisée par leur potentiel d'activation de l'activité cytotoxique d'éosinophiles de rats sains.

stimulatrice de la fonction cytocide d'éosinophiles de rats sains vis-à-vis du schistosomule ne cesse d'augmenter jusqu'à la quatrième injection d'antigène entraînant dans le meilleur des cas 80% de destruction des larves, résultat sensiblement égal à celui obtenu avec un sérum d'infection (Fig.9b). Aucune activité n'a non plus été enregistrée avec des sérums dirigés contre des extraits détergents de vers adultes (Fig. 9 ligne NP40) ou dirigés contre un homogénat brut de vers (Fig. 9 ligne ESA). Les sérums anti-ESA ne semblent différer des sérums d'infection que par leur inaptitude à reconnaître un groupe d'antigènes de masse moléculaire apparente comprise entre 20 et 30 kDa.

1.2 Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'injection de la fraction P28 par voie intrapéritonéale (Fig. 10), mais avec des doses d'antigènes deux fois plus faibles (50µg par injection et par rat). La présence d'anticorps de classe G anti-fraction P28 de S.mansoni est révélée dès la première semaine suivant la seconde injection et se maintient lors des injections suivantes jusqu'à la 4^{ème} inoculation. A ce point précis, la réponse anticorps chute brutalement et la réponse humorale n'est plus stimuable par de nouvelles injections d'antigène (Fig. 10a). Ce phénomène d'induction d'une tolérance apparente, vis-à-vis des antigènes P28, chez la population animale après de multiples injections

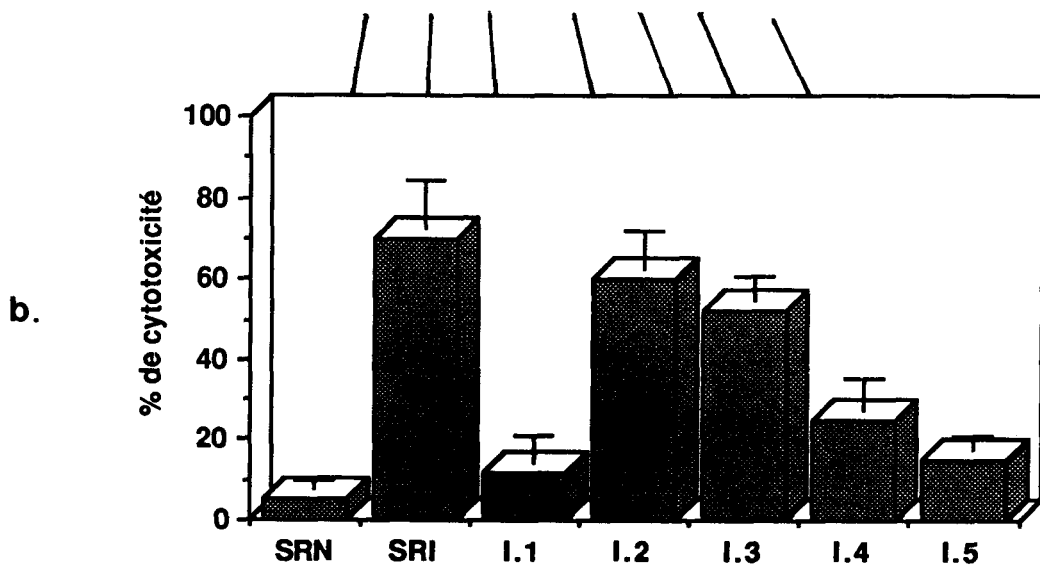


Figure 10. Analyse de la réponse humorale anti-P28 après inoculation par voie intra-péritonéale

Les sérums obtenus après une (I.1), deux (I.2), ..., cinq (I.5) injections de 50µg d'antigènes de la fraction à 15 jours d'intervalle ont été utilisés pour immunoprécipiter les antigènes produits par marquage métabolique d'une population mixte de vers adultes (a) puis utilisés comme précédemment dans des tests de cytotoxicité impliquant des éosinophiles intrapéritonéaux de rats sains. (b)

d'antigène s'exprime également au niveau de l'activité biologique des sérums (Fig. 10b). Deux situations différentes sont observées en fonction du nombre d'injections. Les groupes de sérums obtenus après deux et trois injections montrent une importante capacité à détruire, les schistosomules, en coopération avec les éosinophiles. Les niveaux de cytotoxicité des sérums sont du même ordre que ceux obtenus précédemment soit 65-70 %. Après la 3^{ème} injection, alors que la réponse anticorps semble se maintenir, l'activité cytotoxique des sérums chute aux alentours de 35% puis disparaît en même temps que la réponse humorale après la cinquième injection.

Si les mécanismes aboutissant, en fonction d'un mode de présentation particulier de l'antigène, à tel ou tel état d'immunité sont encore mal connus, il ressort des résultats précédents deux faits capitaux:

- deux injections d'antigènes sont nécessaires et suffisantes pour induire un état d'immunité propre à détruire les schistosomules;

- la voie d'injection influe sur la dose d'antigène requise pour déclencher une réponse humorale détectable;

- l'inoculation répétée d'antigènes de la fraction P28 aboutit à un état de tolérance avec pour conséquence immédiate la disparition de la réponse humorale spécifique.

2. Etude des isotypes impliqués dans la réponse humorale des animaux vaccinés avec la fraction P28 de S. mansoni

Des expériences de déplétion et de compétition ont été réalisées afin de déterminer les isotypes impliqués dans le déclenchement de l'activité cytotoxique des cellules effectrices vis à vis du schistosomule.

Lors de vaccination en présence d'adjuvant complet de Freund, il apparaît que l'isotype majeur impliqué dans le déclenchement de l'activité cytotoxique des éosinophiles est IgG2a comme le montre la figure 11. Le pourcentage de mortalité des schistosomules est réduit de près de 60% lorsque les éosinophiles sont préincubés avec une IgG2a myélomateuse non spécifique et préalablement agrégée selon le protocole expérimental décrit par M. Capron et coll (34). Ce résultat indique que dans les conditions de vaccination faisant appel à l'adjuvant complet de Freund dans le modèle rat Fischer, l'isotype majeur impliqué dans la destruction du parasite in vitro est de nature IgG2a.

Des expériences de cytotoxicité ont également été réalisées, en parallèle, avec deux autres types de cellules effectrices: macrophages et plaquettes (ces dernières n'étant pas à proprement parler des cellules au sens strict). Les sérums obtenus après deux injections d'antigènes de la fraction P28 (I.2) ont activé la fonction cytotoxique des plaquettes sanguines provenant de rats sains induisant la destruction des schistosomules

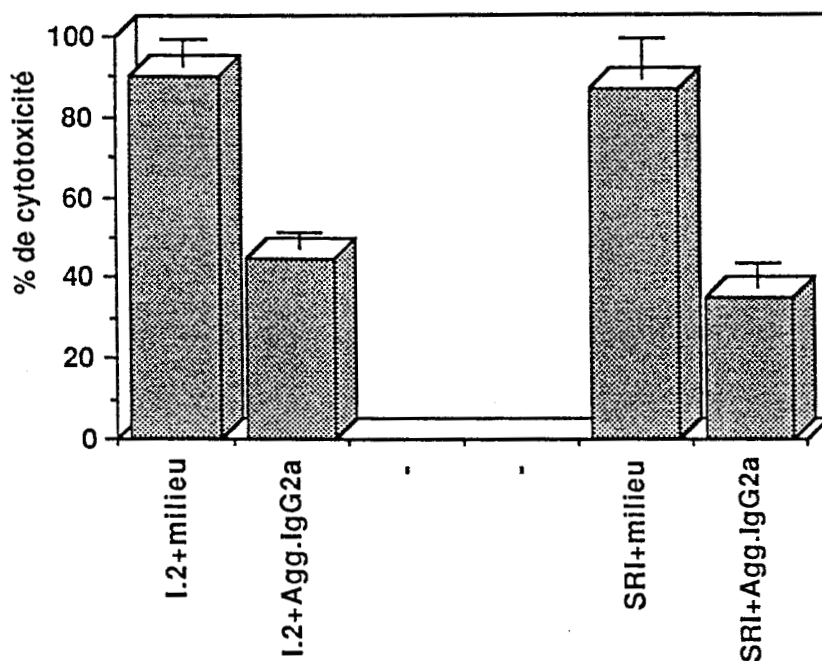


Figure 11. Isotype impliqué dans le mécanisme d'ADCC déclenché par les sérums anti-(P28 + adjuvant complet de Freund)

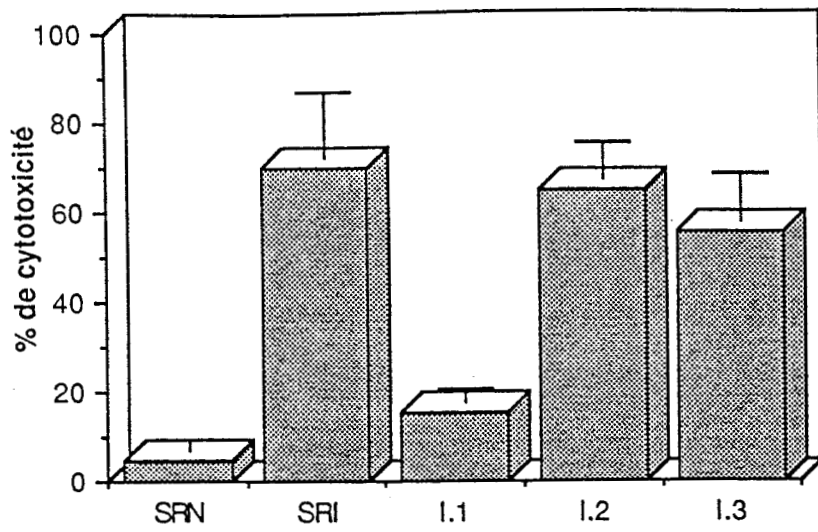
L'expérience est réalisée avec un sérum de rat Fischer anti-P28 obtenu après deux injections d'antigènes (I.2). Les éosinophiles ont été préalablement incubés durant deux heures soit dans le milieu de culture seul (Minimum Essential Medium MEM), soit en présence d'IgG2a myéломateuses agrégées (100µg d'immunoglobulines/300000 cellules). Les sérums de rats d'infection SRI, ou de rats immunisés I.2 sont ajoutés à une dilution finale de 1/16ième.

avec un pourcentage d'efficacité de l'ordre de $70\pm 10\%$. (Fig. 12b). Ce pourcentage est équivalent à celui obtenu avec des populations cellulaires enrichies en éosinophiles intra-péritonéaux de rats (Fig. 12a). Cette activité décroît très rapidement après la troisième injection d'antigène pour s'annuler totalement au-delà. L'activité de ces sérums avec des macrophages est restée assez moyenne avec un taux de mortalité du parasite de l'ordre $40\pm 10\%$ et dans tous les cas très inférieur à la mortalité induite par un sérum d'infection dans les mêmes conditions expérimentales (Fig. 12c).

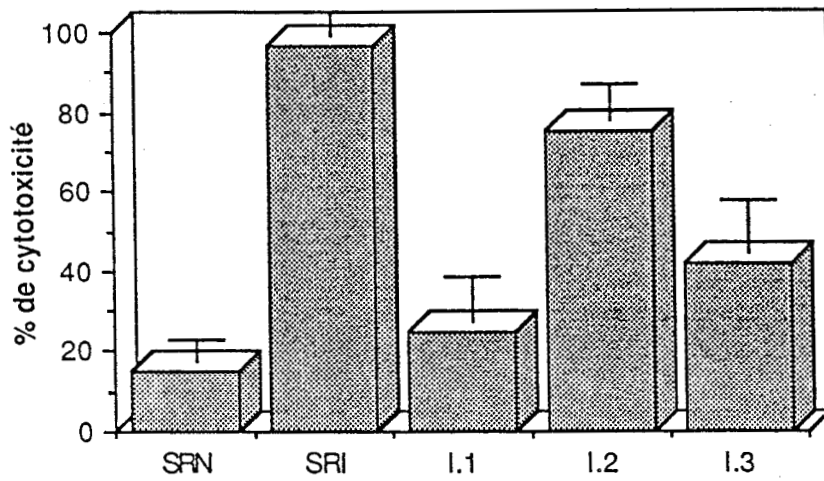
Les travaux démontrant une relation privilégiée entre les anticorps de classe E avec ces types cellulaires, dans le déclenchement d'une cytotoxicité anti-parasitaire (45,46), laissaient supposer que des anticorps de cette nature étaient impliqués. Il ne nous a néanmoins pas été possible de détecter lors d'expériences de "Western Blot" la présence d'anticorps de classe IgE spécifiquement dirigés contre les antigènes de la fraction P28.

A ce stade de l'expérience nous en sommes restés au domaine des hypothèses pour expliquer cette activation des plaquettes par les sérums anti-P28: soit que des quantités infimes, même non détectables par les techniques en vigueur, suffisent à activer les fonctions effectrices de certains types cellulaires, soit encore que cette activation passe par d'autres facteurs sériques pouvant provenir par exemple de l'activation par la fraction P28

a. Cytotoxicité dépendante d'éosinophiles



b. Cytotoxicité dépendante de plaquettes



c. Cytotoxicité dépendante de macrophages

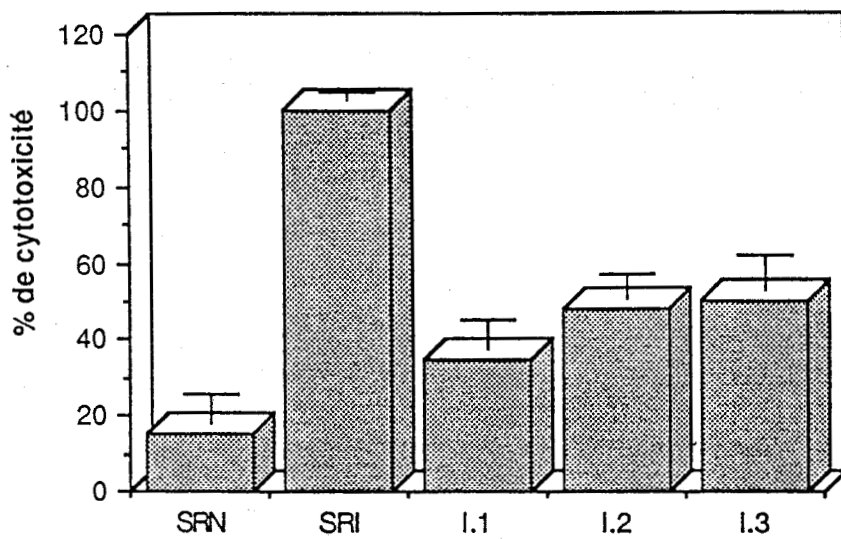


Figure 12. Analyse comparée de la réponse humorale anti-P28 dans trois des principaux modèles de cellules effectrices: éosinophiles, plaquettes, macrophages.

de certaines populations lymphocytaires et en particulier
des lymphocytes d'origine thymiques (66,67,68).

3. Expériences de transfert passif de sérums anti-P28 à des rats Fischer sains

Des groupes de cinq rats Fischer ont été exposés à une infection d'épreuve, par 1000 furcocercaires de S.mansoni, suivie, après un délai de trois heures, d'une injection intra-veineuse de 1.5ml soit des sérums anti-P28 dont nous venons de voir l'activité in vitro, soit de sérums de rats sains à titre de contrôle.

Les résultats sont montrés figure 13. Ce que nous avons obtenu lors de l'expérimentation in vitro, se trouve largement reproduit ici in vivo. Le sérum obtenu après deux injections de 50µg d'antigènes P28 (Fig.13 I.2) confère le meilleur niveau d'immunité anti-schistosome avec une réduction de la charge parasitaire d'environ 65±10% par rapport aux animaux contrôles ayant reçu du sérum sain. L'effet négatif du surdosage des antigènes est également reproduit avec une perte importante du pouvoir protecteur des sérums obtenus après plus de trois injections d'antigènes. (Fig 13 sérums I.4, I.5).

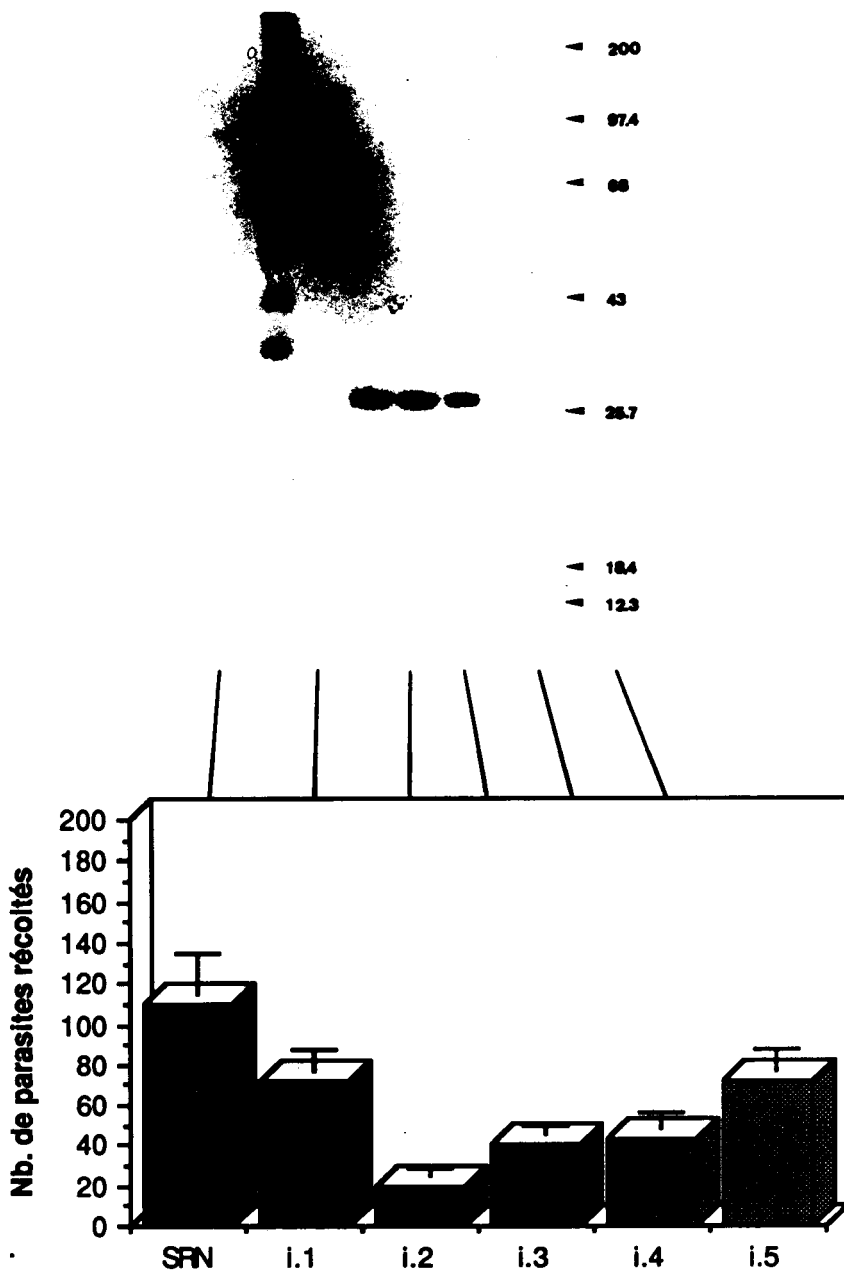


Fig 13. Expérience de transfert passif de sérums anti-P28

Les sérums I.1-I.5 dirigés contre la fraction P28 de S.mansoni purifiée par SDS-PAGE ont été transférés à des rats préalablement infestés (3 heures auparavant). 21 jours après le transfert, les animaux ont été sacrifiés. Les vers en cours d'évolution ont été récoltés par perfusion portale des foies puis comptés. Le pourcentage de protection a été établi par rapport au nombre de vers recueillis chez les animaux contrôles.

4. Expériences de vaccination sur Rongeurs utilisant la fraction P28 de S.mansoni

Nous appuyant sur les résultats précédemment obtenus dans les modèles in vitro, nous avons vacciné des populations d'hôtes semi-permissifs (rat Fischer) et d'hôtes permissif (souris Balb/c). Les animaux ont reçu par voie intrapéritonéale deux injections de 50 µg d'antigène dans le cas des rats et de 50 ng dans le cas des souris puis 4 semaines après la seconde injection les animaux ont subi une infection d'épreuve. Deux types d'adjuvants ont été employés: soit comme précédemment l'adjuvant complet de Freund, soit l'hydroxyde d'aluminium couramment employé dans la vaccination humaine. La figure 14 montre les résultats indiquant le nombre de parasite collectés après perfusion des animaux.

Chez le rat (hôte semi-permissif):

Que la fraction antigénique soit présentée en présence d'Adjuvant Complet de Freund ou en présence d'hydroxyde d'aluminium, les pourcentages de protection se sont révélés extrêmement élevés, de l'ordre de 50-70% .

Les rats vaccinés soit avec la fraction P78 ou la fraction P85 n'ont montré aucune réduction de la charge parasitaire comparativement aux animaux contrôles. Dans le cas de l'antigène P78 une augmentation, de l'ordre de 25-30% de la permissivité des animaux vis-à-vis de S.mansoni a été enregistrée lors de toutes les

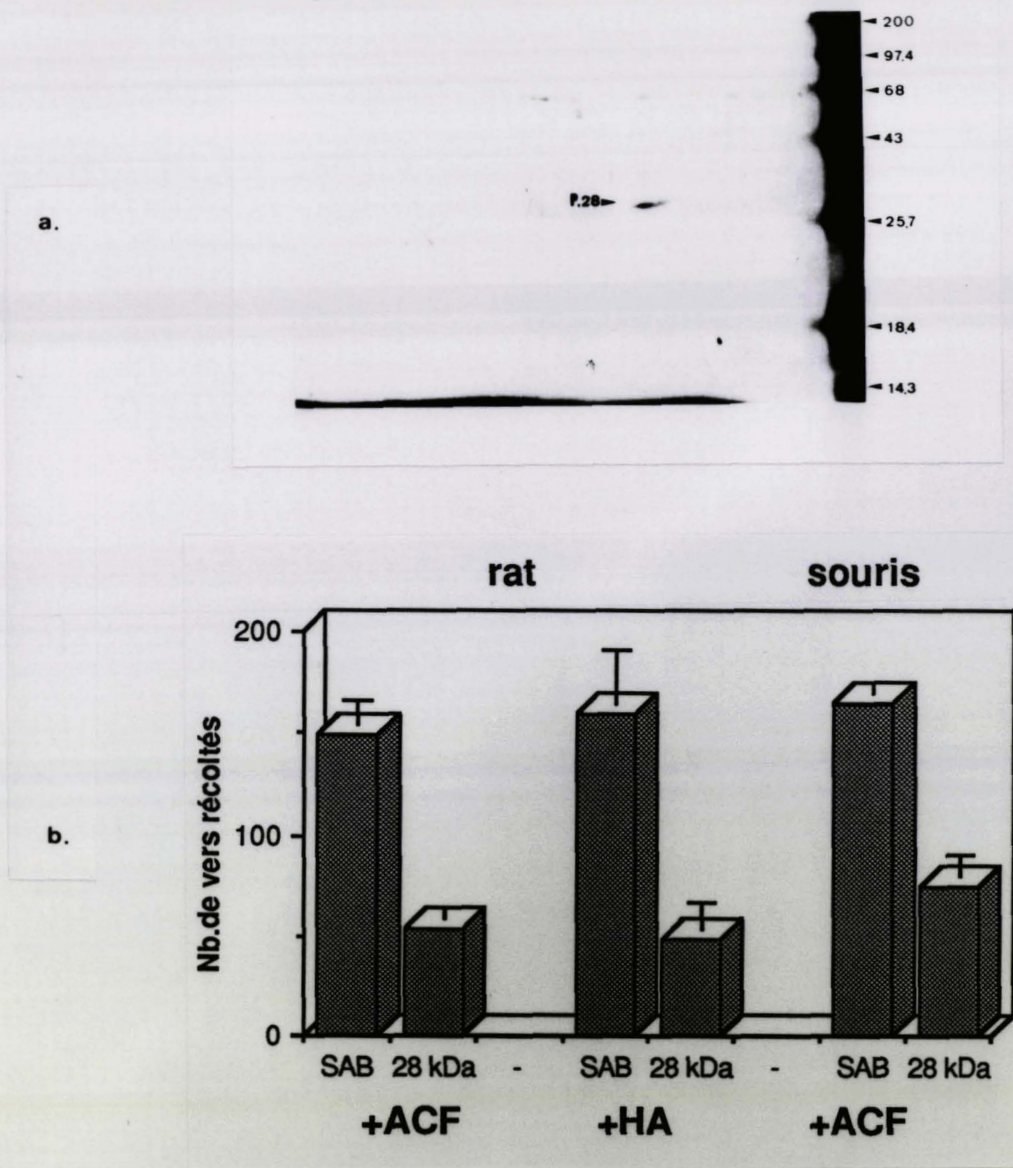


Figure 14. Vaccination de rats Fischer et de souris Balb/C par la fraction P28 de S.mansoni purifiée en SDS-PAGE

a) Analyse en gel bidimensionnel dans les conditions décrites par O'Farrell de la fraction antigénique électroéluée.

b) Nombre de vers recueillis après perfusion: SAB, groupe d'animaux vaccinés par la sérum albumine bovine soit en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF) soit en présence d'hydroxyde d'aluminium (HA); 28 kDa groupe d'animaux vaccinés avec la fraction P28. Les rats ont reçu deux injections de 50µg de protéines par voie intrapéritonéale, les souris ont reçu deux injections de 50ng par voie intrapéritonéale.

expériences.

Chez la souris (hôte permissif) :

Les pourcentages de protection ont été de beaucoup inférieurs à ceux obtenus dans le précédent modèle. Néanmoins les valeurs de 40-43% de réduction de la charge parasitaire sont du même ordre de grandeur que celles enregistrées lors d'expériences de vaccination faisant appel à des antigènes purifiés (63,59).

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que tout ou partie des antigènes de la fraction P28 de S.mansoni est capable de provoquer une réponse immunitaire fortement protectrice vis-à-vis du parasite.

La nature protéique de ces antigènes permettait d'envisager leur production par les méthodes du génie génétique.

Un dernier point restait toutefois à établir. Les schistosomes ont subi comme toute espèce vivante une évolution qui, de l'unité, a conduit à une diversité de formes. Il était donc fascinant de savoir si ce groupe d'antigènes inducteurs d'une réponse immunitaire protectrice vis-à-vis d'une espèce particulière de schistosomes, en l'occurrence S.mansoni, se trouvait être conservé chez d'autres formes majeures du parasite tel que S.haematobium, S.japonicum, ou encore S.bovis qui affecte gravement les zones d'élevage. La figure 15 montre que les sérums dirigés contre la fraction P28 de S.mansoni reconnaissent des antigènes de 28000 Daltons parmi des extraits solubles de vers adultes de S.japonicum (Fig.15 piste 4) et de S.bovis (Fig.15 piste 6). L'expression de ce groupe d'antigènes chez S.haematobium est plus délicate à affirmer bien qu'ayant obtenu des signaux positifs ceux-ci sont d'intensité trop faible pour être montrés ici.

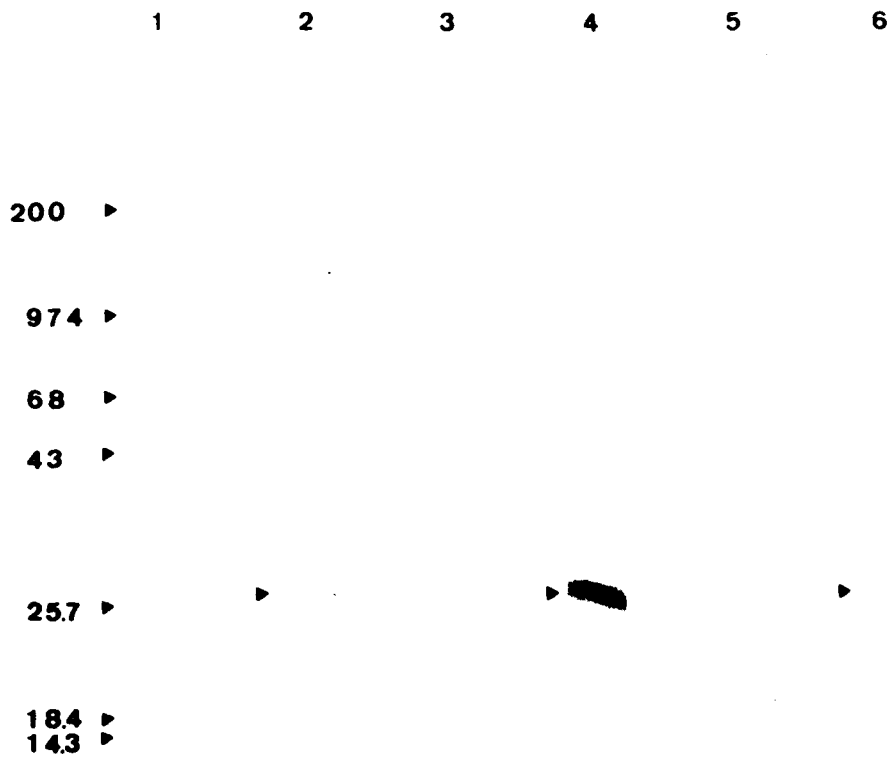


Figure 15. Analyse de l'expression des antigènes de la fraction P28 de S.mansoni chez les autres formes majeures de la schistosomiase.

Des homogénats solubles de vers adultes de S.mansoni (1,2), de S.japonicum (pistes 3,4), et de S.bovis (pistes 5,6) ont été fractionnés sur gel de polyacrylamide 13% puis transférés sur feuille de nitrocellulose. Les antigènes ainsi fixés ont été incubés soit en présence de sérum de rat sain (pistes 1,3,5), soit en présence de sérum anti-fraction P28 de S.mansoni (pistes 2,4,6).

V. CLONAGE DES ANTIGENES P28 DE SCHISTOSOMA MANSONI

Ayant ainsi identifié une fraction antigénique de S.mansoni à pouvoir vaccinant, tout au moins dans les modèles de rongeurs considérés, et présente dans différentes espèces de schistosomes, nous avons en collaboration avec P. Sondermeyer, du laboratoire de Biologie Moléculaire de Transgène à Strasbourg, réalisé le clonage moléculaire et l'expression en vecteur plasmidique de ces antigènes P28 reconnus par les sérums de rats exprimant le meilleur degré de résistance à l'infection par S.mansoni.

1. Sélection de clones phagiques (lambda gt11) exprimant les antigènes de la fraction P28

L'étape initiale de construction de la librairie d'ADNc est fort proche de celle employée par Efstradiatis (69) et Williams (70). L'ADN complémentaire double brin fut préalablement fractionné sur gradient isocinétique (sucrose 5-20%) afin d'optimiser la taille des fragments clonés dans le vecteur lambda. Les fractions correspondant à des fragments d'ADNc de 500-4000 paires de bases ont été regroupées. Les extrémités de l'ADNc ont été allongées de 10-15 résidus de dG en utilisant la terminale transférase. (71)

Le criblage de la banque d'ADNc a été réalisé à faible dilution des phages. Les sérums de rats et de lapins

dirigés contre la fraction P28 produite après fractionnement en SDS-PAGE ont permis d'identifier deux populations de clones. La première contient l'ADNc, codant pour un antigène reconnu par les sérums des deux espèces, et que nous avons dénommée P28.I; la seconde contenant l'ADNc codant pour un antigène reconnu uniquement par le sérum des rats vaccinés avec la fraction SDS-PAGE P28 et dénommée P28.II. Les premiers ADNc isolés ont été analysés en gel d'agarose comme il est montré figure 16.

Le fait que l'antigène P28.I soit reconnu concomitamment par deux espèces animales a été considéré par nous comme un gage d'immunogénicité non restreinte à une espèce animale particulière. Nous avons donc en premier lieu étudié la nature et l'activité biologique de cet antigène.

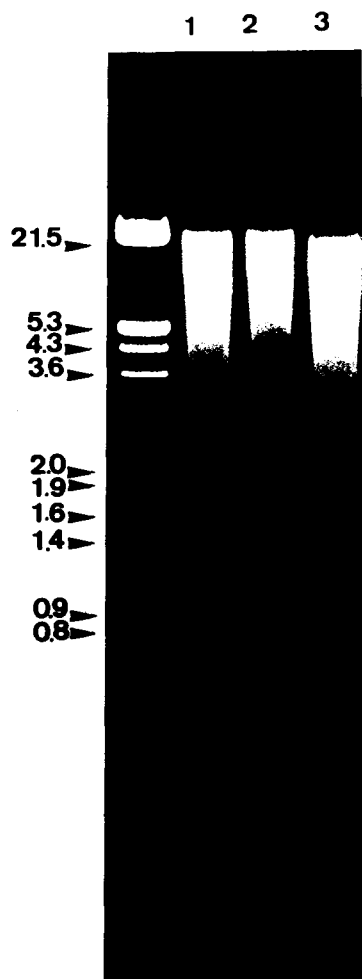


Figure 16 Analyse de l'ADNc de S.mansoni intégré au phage lambda gt11 codant pour les antigènes de la fraction P28

Trois clones phagiques, sélectionnés pour leur capacité à exprimer les antigènes P28, ont été amplifiés en culture liquide sur E.Coli Y1090. Après lyse, les phages ont été purifiés et l'ADN du phage lambda gt11 extrait. Les produits de la digestion par EcoRI de l'ADN phagique ont été analysés sur gel d'agarose 1% en tampon Tris 89mM, EDTA 2.5 mM, Borate 89mM, pH 8.3. PM: ADN de phage lambda sauvage coupé successivement par HindIII et EcoRI; (1) clone TG06 sélectionné par les sérums de rats et de lapins anti-P28 (P28.I); (2) clone TG07 sélectionné par les seuls sérums de rats (P28.II); (3) clone TG08 sélectionné par les sérums de rats et de lapins (P28.I)

2. Etude de l'antigène P28.I de la fraction P28

2.1 Etude de la séquence de l'antigène P28.I

De ce premier criblage trois candidats indépendants lambda TG06, lambda TG08, lambda TG09 ont été sélectionnés et séquencés suivant la technique de la terminaison de chaîne, subséquemment après clonage dans le vecteur M13.

Un oligonucléotide synthétisé à partir de la séquence de l'ADNc du clone lambda TG06 a été utilisé pour un nouveau criblage de la banque d'ADNc mais cette fois contenue dans lambda gt10. De ce criblage, deux clones dénommés lambda TG10 et lambda TG11 ont été isolés et séquencés. Les zones de recouvrement des séquences des portions d'ADNc contenues dans chacun de ces clones sont montrés figure 17a..

Nous avons ainsi pu reconstituer un ADNc d'une longueur de 783 paires de bases suivi d'une queue poly-(A). La traduction de la séquence ayant son origine à partir de la méthionine située en position 7 donne par déduction une protéine composée de 211 acides aminés avec une masse moléculaire relative de 23000. (Fig. 17b)

L'identité entre cet antigène cloné dans E.Coli et la fraction P28 de S.mansoni purifiée en SDS-PAGE a été par la suite confirmée par des segments de séquence obtenus à partir de fragments de protéolyse trypsique de l'antigène

P28 électroélué, purifié sur HPLC en phase inverse (Figure 17b). Ces fragments correspondent à différentes zones de la séquence de l'ADNc. Aucune séquence répétitive n'a pu être mise en évidence. D'autre part, nous n'avons pu mettre en lumière aucune séquence "signal" (message peptidique situé du côté de l'extrémité N-terminale de la protéine permettant l'insertion de la protéine dans la membrane).

Ce point pose à nouveau le problème du transport de l'antigène P28.I vers la surface du parasite et de son accessibilité aux anticorps de l'hôte.

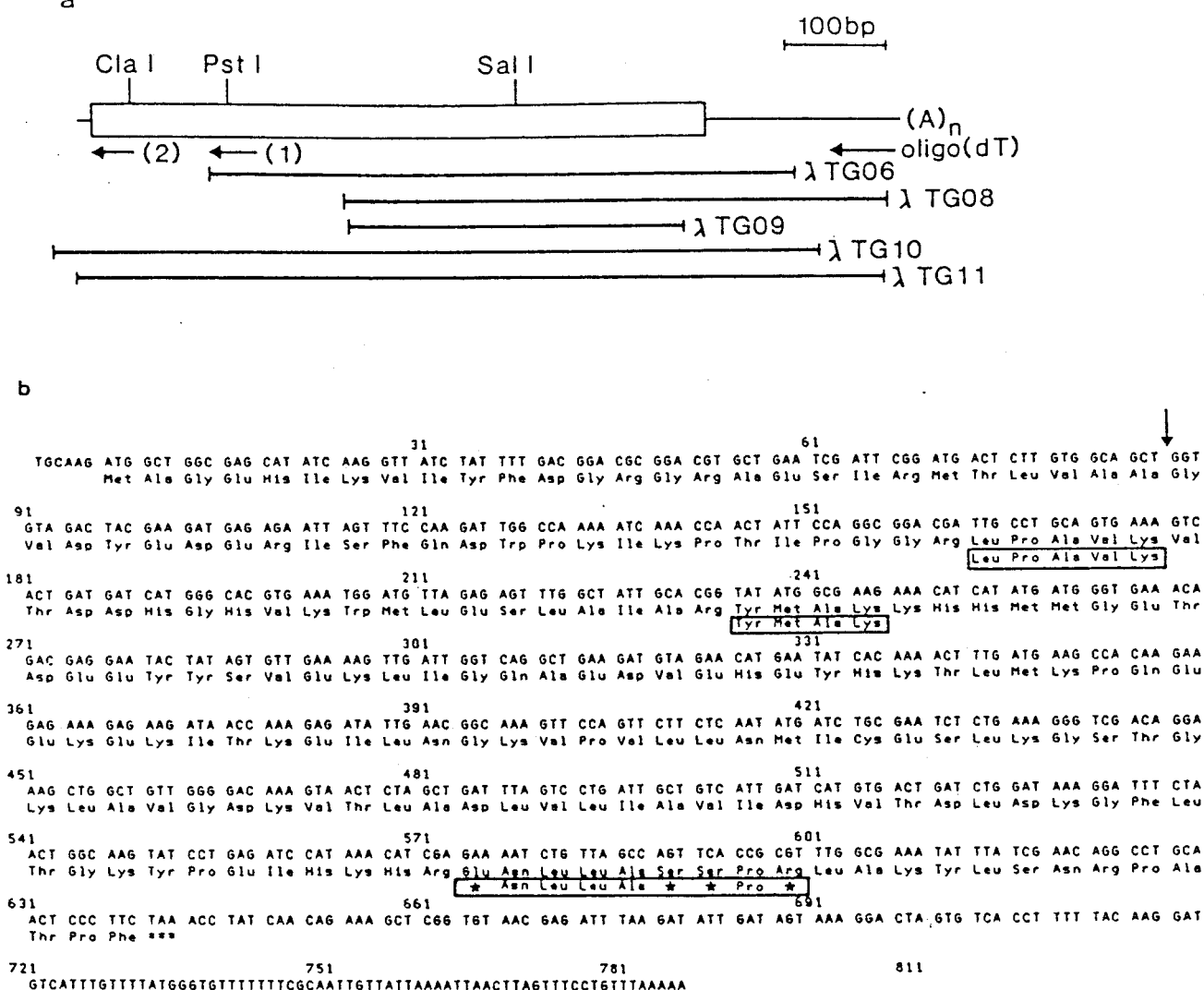


Figure 17 Séquence nucléotidique et protéique de l'antigène P28.I de Schistosoma mansoni

a) Position relative des différents ADNc des clones lambda correspondant à tout ou portion de l'ARN messenger codant pour l'antigène P28.I. Les flèches signalées par (1), (2) figurent les oligonucléotides de synthèse qui ont été utilisés pour la sélection des clones lambda TG10 et TG11;

b) Séquence nucléotidique et protéique (déduite de la précédente) de l'antigène P28.I. Les séquences encadrées représentent les séquences de trois peptides, issus de la digestion trypsique de la fraction P28, produite par SDS-PAGE à partir d'un homogénat de vers adultes de S. mansoni. Les positions étoilées représentent les résidus non identifiés.

2.2 Etude de la fonction de l'antigène P28.I

La comparaison de la séquence de l'antigène P28.I avec celles d'autres séquences protéiques, par l'équipe du Pr. B. Ketterer du Middlesex Hospital Medical School de l'Université de Londres, nous a permis de découvrir un certain degré d'homologie séquentielle avec une enzyme impliquée dans des processus d'oxydo-réduction : la glutathion transférase (Figure 18a). Plus que d'une enzyme il s'agit d'une famille polymorphe, codée par une famille de gènes ayant probablement un ancêtre commun. L'antigène P28.I présente une homologie avec ces différentes formes. Chez le rat trois familles multigéniques de glutathion-S transférases ont été décrites (72). L'antigène P28.I présente une homologie mixte avec les 1/2 et 3/4 dont, en particulier, 75% d'homologie avec l'extrémité N-terminale de la forme 1 correspondant au deuxième exon du gène de structure codant pour la glutathion-S-transférase de rat forme 1 (73). Par ailleurs des tests enzymatiques réalisés par A. Vidal, (Transgène), sur des lysats clarifiés de cultures bactériennes contenant le plasmide à promoteur PL intégrant l'ADNc P28-I a révélé que l'antigène recombinant était effectivement fonctionnel et montrait une forte activité " glutathion-S-transférase" (figure 18b).

Dès lors, il était crucial dans l'optique de notre approche vaccinale d'analyser l'existence d'une réaction épitopique croisée avec les glutathion-S-transférases des

hôtes vertébrés et principalement celles de l'homme. L'enzyme associée à l'activité glutathion-S-transférase de S.mansoni a été préalablement purifiée à partir d'homogénat de vers adulte . Des expériences de "Western blot" ont confirmé (Fig.19a) que l'antigène P28-I était bien responsable de cette activité enzymatique chez le parasite, la fraction purifiée, sur colonne de glutathion, à partir d'un homogénat de vers adultes de S.mansoni, étant reconnu par des sérums de rats anti-P28.I.

Des expériences de reconnaissance des différentes glutathion-S-transférases (Rongeurs et Homme figure 19b) par les anticorps de classe G n'ont montrée aucune réactivité épitopique croisée majeure avec les enzymes des hôtes putatifs de S.mansoni (Fig. 19c).

Les antigènes fixés sur feuille de nitrocellulose, ayant préalablement été incubés avec les sérums anti-P28.I, ont été mis en contact avec des sérums de lapin anti-gluthation-S-transferases de rat (famille 1 et 2). La figure 19d montre qu'il existe une forte communauté antigénique entre les glutathion-S-transférases de rat et la glutathion-S-transférase humaine Pi.

	résidu		
	N°		
<u>S.mansoni</u>	9	Y F D G R G R A E S I R M T L V A A G V	
Forme 1	3	Y F D G R G R M E P I R W L L A A A G V	
Forme 2	8	Y F N A R G R M E C I R W L L A A A G V	
<u>S.mansoni</u>	70	S L A I A R Y M A K K H H M M G E T D E E	
Forme 3	73	S N A I M R Y L A R K H H L C G E T E E E	
Forme 4	73	S N A I L R Y L G R K H N L C G E T E E E	
<u>S.mansoni</u>	152	G D K V T L A D	
Forme 3	149	G D K V T Y V D	
Forme 4	149	G N K I T Y V D	

Figure 18 Etude de la fonction glutathion-S-transférase de l'antigène P28.I

(a) Analyse des zones d'homologies entre les formes 1/2, 3/4 des GSH-transférases de rat et l'antigène P28.I (G. glycine, A. alanine, V. valine, L. leucine, I. isoleucine, M. méthionine, F. phénylalanine, P. proline, S. sérine, T. thréonine, C. cystéine, N. asparagine, Q. glutamine, Y. tyrosine, W. tryptophane, D. aspartate, E. glutamate, H. histidine, K. lysine, R. arginine. (b) Activité glutathion transférase de l'antigène P28.I (A. Vidal communication personnelle)

Cette absence de réaction croisée entre les enzymes de l'hôte vertébré et du parasite est pour le moins encourageante, et laisse présager que l'antigène n'induirait pas de réactions auto-immunes chez l'individu vacciné.

Du point de vue fonctionnel, les glutathion-S-transférases étant impliquées dans des processus de détoxification de drogues, et dans les réactions de réduction des peroxydes (au niveau membranaire par exemple), nous pouvons envisager que l'antigène P28.I est impliqué dans les mécanismes développés par le parasite pour résister aux agressions du système immunitaire, dont l'un des outils est la libération d'ions superoxydes par les cellules effectrices. Dans cette hypothèse le "piégeage" de l'enzyme par les anticorps au niveau membranaire augmenterait la susceptibilité de la larve aux fonctions lytiques des cellules effectrices.

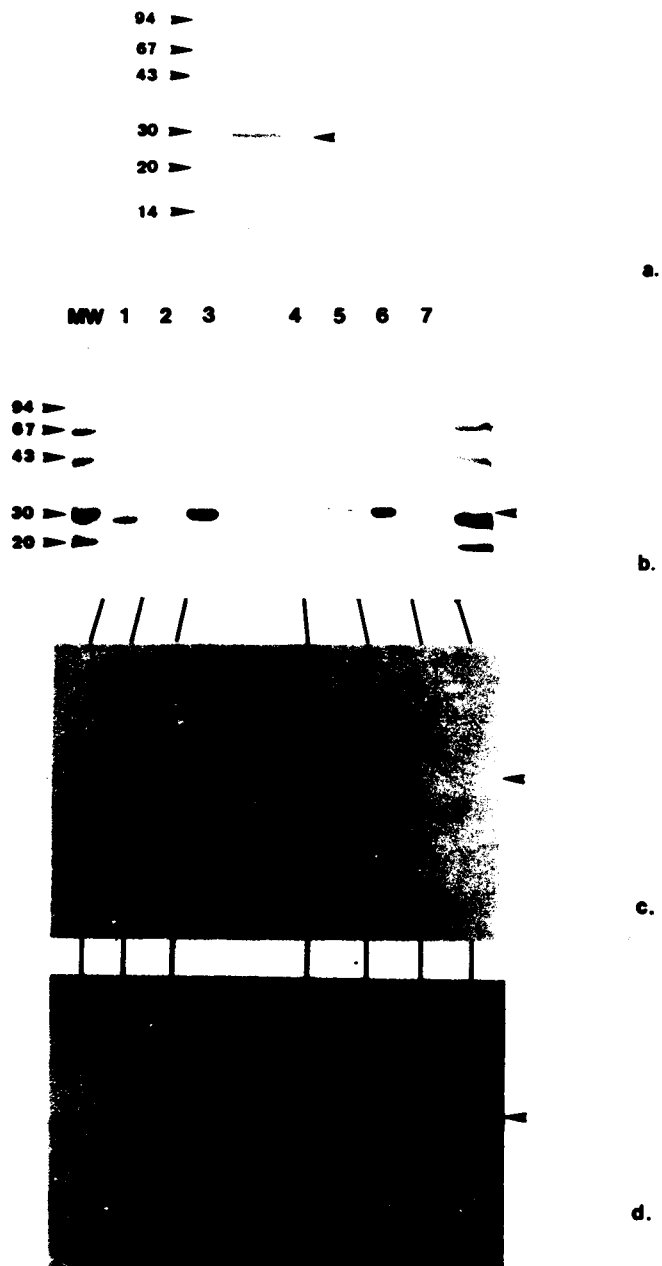


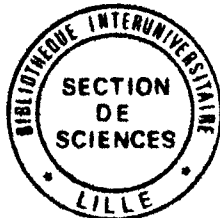
Figure 19 Analyse d'une potentielle communauté antigénique entre l'antigène P28.I et les glutathion-S-transférases du rat et de l'Homme

a) Fraction purifiée sur colonne de glutathion à partir d'un homogénat de vers adultes de S.mansoni, transférée sur feuille de nitrocellulose puis incubée avec un sérum de rat anti-P28.I; b) glutathion-S-transférases de rat (R) et d'Homme (H) analysées sur gel SDS-PAGE: 1 (H) sous-unité α , 2 (H) sous-unité μ , 3 (H) sous-unité Π , 4 (R) sous-unité 4, 5 (R) sous-unité 3, 6 (R) sous-unité 2, 7 (R) sous-unité 1/2; c) "Western blot" des glutathion-S-transférases précitées et distribuées selon un ordre identique, mis en incubation avec un sérum de rat anti-P28.I; d) Incubation subséquente du "blot" (c) avec un sérum de lapin anti-glutathion-S-transférase de rat (sous-unités 1/2).

2.3. Spécificité d'espèce de l'antigène P28.I

Ainsi que nous l'avions réalisé avec les sérums de rats vaccinés avec la fraction P28 produite à partir d'un homogénat de vers adultes de S.mansoni. Nous avons analysé la spécificité d'espèce de l'antigène P28.I. Les résultats sont montrés figure 20.

Le signal positif enregistré sur les pistes de nitrocellulose sm.2, sj.4, et sb. 6 indique que l'antigène P28.I de S.mansoni est également exprimé chez Schistosoma japonicum et Schistosoma bovis, ouvrant dans ce dernier cas de nouvelles possibilités d'applications au niveau de la vaccination vétérinaire, puisque S.bovis est à l'origine d'importante pertes économiques pour les pays en voie de développement situés dans les zones d'endémies.



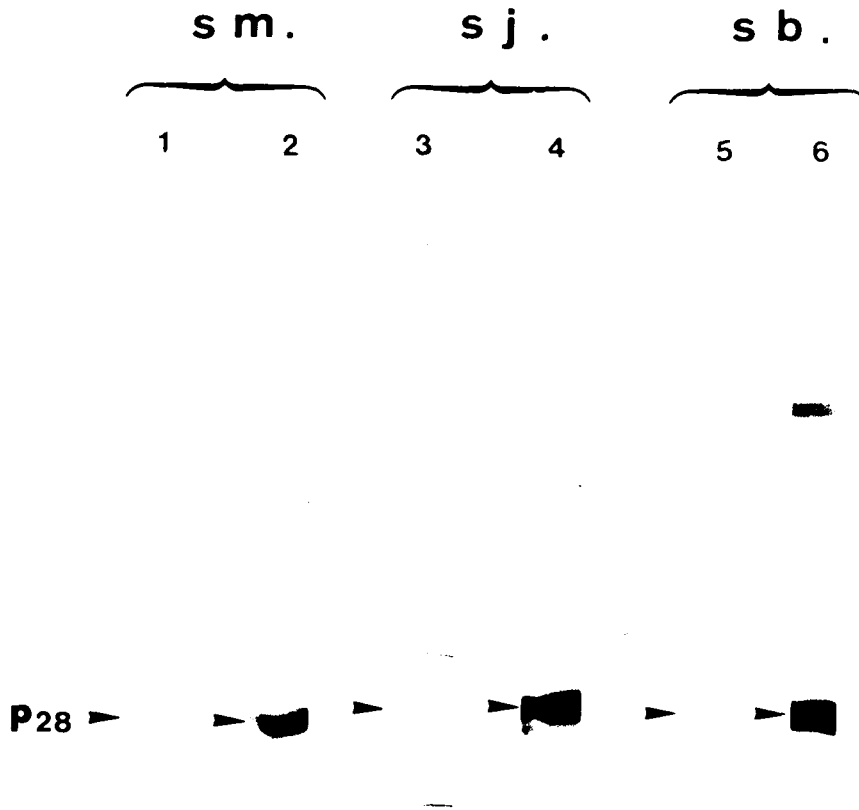


Figure 20 Analyse de la spécificité d'espèce de l'antigène P28.I de Schistosoma mansoni

Des extraits bruts de S.mansoni (sm.), S.japonicum (sj.), et S.bovis (sb) ont été transférés, après fractionnement en gel de polyacrylamide, sur feuille de nitrocellulose, puis incubés en présence de sérums de rats sains (pistes 1,3,5) ou en présence de sérums de rats vaccinés avec l'antigène P28.I (piste 2,4,6).

2.4 Etude du rôle vaccinal de l' antigène P28.I

A. Etude in vitro de la réponse humorale dirigée contre l'antigène P28 I

Préalable indispensable à l'expérimentation vaccinale l'analyse de la réponse anticorps déclenchée lors de la vaccination de rongeurs à l'aide de l'antigène P28.I a été effectuée dans les tests de cytotoxicité anticorps dépendante de cellules effectrices (éosinophiles, plaquettes, macrophages). La figure 21 montre l'activité de cette réponse en présence d'éosinophiles normaux de rat. Le pourcentage de cytotoxicité obtenu avec des sérums non chauffés augmente après la deuxième injection pour atteindre un optimum de $50 \pm 10. \%$ (Fig. 21c). Après chauffage des sérums, ce pourcentage chute à $20.5 \pm 5.5 \%$ (Fig. 21d) .De plus, les expériences de déplétion des sérums en IgE par passage sur immuno-adsorbant anti-IgE montrent une réduction de l'activité des sérums à des valeurs proches de zéro (Fig. 21e). Ces résultats indiquent que l'antigène P28-I inoculé en présence d'hydroxyde d'aluminium semble induire une réponse anticorps active de nature IgE. Néanmoins, la perte totale d'activité laisse penser que l'activité thermorésistante (activité IgG dépendante) a également été piégée sur la colonne d'affinité.

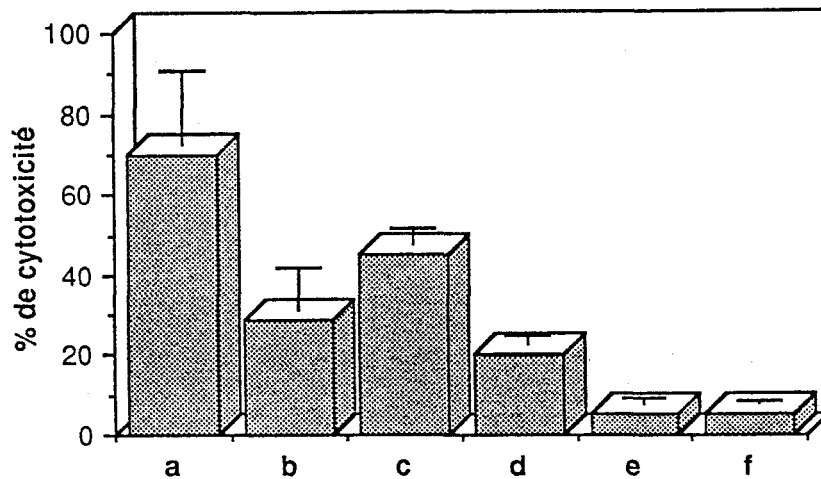


Figure 21 Activité cytotoxique in vitro des sérums anti-P28.I

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en présence de populations d'éosinophiles de rat sain, enrichies à 30%. a) Sérum de rat d'infection; b) sérum de rat d'infection inactivé par la chaleur; c) sérum de rat anti-P28.I prélevé après deux injections à 15 jours d'intervalle de 50 µg d'antigène recombinant. d) sérum (c) inactivé par la chaleur; e) sérum (c) épuisé en IgE après passage sur une colonne d'anti-IgE couplés à une phase solide; f) sérum de rat normal.

B. Résultats de vaccination in vivo dans les modèles rongeurs

Vingt rats et 20 hamsters ont été vaccinés par deux injections de cII-P28.I en présence de 1.25 mg d'hydroxyde d'aluminium. Les animaux ont été exposés à 1000 cercaires trois semaines après avoir reçu le rappel de vaccination, et perfusés 21 jours après l'infection dans le cas des rats et 35 jours après l'infection dans le cas des hamsters. Les résultats sont montrés figure 22. En ce qui concerne la population de rats, l'analyse des immuns complexes élués comme précédemment de la protéine A-sépharose montre au jour de l'infection l'absence de réponse humorale circulante d'isotype G. Au 8^{ème} jour, l'infection provoque une nouvelle stimulation antigénique induisant une réponse humorale spécifiquement dirigée contre l'antigène P28, cette réponse se maintient en intensité jusqu'au jour de la perfusion. Des résultats identiques ont été obtenus lors de l'analyse de la réponse humorale chez le hamster. (Fig. 22a)

La réduction de la charge parasitaire enregistrée après perfusion a été de 65% pour la population de rat et de 50% pour la population de hamsters. (Fig. 22b)

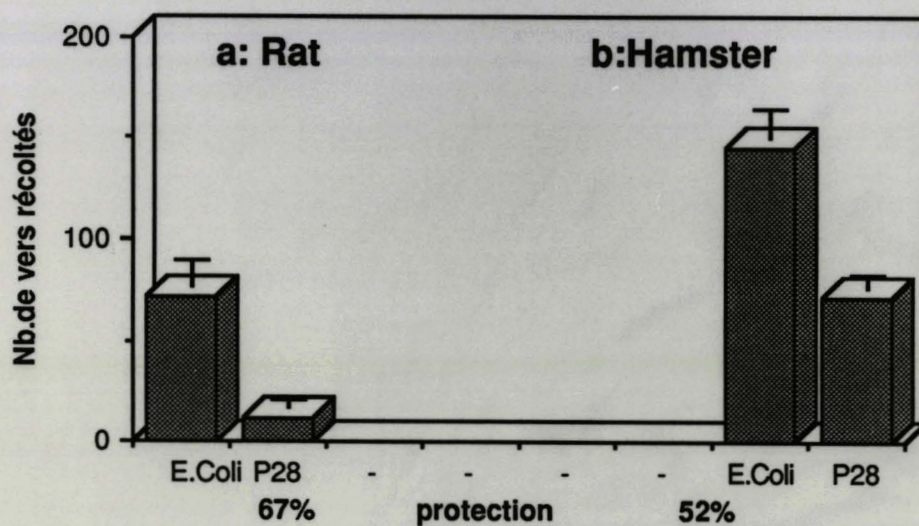
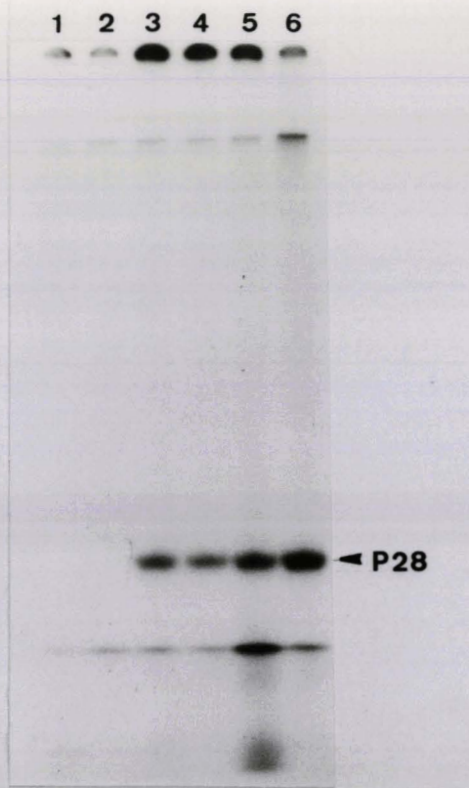


Figure 22 Vaccination de rats Fischer et de hamsters (Mesocricetus auratus) contre l'infection expérimentale à Schistosoma mansoni

a) Analyse de la cinétique post-infection de la réponse anticorps de classe G chez les rats vaccinés. Immunoprécipitation d'antigènes radiomarqués produits par marquage métabolique de vers adultes: 1. Rat contrôle, 2. jour de l'infection, 3. 8 jours après l'infection, 4. 15 jours après l'infection, 5. 21 jours après l'infection, 6. sérum de rat anti-fraction P28 de S.mansoni.

b) Nombre de vers adultes récoltés après perfusion. Les pourcentages de protection ou plus exactement de réduction de la charge parasitaire sont exprimés par rapport au nombre de vers récoltés à partir des animaux vaccinés avec des extraits membranaires de E.Coli.

C. Vaccination de Primates par l' antigène P28.I

Etape déterminante dans l'élaboration d'un vaccin contre la ou plutôt les schistosomiasés humaines, une expérience de vaccination chez huit babouins femelles a été réalisée, utilisant l'antigène P28.I exprimé comme précédemment sous forme fusionnée au cII.

Le protocole de vaccination est détaillé au chapitre Matériels et Méthodes .

Des quatre singes vaccinés seul l'un d'entre eux (Babouin n°7 ayant reçu 400 µg de cII P28 I) a élaboré une réponse anticorps de nature IgG détectable (Figure 23a). Les tests de cytotoxicité réalisés en système hétérologue (sérums de primates - cellules effectrices humaines) ont permis d'établir la prévalence de la réponse anticorps d'isotype E dans le déclenchement de l'activité cyto-cide des cellules effectrices humaines et principalement des éosinophiles. Le niveau de cette activité variait selon les individus de 35 à 80% .

Néanmoins , du fait de l'absence d'anticorps anti-IgE spécifique d'espèce, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence au niveau moléculaire la présence d'IgE se liant spécifiquement à l'antigène P28-I.

Après un suivi de quatre semaines suivant la seconde injection , tous les singes ont atteint des degrés d'immunité sous tendus in vitro par des pourcentages de cytotoxicité dépendant de cellules effectrices de l'ordre de 50%

Aucune activité supérieure à 10% n'a été enregistrée avec les sérums des babouins contrôle.

Les babouins ont été exposés à l'infection par 600 furcocercaires. Après huit jours d'infection les plaquettes et les sérums des animaux ont été récoltés.

Les résultats obtenus avec les plaquettes naturellement armées au cours de l'infection sont montrés figure 23b. A cette date aucune activité anti-S.mansoni n'est relevée avec les plaquettes purifiées des babouins vaccinés avec les extraits membranaires de E.COLL. A l'opposé les plaquettes de tous les animaux vaccinés ont permis d'induire la destruction de 40 à 75% des schistosomules.

Paradoxalement, aucune réponse humorale cytotoxique n'a pu être enregistrée.

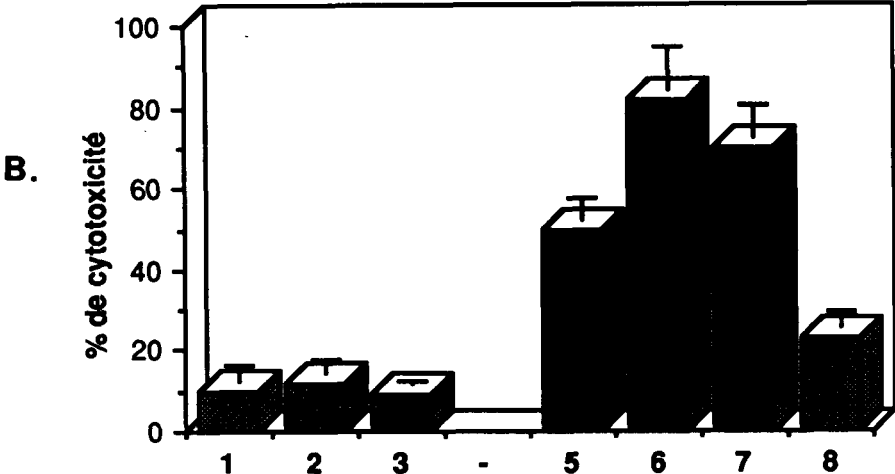
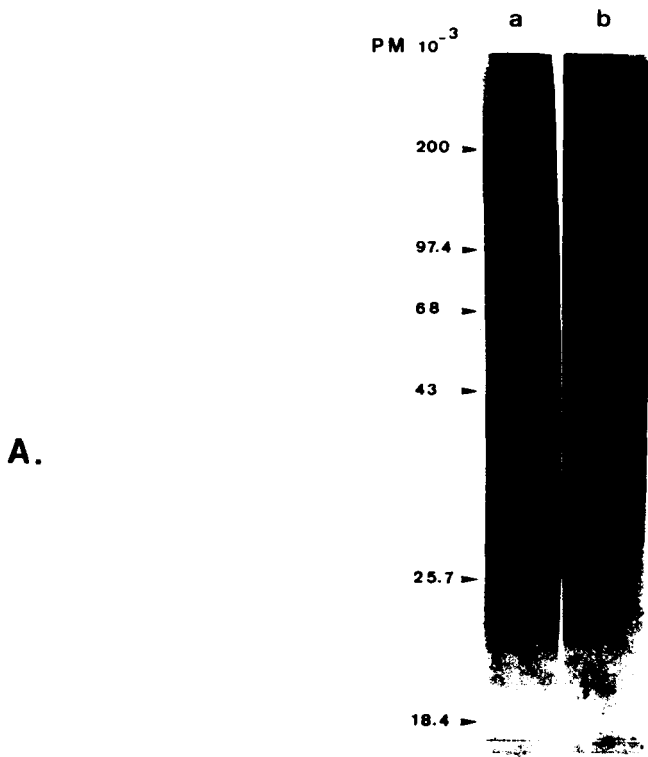


Figure 23 Réponse humorale et plaquettaire des singes vaccinés par l'antigène P28.I

A) Analyse en "Western blotting" de la réponse humorale de classe IgG du babouin N°7 (Aa), le singe N°3 vacciné avec 400µg d'extrait membranaire de E.Coli étant pris comme contrôle (Ab).

B) Analyse du degré d'activation des plaquettes naturellement "armées" 8 jours après l'infection d'épreuve. La plupart des plaquettes des singes vaccinés sont actives vis-à-vis du parasite (singe N°5,6,7), alors qu'aucune activité notable n'est enregistrée avec les plaquettes des singes contrôle (1,2,3).

Ces résultats suggèrent que la majorité des IgE anti-S.mansoni se trouve liée à la surface des cellules effectrices .

Les pourcentages de protection obtenus pour chaque animal (Fig. 24a) s'échelonnent entre 45 et 82%. Seul le babouin n°7 ne s'est pas trouvé protégé contre l'infection. D'autre part, il est à noter que des injections massives d'antigène bactérien induit une réduction de la charge parasitaire non spécifique d'antigène. Néanmoins, l'analyse anatomopathologique réalisée sur les foies des singes vaccinés en comparaison avec ceux des singes immunisés à l'aide d'extraits membranaires de E.Coli, a mis en évidence une réduction quantitative (de 59 à 86% selon l'animal, Fig. 24b) et qualitative (réduction de la superficie moyenne Fig. 24c) des granulomes dans le tissu hépatique .

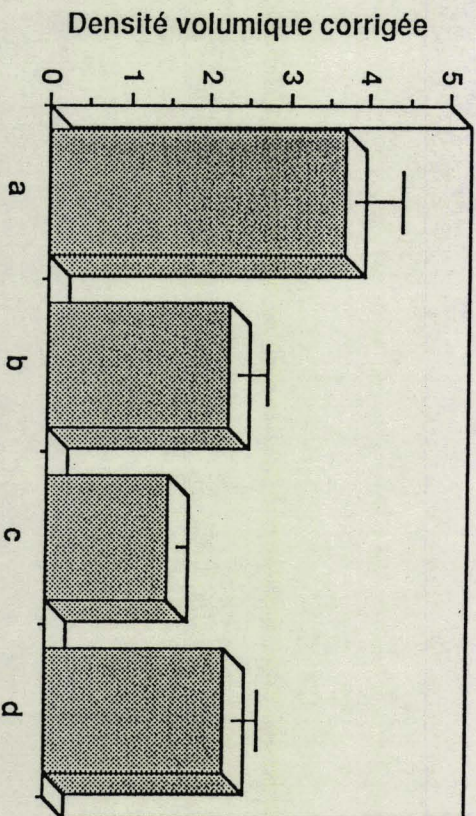
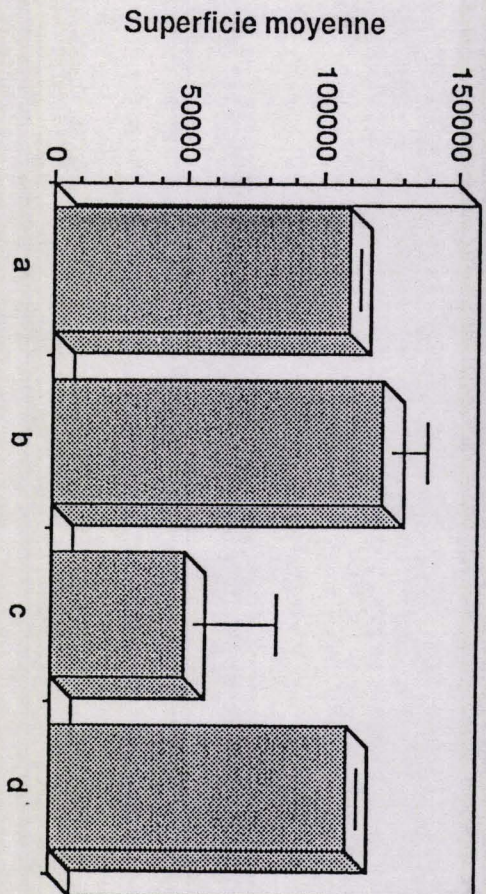
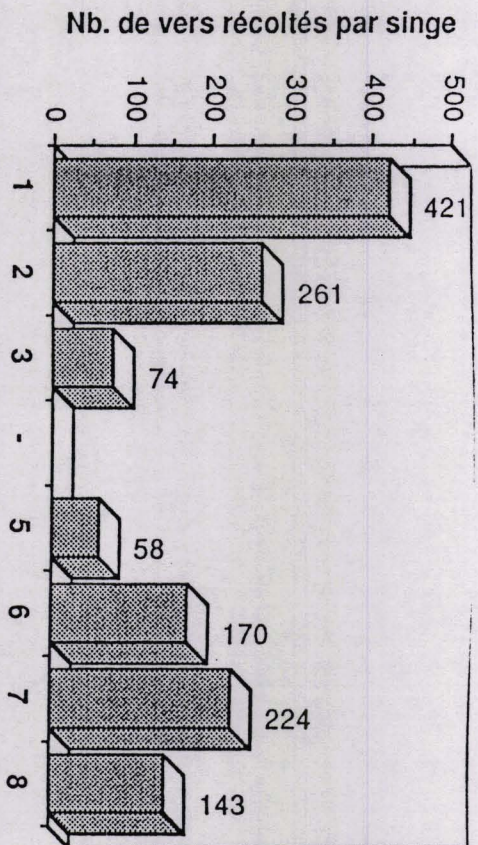


Figure 24. Résultats de la vaccination des babouins vis-à-vis de l'infection expérimentale à S.mansoni

- A) Nombre de vers récoltés 45 jours après l'infection
 B) Superficie moyenne des granulomes au niveau du tissu hépatique: a. singe N°1, b. singes N°2,3 vaccinés par E.Coli, c. singes N°5,6 vaccinés par 200µg de P28.I, d. singes N°7,8 vaccinés par 400µg de P28.I
 C) Densité des granulomes par volume de tissu hépatique

3. Etude préliminaire de l'antigène P28.II

Les résultats obtenus avec l'antigène P28.I indiquant qu'une protection efficace, bien que partielle, pouvait être obtenue aussi bien chez les rongeurs que chez les primates, nous ont encouragé à poursuivre dans cette voie.

De plus le caractère partiel de la réduction de la charge parasitaire, lors des expériences de vaccination par l'antigène P28.I, et ce quelque soit le modèle animal considéré, impose d'envisager l'élaboration d'un cocktail vaccinal multigénique.

Pour des raisons principalement liées, aux difficultés rencontrées dans l'expression de la protéine P28.II dans le modèle plasmide PL-E.Coli, le développement de l'étude de son potentiel vaccinant s'est trouvé retardé. Les résultats que nous présentons ici sont d'avantage une fenêtre ouverte sur l'avenir du développement d'un vaccin dans la schistosomiase et laissent présager que l'activité vaccinnante de l'antigène P28.I pourra être optimisée par l'adjonction d'autres antigènes produits par recombinaison génétique.

3.1 Etude de la séquence de l'antigène P28.II

La séquence du clone lambda TGC7, exprimant l'antigène reconnu par les seuls sérums de rats vaccinés, est montré figure 25. Une étude préliminaire de cette séquence a révélé une forte homologie de séquence avec la phosphoglycéromutase de Levure. A nouveau comme pour le

cas de l'antigène P28.I se pose le problème d'une communauté antigénique avec les enzymes des hôtes vertébrés de S.mansoni. Pour l'heure, il ne semble pas que l'injection de cet antigène ait produit, chez les rats immunisés quelques perturbations que ce soit.

Une étude, portant sur l'existence de communautés antigéniques avec les enzymes de mammifères, est en cours au laboratoire.


```

31                               61                               91
AAT T C C C C C C C C C C C C C C C A T C G T G G C A T G G C T C C T T A C A G A A T I G T G I I T A T T C G C C A T C C C A G A G A G I G I I T A C A A T G A A G A A A A C C A T T T T G T G G T T G C C A T G A T G C A G A T C T T T C A G
luPheProProProProProIleValAlaTrpLeuLeuThrGluLeuCysLeuPheAlaMetGlnArgValPheThrMetLysLysIleAspPheValValGlyMetMetGlnIlePheGln
AsnSerProProProProSerTrpHisGlySerLeuGlnAsnCysValTyrSerProCysArgGluCysLeuGln* * * * * ArgLysSerIleLeuTrpLeuAla* * * * * CysArgSerPheArg
IleProProProProHisArgGlyMetAlaProTyrArgIleValPheIleArgHisAlaGluSerValTyrAsnGluGluAsnArgPheCysGlyTrpHisAspAlaAspLeuSerGly

151                               181                               211
A C A A G G T A T C A C T G A G G C T A A A C A A G C T G G C C A A C T T C T A C G C C A A A A T C A C T T C A C C T T T G A T A T T G C C T A T A C A A G C G T T C T A A A A A G A G C C A T C A A G A C T T T A A A C T T T G C C T T G
spLysValSerLeuArgLeuAsnLysLeuAlaAsnPheTyrAlaLysIleThrSerProLeuIleLeuProIleGlnAlaPhe* * * * * LysGluProSerArgLeu* * * * * ThrLeuSerLeu
ThrArgTyrHis* * * * * Gly* * * * * ThrSerTrpProThrSerThrProLysSerLeuHisLeu* * * * * TyrCysLeuTyrLysArgSerLysLysSerHisGlnAspPheLysLeuCysPro* * * * *
GlnGlyIleThrGluAlaLysGlnAlaGlyGlnLeuLeuArgGlnAsnHisPheThrPheAspIleAlaTyrThrSerValLeuLysArgAlaIleLysThrLeuAsnPheValLeuAsp

271                               301                               331
T G A A C T T G A T C T T A A C T G G A T A C C T G T G A C A A A A A C A T G G C G T C T A A A T G A A A G A A T G T A C G G T G C T C T T C A A G C T C T G A A T A A G C T G A A A C T G C T G C C A A A C A T G G A G A G S A A C A A G
etAsnLeuIleLeuThrGlyTyrLeu* * * * * GlnLysHisGlyVal* * * * * MetLysGluCysThrValIleuFheLysVal* * * * * IleSerLeuLysLeuLeuProAsnMetGluArgAsnLys
* * * * * Thr* * * * * Ser* * * * * LeuAspThrCysAspLysAsnMetAlaSerLys* * * * * LysAsnValArgCysSerSerArgSerGlu* * * * * Val* * * * * AsnCysCysGlnThrTrpArgGlyThrSer
GluLeuAspLeuAsnTrpIleProValThrLysThrTrpArgLeuAsnGluArgMetTyrGlyAlaLeuGlnGlyLeuAsnLysSerGluThrAlaAlaLysHisGlyGluGluGlnVal

391                               421                               451
T A A A A T A T G G A G A C G T G C T T A T G A T A T A C C T C C C C C T C C C T T T G A C A T T C A G A T C C T C G C T T C C C G G T A A T G A A C C A A A G T A T G C C T T A C T T G A C T C T T C C T G C A T A C C A C G T A C T G
euLysTyrGlyAspValLeuMetIleTyrLeuProLeuLeuLeuThrPheGlnIleLeuAlaSerProValMetAsnGlnSerMetProTyrLeuThrLeuProAlaTyrHisValLeu
* * * * * AsnMetGluThrCysLeu* * * * * TyrThrSerProSerCys* * * * * HisPheArgSerSerLeuProArg* * * * * ThrLysValCysLeuThr* * * * * LeuFheLeuHisThrThrTyr* * * * *
LysIleTrpArgArgAlaTyrAspIleProProProProValAspIleSerAspProArgPheProGlyAsnGluProLysTyrAlaLeuLeuAspSerSerCysIleProArgThrGlu

511                               541                               571
C T G T T T A A A G G A C A C T G T T C A A C C G T A C T C C C A T T T T G G T T T G A T A C T A T T T C T G C A A G T A T A A A G A G A C C G G A A C A G G T T C T G A T T G T G C C C C A T G G A A A C A G I T T A A G A G C C C T T A
SerVal* * * * * ArgThrLeuPheAsnValTyrCysHisPheGlyLeuIleLeuPheLeuGlnVal* * * * * ArgAspAlaAsnArgPhe* * * * * LeuSerProMetGluThrVal* * * * * GluArgLeu
ValPheLysGlyHisCysSerThrCysThrAlaIleLeuVal* * * * * TyrTyrPheCysLysTyrLysGluThrArgThrGlySerAspCysArgProTrpLysGlnPheLysSerAlaTyr
CysLeuLysAspThrValGlnArgValLeuProPheTrpPheAspThrIleSerAlaSerIleLysArgArgGluGlnValLeuIleValAlaHisGlyAsnSerLeuArgAlaLeuIle

```

Figure 25. Séquence nucléotidique et protéique (déduite de la séquence en nucléotides) de l'antigène P28.II

L'ADNc du clone phagique TG07 a été séquencé par la technique de terminaison de chaîne. La séquence en acides aminés a été déterminée par déduction. Les acides aminés déduits de codons impliquant plusieurs possibilités, sont représentés par des étoiles.

3.2 Activité in vitro et in vivo des sérums anti-P28.II

Les sérums de rats Fischer mâles, vaccinés, selon le protocole précédemment établi pour l'antigène P28.I, par deux injections intrapéritonéales de 50µg de P28.II exprimée dans E.Coli, ont été prélevés 14 jours après le rappel.

Les tests de cytotoxicité, réalisés en présence d'éosinophiles intrapéritonéaux de rats sains, ont montré (Fig. 26a) que ces sérums étaient capables de détruire jusqu'à 80% des larves de S.mansoni, in vitro.

De plus, des expériences de transfert passif de sérums anti-P28.II ont montré qu'ils pouvaient induire une importante réduction de la charge parasitaire (jusqu'à 75%) (Fig. 26b).

Ces résultats, pour encourageants qu'ils soient, posent le problème de savoir pourquoi la fraction P28 native qui contient les deux antigènes n'induit pas de protection au delà de 70%, alors que les antigènes P28.I et P28.II semblent capables des mêmes performances.

Les antigènes en mélange déclenchent-ils des réactions antagonistes l'une de l'autre, ou la fraction P28 purifiée à partir de vers adultes de S.mansoni contient elle d'autres facteurs de régulation négative que nous n'aurions pas encore caractérisés ?

La construction d'une protéine de fusion P23.I-P23.II est d'ores et déjà envisagée et permettra sans doute de répondre, tout au moins partiellement, à ces questions.

Néanmoins, l'activité cytotoxique des sérums anti-P23.II, est un élément positif et une chance supplémentaire de parvenir, à court terme, à l'élaboration d'un vaccin efficace dans la schistosomiase.

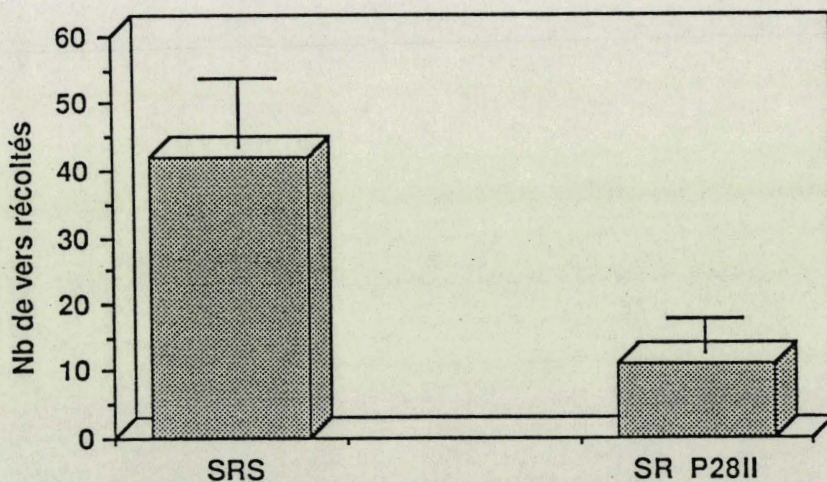
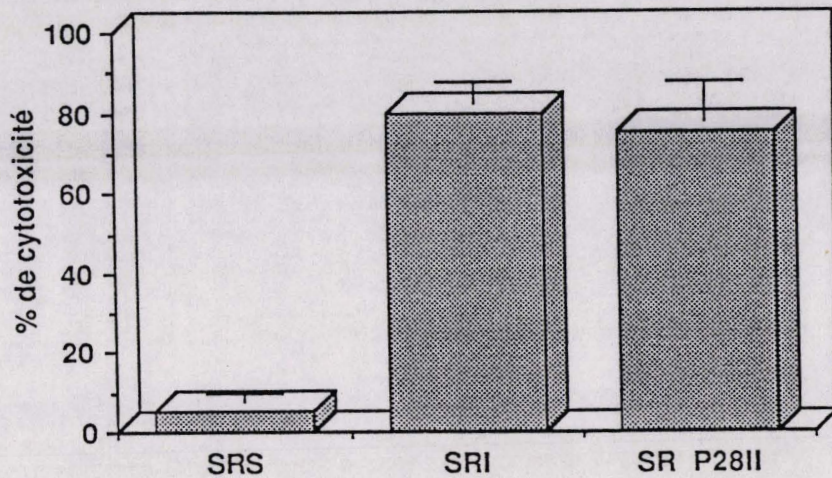


Figure 26 Etude de la réponse humorale anti-P28.II chez le rat Fischer

a. Analyse de l'activité cytotoxique des sérums anti-P28.II en présence d'éosinophiles de rats normaux. SRS: sérum de rat sain, SRI: sérum de rat d'infection, SR P28II: sérum de rat anti-P28.II prélevé après deux injections d'antigène recombinant.

b. Transfert passif de 1.5ml de sérums anti-P28.II à des rats sains trois heures après l'infection d'épreuve. En ordonnée est représenté le nombre de vers récoltés après perfusion hépatique.

DISCUSSION

Au delà du débat, de savoir, si un vaccin dans la schistosomiase doit être efficace à 100% ou doit autoriser le maintien d'une population réduite de vers adultes propre à induire une immunité durable, il demeure que la démonstration de l'aptitude d'une protéine produite par génie génétique à induire dans les modèles animaux un degré de protection significatif vis-à-vis de Schistosoma mansoni nous semble être faite. Les voies ouvertes par ces premiers travaux sont multiples et parcmées d'embuches.

La faisabilité d'un vaccin efficace à cent pourcent dans les affections parasitaires, en général, reste à établir.

A l'heure actuelle, les pourcentages de protection les plus élevés (jusqu'à 90%) ont été obtenus avec des mélanges de composés antigéniques complexes tel que le SRP décrit par Auriault et coll. (57), ou le SWAP décrit par l'équipe du NIH dirigée par A. Sher (59).

A l'intérieur de ces mélanges ont été identifiés les principes vaccinaants (antigènes de 22-26000 Daltons dans le cas du SRP, antigène de 97000 Daltons dans le cas du SWAP). A l'heure actuelle seul l'antigène de 97000 Daltons a été produit par génie génétique mais nous ignorons s'il a gardé son activité vaccinnante.

Pour l'instant, seul l'antigène P28-I a pu être employé sous sa forme produite dans un système d'expression E.Coli pour des expériences de vaccination dans différents

modèles animaux: Rongeurs, Primates, et plus récemment Bovidés. Son activité protectrice partielle devra être renforcée par divers moyens.

D'ores et déjà, de nouveaux modes de présentation de l'antigène ont été mis en oeuvre ainsi que de nouveaux systèmes d'expression tel que le modèle Levure et le modèle Vaccine déjà employé avec succès par la société Transgène dans le cadre d'un programme de vaccination antirabique à l'aide d'un antigène obtenu par recombinaison génétique.

Comme nous l'avons montré le deuxième composant immunogénique de la fraction P28 de S.mansoni a également été produit par génie génétique. Utilisé dans des expériences d'immunisation chez des rongeurs, nous avons pu montrer que cet antigène induisait une réponse anticorps cytotoxique, provoquant, in vitro, la destruction de 70 à 90% des larves. Ces résultats permettent d'envisager la construction par génie génétique d'un antigène à deux têtes qui potentialisera la réponse immune de l'hôte vis-à-vis de deux cibles distinctes présentes à la surface du parasite, augmentant d'autant les chances d'induire la destruction de ce dernier.

Les résultats obtenus tant in vitro qu'in vivo laissent à penser que la réponse humorale, dont l'activité cytotoxique est supportée par les cellules effectrices,

est d'isotype polydisperse. Elle peut être de nature IgG2a comme ce fut le cas lors de nos premiers essais d'immunisation, ou encore de nature IgE. L'orientation vers une réponse isotypique déterminée est encore mal maîtrisée. Dans tous les cas l'induction de telle ou telle type de réponse est multifactorielle et si la nature de l'hôte (rat, souris, ou primate) est prépondérante, la voie d'injection, les doses d'antigènes ainsi que le choix de l'adjuvant sont autant de paramètres qui, en complément de l'antigénicité intrinsèque de P28.I, influent sur l'évolution de la réponse immune.

Auriault et coll. (74) ont étudié la réponse lymphocytaire anti-P28. Ces auteurs ont purifié et maintenu en culture en présence d'extraits parasitaires des lymphocytes T d'animaux vaccinés par la fraction P28 purifiée en SDS-PAGE. Ces auteurs ont pu montrer, après un long séjour in vitro, que ces lymphocytes étaient restimulés par l'antigène produit cette fois par E.Coli. De plus le transfert de ces lignées lymphocytaires, à des rats sains, a permis de rendre, dans de fortes proportions, (80%) ces animaux résistants à l'infection expérimentale par S.mansoni. Du fait de ce transfert la réponse humorale anti-P28 s'est trouvée activée plus précocément lors de l'infection.

Plus récemment ce même groupe, en collaboration avec l'équipe de A. Tartar, à l'Institut Pasteur de Lille, a montré que des peptides de synthèse étaient capables de

stimuler la prolifération de lignées lymphocytaires préalablement stimulées par la molécule entière, identifiant ainsi des épitopes T privilégiés le long de la chaîne polypeptidique de l'antigène P28.I. Cette approche nous permettra peut-être d'optimiser encore l'efficacité du vaccin anti-schistosome.

Ainsi, réponses cellulaire et humorale interagissent aboutissant, après stimulation par l'antigène P28.I, à l'induction d'un niveau de protection de l'ordre de 65-70% dans les modèles rongeurs utilisés.

Les expériences, qui vont maintenant se dérouler sur le terrain, en Afrique notamment, vont seules déterminer l'efficacité réelle de ces antigènes et permettront d'établir si les antigènes P28.I et P28.II que nous venons de décrire seront les composantes intégrales ou partielles d'un vaccin dans la schistosomiase.

MATERIELS ET METHODES

I. PARASITES

Une souche portoricaine de Schistosoma mansoni, dont le cycle est maintenu artificiellement au laboratoire chez une planorbe (Biomphalaria glabrata) et le hamster doré (Mesocricetus auratus), a été utilisée dans toutes les expériences. Les souches de Schistosoma japonicum et de Schistosoma bovis nous ont été aimablement fournies par le Dr. Tsuji (Tokyo) et le Dr. Delourdes (Lisbonne) .

1. Vers adultes

Les vers sont collectés par perfusion portale avec de l'eau physiologique héparinée chez des hamsters , entre 35 et 40 jours après l'infection. Les vers sont ensuite lavés par 5 fois 100 ml de milieu MEM (Minimum Essential Medium) contenant 100 u/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

2. Cercaires

Les mollusques infectés sont exposés à la lumière durant 1h30 et à une température de 30°C. Les cercaires sont ainsi libérées dans l'eau, puis purifiées et concentrées par ascension dans une fiole jaugée vers une source de lumière .

3. Schistosomules

a. Schistosomules "peau"

Le passage des cercaires à travers une peau abdominale de souris (Balb/C) a été initialement décrit par Clegg et Smithers (23). Les cercaires récoltées comme précédemment décrit sont déposées dans un milieu HLEG (Hydrolysat Lactalbumine Earle Glucose) contenant 100 u/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine , au dessus d' une peau abdominale de souris fraîchement prélevée et les schistosomules sont récoltés au bout de trois heures d'incubation à 37°C.

b. Schistosomules "mécaniques"

Les cercaires placées à + 4°C et à l'obscurité durant 30 minutes, sédimentent puis sont resuspendues dans 2-3 ml d'eau. Têtes et queues sont séparées par agitation sur "Vortex" pendant 2 mn suivie d'une centrifugation, pendant 10 mn à 500g, sur un coussin composé d'une solution isotonique de Percoll à 54% (Percoll 54 ml, NaCl 9% 6 ml, milieu MEM 40 ml).

II. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DE VERS ADULTES (76)

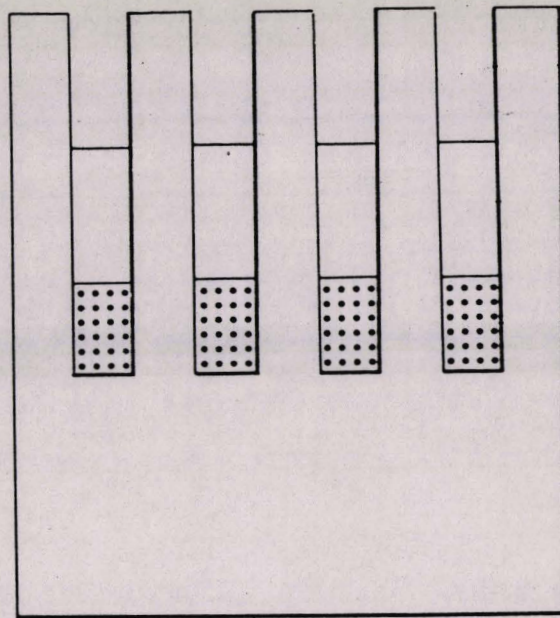
Les vers adultes obtenues par perfusion de 30 hamsters sont lavés 5 fois en tampon PBS (Phosphate de Sodium 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M) afin d'éliminer les débris tissulaires provenant de l'hôte. Après avoir été concentrés par sédimentation les vers sont solubilisés dans du tampon PBS à l'aide d'un Potter-Elvehjem. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé à 5000 tours/mn durant 20 mn, dans un rotor HB4 (Sorvall), afin d'éliminer le matériel insoluble. L'homogénat est ensuite additionné d'un volume de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 6%, saccharose 20%) et chauffé à 100°C pendant 3 mn. Des fractions aliquotes de 2 mg de protéines sont fractionnées en gel de polyacrylamide-SDS.

L'électrophorèse est effectuée dans les conditions décrites par Laemmli (75). Des gels de 1.5 mm d'épaisseur (14 x 16 cm) ont été utilisés. Les protéines sont tout d'abord concentrées dans un gel de polyacrylamide à 5% pH 6.8 puis fractionnées sur un gel réticulé de manière homogène à 13% pH 8.8.

Après électrophorèse, les protéines sont colorées par incubation dans une solution contenant 0.35 g pour 1000 de Bleu Brillant de Coomassie, 50% de méthanol et 10% d'acide acétique. Après 2 heures les gels sont mis à décolorer toute la nuit dans une solution aqueuse contenant 20% de méthanol et 8% d'acide acétique.

Les bandes de protéines sont référencées en fonction de leur poids moléculaire apparent, puis découpées à l'aide d'un scalpel avant d'être transférées sur un gel d'éluion (Fig. 28). La bande est immergée dans un puit formé dans le gel de soutien contenant 2ml d'un tampon composé de Tris-HCl 62.5 mM pH 6.3, SDS 1% ,et de glycérol 40%. Une seconde solution de NaCl 2 M est déposée constituant une interface à la frontière de laquelle les protéines se concentreront lors de l'électroéluion. L'éluion est réalisée sous un voltage constant de 80 V pendant 5 heures. Les protéines sont récupérées au niveau de l'interface NaCl-Glycérol à l'aide d'une pipette Pasteur par aspiration douce. La fraction protéique ainsi obtenue est ensuite dialysée contre de l'eau bi-distillée puis concentrée par lyophilisation. Chaque fraction protéique est ensuite analysée en gel de polyacrylamide-SDS afin d'en contrôler l'intégrité.

anode +



cathode -



Figure 27 Schéma du gel d'électroélution des protéines fractionnées en SDS-PAGE

(a) 2M NaCl dans l'eau bi-distillée. (b) Tampon de récupération des protéines: 40% en glycérol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, SDS 0.1%. (c) fractions protéiques incluses dans l'acrylamide du gel de fractionnement. (d) gel de support constitué par de l'acrylamide 13% en tampon Tris-HCl 375mM pH 3.8, 0.1% SDS.

III. PRODUCTION DES SERUMS POLYCLONAUX

1. Immunisation de rat Fischer par l'antigène fractionné

Après lyophilisation chaque fraction protéique, est resuspendue dans 500 µl d'eau physiologique puis mélangée par agitation sur "Vortex" à 500 µl d'adjuvant complet de Freund. L'équivalent de 40 µg d'antigène est injecté par voie intrapéritonéale à chaque animal en l'occurrence des rats Fischer mâles d'environ 200g. Une seconde injection est réalisée 14 jours après la première immunisation. Le sang des animaux ainsi immunisés est collecté, de manière hebdomadaire, au niveau du sinus rétro-orbitaire. Les sérums sont fractionnés et conservés à -20°C avant utilisation .

2. Sérums d'infection

Dix rats Fischer mâles ont été infestés à la suite d'une mise en contact, pendant 30 mn, avec 1000 cercaires au niveau de l'abdomen. Le sang collecté comme précédemment, a été prélevé à différentes périodes après l'infection.

Les sérums humains ont été obtenus après ponction intraveineuse chez des patients présentant tous les critères immunopathologiques d'une schistosomiase.

3. Les sérums de lapin hyperimmun

De l'ordre de 1mg d'antigène brut de vers adultes est inoculé selon le protocole décrit par Vaitukaitis et coll (77).

IV. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL DES STADES ADULTES ET LARVAIRES DE S. MANSONI (78)

1. Extraction de l'ARN de vers adultes

Les vers adultes prélevés comme précédemment décrit sont lavés en milieu MEM puis incubés dans ce même milieu durant 30 mn à 37°C. Les parasites sont ensuite solubilisés dans une solution de guanidium thiocyanate 4M composée de 10 mM acétate de sodium pH 5.5, 2 mM EDTA pH 8.0, 1% sarcosyl, et 5% β -mercaptoéthanol. L'homogénat est centrifugé à 10000 tours/mn durant 20 mn dans un rotor HB4 (Sorvall) afin de sédimenter le matériel insoluble. La solution est ensuite soniquée 3 fois 10 secondes de sorte que l'ADN génomique soit détruit. Le sonicat est déposé sur un coussin de CsCl de densité 1.81 contenant 10 mM acétate de sodium pH 5.5 et 2 mM EDTA pH 8.0 puis centrifugé à 26000 tours/mn durant 20 heures dans un rotor SW41 (Beckman) à 20°C. Le culot d'ARN obtenu est resuspendu dans 1 ml d'eau préalablement autoclavée 2h à 140°C. Deux extractions par du phénol:chloroforme (1:1) sont réalisées, suivies de deux extractions par un mélange de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). L'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité par addition de 2.5 volumes d'éthanol à -20°C et de 0.1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5.5. L'ARN est stocké dans l'éthanol pour les longues périodes d'inutilisation. Avant usage, le précipité d'acides nucléiques est sédimenté à 10000 tours/mn durant 20 mn dans un rotor HB4 à 4°C. Le culot

est lavé par de l'éthanol à 70% dans de l'eau puis séché sous vide avant d'être repris dans de l'eau. La concentration ainsi que le degré de pureté relatif de la préparation de l'ARN sont appréciés respectivement par la lecture de l'absorbance de la solution à 260 nm et par le calcul du rapport des absorbances à 260 nm et 280 nm. Cette dernière valeur doit être proche de 2.

2.Extraction de l'ARN de schistosomule

Les cercaires ont été mécaniquement transformées en schistosomules puis incubées 3 heures dans du milieu MEM à 37°C sous 5% de CO₂. Les larves ainsi obtenues ont été congelées dans l'azote liquide. Environ 7x10⁶ schistosomules ont été broyées dans l'azote liquide en utilisant un mortier, la poudre est ensuite rapidement homogénéisée dans une solution de guanidium thiocyanate 4M. Le reste de la procédure d'extraction a été décrite au paragraphe précédent.

V. PREPARATION DES ANTIGENES RADIOMARQUES

1. Marquage métabolique de vers adultes

Dix couples de vers adultes sont lavés en milieu MEM déplété en méthionine et cystéine, puis incubés pendant 1 heure dans ce même milieu, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu est ensuite renouvelé et additionné de 1.85 MBq de méthionine ³⁵S. L'incubation est poursuivie pendant 12 heures supplémentaires. Les vers adultes sont ensuite lavés dans 10 volumes de MEM sans méthionine à 4°C, avant d'être homogénéisés dans 500 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.4, à l'aide d'un Potter-Elvehjem. La radioactivité incorporée est évaluée en traitant 1µl d'incubat dilué dans 500 µl d'eau, par 250 µl d'une solution de soude 1N contenant de la méthionine 0.68 mM et de l'H₂O₂ 0.68%. On incube à 37°C durant 15 mn. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de TCA 25%. Le matériel TCA-précipitable est filtré sur papier Whatman GF/C en lavant par du TCA 8% puis par de l'eau froide. Les filtres sont ensuite placés dans des fioles de comptage et 5 ml d'aqualyte (Becker Chemicals, Holland) sont ajoutés. Le comptage s'effectue dans un compteur à scintillation liquide LKB.

2. Production de polypeptides synthétisés in vitro en lysat de réticulocytes de lapin (79)

La technique de traduction in vitro dans un lysat de réticulocytes de lapin , dont l'ARN endogène a été préalablement hydrolysé par l'addition de la nucléase de micrococcus , a été utilisée pour produire les polypeptides immatures de deux des stades du parasite : le ver adulte et le schistosomule. 7.8 µg d'ARN total sont incubés, pendant 1 heure, à 30°C, en présence de 30 µl d'un homogénat contenant 70% de lysat de réticulocyte lapin (Amersham, Grande-Bretagne), 59.2 kBq/µl de méthionine marquée 1.69 mM d'acétate de potassium et 0.90 mM de magnésium. La radioactivité incorporée dans le matériel TCA-précipitable est évaluée comme précédemment.

3. Marquage des protéines de surface du schistosomule

Dix schistosomules sont lavés 3 fois dans du tampon PBS (Phosphate de Na 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM). Les schistosomules sont marqués en tampon PBS dans un volume final de 250 µl contenant 18.5 MBq d'iode 125, 12.5µl NaI (1 mg/ml) et 12.5µl de lactoperoxydase (1mg/ml). La réaction s'effectue à 20°C pendant 15 mn . La réaction est arrêtée par l'addition de 150 µg de NaI et l'iode 125 libre est éliminé par 10 ml de tampon PBS stabilisé à 4°C. (80,81)

V IMMUNOPRECIPITATION DES PRODUITS RADIOMARQUES

1. Immunoprécipitation des produits de traduction in vitro

12000 Bq sont dilués dans un tampon A (Tris-HCl 10mM, pH 7.4, EDTA 2 mM, NaCl 0.15M, NP40 0.5%) et sont incubés durant 18 heures avec 10 μ l de sérum immun. Les complexes immuns formés sont adsorbés sur 10mg de Protéine A-Sépharose (poids sec) préalablement gonflée et lavée dans une solution aqueuse contenant de la méthionine froide 5mM, puis équilibrée dans le tampon A. Après deux heures de contact à température ambiante les billes de Protéines A-Sépharose sont lavées par 1 ml de tampon A, et ce 8 à 10 fois consécutivement. Le dernier lavage est réalisé en tampon Tris-HCl 10mM, EDTA 2mM. Les complexes immuns sont élués par 40 μ l de tampon Tris-HCl 62.5mM, pH 6.8, SDS 2%, Saccharose 10%, Bleu de Bromophénol 0.005%. L'élué est réalisé au bain-marie pendant 3mn à 100°C. Les produits élués sont ensuite analysés en gel de polyacrylamide-SDS dans les conditions précédemment décrites.

2. Immunoprécipitation des produits de marquage métaboliques et des produits de marquage de surface

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites précédemment seul le tampon A est remplacé par un tampon B Tris-HCl 10mM, pH 7.4, 0.5% Triton X100, SDS 0.3%, NaCl 0.15M, EDTA 2mM.

VI "WESTERN BLOTTING" OU TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE DE PROTEINES SUR FEUILLE DE NITROCELLULOSE

1. Electrotransfert

Le transfert de protéines sur feuille de nitrocellulose a été réalisé dans les conditions expérimentales décrites en 1979 par Towbin et coll. (82). Les protéines sont tout d'abord fractionnées sur gel SDS-PAGE dans les conditions décrites par Laemmli (75). Le gel de fractionnement est ensuite mis en contact avec une feuille de nitrocellulose préalablement équilibrée dans le tampon de transfert (20mM Tris, 150mM glycine, 20% méthanol). L'ensemble est placé en "sandwich" entre deux feuilles de papier Whatman N°1 et deux plaques de Scotchbrite également équilibrées dans le tampon de transfert. L'électrotransfert proprement dit est réalisé à 100mA durant 1 heure à température ambiante.

2. Révélation de complexes immuns sur feuille de nitrocellulose

Après le transfert, la feuille de nitrocellulose est saturée en tampon Tris-HCl 10mM pH 7.4, 0.15M NaCl, 3% en protéines de lait. Les bandelettes de nitrocellulose sont ensuite incubées 18h à 4°C (ou 2h à température ambiante) avec soit des sérums d'immunisation, d'infection, soit encore des sérums d'animaux sains ou pris comme contrôle. Les sérums sont en général dilués au 1/100ème dans le même

tampon. Les bandelettes sont ensuite lavées en tampon Tris-HCl 10mM pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.5% NP40, puis incubées avec des anti-anticorps spécifiques d'espèces (voire d'isotypes) marqués par la peroxydase. Les complexes immuns ainsi constitués sont révélés par incubation, subséquente, après trois lavages, avec un révélateur: Tris-HCl 10mM pH 7.4, 0.15M NaCl, 3 pour 1000 H_2O_2 , 0.06% 4-Chloro-1-Naphtol (p/v).

VII. CLONAGE DE L'ADN COMPLEMENTAIRE CODANT POUR L'ANTIGENE DE MASSE RELATIVE APPARENTE 28000

1. Construction de la banque d'ADN complémentaire

La construction et le criblage de la banque d'expression d'ARN de vers adultes ont été réalisés dans les conditions expérimentales décrites par Y. Le Bouc et coll. (71). La synthèse du premier brin d'ADNc ainsi que du second brin a été réalisée selon les indications publiées par Efstradiatis (69).

Pour la construction de la banque d'ADNc proprement dite la transférase terminale a été fournie par BRL. La synthèse d'une queue poly-dG est réalisée en présence de 5U d'enzyme et de dGTP marqué au Tritium durant 3 min à 37°C. La réaction est stoppée par addition d'EDTA 5mM final dans l'incubat et chauffage à 65°C durant 5 min. 100ng d'ADNc ainsi traités sont ensuite liés à un oligomère de synthèse phosphorylé 5'-dAATTCccccccccccc-3'. La réaction d'hybridation est réalisée durant 16 heures à 50 °C.

La réaction de ligation au vecteur Lambda gt10 est réalisée à 4°C durant 6 à 24 heures en tampon de ligation (130 mM Tris-HCl , pH 7.6 , 20mM MgCl₂ , 2mM spermidine, 20 mM DTT, 1 mM ATP), en présence de 5 µg de lambda NM607 digéré par EcoRI et de 4U de T4 ADN ligase. L'ADN est ensuite concentré par précipitation à l'éthanol.

L'empaquetage de l'ADN dans les têtes de phages a été décrit par Murray (34) La banque a été amplifiée sur E.Coli POP101.

Après amplification, les phages sont concentrés par précipitation au polyéthylène glycol 6000 à 10% final en présence de NaCl 1M. La purification de la population de phages est poursuivie par deux centrifugations en gradient de CsCl. L'ADN des phages est extrait par lyse des têtes. Les inserts d'ADN complémentaire sont récupérés par digestion EcoRI et purifiés sur gradient de sucrose. Les fractions correspondant à des fragments d'ADN de 500 à 2000 paires de bases sont collectées, dialysées, et concentrées par précipitation éthanolique. Les inserts ainsi purifiés sont ensuite insérés dans un vecteur d'expression dérivé du phage lambda gt 11 qui permet l'expression de gènes étrangers sous le contrôle du promoteur du gène lacZ (promoteur P_L). La protéine est exprimée sous une forme fusionnée avec la β-galactosidase.

2.Criblage de la banque et sélection des clones exprimant l'antigène de 28000

Un échantillon de cette banque produite en lambda gt11 est inoculé sur la souche de E.Coli Y1090 à une dilution de 10⁵ phages par boîte de 36 mm de diamètre. Après une phase de prolifération à 42°C durant 2 heures, l'expression de la protéine de fusion, sous le contrôle du promoteur du lacZ est induite à 37°C en présence d'un

inducteur métabolique l'isopropyl- α -D-thiogalactopyranoside. Les protéines synthétisées sont adsorbées sur filtres de nitrocellulose. Les filtres sont saturés par du sérum de veau foetal à 3% en tampon PBS puis incubés en présence soit du sérum de rat anti-P28 soit en présence du sérum de lapin , durant deux heures à 20°C ou 12 heures à 4°C en tampon PBS. Les filtres sont ensuite lavés en tampon PBS durant 30 minutes puis incubés en présence d'anticorps anti-rat ou anti-lapin couplés à la biotine. Le complexe ainsi constitué est révélé par l'addition de de peroxydase couplée à la streptavidine suivie d'une révélation enzymatique en présence de 4-Chloro-1-Naphtol (HRP, Bio-Rad) et d' H₂O₂ à 1 pour 1000 en tampon PBS.

3.Expression de l'antigène P28 dans E.Coli

Afin d'exprimer l'antigène P28 dans E.Coli, avec un rendement satisfaisant, un dérivé du plasmide d'expression pTG908, dénommé pTG1924 (Transgène), a été utilisé. Ce vecteur contient une origine de réplication, le promoteur P_L du bactériophage lambda et la séquence de fixation des ribosomes de cII incluant l'extrémité N-terminale du gène cII avec, en particulier, un site de restriction EcoRI unique situé à quelques 39 paires de bases en aval du codon d'initiation de traduction ATG du gène cII et en phase avec celui-ci.

VIII VACCINATION DES PRIMATES

Huits primates, ayant subi au préalable une mise en quarantaine de deux mois, ont été vaccinés au laboratoire soit avec un extrait membranaire de E.Coli, soit avec l'antigène P28.I contaminé par 20% de produits de E.Coli.

BABOUIN N°	E.COLI	cII-P28.I
1	-	-
2	2 fois 100µg	-
3	2 fois 200µg	-
4	bilharzien	-
5	-	2 fois 100µg
6	-	2 fois 100µg
7	-	2 fois 200µg
8	-	2 fois 200µg

Les animaux ont reçu, mélangé à l'antigène, 1.25mg d'hydroxyde d'aluminium à chaque injection. Quatre semaines après la seconde injection les animaux ont été soumis à une infection d'épreuve par 600 furcocercaires de S.mansoni. Les animaux ont été perfusés 45 jours après l'infestation et les vers ont été collectés puis comptés. Des échantillons de tissu hépatique ont été fixés par l'acide picrique. L'étude anatomopathologique des échantillons a été réalisée par J.A Grimaud, à Lyon.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1965) Acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the albino rat. Parasitology, 55, 711.
- 2) MADDISON, S.E., NORMAN, L., GEIGER, S.J. and KAGAN, I.G. (1970) S. mansoni infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed and antigen sensitized animals. J. Parasitol., 56, 1058.
- 3) SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1965) Naturally acquired resistance to experimental infections of S. mansoni in the Rhesus monkeys (*Macaca Mulatta*). Parasitology, 55, 701.
- 4) KAGAN, I.G. (1958) Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. Rice. Inst. Pamph., 45, 151.
- 5) LEWERT, R.M. (1958) Invasiveness of helminth larvae. Rice Inst. Pamph., 45, 97.
- 6) CLEGG, J.A. and SMITHERS, S.R. (1968) Death of schistosome cercariae during the penetration of the skin. II penetration of mamalian skin by S.mansoni. Parasitology, 58, 111.
- 7) PURNELL, R.E. (1966) Host-parasite relationships in schistosomiasis. II. The effects of age and sex on the infection of mice and hamsters with cercariae of S. mansoni and of hamsters with cercariae of S. haematobium. Ann.Trop. Med. Parasit., 60, 94.
- 8) ROBINSON, E.J. (1957) A possible effect of testosterone on the development of Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 43, 59.
- 9) DAVIES, P. and JACKSON, H. (1970) Experimental studies on the chemosterilization of S.mansoni. Parasitology, 61, 167

- 10) CHEEVER, A.W. and POWERS, K.G. (1969) Schistosoma mansoni infection in rhesus monkeys : changes in egg production and egg distribution in prolonged infections in intact and splenectomized monkeys. Ann. Trop. Med. Parasit., 63, 83.

- 11) CIOLI, A. and DENNERT, G. (1976) The course of Schistosoma mansoni infection in thymectomized rats. J. Immunol., 117, 59.

- 12) SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1969) Immunity in schistosomiasis. Ann.N.Y. Acad. Sci., 160, 826

- 13) KLOETZEL K. (1967) Egg and pigment production in S. mansoni infections of the white mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 293.

- 14) KLOETZEL K. and RODRIGUES DA SILVA J. (1967) Schistosomiasis mansoni acquired in adulthood : behaviour of egg counts and the intradermal test. Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 167.

- 15) SMITHERS S.R. and TERRY R.J. Acquired resistance to experimental infections of S.mansoni in the albino rat.(1965) Parasitology, 55, 711.

- 16) NAIMARK, D.H., BENENSON, A.S., OLIVER-GONZALEZ, J., MAC MULLEN, D.B. and RITCHIE, L.S. (1960) Studies of schistosomiasis in primates : observation on acquired resistance. Am. J. Trop. Med. Hyg., 9, 430.

- 17) RITCHIE, L.S., KNIGHT, W.B., Mac MULLEN, C.B. and VON LICHTENBERG, F. (1966) The influence of infection intensity of S. mansoni on resistance against existing and subsequent infections in Macaca mulatta. Am. J. Trop. Med. Hyg., 15, 43.

- 18) SMITHERS, S.R. and TERRY, R.J. (1967) Resistance to experimental infection by S. mansoni in Rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 61, 517.

- 19) 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 of IgG for classical pathway activation. J. Immunol. 123, 1551.

- 20) RAMALHO-PINTO, F.J., Mc LAREN, D.J. and SMITHERS, S.R. (1978) Complement mediated killing of Schistosoma mansoni by rat eosinophils in vitro. J. Exp. Med., 147, 147.
- 21) 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.
- 22) 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 schistosomules. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 26. 134.
- 23) CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1972) The effect of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. Int. J. Parasit. 2, 79.
- 24) CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. & PETITPREZ, A. (1974) Etude in vitro des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative in vitro de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de Schistosoma mansoni. J. Parasit. 4, 613.
- 25) CAPRON, M., CAMUS, D., CARLIER, Y., FIGUEIREDO, J.F.M., PRATA, A. & CAPRON, A. (1977) Immunological studies in human schistosomiasis. II Cytotoxic antibodies for Schistosoma mansoni schistosomules. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 26, 248.
- 26) SHER, A., SMITHERS, S.R. & Mc KENZIE, P. (1975) Passive transfer of acquired resistance to Schistosoma mansoni in laboratory mice. Parasitology 70, 347.
- 27) BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, C & REES, P.M. (1975) Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula. Nature 256, 727.

- 28) BUTTERWORTH, A.E., DAVID, J.R., FRANKS, D., MAHMOUD, A.A.F., DAVID, P.H., STURROCK, R.F. & HOUBA, V. (1977a) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 51 Cr-labeled schistosomula of *S. mansoni* : damage by purified eosinophils. *J. exp. Med.* 145, 136.
- 29) BUTTERWORTH, A.E., REMOLD, H.G., HOUBA, V., DAVID, J.R., FRANKS, D., DAVID, P.H. & STURROCK, R.F. (1977b) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to 51 Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* : mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118, 2230.
- 30) CAPRON, A., DESSAINT, J.P., HAQUE, A., CAPRON, M., Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against parasites. *Prog. Allergy*, vol. 31, pp. 234-267 (KARGER, BASEL 1982).
- 31) CAPRON, M., ROUSSEAU, J., MAZINGUE, C., BAZIN, H., and CAPRON A. (1978) Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody dependent eosinophil cytotoxicity of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Immunol.*, 121, 2518.
- 32) ANWAR, A.R.E. and KAY, A.B. (1977) The ECF-A tetrapeptides and histamines selectively enhance human eosinophil complement receptors. *Nature*, 269, 522.
- 33) CAPRON, M., CAPRON A., GOETZL, E.J, and AUSTEN, K.F. (1981) Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. *Nature*, 289, 71.
- 34) CAPRON, M., CAPRON, A., BAZIN G., BOUT D., and JOSEPH, M. (1978) Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8, 127.
- 35) BAZIN, H., BECKER, A., AND QUERINJEAN, P. (1974) Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE, and IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 4, 44.

- 36) BACH, M.K., BLOCH, K.J., and AUSTEN, K.F. (1971) IgE and IgG_a antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells.II. Interaction of IgG_a and IgE at the target cell. J. Exp. Med., 133, 772.
- 37) HALPER, J., and METZGER, H. (1976) The interaction of IgE with rat basophil leukemia cells. VI. Inhibition by Ig_a immune complexes. Immunochemistry, 15, 907
- 38) GRZYCH, J.M., CAPRON, M., DISSOUS, C., and CAPRON A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. J. Immunol. 133, 998
- 39) DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BOUT, D., and CAPRON, A. (1975) Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (S.mansoni or S.haematobium) Clin. exp. Immunol., 20, 427.
- 40) CAPRON, M., BAZIN, H., JOSEPH, M., and CAPRON, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., 126, 1764.
- 41) CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., and BAZIN, H. (1975) Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni schistosomules. Nature (Lond.) 253, 474.
- 42) JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., A. (1977) Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. Cell. Immunol. 34, 247.
- 43) SEGAL, D.M., TAUROG, J.D. and METZGER M. (1977) Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. Proc. natl. Acad. Sci. USA 74, 2993.
- 44) AURIAULT, C., PESTEL, J., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., and CAPRON, A. (1981) Interaction between macrophage and Schistosoma mansoni schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomule. Cell. Immunol. 62, 15.

- 45) JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H., VIENS, P. (1983): A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 310 .
- 46) JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, M., AMEISEN, J.C., TORPIER, G., KUSNIERZ, J.P., OVLAQUE, G., CAPRON, A. (1984) IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminths. International Work-shops on Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity, Anna-polis, June 10-13, (Plenum, New-York).
- 47) Septième Rapport du Programme de Recherche sur les Maladies Tropicales (TDR) O.M.S., Genève 1985
- 48) DISSOUS, C. (1984) Etude des antigènes de surface de Schistosoma mansoni. Caractérisation de molécules impliquées dans l'immunité à la réinfection. Thèse, D.Sc., Université des Sciences et Techniques de Lille, Lille (France).
- 49) BUTTERWORTH, A.E., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., RICHARDSON, B.A., ARAP SIONGOK, T.K. and STURROCK, R.F. (1984) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment observations and the results of treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 108
- 50) KHALIFE, J., CAPRON M., CAPRON A., A., GRZYCH, J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W, and OUMA, J.H. (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.*, (sous presse)
- 51) BUTTERWORTH, A.E., BENSTED.SMITH, A., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKI, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H, ARAP SIOGOK, T.K., and STURROCK R.F. (1987) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*, 94, 281.
- 52) DISSOUS, C., DISSOUS, C., and CAPRON, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 215.

- 53) DISSOUS, C., GRZYCH, J.M., and CAPRON, A. (1982) Schistosoma mansoni surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG 2a. J. Immunol. 129, 2232.
- 54) GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H., and CAPRON, A. (1982) In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S.mansoni antibodies. J. Immunol. 129, 2739.
- 55) GRZYCH, J.M., CAPRON, M., LAMBERT, P.H., DISSOUS, C., TORRES, S., and CAPRON, A. (1985) An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. Nature, 316, 74.
- 56) DISSOUS, C., GRZYCH, J.M., and CAPRON, A. (1986) Schistosoma mansoni shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. Nature 323, 443 .
- 57) AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., VERWAERDE, C., PIERCE, R.J., JOSEPH, M., CAPRON, M., and CAPRON, A. (1984) Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for Schistosoma mansoni schistosomula in vitro. Eur. J. Immunol. 14, 132.
- 58) AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., JOSEPH, M., CAPRON, M., VERWAERDE, C., BILLAUT, P., and 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
- 59) SHER, A., E., PEARCE, S., HIENY, and S. JAMES. (1986) Induction of protective immunity against Schistosoma mansoni by a non-living vaccine. IV. Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity. J. Immunol. 136, 3878.
- 60) JAMES, S.L., E.J., PEARCE, and A. SHER. (1985) Induction of protective immunity against Schistosoma mansoni by a nonliving vaccine. II. Partial characterization of antigens by antibodies from mice immunized with soluble schistosome extracts. J. Immunol. 134, 3432.

- 61) LANAR, D.E., PEARCE, E.J., JAMES, S.L., SHER, A. (1986) Identification of paramyosin as Schistosoma antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science*, 234, 593
- 62) HAZDAI, R.T., LEVI-SCHAFFER, F., BRENNER, HOROWITZ, S., ESHHAR, Z., and ARNON, R. (1985) Protective monoclonal antibody against Schistosoma mansoni: antigen isolation, characterization, and suitability for active immunization. *J. Immunol.*, 135, 2772.
- 63) SMITH, M.A., and J.A. CLEGG. (1985) Vaccination against Schistosoma mansoni with purified surface antigen. *Science*. 227, 535.
- 64) PIERCE, R.J., AIMAR, C., BALLOUL, J.M., DELARUE, M., GRAUSZ, D., VERWAERDE, C. and CAPRON, A. (1985) Translation of Schistosoma mansoni antigens in Xenopus oocytes microinjected with mRNA from adult worms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 15, 171.
- 65) O'FARREL, P.H. (1975) High resolution two-dimensional gel electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007.
- 66) JAMES, S.L., CORREA-OLIVEIRA, R., and LEONARD, E.J. (1984) Defective vaccine-induced immunity to Schistosoma mansoni in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.* 133, 1587.
- 67) CORREA-OLIVEIRA, R., SHER, A. and JAMES, S.L. (1984) Defective vaccine-induced immunity to Schistosoma mansoni in P strain mice. I. Analysis of antibody responses. *J. Immunol.* 133, 1581.
- 68) PANCRE, V., JOSEPH, M., MAZINGUE, C., WIETZERBIN, J., CAPRON, A., and AURIAULT, C. (1987) Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon gamma. *J. Immunol.*, 138, 4490.
- 69) EFSTRADIATIS, A., and VILLA-KOMAROFF, L. (1979) Genetic engineering (Stelow, J.K. and Holoander, A. eds) Vol. I, p.15, Plenum, New York

- 70) WILLIAMS, J.D. (1981) Genetic engineering (Williamson, R., ed.) vol. I, p.2, Academic Press, New York.
- 71) LE BOUC, Y., DREYER, D., JAEGER, F., M. BINOUX, and P. SONDERMEYER. (1986) Complete characterization of the human IGF-I nucleotide sequence isolated from newly constructed adult liver cDNA library. FEBS, 196, 108.
- 72) MANNERVIK, B., ALIN, P., GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIR, M.K., WARHOLM, M., and JORNVALL, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc. natl. Sci. USA, 82, 7202.
- 73) TAYLOR, J.B., VIDAL, A., TORPIER, G., MEYER, D.J., ROITSCH, BALLOUL, J-M., SOUTHAN, C., PEMBLE, S., LECOCQ, J-P., CAPRON, A., and KETTERER, B. (1987) The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of Schistosoma mansoni. (soumis à publication).
- 74) AURIAULT, C., BALLOUL, J-M., PIERCE, R.J., DAMONNEVILLE, M., SONDEMEYER, P., and CAPRON, A. Helper T cells induced by purified 28-Kilodalton antigen of Schistosoma mansoni protect rats against infection. Infection and Immunity, 55, 1163.
- 75) LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature (London), 227, 680.
- 76) MENDEL-HARTVIG, I. (1982) A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 121, 215.
- 77) VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESHLAG, E., and ROSS, G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. 33, 988.

- 78) CHIRGWIN, J.M., PRZYBLA, A.E., Mac DONALD, R.J. and RUTTER, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294.
- 79) PELHAM, R.B. and JACKSON, J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from rabbit reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247.
- 80) MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E. and SANTER, V. (1971) Enzymic iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *J. Biochem.*, 124, 921.
- 81) MARCHALONIS, J.J. (1969) An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *J. Biochem.*, 113 299.
- 82) TOWBIN, H., T. STAEBLIN, and J. GORDON (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350.
- 83) HOHN, B., and MURRAY, K.(1977) Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3259.