

50376
1987
325

50376
1987
325

N° d'ordre : 756

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

FLANDRES-ARTOIS

THESE

présentée à l'Université de Lille I

pour obtenir le titre de Docteur es-Sciences Naturelles

par

Claudie VERWAERDE



**INDUCTION ET REGULATION DE LA
REPONSE IgE PAR LE PARASITE
TREMATODE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Présentée le 27 novembre 1987 devant la Commission d' Examen

MEMBRES DU JURY : Président : Mr. J. MONTREUIL

Rapporteurs : Mr. A. CAPRON
Mr. P-H. LAMBERT
Mr. J. KREMBEL
Mr. C. AURIAULT

Examineur : Mme G. SPIK

Je dédie cette Thèse :

à mes parents

à Alphée

à Gérardine, Yves et Thomas

**Ce travail a été réalisé dans le laboratoire et sous la direction du
Professeur André CAPRON**

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité Mixte INSERM 167 - CNRS 624

Institut PASTEUR de Lille

Avec les collaborations de :

Claude AURIAULT

Hervé BAZIN

Monique CAPRON

Martine DAMONNEVILLE

Michel JOSEPH

Jean-Marie GRZYCH

Raymond PIERCE

A Monsieur le Professeur André CAPRON

J'éprouve une grande fierté d'appartenir à votre laboratoire de recherche. Je tiens à vous exprimer ici ma profonde gratitude et mon entière admiration.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider la soutenance de cette Thèse.

A Monsieur le Professeur Paul-Henri LAMBERT

Je vous suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK

Vous m'avez fait l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean KREMBEL

C'est sous votre direction que j'ai commencé mes premiers travaux de recherche. Je suis heureuse de vous compter aujourd'hui parmi les membres de mon jury et vous en remercie.

A Monsieur le Docteur Claude AURIAULT

Par le dynamisme et l'enthousiasme dont vous faites preuve et que vous communiquez autour de vous, vous m'avez apporté une aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Soyez assuré de ma profonde amitié.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin et de quelque manière que ce soit, m'ont aidé à réaliser ce travail.

Une partie des travaux présentés dans ce mémoire a fait l'objet des publications suivantes :

VERWAERDE C., GRZYCH J.M., BAZIN H., CAPRON M. & CAPRON A. (1979)

Production d'anticorps monoclonaux anti-*Schistosoma mansoni*: Etude préliminaire de leurs activités biologiques. C. R. Acad. Sc. Paris, **289D**, 725.

VERWAERDE C., GRZYCH J.M., BAZIN H., CAPRON M. & CAPRON A. (1979)

Production of monoclonal antibodies against *S. mansoni*. Preliminary studies on their biological activities. Communication dans "Hybridoma technology with special reference to parasitic diseases" UNDP/World Bank/WHO.

BAZIN H., GRZYCH J.M., VERWAERDE C., CAPRON M. & CAPRON A. (1980)

A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. Ann. Immunol., **131D**, 359.

GRZYCH J.M., CAPRON M., VERWAERDE C., NOGEUIRA-QUEIROZ A.J., BAZIN H. & CAPRON A. (1981)

Monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. A summary of recent progresses. Communication dans "Properties of the monoclonal antibodies produced by Hybridoma technology and their application to the study of diseases". UNDP/World Bank/WHO.

CAPRON M., CAPRON A., JOSEPH M. & VERWAERDE C. (1983)

IgE receptors on phagocytic cells and immune response to schistosome infection. Monogr. Allergy, **18**, 33.

PIERCE R., VERWAERDE C., DAMONNEVILLE M., LEPRESLE T. & CAPRON A. (1983)

Allergens of *Schistosoma mansoni* : I. Comparison of the IgE response in human and experimental infections towards characterized allergens from adult worms products. Int. Archs Allergy appl. Immun., **72**, 219.

AURIAULT C., DAMONNEVILLE M., VERWAERDE C., PIERCE R.J., JOSEPH M., CAPRON M. & CAPRON A. (1984)

Rat IgE directed against schistosomula-released products of schistosomula of *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. Eur. J. Immunol., **14**, 132.

DAMONNEVILLE M., PIERCE R.J., VERWAERDE C. & CAPRON A. (1984)

Allergens of *Schistosoma mansoni* : II. Fractionation and characterization of *S.mansoni* egg allergens. Int. Archs Allergy appl. Immun., **73**, 248.

AURIAULT C., DAMONNEVILLE M., JOSEPH M., CAPRON M., VERWAERDE C., BILLAUT P. & CAPRON A. (1985)

Defined antigens secreted by the larvae of schistosomes protect against schistosomiasis : induction of cytotoxic antibodies in the rat and the monkey. Eur. J. Immun., **15**, 1168.

PIERCE R.J., AIMAR C., BALLOUL J.M., DELARUE M., GRAUSZ D., VERWAERDE C. & CAPRON A. (1985)

Translation of *Schistosoma mansoni* antigens in *Xenopus* oocytes microinjected with mRNA from adult worms. Mol. Biochem. Parasitol., **15**, 171.

VERWAERDE C., AURIAULT C., DAMONNEVILLE M., GRZYCH J.M., PIERCE R.J. & CAPRON A. (1985)

IgG response of rats and humans to the released products of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Parasitology, **90**, 509.

DAMONNEVILLE M., AURIAULT C., VERWAERDE C., DELANOYE A., PIERCE R.J. & CAPRON A. (1986)

Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula-released products antigens (SRP-A) : role of IgE antibodies. Clin. exp. Immunol., **65**, 244.

DAMONNEVILLE M., AURIAULT C., THOREL T., VERWAERDE C., PIERCE A., STRECKER G. & CAPRON A. (1986)

Induction of a protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum-released products : Immunochemical properties of the target antigens. Int. Archs Allergy appl. Immunol., **79**, 320.

VERWAERDE C., AURIAULT C., DAMONEVILLE M., NEYRINCK J.L., VENDEVILLE C. & CAPRON &. (1986)

Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. Scand. J. Immunol., **24**, 509.

VERWAERDE C., JOSEPH M., CAPRON M., PIERCE R.J., DAMONEVILLE M., VELGE F., AURIAULT C. & CAPRON A. (1987)

Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., **138**, 4441.

DAMONEVILLE M., VELGE F., VERWAERDE C., PESTEL J., AURIAULT C. & CAPRON A. (1987)

Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula-released products (SRP-A). Clin. exp. Immunol., **69**, 299.

VERWAERDE C., AURIAULT C., NEYRINCK J.L. & CAPRON A.

Properties of serine proteases of *S. mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. Scand. J. Immunol. (Sous presse).

SOMMAIRE

	Page
GENERALITES	13
TRAVAUX PERSONNELS	53
DISCUSSION ET CONCLUSION	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
TABLE DES MATIERES	175

LISTE DES ABREVIATIONS :

ACF	: Adjuvant complet de Freund
Ag	: Antigène
CR3	: Récepteur du fragment C3bi du complément
DNP-OA	: Dinitophényl-ovalbumine
FcE R	: Récepteur du fragment Fc des IgE
Fc γ R	: Récepteur du fragment Fc des IgG
GEF	: Glycosylation-enhancing factor
GIF	: Glycosylation-inhibiting factor
IFN	: Interféron
IgE-BF	: IgE-binding factor
IgE-PF	: IgE-potentiating factor
IgE-SF	: IgE-suppressive factor
IL	: Interleukine
kDa	: Kilodalton
Ly	: Lymphocytes
MØ	: Macrophage
PCA	: Passive cutaneous anaphylaxis
RAST	: Radio allergosorbent test
SDIF	: Schistosoma derived inhibitory factor
SRP	: Schistosomulum-released products

RESUME

Les anticorps de classe IgE produits lors de l'infection par *Schistosoma mansoni* jouent un rôle essentiel dans l'immunité anti-parasitaire. L'étude des antigènes cibles et inducteurs de cette réponse IgE protectrice s'avère donc d'un intérêt primordial et a fait l'objet de nos travaux. Cette étude a été réalisée sur les parasites prélevés au stade larvaire (schistosomule), cible de la réponse immune et au stade adulte (schistosome), stade essentiel dans le maintien de l'immunité. Les anticorps IgE des sérums de rats immuns ou de patients bilharziens réagissent de façon intense avec de nombreux antigènes du vers adulte, en révélant néanmoins une fraction majeure commune de pI 4,9-5,2 et de PM 70-150 kDa. L'induction de la réponse IgE par le schistosomule a été étudiée en utilisant comme matériel parasitaire les produits d'excrétion-sécrétion de la larve (SRP : Schistosomulum-released products). L'injection de ce SRP à des rats, sans addition d'adjuvant, entraîne une production importante d'anticorps IgE cytotoxiques *in vitro* pour le schistosomule à un niveau comparable à celui d'un sérum d'infection, ainsi qu'une réponse IgG protectrice significative. Les anticorps IgE anti-SRP révèlent deux molécules de 22 et de 26 kDa chez le schistosomule, la molécule de 26 kDa étant reconnue majoritairement par des sérums d'infection. L'importance de cet antigène de 26 kDa dans l'immunité anti-schistosome a d'autre part été confirmée par la production d'un anticorps monoclonal de classe IgE reconnaissant cette molécule dans le SRP. Cet anticorps monoclonal présente les mêmes activités que les IgE d'un sérum d'infection, à savoir une activité schistosomicide *in vitro* en présence de macrophages (65%), d'éosinophiles (50%) et de plaquettes (70%). De plus, une protection des rats contre la schistosomiase de 45 à 65% est obtenue par l'injection de cet anticorps chez ces animaux avant leur infestation, ce qui constitue une preuve directe de l'intervention *in vivo* des mécanismes décrits *in vitro*.

En plus de la production d'IgE spécifiques, l'infection par schistosome

s'accompagne d'une élévation importante de la réponse IgE générale. L'implication du stade larvaire dans ce phénomène de potentialisation a été étudiée à l'aide du matériel SRP soit *in vitro* sur la synthèse d'IgE par des cellules humaines ou de rat en culture soit *in vivo* sur la production d'IgE chez des rats immunisés avec un allergène non parasitaire. Une nette augmentation de la synthèse d'IgE est observée sous l'action de facteurs présents dans le SRP, facteurs supportant une activité de type sérine protéase. Ces molécules agissent par une augmentation du nombre de FcE RII au niveau de la membrane des cellules lymphoïdes et sont présentes sous deux formes moléculaires : une majeure de 27,5 kDa et une mineure de 29 kDa.

Nos travaux indiquent donc que le parasite *S. mansoni* intervient dès le stade larvaire dans l'induction d'une réponse anticorps protectrice et contrôle cette réponse immune par la libération de facteurs immunomodulateurs.

GENERALITES

INTRODUCTION

Le parasitisme est certainement l'une des questions les plus fascinantes posées par le monde vivant. En effet, comment un organisme peut-il vivre nécessairement et directement d'un autre organisme sans aucune contrepartie, à la fois en se protégeant contre les réactions de défense de l'hôte qu'il habite tout en le ménageant, condition à sa propre survie. La notion de parasitisme implique donc une adaptation morphologique, fonctionnelle et écologique du parasite à son hôte d'une rare complexité.

Parmi les parasitoses les plus importantes, la schistosomiase (ou bilharziose, du nom de celui qui l'a décrite, Théodore BILHARZ) se situe au deuxième rang mondial, après le paludisme. Elle sévit dans les régions chaudes du globe dans des zones géographiques aussi variées que l'Afrique, l'Amérique centrale, l'Amérique latine, les Caraïbes ou encore l'Extrême-Orient. On estime actuellement à 250 millions le nombre d'individus infectés par schistosome. Parmi ceux-ci, 5 à 10% feront une forme grave de la maladie pouvant aller jusque la mort.

Trois agents principaux du genre schistosome sont responsables de la maladie chez l'homme :

- *Schistosoma haematobium*, agent de la bilharziose génito-urinaire,
- *Schistosoma japonicum*, agent de la bilharziose artério-veineuse,
- *Schistosoma mansoni*, agent de la bilharziose intestinale.

La schistosomiase à *S. mansoni* a été la plus étudiée en raison de la possibilité de la reproduire chez différents modèles expérimentaux. Il a été ainsi montré que bien que l'hôte développe une réponse immunitaire importante et très variée, celle-ci n'affecte

que le stade larvaire du parasite et se révèle totalement inefficace sur le parasite de la première infection.

Depuis quelques années, les recherches se sont orientées principalement dans trois directions :

- l'étude des mécanismes effecteurs de l'immunité avec la définition des éléments cellulaires et moléculaires impliqués;
- la caractérisation des antigènes parasitaires cibles de la réponse immune;
- la modulation de cette réponse immune par le parasite.

Parmi toutes les données importantes apportées par ces travaux, la réponse humorale de type IgE s'est révélée être une des composantes essentielles de l'immunité anti-schistosome. C'est dans ce domaine particulier de recherche que nous avons entrepris une série de travaux visant d'une part à la connaissance des antigènes inducteurs et cibles de la réponse IgE spécifique et d'autre part à la compréhension des mécanismes régulant la réponse IgE en général par le parasite.

CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION PAR *S.MANSONI*

I-LE CYCLE DE *S. MANSONI*

Le parasite *S. mansoni* présente un cycle évolutif relativement complexe, faisant intervenir un hôte intermédiaire et un hôte définitif. Ce cycle est schématisé dans la Figure 1 (p.17).

-- Les **cercaires** (1), encore appelées furcocercaires, représentent le stade infestant pour l'homme. Elles sont constituées d'une tête et d'une queue bifide, présentent un phototropisme et une motilité importante qui leur permettent de nager à la surface de l'eau et d'entrer en contact avec l'hôte définitif. Leur durée de vie est relativement courte, environ 8 à 12 heures après leur émission. La pénétration dans la peau se fait par l'action conjuguée des mouvements de la cercaire et la libération d'enzymes contenues dans les glandes céphaliques.

-- Seule la partie antérieure pénètre et donne naissance au **schistosomule** (2), stade larvaire du parasite. Cette transformation se traduit par des changements morphologiques importants avec notamment l'acquisition d'une double membrane appelée membrane heptalaminée. Les schistosomules migrent jusqu'au poumon où on les retrouve vers le 6^{ème} jour puis vers le foie.

-- Dans le foie, le parasite mature en vers adulte, le **schistosome** (3). Leur longueur peut atteindre 15 à 20 mm et leur durée de vie, en moyenne de 2 à 5 ans, peut aller jusqu'à 25 ans. Les schistosomes sont des parasites hématophages et bisexués. Ils vivent en accouplement continu, la femelle logée dans le canal gynécophore du mâle.

-- C'est vers le 35^{ème} jour après la pénétration dans l'hôte que commence la ponte des **œufs** (4) par les femelles gravides ayant migré au niveau du système mésentérique. On estime environ à 300 le nombre d'œufs pondus par femelle et par jour. L'œuf de *S. mansoni* se caractérise par un éperon latéral. Il effectue une migration à travers les tissus pour gagner la lumière intestinale; mais une partie reste

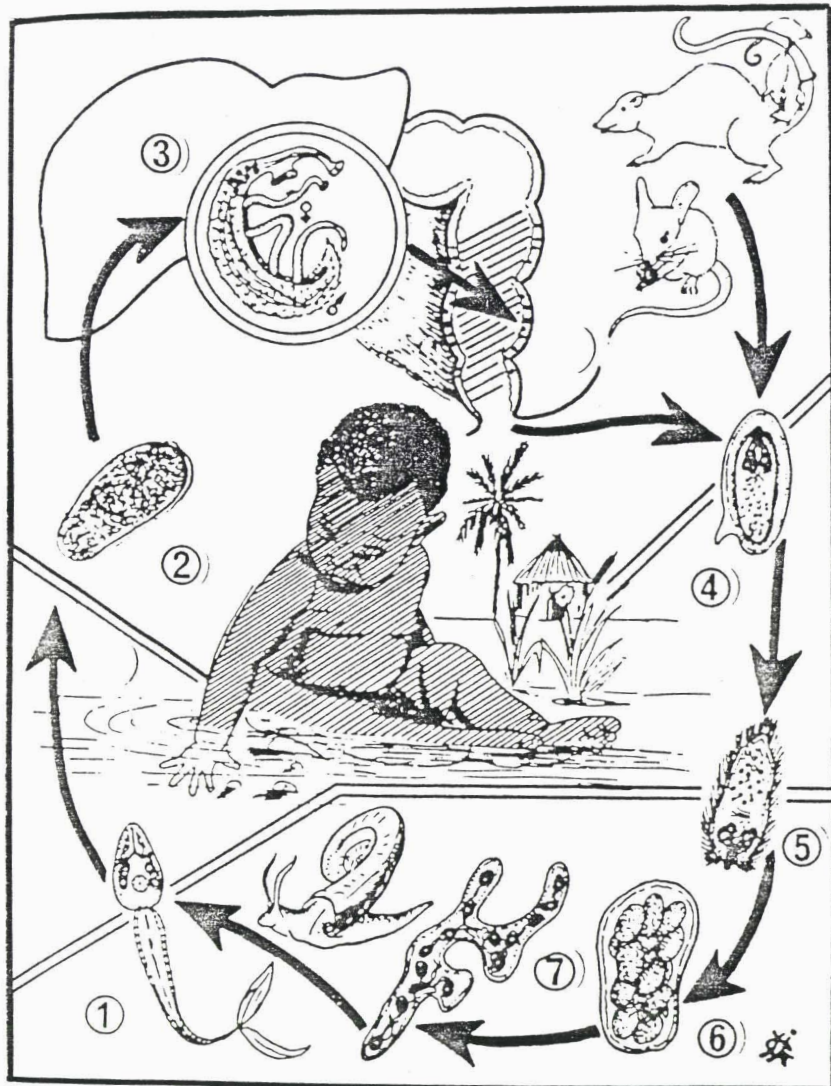


Figure 1 : Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (d'après GOLVAN, Y.J.,
Ed. Flammarion, 1969).

bloquée dans les tissus et provoque la formation de granulomes, responsables en grande partie de la pathologie de la schistosomiase.

-- Pendant sa migration, l'œuf subit une maturation, mais ce n'est qu'au contact de l'eau qu'il éclot et libère le **miracidium** (5), organisme cilié. Grâce à son déplacement rapide, le miracidium pourra entrer en contact avec son hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce du genre *Biomphalaria*. En quelques jours, le miracidium se transforme en **sporocyste primaire** (6). Chaque mollusque ne permet en général l'évolution que d'un seul sporocyste. Ce sporocyste primaire donne ensuite naissance à de nombreux **sporocystes secondaires** (7) qui vont se transformer en cercaires, stade infestant pour l'hôte définitif.

II-L'IMMUNITE A *S. MANSONI*

A - IMMUNITE NATURELLE

La susceptibilité à l'infection par *S. mansoni* est très variable selon l'espèce animale considérée. En fonction de leur résistance à l'infection, trois catégories d'hôtes peuvent être définies. Les hôtes ne permettant aucune vie du parasite sont dits résistants. Chez les hôtes permissifs - comme le hamster, la souris ou encore l'homme - le parasite peut se développer jusqu'au stade final, pondre des oeufs et persister très longtemps. Le rat et le singe Rhésus constituent une troisième catégorie d'hôtes, dits semi-permissifs, particulièrement intéressante. En effet, bien que permettant un certain degré de développement du parasite, le rat élimine à partir de la 3^{ème} semaine la presque totalité de la charge parasitaire (SMITHERS et TERRY, 1965a) alors que chez le singe Rhésus, on observe d'abord une baisse de la ponte suivie d'une diminution du nombre de vers (SMITHERS et TERRY, 1965b). Ce phénomène, dit de "self-cure", est encore mal connu et ne peut être expliqué qu'en partie par un mécanisme immunologique.

A côté de cette immunité naturelle dépendante d'espèce, une immunité intraspécifique semble également exister. Chez l'homme, CARDOSO (1953) a montré une susceptibilité plus importante de la race blanche comparée à la race noire au Brésil. Chez la souris, une différence de susceptibilité génétique a été également observée grâce à l'utilisation d'animaux de souche différente (KAGAN, 1958).

B - IMMUNITE ACQUISE

Nous nous limiterons essentiellement dans ce chapitre au modèle expérimental du rat, en soulignant cependant les analogies avec la schistosomiase humaine.

1-Concept de l'immunité concomitante

a-Définition

L'infection par *S. mansoni* se traduit par la mise en place d'une immunité importante mais d'un caractère particulier. Elle ne s'exprime en effet que sur les vers d'une deuxième infection et se révèle totalement inefficace sur ceux de la première infection. SMITHERS et TERRY (1969) furent les premiers à proposer le terme d'immunité concomitante par analogie avec l'immunité anti-tumorale. En effet, des animaux portant une tumeur sont souvent résistants à une deuxième greffe de la même tumeur; la deuxième greffe est rejetée tandis que la première peut continuer à se développer, se révélant insensible à la réponse immunitaire qu'elle a engendrée (GERSHON *et al.*, 1967). L'immunité concomitante a l'avantage biologique évident de prévenir une surcharge parasitaire dans l'hôte. Les vers d'une première infection, en conjonction avec la réponse immunitaire de l'hôte, représentent une barrière à une continuelle réinfection qui conduirait à long terme à la mort à la fois de l'hôte et du parasite.

b-Support de l'immunité concomitante

Le parasite *S. mansoni* est présent chez l'hôte définitif sous trois stades : l'œuf, le schistosomule et le schistosome. Chacun de ces stades représente donc un candidat potentiel pour l'établissement de l'immunité.

La participation des œufs dans l'immunité a été essentiellement abordée chez la souris par des expériences d'infection unisexuée à *S. mansoni* (DEAN *et al.*, 1978; BICKLE *et al.*, 1979). Malgré quelques résultats contradictoires, il semble que les œufs ne soient pas essentiels dans le développement de l'immunité acquise à *S. mansoni* bien que représentant un stimulus antigénique important.

L'implication précise du stade larvaire a été plus délicate à étudier car le schistosomule évolue dans l'organisme. Ce problème fut contourné par l'utilisation de cercaires irradiées, qui meurent avant d'atteindre le stade adulte. Il est maintenant bien établi que l'infection d'animaux d'espèce différente par des cercaires irradiées les protègent en partie contre une infection ultérieure et que cette résistance dépend de mécanismes immunologiques spécifiques (HSÜ *et al.*, 1969; JAMES *et al.*, 1981; FORD *et al.*, 1984; Mc LAREN *et al.*, 1985).

Le vers adulte est actuellement considéré comme le principal stimulus de l'immunité. Par transfert de vers adultes dans la veine porte de singes normaux, SMITHERS et TERRY (1967) ont décrit une résistance presque totale contre une deuxième infection dans 50% des cas, avec une nette élimination des symptômes dans les autres cas. Dans le cas particulier du rat, modèle expérimental que nous étudions, l'apparition de l'immunité coïncide avec le rejet des vers adultes, c'est-à-dire une libération importante d'antigènes. Par la suite, l'absence de stimulus antigénique pourrait expliquer la disparition en quelques semaines de cette immunité (PEREZ *et al.*, 1974).

2-La réponse humorale

L'infection par *S. mansoni* se traduit par une production importante d'anticorps. Ces anticorps n'apparaissent cependant que lentement (à partir de la 3^{ème} semaine d'infection) pour atteindre un maximum vers la 12^{ème} semaine (MADDISON *et al.*, 1970). Néanmoins, la réponse humorale est essentielle dans l'immunité anti-schistosome. Le transfert passif de sérums immuns à des rats sains confère une protection significative contre une infection ultérieure par *S. mansoni* (A.CAPRON *et al.*, 1980a). Parallèlement, le traitement de rats par un sérum anti- μ entraîne une nette diminution de l'efficacité d'une infection par schistosomes (BAZIN *et al.*, 1980a).

La principale caractéristique de cette réponse humorale est la production importante d'anticorps anaphylactiques, anticorps réaginique de classe IgE chez l'homme, la souris ou le rat et anticorps non réaginique de classe IgG2a pour le rat et IgG1 pour la souris (DESSAINT *et al.*, 1975b; ROUSSEAUX-PREVOST *et al.*, 1980). Chez le rat, une corrélation étroite existe entre l'apparition des anticorps IgE anti-*S.mansoni* et le développement de l'immunité à la réinfection (ROUSSEAUX-PREVOST *et al.*, 1978). Nous verrons dans le chapitre "Mécanismes effecteurs" que ces deux types d'anticorps sont d'une particulière importance dans l'immunité anti-schistosome et qu'ils participent aux réactions de défense contre le parasite en collaboration avec des populations cellulaires particulières.

3-Les mécanismes effecteurs spécifiques de l'immunité

a-Cytotoxicité par anticorps létaux

CLEGG et SMITHERS (1972) furent les premiers à décrire la présence d'anticorps létaux pour le schistosomule en présence de complément, dans les sérums immuns de singe Rhésus. Cette activité schistosomicide fut ensuite retrouvée chez de

nombreuses espèces animales comme l'homme, le lapin ou le rat (A.CAPRON *et al.*, 1974). La signification biologique de ce mécanisme reste cependant incertaine. Dans la plupart des cas, une source de complément puissante et hétérologue, le complément de cobaye, est nécessaire pour obtenir une cytotoxicité significative (M.CAPRON *et al.*, 1977). D'autre part, aucune corrélation n'est trouvée entre le taux en anticorps létal et l'immunité (PEREZ *et al.*, 1974) et le transfert passif de fractions d'IgG montrant une activité létale *in vitro* s'avère inefficace *in vivo* (SHER *et al.*, 1975). Enfin, des antigènes parasitaires libérés dans la circulation semblent agir comme des facteurs bloquants par une forte activité anticomplémentaire (SANTORO *et al.*, 1980). Une relation inverse est en effet trouvée entre la capacité létale et le taux en antigènes circulants des sérums (M.CAPRON *et al.*, 1980).

b-Cytotoxicité cellulaire

Les mécanismes cellulaires de l'immunité à *S. mansoni* n'obéissent pas au schéma classique observé lors d'infection par organismes vivants. Le plus surprenant est la non-participation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dans l'élimination du parasite. Toutes les conditions pour une activité CTL sont pourtant remplies puisque les schistosomes peuvent acquérir à leur surface des antigènes majeurs d'histocompatibilité (SHER *et al.*, 1978). Des lymphocytes T alloréactifs, bien que capables d'adhérer aux larves, sont totalement incapables de les tuer (BUTTERWORTH *et al.*, 1979). Un seul travail a montré une activité schistosomicide des lymphocytes T dans la schistosomiase humaine (ELLNER *et al.*, 1982) mais cela reste une observation unique et non reproduite dans d'autres laboratoires. A l'heure actuelle, il est encore difficile d'expliquer précisément comment le parasite se protège de l'action cytocide de ces cellules, malgré certains éléments que nous apporterons dans un chapitre ultérieur. Bien que sans action directe sur le parasite, les lymphocytes T sont néanmoins indispensables pour le développement d'une immunité contre les schistosomes. Cette thymodépendance a été mise en évidence pour des composantes

essentielles de la réponse immune comme la production d'IgE, l'hyperéosinophilie ou encore l'hypersensibilité de type retardé (M.CAPRON *et al.*, 1983; PHILLIPS *et al.*, 1983).

-- Cytotoxicité des neutrophiles

La participation des neutrophiles fut décrite pour la première fois par DEAN *et al.* (1974). Ces auteurs montrèrent que des neutrophiles sanguins étaient capables de tuer des schistosomules en présence d'anticorps de rat et de complément. Ces résultats furent ensuite retrouvés par INCANI et Mc LAREN (1981) qui décrivent en plus une cytotoxicité directe des neutrophiles avec du complément mais sans participation d'anticorps, mécanisme dépendant de la génération de molécules C3b à la surface du parasite. Des résultats contradictoires furent aussi obtenus chez l'homme. Pour VADAS *et al.* (1979), les neutrophiles adhèrent de façon réversible au parasite et n'entraînent que des dommages minimes à sa membrane. A l'opposé, Mc KEAN et ANSWAR (1981) reportent la mort de schistosomules par des neutrophiles humains en présence de complément. Compte-tenu de la nécessité du complément dans ce système et la fonction plutôt contestable des anticorps dans ce mécanisme effecteur, la cytotoxicité des neutrophiles apparaît plus comme le résultat d'une adhérence immune que comme un véritable mécanisme actif de cytotoxicité cellulaire.

-- Cytotoxicité des macrophages dépendante d'IgE

En 1975, A.CAPRON *et al.* (1975) observèrent que des macrophages normaux incubés avec du sérum de rat immun à *S. mansoni* sont capables dans un premier temps d'adhérer au schistosomule puis de le tuer après 18 heures de contact. Le chauffage du sérum immun (3h à 56°C) avant la préincubation avec les macrophages abolit complètement l'adhérence et la cytotoxicité de ces cellules et l'addition d'une source de complément frais ne restaure pas l'activité schistosomicide. Ces résultats laissent donc supposer la participation des anticorps de classe IgE, autre facteur thermolabile du sérum. Des expériences de chromatographie d'affinité montrèrent que

le facteur sérique impliqué n'était retenu que par un immunoabsorbant anti-IgE. Le rôle des IgE fut ensuite confirmé par des expériences d'inhibition avec des protéines myélomateuses où seule l'IgE inhibait la cytotoxicité (JOSEPH *et al.*, 1977). La fraction anticorps IgE induisant la cytotoxicité des macrophages se présente sous forme complexée à des antigènes circulants de *S. mansoni*. La spécificité de l'anticorps est essentielle puisqu'aucune mortalité du schistosomule n'est observée avec des macrophages incubés avec des sérums réaginique dirigés contre des allergènes non-parasitaires. Inversement, des macrophages incubés avec du sérum immun à *S. mansoni* n'ont aucun effet sur d'autres cibles parasitaires, même très proches comme *S. bovis* (A.CAPRON *et al.*, 1976). Ce mécanisme effecteur fut également retrouvé avec des sérums de patients bilharziens et des monocytes humains ou des macrophages péritonéaux de babouins (JOSEPH *et al.*, 1978).

-- Cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps

BUTTERWORTH *et al.* (1975) furent les premiers à souligner le rôle potentiel des éosinophiles dans les mécanismes d'immunité à *S. mansoni*. Ces auteurs montrèrent que des éosinophiles humains normaux étaient capables de tuer *in vitro* des schistosomules en présence d'anticorps de classe IgG présents dans le sérum de patients infectés par *S. mansoni*. Des études pathologiques avaient montré déjà une accumulation d'éosinophiles autour du schistosomule au point de pénétration du parasite ou au niveau du poumon (HSÛ *et al.*, 1971 ; VON LICHTENBERG *et al.*, 1976). De plus, l'immunité à la réinfection chez la souris est nettement diminuée par l'injection d'un sérum anti-éosinophile (MAHMOUD *et al.*, 1975). Toutes ces données expérimentales suscitèrent un intérêt particulier pour cette population cellulaire et après l'homme, la fonction effectrice des éosinophiles put être démontrée chez le babouin (BUTTERWORTH *et al.*, 1976), le rat (Mc KENZIE *et al.*, 1977; M.CAPRON *et al.*, 1978) et la souris (KASSIS *et al.*, 1979).

Le maximum de connaissances sur ce mécanisme effecteur fut apporté par des

travaux réalisés dans notre laboratoire, utilisant le rat comme modèle expérimental. M.CAPRON démontra la double fonction effectrice des éosinophiles, dépendante des deux classes d'anticorps anaphylactiques du rat, l'IgG2a et l'IgE (M.CAPRON *et al.*, 1978, 1981a). Durant les 6 premières semaines d'infection, la cytotoxicité des éosinophiles est dépendante d'anticorps de classe IgG2a alors qu'après la 8^{ème} semaine, ce sont les anticorps de classe IgE qui interviennent dans ce mécanisme effecteur. Dans les deux cas, le mastocyte, bien que n'induisant pas par lui-même la mort du parasite, se comporte comme une cellule accessoire indispensable pour l'expression de cette cytotoxicité. L'épuisement en mastocytes de la population effectrice se traduit par une diminution dramatique de la mortalité des schistosomules. Cette capacité cytotoxique est restaurée en grande partie par l'addition soit d'une population de mastocytes soit de produits de dégranulation de ces cellules obtenus par des réactions chimiques ou anaphylactiques. Parmi ces produits de dégranulation, l'ECF-A (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis) semble jouer un rôle essentiel dans l'expression de la capacité schistosomicide des éosinophiles par augmentation des récepteurs Fc de ces cellules (M.CAPRON *et al.*, 1981b). En conclusion, l'activité schistosomicide des éosinophiles semble résulter d'au moins deux signaux : l'un engendré par la fixation de l'anticorps sur le récepteur Fc de la cellule, l'autre induit par les produits de dégranulation du mastocyte par les IgG2a et les IgE. L'obtention d'un anticorps monoclonal IgG2a cytotoxique en présence d'éosinophiles a constitué une preuve supplémentaire de l'efficacité de ce mécanisme effecteur aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (GRZYCH *et al.*, 1982). Enfin, la collaboration IgE-éosinophile a été également démontrée dans la schistosomiase humaine (M.CAPRON *et al.*, 1984a).

-- Cytotoxicité des plaquettes dépendante d'IgE

La participation des plaquettes en tant que cellules effectrices dans l'immunité anti-*S. mansoni* a été démontrée par JOSEPH *et al.* (1983). Des plaquettes prélevées chez le rat en cours d'infection sont capables de tuer *in vitro* des schistosomules, avec

un maximum de cytotoxicité observé à une période où les rats expriment une immunité importante à la réinfection. De même, des plaquettes de patients bilharziens sont hautement cytotoxiques *in vitro* pour la larve du parasite. Parallèlement, des plaquettes saines de rat ou humaines incubées avec du sérum de rat immun à *S. mansoni* ou du sérum de bilharziens expriment des propriétés cytotoxiques importantes pour le schistosomule. L'immunoabsorption des IgE et l'inhibition par des protéines myélomateuses indiquent clairement la dépendance IgE de ce mécanisme.

--Récepteurs membranaires impliqués dans la cytotoxicité dépendante d'IgE

Pendant très longtemps, les anticorps de classe IgE furent uniquement associés aux réactions d'allergie par leur capacité de fixation au mastocyte. Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont, comme nous l'avons vu, attribué à ces immunoglobulines une deuxième fonctionnalité. Cette interaction de l'IgE avec d'autres cellules que le mastocyte soulevait donc l'existence d'un récepteur pour les IgE (FcE R) sur la membrane de ces différentes populations cellulaires. Les données actuelles sur ce sujet ont fait l'objet d'une revue récente par A.CAPRON (1986). Les caractéristiques de ce nouveau type de ce récepteur, appelé FcE RII par opposition au FcE RI précédemment décrit sur le mastocyte, peuvent être résumées comme suit : 1) récepteur de faible affinité ($K_a : 10^7 \text{ M}^{-1}$) comparé au FcE RI ($K_a : 10^9 \text{ M}^{-1}$) ; 2) interaction préférentielle avec des IgE agrégées ($K_a : 10^8 \text{ M}^{-1}$), contrairement au mastocyte ; 3) de 10^3 (plaquette) à 5.10^5 (macrophage) récepteurs par cellule (pour 10^6 pour le mastocyte) ; 4) communauté antigénique avec les FcE R présents à la surface des lymphocytes.

La directe participation de ces FcE RII dans l'activité cytotoxique a été clairement démontrée par l'effet inhibiteur d'un anticorps monoclonal anti-FcE RII. Une corrélation étroite entre la capacité cytotoxique de différentes sous-populations d'éosinophiles humains et le nombre de FcE RII a d'autre part pu être décrite (M.CAPRON *et al.*, 1984a).

La fixation des IgE sur le FcE RII se traduit par une libération de nombreux médiateurs, classiques comme les métabolites de l'oxygène, mais aussi plus spécialisés en fonction de la cellule concernée. Ainsi, dans le cas des macrophages, cette activation se traduit par une libération de leucotriènes, de prostaglandines, de PAF (Platelet activating factor) ou encore d'interleukine 1. Dans le cas des éosinophiles, une certaine sélectivité du signal engendré semble exister selon qu'il s'agit d'une fixation d'IgE ou d'IgG, les médiateurs libérés étant différents en fonction de l'immunoglobuline impliquée.

Plus récemment, l'implication d'un second récepteur cellulaire a été évoquée dans la cytotoxicité des éosinophiles humains dépendante d'IgE. Il s'agit du récepteur CR₃, récepteur du facteur du complément, le C₃bi, présent à la surface du schistosomule (M.CAPRON *et al.*, 1986).

-- Pertinence *in vivo* des mécanismes effecteurs

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'hôte parasité est capable de mettre en place des systèmes de défense variés et efficaces. Cependant, la connaissance de ces mécanismes d'immunité a été apportée essentiellement par des études réalisées *in vitro* et on peut donc se poser la question de la réelle signification biologique de ces différents mécanismes. De nombreuses évidences plus ou moins directes corroborent l'implication des anticorps de classe IgG2a et IgE dans l'immunité du rat. On peut en premier lieu noter qu'il existe une corrélation dans le temps entre le développement de l'immunité à la réinfection du rat et l'évolution des anticorps anaphylactiques d'une part et leur efficacité dans les mécanismes effecteurs décrits *in vitro* d'autre part (A.CAPRON *et al.*, 1980b). De plus, l'immunité qui est transférée à des rats normaux par l'injection de sérum immun à *S. mansoni*, est nettement diminuée par l'épuisement sélectif du sérum en IgG2a ou en IgE (A.CAPRON *et al.*, 1983). L'évidence la plus concluante du rôle des anticorps de classe IgG2a a été apportée par les études réalisées avec un anticorps monoclonal de

classe IgG2a, cytotoxique *in vitro* pour le schistosomule en présence d'éosinophiles (GRZYCH *et al.*, 1982). Par transfert passif à des rats naïfs, cet anticorps monoclonal induit une protection significative de ces animaux contre une infection ultérieure à *S. mansoni*.

Même si ces différentes études tendent à établir le rôle fonctionnel des anticorps anaphylactiques dans l'immunité acquise à *S. mansoni*, elles fournissent peu de renseignements quant à la participation de telle ou telle population cellulaire effectrice, notamment dans les systèmes dépendants d'IgE. Des évidences plus directes de l'existence de ces mécanismes effecteurs *in vivo* découlent des expériences de transfert de cellules immunes à des animaux sains avant leur infestation. Ainsi, M. CAPRON *et al.* (1984b) a décrit une certaine résistance chez les animaux injectés par des cellules prélevées à des rats en cours d'infection. Cette immunité transférée est obtenue avec des populations cellulaires enrichies en éosinophiles à des périodes correspondant à la présence d'anticorps IgG2a (4 semaines d'infection) ou d'anticorps IgE (5 à 8 semaines d'infection) à la surface de ces cellules. Cette étude démontre également que les macrophages peuvent être considérés comme des cellules protectrices *in vivo* dans une période tardive de l'infection (6 à 12 semaines). Parallèlement, JOSEPH *et al.* (1983) montrèrent que l'injection à des animaux sains de plaquettes immunes prélevées chez des rats infestés par *S. mansoni*, à une période où l'immunité est optimale, leur confère une protection significative contre une infection ultérieure.

On peut bien sûr opposer à ces différentes expérimentations un caractère restrictif puisqu'elles ne considèrent qu'un seul paramètre à la fois alors que l'immunité est sans doute le résultat de processus multifactoriels intervenant de façon successive ou synergique. Mais il est évident que la complexité de l'infection par *S. mansoni* rend extrêmement difficile une analyse précise des mécanismes d'immunité *in vivo* et que ces travaux représentent une somme d'évidences pour l'intervention *in vivo* des mécanismes effecteurs décrits *in vitro*.

4-Les mécanismes effecteurs non spécifiques

A côté de ces mécanismes spécifiques de protection élaborés par l'hôte lors de l'infection par *S. mansoni*, quelques mécanismes d'immunité dits "non spécifiques" (i.e. n'impliquant pas d'anticorps spécifiques) ont été mis en évidence.

L'activation du complément par la voie alterne par la membrane du schistosomule pourrait constituer un facteur important de mortalité de la larve parasitaire (SANTORO *et al.*, 1979). Cette activité cytocide du complément pourrait même être amplifiée en présence de cellules portant un récepteur C3b, comme les éosinophiles activés en présence de complément (OTTESEN *et al.*, 1977; RAMALHO-PINTO *et al.*, 1978).

Certaines activations du macrophage confèrent aussi à cette cellule une activité létale vis-à-vis du schistosomule. L'action des lymphokines telles que le MIF (Macrophage inhibitory factor) ou encore des IgG agrégées non spécifiques et en présence de complément sont capables de rendre des macrophages normaux cytotoxiques pour le parasite (BOUT *et al.*, 1981; AURIAULT *et al.*, 1981b). On observe également une résistance à l'infection par l'utilisation d'immunostimulants comme le BCG ou encore après induction de réactions inflammatoires par des agents chimiques ou bactériens (MAHMOUD *et al.*, 1979).

Dans le même ordre d'idées, BOUT *et al.* (1986) ont pu montrer récemment que des plaquettes saines incubées avec de la CRP (C-reactive protein), protéine inflammatoire produite notamment au cours de l'infection par *S. mansoni*, sont capables de tuer, indépendamment de la présence d'anticorps, des schistosomules *in vitro* et de conférer par transfert passif une protection significative contre la schistosomiase.

Enfin, des travaux récents ont montré que la fonction effectrice des plaquettes était modulée par des lymphokines produites par les lymphocytes T (LyT) après stimulation mitogénique ou par les antigènes correspondant à leur spécificité. Il s'agit

d'une double régulation à la fois positive et négative reliée à des sous-populations cellulaires différentes. Des LyT de phénotype "helper" (W3/25⁺ pour le rat et CD4⁺ pour l'homme) libèrent des facteurs capables de rendre des plaquettes saines cytotoxiques pour les schistosomules (PANCRE *et al.*, 1987). Ces lymphokines activatrices sont au nombre de deux, l'une d'elles correspond à l'interféron γ (PANCRE *et al.*, 1987), la deuxième au TNF (Tumor necrosis factor) (DAMONEVILLE *et al.*, soumis à publication). A l'inverse, une lymphokine suppressive de l'activité plaquettaire (PASL, Platelet activity suppressive lymphokine) est produite après stimulation des lymphocytes de phénotype suppresseur (CD8⁺ pour l'homme) (PANCRE *et al.*, 1986). De plus, la préincubation de plaquettes immunes à *S. mansoni* avec des surnageants de LyT contenant de la PASL abolit leur pouvoir protecteur. On peut penser que le parasite intervient dans ce mécanisme de contrôle de l'activité plaquettaire, que nous avons classé arbitrairement comme non-spécifique. Par la stimulation de l'une ou l'autre de ces populations lymphocytaires, le parasite pourrait à certaines périodes de l'infection réguler la capacité cytotoxique des plaquettes dépendante d'IgE dirigée contre son stade larvaire.

La part que jouent ces différents mécanismes dans l'immunité est difficile à estimer. Ils représentent vraisemblablement les premières défenses de l'hôte en début d'infection et un complément aux mécanismes spécifiques.

5-Mécanismes d'évasion et de régulation de la réponse immune par le parasite

Malgré la diversité et l'efficacité relative des mécanismes de défense mis en place par l'hôte infesté, il n'en demeure pas moins que le parasite peut se développer et survivre très longtemps dans l'hôte qu'il habite. On peut donc se poser la question suivante : Comment le parasite élude-t-il la réponse immune dirigée contre lui?

On peut dire schématiquement qu'il utilise deux types de stratégies. La première

consiste à modifier sa surface, interface entre lui et l'hôte et cible préférentielle des attaques de l'organisme parasité. La deuxième, plus complexe et particulièrement fascinante, repose sur une modulation par des facteurs produits par le parasite des mécanismes effecteurs dirigés contre lui.

a-Modification de la surface du parasite

--Acquisition d'antigènes d'hôte

DAMIAN (1964) et A.CAPRON *et al.* (1965) furent les premiers à montrer l'existence de molécules identiques à celles de l'hôte à la surface des schistosomes. Parmi ces molécules, on peut citer des antigènes des groupes sanguins (GOLDRING *et al.*, 1976), des produits du complexe majeur d'histocompatibilité (SHER *et al.*, 1978) ou encore des immunoglobulines fixées par l'intermédiaire du récepteur Fc présent à la surface des schistosomules (TORPIER *et al.*, 1979). Cette acquisition d'antigènes d'hôte fut étudiée *in vivo* par SMITHERS *et al.* (1969) qui montrèrent la destruction très rapide de parasites prélevés chez la souris et transférés chez des singes immunisés contre des protéines murines. DEAN et SELL (1972) et DAMIAN *et al.* (1973) proposèrent encore une version quelque peu différente, le mimétisme moléculaire, dans laquelle la réaction croisée entre le parasite et l'hôte serait supportée par des antigènes parasitaires mais portant des déterminants antigéniques communs avec des protéines ubiquitaires comme l' α_2 -macroglobuline ou les antigènes de Forssman.

Ce "masquage" antigénique ne peut expliquer à lui seul la persistance du parasite dans l'hôte. En effet, des schistosomules cultivés *in vitro* dans un milieu dépourvu de protéines d'hôte deviennent également résistants vis-à-vis des mécanismes effecteurs dépendants d'anticorps après quelques heures de culture (DEAN, 1977).

-- Modulation membranaire

La seconde possibilité dont dispose le parasite est de modifier intrinsèquement sa membrane. Cette modulation fut initialement envisagée par MOSER *et al.* (1980) qui montrèrent que des schistosomules prélevés au niveau de la peau et au niveau du poumon étaient respectivement, après marquage au TNP (trinitrophényl), sensibles et résistants à l'action d'anticorps anti-TNP, bien que la capacité de marquage fut identique dans les deux cas. Ce changement intrinsèque de tégument serait basé sur une modification des lipides membranaires (SIMPSON et CIOLI, 1982). RUMJANEK & Mc LAREN (1981) ont en effet décrit un changement important de la composition lipidique de la membrane du schistosomule en présence de sérum humain, modification due à un échange de lipides entre le parasite et le sérum. Ces auteurs ont montré qu'il existait une corrélation étroite entre cette modulation induite par les lipides sériques et la perte d'efficacité des mécanismes de cytotoxicité *in vitro* dépendant d'anticorps en présence soit de complément (anticorps létaux) soit d'éosinophiles.

La perte spontanée des antigènes de surface semble constituer pour le parasite un autre moyen efficace d'échapper à la réponse immune de l'hôte comme le montrèrent les travaux originaux de SAMUELSON (SAMUELSON *et al.*, 1980; SAMUELSON et CAULFIELD, 1982). Ces auteurs étudièrent la fixation d'anticorps sur des schistosomules durant les premières de culture *in vitro*, anticorps révélés par un réactif fluorescent. Ils purent ainsi démontrer, après la fixation des anticorps, une diminution au cours du temps de l'intensité de la fluorescence. Ce même phénomène a été observé après marquage radioactif des molécules de surface des schistosomules, molécules libérées dans le milieu de culture. Cette libération d'antigènes membranaires soit spontanée soit après fixation d'anticorps représente non seulement un mécanisme d'évasion du parasite mais aussi, comme nous le verrons dans le cadre de nos travaux, un facteur important d'induction et de régulation de la réponse immune.

b-Régulation de la réponse immune par des facteurs d'origine parasitaire

--Régulation de la réactivité lymphocytaire

En 1979, CAMUS *et al.* décrivent une réponse proliférative significative et une hypersensibilité cutanée retardée chez le rat lors des trois premières semaines d'infection suivies d'une nette diminution de ces deux types de réponse.

La possibilité d'action de molécules d'origine parasitaire sur les lymphocytes fut apportée par la description dans les produits de vers adultes d'un facteur inhibant la prolifération lymphocytaire *in vitro* et *in vivo* (DESSAINT *et al.*, 1977; CAMUS *et al.*, 1981). Ce facteur appelé SDIF (Schistosoma-derived inhibitory factor) inhibe sélectivement la prolifération des lymphocytes T dépendante ou non de la présence d'interleukine 2 et agit sur les LyT dans une phase tardive du cycle cellulaire (MAZINGUE *et al.*, 1983, 1986). De plus, cette molécule diminue la réponse IgE primaire et secondaire chez des rats immunisés avec un allergène, conséquence vraisemblable de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes (LANGLET *et al.*, 1984). Le SDIF est une petite molécule acido-soluble (<500kDa) et résistante à la chaleur.

Contrairement au vers adulte, les produits d'incubation du schistosomule (SRP, Schistosomula-released products) augmentent de façon non-spécifique la prolifération des lymphocytes T et B (AURIAULT *et al.*, 1984). Cette activité est supportée par une ou plusieurs molécule(s) de petit poids moléculaire et résistante(s) à la chaleur. Leur cible cellulaire n'est pas définie de façon précise; il pourrait s'agir soit d'une action directe sur les deux populations de lymphocytes soit préférentielle sur les LyT "helper", l'activation des LyB résultant d'un signal d'activation de ces LyT.

--Régulation de l'activité des macrophages

La description de ce mécanisme de régulation a pour origine la mise en évidence par AURIAULT *et al.* (1981a) de l'hydrolyse des IgG fixées à la surface du schistosomule via le Fc γ R par des enzymes appartenant au groupe des sérine protéases et des métalloprotéases. Les peptides résultant de ce découpage enzymatique présentent une activité inhibitrice importante de l'activité des macrophages, évaluée par la mesure de nombreux paramètres comme la libération d'enzymes lysosomiales, la génération d'anions superoxydes ou encore la phagocytose (AURIAULT *et al.*, 1980). Ces peptides d'IgG diminuent fortement la cytotoxicité des macrophages dépendante d'IgE vis à vis des schistosomules. La molécule responsable de cet effet inhibiteur est un tripeptide, le TKP (Thr-Lys-Pro) correspondant aux acides aminés 289-291 de la molécule d'IgG. Ce peptide reproduit les effets observés avec l'hydrolysat total d'IgG à des concentrations de l'ordre de 10^{-12} M (AURIAULT *et al.*, 1985b). De plus, l'injection de ce tripeptide à des souris infestées par *S. mansoni* se traduit par une diminution importante de la formation des granulomes (HIMMI *et al.*, 1985). Enfin, après hydrolyse des IgG, la partie Fc restant fixée à la membrane de schistosomule peut activer le complément par la voie classique. Cette consommation du complément pourrait avoir comme conséquence une diminution des mécanismes effecteurs dépendant du complément.

--Régulation de l'activité des éosinophiles

*** par le SDIF**

Comme nous l'avons souligné précédemment, la fonction effectrice des éosinophiles ne s'exprime pleinement qu'en présence de mastocytes ou de médiateurs mastocytaires. Les travaux de MAZINGUE *et al.* (1980) ont montré qu'en plus de son effet sur les LyT, le SDIF inhibe *in vitro* la dégranulation mastocytaire et *in vivo* les

réactions anaphylactiques. Ce facteur parasitaire réduit en effet la capacité cytotoxique des éosinophiles dirigée contre le schistosomule. Il s'agit d'une régulation indirecte de la capacité effectrice des éosinophiles par l'inhibition de la dégranulation mastocytaire, le SDIF étant sans effet sur les éosinophiles (A.CAPRON *et al.*, 1980c).

***par des enzymes de schistosomes**

L'addition des produits d'incubation de schistosomes à différents stades -- J0, J6 (stade poumon), J20 (stade foie), J40 (stade adulte) -- dans le test de cytotoxicité dépendant des éosinophiles et des anticorps IgG, entraîne une augmentation significative de la mortalité du parasite (AURIAULT *et al.*, 1982a). Cette potentialisation s'explique par une augmentation à la fois du nombre de Fc γ R et de la dégranulation des éosinophiles, paramètres essentiels dans l'adhésion et la cytotoxicité des éosinophiles. Cette activité stimulante est supportée par une molécule à activité collagénasique (AURIAULT *et al.*, 1983).

***par des anticorps bloquants**

L'intervention des anticorps bloquants dans la régulation de la fonction effectrice des éosinophiles fut décrite en 1984 par GRZYCH *et al.* à partir d'une étude réalisée sur un anticorps monoclonal anti-*S. mansoni* de classe IgG2c (IPL Sm3), reconnaissant le même antigène que l'IPL Sm1, anticorps IgG2a cytotoxique en présence d'éosinophiles (GRZYCH *et al.*, 1982). Alors que cet anticorps IPL Sm3 n'exprime aucune activité cytotoxique pour le schistosomule, il empêche *in vitro* la mort des schistosomules par l'IPL Sm1. Cette activité bloquante se situe à la fois au niveau de la cible par une compétition pour l'antigène et au niveau de la cellule effectrice par une compétition pour un même récepteur Fc γ . Cet effet inhibiteur fut confirmé *in vivo* par l'annulation du pouvoir protecteur de l'IPL Sm1 par l'IPL Sm3. L'étude de l'activité cytotoxique des éosinophiles prélevés chez le rat en cours d'infection a montré qu'à certaines périodes ces cellules sont incapables de tuer le

parasite même si des anticorps spécifiques leur sont ajoutés (M.CAPRON *et al.*, 1979). Ce phénomène fut attribué à la présence d'anticorps cytophiles sous forme de complexes immuns à la surface des éosinophiles. L'existence d'anticorps bloquants pourrait être une deuxième explication de l'absence de cytotoxicité observée.

Plus récemment, des anticorps bloquants de classe IgM ont été décrits dans le système humain (KHALIFE *et al.*, 1986). La signification biologique de ces anticorps bloquants, dans le contexte de la schistosomiase humaine, a été évaluée chez deux groupes d'enfants du Kenya classés par BUTTERWORTH *et al.* (1985) comme résistants ou susceptibles à la réinfection après traitement. Les résultats obtenus montrent que les individus susceptibles à la réinfection présentent un taux d'anticorps IgM significativement plus grand que ceux classés comme résistants. Ceci implique donc que la notion d'état d'immunité ne doit pas être pensée uniquement en fonction de la présence d'anticorps effecteurs mais doit aussi tenir compte de l'existence de ces anticorps particuliers. Dans la perspective d'une stratégie vaccinale, il sera donc essentiel de connaître les éléments qui conduisent à la production préférentielle de l'isotype protecteur.

Parmi tous ces mécanismes de contrôle de la réponse immune de l'hôte déployés par le parasite, il est intéressant de noter que certains présentent un intérêt dépassant largement le cadre de l'immunologie parasitaire. Des molécules telles que le SDIF ou le TKP se révèlent comme des substances à potentialité immunopharmacologique évidente.

REGULATION DE LA REPONSE IgE

I- CARACTERISTIQUES GENERALES

Le but de ce chapitre n'est pas de présenter toutes les données concernant ce vaste sujet mais plutôt de focaliser sur quelques données essentielles apportées ces dernières années sur la régulation spécifique de l'isotype IgE.

A - DISSOCIATION ENTRE LA REPONSE ANTICORPS IgE ET IgG

Contrairement aux IgG, la production d'anticorps IgE est obtenue dans des conditions restreintes. Cette différence peut être illustrée par les exemples suivant :

1) La réponse IgE est hautement dépendante de l'adjuvant utilisé. Les adjuvants tels que le vaccin *Bordetella pertussis* ou l'alum (hydroxide d'alumine) sont de bons adjuvants pour la réponse IgE tandis que l'adjuvant complet de Freund (ACF) se révèle beaucoup moins efficace (ISHISAKA, 1976). De plus, l'injection répétée d'ACF avant une immunisation supprime sélectivement la réponse anticorps IgE sans affecter la réponse anticorps IgG (TUNG *et al.*, 1978).

2) Certaines souches de souris comme les SJL ne produisent pas d'anticorps IgE contre des antigènes classiques en dépit d'une production normale d'anticorps de classe IgG (HERZENBERG *et al.*, 1976).

3) L'irradiation de souris par des faibles doses de rayons X ou l'injection de cyclophosphamide avant une immunisation augmente de façon sélective la réponse IgE (TADA *et al.*, 1971; CHIORAZZI *et al.*, 1976).

4) L'infection par helminthes augmente la synthèse d'IgE de façon importante sans affecter le niveau des autres immunoglobulines (OLGIVIE, 1964).

La dissociation entre la réponse anticorps de type IgE et de type IgG suggère

donc que la réponse IgE est non seulement régulée de façon spécifique d'antigène mais aussi de façon sélective pour l'isotype IgE.

B - LA REGULATION SPECIFIQUE D'ISOTYPE IgE

1-Mise en évidence

La mise en évidence de populations de lymphocytes T régulant de façon isotype-spécifique la réponse IgE découle de l'effet sélectif des irradiations par les rayons X. WATANABE *et al.* (1976) montrèrent que cet effet potentiateur de la réponse IgE pouvait être annulé par le transfert de thymocytes ou de LyT spléniques normaux chez ces animaux irradiés. De façon similaire, TUNG *et al.* (1978) observèrent que les LyT prélevés chez des animaux traités par l'ACF supprimaient de façon plus efficace que les LyT normaux l'augmentation de la réponse IgE induite par l'irradiation. Ces auteurs démontrèrent d'autre part que le sérum de ces animaux traités par l'ACF contenait un facteur soluble qui inhibait sélectivement la réponse IgE.

Cette découverte initiale de facteurs solubles régulant la production d'IgE allait permettre une avancée importante dans la compréhension de la régulation du système IgE.

2-Facteurs mis en évidence par l'équipe de KATZ

Le message essentiel de ces travaux peut se résumer comme suit : C'est à partir des cellules B FcE R⁺ que s'initie une cascade d'interactions cellulaires et moléculaires qui aboutit finalement au contrôle de l'expression de ces FcE R et de la production des IgE. Cette théorie est représentée schématiquement par la Figure 2 (p.39) et a été établie chez la souris.

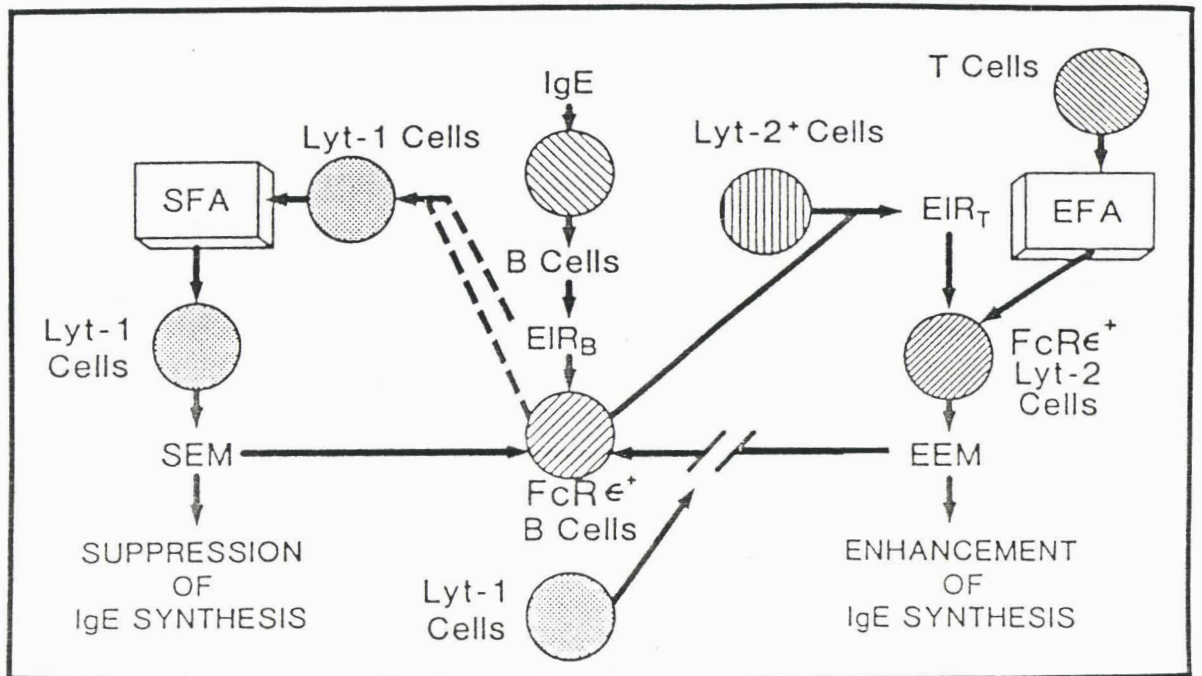


Figure 2 : Régulation de la synthèse d'IgE selon KATZ *et al.* (d'après KATZ, D., *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, 77, p.22, 1985).

Initialement, sous l'action d'IgE, le LyB produit un facteur appelé **EIR_B** (**IgE-induced regulant**) qui induit l'expression de FcE R par les LyB (MARCELLETI et KATZ, 1984a, 1984b). Ces LyB FcE R⁺, soit par un contact direct soit par l'action de EIR_B, entraînent la production par des cellules T de phénotype LyT-1 (suppresseur chez la souris) de **SFA (Suppressive factor of allergy)** (TUNG *et al.*, 1978; KATZ et TUNG, 1978; MARCELLETI et KATZ, 1984b). Sous l'action de ce SFA, des LyT-1 synthétisent et sécrètent un facteur suppresseur final, le **SEM (Suppressive effector molecule)** (MARCELLETI et KATZ, 1984c). Enfin, ce SEM agit au niveau des LyB FcE R⁺ en inhibant l'expression de ce FcE R et la synthèse d'anticorps IgE.

Parallèlement à cette régulation négative de la réponse IgE, un circuit de régulation positive a été mis en évidence, initié lui aussi par les LyB FcE R⁺. Ce processus fait intervenir des LyT de phénotype LyT-2⁺ (phénotype "helper" chez la souris). Sous l'action des LyB FcE R⁺, ces LyT produisent une lymphokine, l'**EIR_T** (MARCELLETI et KATZ, 1984d), qui sélectivement stimule l'expression de FcE R sur les LyT-2⁺. De plus, durant ce processus d'activation, des LyT produisent parfois de l'**EFA (Enhancing factor of allergy)** (KATZ *et al.*, 1979). Sous l'action de cette lymphokine, les cellules LyT-2⁺- FcE R⁺ induites par action de l'EIR_T, sécrètent une molécule potentiatrice finale, l'**EEM (Enhancing effector molecule)** (MARCELLETI et KATZ, 1984c) qui inhibe d'une part l'expression des FcE R par les LyB et d'autre part augmente la synthèse d'IgE.

En résumé, il ressort que :

- 1) à la fois le SFA et l'EFA inhibent l'expression des FcE R par les LyB et ceci par l'intermédiaire des LyT.
- 2) le SFA agit sur les LyT-1⁺ qui produisent du SEM, tandis que l'EFA stimule les

LyT-2⁺ à produire de l'EEM.

3) la cible directe du SEM et de l'EEM est le LyB.

Enfin, il est important de préciser que ces deux molécules effectrices finales ont la propriété de lier la molécule d'IgE et pourraient être identiques aux " IgE-binding factors" décrits par ISHIZAKA. Des études récentes ont montré l'existence chez l'homme d'un mécanisme de régulation de la réponse IgE similaire à celui décrit chez la souris. Un facteur produit par réaction lymphocytaire mixte présente une activité SFA par sa sélective suppression de la synthèse d'IgE *in vitro*. Ce SFA humain a pu être obtenu à partir d'un hybridome T et reproduit les effets précédemment décrits à savoir une suppression sélective de la réponse IgE et de l'induction des FcE R.

3-Facteurs mis en évidence par l'équipe d'ISHIZAKA

Le modèle d'étude utilisé par ces auteurs est initialement l'infection du rat par le nématode *Nippostrongylus brasiliensis* où une augmentation sélective de la réponse IgE est observée (OLGIVIE & JONES, 1969; ORR & BLAIR, 1969). Ces travaux ont mis en évidence deux facteurs produits par les LyT capables de se lier aux IgE : les **IgE-binding factors (IgE-BF)** régulant la synthèse d'IgE soit de façon positive - l'**IgE-potentiating factor (IgE-PF)** - soit de façon négative - l'**IgE-suppressive factor (IgE-SF)**. La nature de ces IgE-BF est sous le contrôle d'autres lymphokines : le **GEF (Glycosylation-enhancing factor)** pour l'IgE-PF et le **GIF (Glycosylation-inhibiting factor)** pour l'IgE-SF. Des expériences ultérieures montrèrent que la formation de ces IgE-BF n'est pas limitée au modèle d'infection par *N. brasiliensis*. Cette théorie est schématiquement représentée par la Figure 3 (p.42).

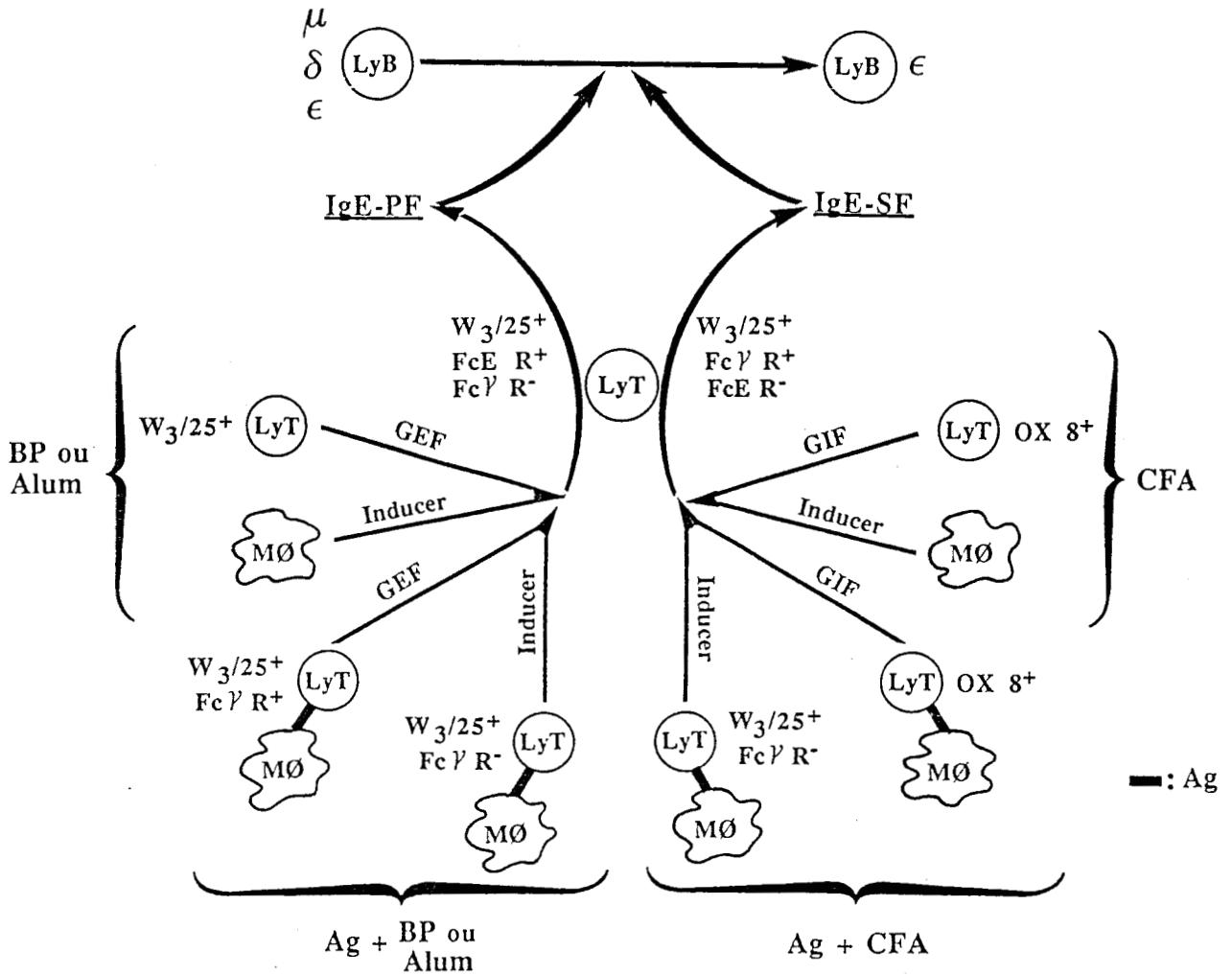


Figure 3 : Régulation de la synthèse d'IgE selon ISHIZAKA *et al.* : Mécanismes de production des "IgE-binding factors" après traitement par adjuvants ou après stimulation antigénique.

a-Corrélation entre la réponse IgE et la nature des IgE-BF produits

Cette corrélation a été observée dans les situations suivantes :

1) Dans le modèle d'infection du rat par *N. brasiliensis*, on assiste à une libération spontanée *in vitro* d'IgE-PF par les cellules de ganglions mésentériques de rats infectés depuis 14 jours (période où commence la réponse IgE) (SUEMURA *et al.*, 1980). Par contre, si ces cellules sont prélevées après 8 jours d'infestation et cultivées en présence d'IgE, c'est de l'IgE-SF qui est produit (HIRASHIMA *et al.*, 1980a).

2) La production préférentielle de l'un ou l'autre de ces facteurs est induite par des adjuvants différents. Des cellules spléniques de rat injectés plusieurs fois par de l'ACF libèrent spontanément de l'IgE-SF (HIRASHIMA *et al.*, 1980b) tandis qu'une injection de vaccin *B. pertussis*, bon adjuvant de la réponse IgE, entraîne la formation d'IgE-PF (HIRASHIMA *et al.*, 1981).

3) Lors d'une réponse immune, la production de ces IgE-BF dépend du protocole d'immunisation utilisé. Si l'immunisation des rats est réalisée avec un antigène absorbé sur de l'alum, ces animaux produisent des anticorps IgE et leurs cellules spléniques sécrètent de l'IgE-PF après stimulation antigénique. Par contre, l'immunisation de ces rats avec le même antigène mais en présence d'ACF induit la production d'IgE-SF (UEDE *et al.*, 1982).

4) Il semble que la différence génétique observée dans la réponse IgE soit reliée à la nature de l'IgE-BF produit. Quand des souris bonnes (BDF1) et mauvaises (SJL) répondeuses IgE sont immunisées avec un antigène en présence d'alum, les souris BDF1 développent une réponse anticorps IgE persistante tandis qu'aucune production d'IgE n'est obtenue chez les SJL. *In vitro*, les cellules spléniques des souris BDF1 libèrent de l'IgE-PF sous stimulation antigénique alors que celles des souris SJL produisent de l'IgE-SF (UEDE *et al.*, 1984).

En conclusion, il apparait donc que l'IgE-PF est retrouvé à chaque fois que la synthèse d'IgE est augmentée. A l'opposé, l'IgE-SF est produit dans les situations où la réponse IgE est sélectivement supprimée.

b-Origine et propriétés des IgE-BF

-- "IgE-potentiating factor"

Ce facteur est libéré par des LyT W3/25⁺ (marqueur des LyT "helper" chez le rat) portant un récepteur pour les IgE (SUEMURA *et al.*, 1980). Il agit sur les LyB portant des IgE et des IgM de membrane en entraînant leur différenciation en LyB ϵ . Sa production se ferait par une libération de Fc ϵ R (YODOI *et al.*, 1980).

Cet IgE-PF est une glycoprotéine de 13 à 15kDa, se fixant sur des lectines telles que la Concanavoline A ou la lectine de lentille et possédant donc des résidus α -mannose. Il s'agit en fait d'une protéine à la fois N- et O- glycosylée, le résidu sucré terminal des 2 oligosaccharides étant de l'acide sialique. La fixation de l'IgE-PF sur la molécule d'IgE se fait par la partie protéique.

-- "IgE-suppressive factor"

Il est produit par des LyT W3/25⁺ portant un récepteur pour les IgG (Fc γ R⁺) et son action est comparable à celle de l'IgE-PF (HIRASHIMA *et al.*, 1980a). Il s'agit également d'une glycoprotéine de 13 à 15kDa mais ne renfermant que des structures O-oligosaccharidiques. Cet IgE-SF présente une forte affinité pour l'agglutinine d'arachide dont le ligand caractéristique est de type β -Gal(1-3)-Gal Nac (YODOI *et al.*, 1981b).

c-Comparaison de l'IgE-PF et de l'IgE-SF

Ces deux facteurs sont composés d'une entité protéique identique, la différence étant supportée uniquement par la partie glucidique.

Ceci a été démontré d'abord par l'utilisation de LyT activés par de la concanavaleine A (Con A) à des concentrations différentes (YODOI *et al.*, 1981c). Des LyT activés par 1µg/ml de ConA en présence d'IgE produisent de l'IgE-SF alors qu'une activation par 10µg/ml de ConA induit la formation d'IgE-PF. Mais si les LyT sont activés par 10µg/ml de ConA en présence de tunicamycine, inhibiteur de la N-glycosylation, l'IgE-BF produit est de type suppresseur.

Cette commutation des LyT de la formation de l'IgE-PF en IgE-SF est également observée sous l'action de glucocorticoïdes et découle des travaux de SPIEGELBERG *et al.* (1979). Ces auteurs avaient montré que le nombre de cellules FcE R⁺ dans la population lymphocytaire du sang périphérique était plus élevé chez les patients atopiques que chez une population normale mais que cette proportion était extrêmement faible chez les patients traités par les corticostéroïdes. YODOI *et al.* (1981c) montrèrent que le traitement des LyT activés par 10µg/ml de ConA par de la dexaméthasone prévenait l'expression des FcE R et conduisait à la production d'IgE-SF au lieu d'IgE-PF. Un résultat comparable est obtenu si de la lipomoduline, protéine inhibitrice des phospholipases induite par les glucocorticoïdes, est utilisée (UEDE *et al.*, 1983). Inversement, l'utilisation d'un anticorps anti-lipomoduline ou d'un activateur des phospholipases dans le protocole de production d'IgE-SF induit la formation d'IgE-PF au lieu d'IgE-SF (YODOI *et al.*, 1981a).

Ces résultats suggéraient donc que les mêmes LyT ont la double capacité de produire de l'IgE-PF et de l'IgE-SF. Et ceci fut confirmé par l'utilisation d'un hybridome T sécrétant de l'IgE-SF en présence d'IgE. L'addition d'anti-lipomoduline ou d'un activateur des phospholipases à cet hybridome T entraîne la synthèse d'IgE-PF (HUFF *et al.*, 1983). De plus, des expériences récentes de biologie moléculaire ont montré que ces deux IgE-BF portent un gène structural commun (MAERTENS *et al.*, 1987). Enfin, ces facteurs portent un déterminant antigénique commun avec les FcE R des cellules T et B (ISHIZAKA, 1985).

d-Mécanisme de détermination de la nature des IgE-BF

Pourquoi dans certaines conditions (infection par *N. brasiliensis*, traitement par du *B. pertussis*) il y a production d'IgE-PF et que dans d'autres (traitement par l'ACF) il y a production d'IgE-SF?

La production d'IgE-BF se fait sous l'action d'IgE ou d'"inducer". Ces "inducers" sont soit de l'interféron produit par le macrophage après traitement avec un adjuvant soit des substances libérées par des LyT après stimulation antigénique. Mais sous l'action de ces substances, les IgE-BF produits par des cellules normales sont également partagés entre IgE-PF et IgE-SF. En fait, la nature des IgE-BF est conditionnée par des facteurs d'origine T qui soit augmentent soit inhibent la glycosylation de ces IgE-BF. Il s'agit respectivement du GEF (Glycosylation-enhancing factor) et du GIF (Glycosylation-inhibiting factor).

Le GEF est synthétisé par des LyT W3/25⁺ Fc γ R⁺ sous l'action du vaccin *B. pertussis* ou encore par les LyT après immunisation avec un antigène absorbé sur de l'alum. Ce GEF est une protéine de 25kDa présentant une activité enzymatique de type kallikréine et des propriétés "lectine-like" par son affinité pour la galactose (IWATA *et al.*, 1983). La fixation de cette enzyme aux résidus galactose présents à la surface des LyT se traduirait par une activation des phospholipases A₂ (IWATA *et al.*, 1984) qui conduit à la formation de lysolécithine (YODOI *et al.*, 1981a), activatrice elle-même de certaines glycosyltransférases. Et comme nous l'avons vu, cette activation, en augmentant la N-glycosylation des IgE-BF, leur confère une activité potentiatrice.

Le GIF est produit par des LyT OX8⁺ (marqueur des LyT suppresseurs ou cytotoxiques) Fc γ R⁻ notamment après traitement de l'animal receveur à l'ACF. Ce GIF est un fragment de lipomoduline phosphorylé et inhibe la fixation des N-oligosaccharides aux IgE-BF par inactivation des phospholipases (UEDE *et al.*, 1983).

La nature et l'activité biologique des IgE-BF dépendent donc d'une balance entre le GEF et le GIF dans l'environnement cellulaire.

4-Régulation de la réponse IgE par l'Interleukine 4 et l'Interféron γ

D'autres équipes se sont intéressées à l'induction et la régulation de la réponse IgE sans prendre en compte le rôle décrit précédemment joué par les IgE-BF. COFFMAN et CARTY (1986) notamment ont mis en évidence que l'addition des surnageants de LyT murins stimulés par la ConA à des LyB stimulés par du LPS (Lipopolysaccharide) augmente 100 fois la production d'IgE mais aussi d'IgG1 *in vitro*. La production de ces deux isotypes est totalement inhibée en présence d'interféron γ (IFN γ) même à de très faibles concentrations. Ceci laissait donc supposer que, dans le surnageant des LyT stimulés, une ou plusieurs lymphokines libérées auraient une action directe sur les LyB producteurs d'anticorps et plus particulièrement d'IgE mais que la présence d'IFN γ aurait pour conséquence de supprimer cette synthèse.

La balance de ces deux types de facteurs au cours de la réponse IgE a été étudiée par MOSMANN *et al.* (1986) qui ont montré que :

1) L'effet stimulant des réponses IgE et IgG1 était dû à la présence d'interleukine 4 (IL4, identique au B-stimulating factor 1) dans les surnageants de LyT stimulés.

2) deux populations de LyT sont impliquées dans la régulation *in vitro* de ces deux isotypes, l'une étant impliquée dans l'induction, l'autre dans la suppression de la synthèse. La première sous-population (TH1) de phénotype $L3T4^+ LyT2^-$ produit de l'interleukine 2 (IL2) et de l'interleukine 3 (IL3) et de l'IFN γ et joue le rôle de modulateur de la synthèse d'IgE par la présence de l'IFN γ . L'autre sous-population (TH2), de même phénotype que les TH1, mais produisant de l'IL3 et de l'IL4, serait

la population inductrice de la réponse IgE, par la production d'IL4.

La suppression *in vivo* de la réponse IgE polyclonale par des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IL4 apporte un argument supplémentaire à la validité de ces travaux (FINKELMAN *et al.*, 1986).

On peut donc constater que, outre le rôle important que semblent jouer les IgE-BF et les lymphokines régulant leurs fonctions biologiques, d'autres lymphokines produites par des sous-populations lymphocytaires T distinctes peuvent en plus intervenir dans la régulation de la production des IgE.

II- REGULATION DE LA REPOSE IgE AU COURS DE L'INFECTION PAR *S. MANSONI*

A - PHENOMENE DE POTENTIALISATION

L'une des caractéristiques les plus surprenantes de l'infection par helminthes est la production très importante des IgE. Cette hyperproduction est observée après infection par nématodes comme *Ascaris suum* (JOHANSSON *et al.*, 1968) ou *Nippostrongylus brasiliensis* (JARRETT et BAZIN, 1974), par trématodes comme *Fasciola hepatica* (KOJIMA *et al.*, 1972) ou *S. mansoni* (KELLERMEYER *et al.*, 1973), ou encore par cestodes comme *Echinococcus granulosus* (HULDT *et al.*, 1973).

Cette augmentation de la réponse IgE est due en grande partie à un phénomène de potentialisation par le parasite des réponses IgE préexistantes. Seulement 10% des IgE produites sont des anticorps anti-parasites (DESSAINT *et al.*, 1975a, 1975b). Cette potentialisation a été essentiellement étudiée dans le modèle d'infection du rat par *N. brasiliensis*. En 1969, ORR et BLAIR décrivent que des rats immunisés avec de l'ovalbumine et infestés 10 jours après par ce nématode présentaient un taux d'anticorps anti-ovalbumine nettement plus élevé que les rats témoins non infestés. Cette réponse potentialisée fut aussi observée avec d'autres helminthes et d'autres antigènes comme l'hémocyanine ou l'extrait de poussière de maison (JARRETT, 1972; JARRETT et STEWART, 1972). Cet effet stimulant non-spécifique fut décrit plus récemment dans le modèle d'infection du rat par *S. mansoni* (ROUSSEAUX-PREVOST *et al.*, 1982). De plus, si plusieurs antigènes sont utilisés pour l'immunisation, les différentes réponses IgE obtenues peuvent être potentialisées par une infection (JARRETT et STEWART, 1972). Cette potentialisation ne s'exerce que sur les anticorps de classe IgE dirigés contre les antigènes utilisés pour

l'immunisation, le taux en anticorps IgG n'étant pas modifié (JARRETT *et al.*, 1972; BLOCH *et al.*, 1973).

Ce phénomène de potentialisation est à distinguer d'un simple effet adjuvant. En effet, si l'infection est réalisée avant, en même temps ou juste après l'immunisation, la réponse IgE n'est pas potentialisée et peut même être inhibée (ORR et BLAIR, 1969; ORR *et al.*, 1972). Cette potentialisation ne s'exerce que lorsque la réponse a démarré.

JARRETT et STEWART (1973) démontrèrent, par l'utilisation de larves irradiées et par transfert de vers adultes de *N. brasiliensis*, que cet effet potentiateur est vraisemblablement dû à des produits provenant des deux stades parasitaires.

Pendant très longtemps il a été admis que seul le vers vivant était capable d'induire cet effet potentiateur, l'utilisation d'extraits parasitaires s'étant révélée totalement inefficace (ORR *et al.*, 1971; JARRETT, 1976). Mais en 1980, STROMBERG montra que des produits d'incubation de larves d'*Ascaris suum* (ACF, *Ascaris culture fluid*) augmentaient de façon importante la production d'anticorps IgE anti-ovalbumine chez le cobaye. Cette potentialisation est observée seulement lors d'une réponse secondaire et n'est efficace que si l'ACF est injecté en même temps ou juste après l'ovalbumine. Dans le modèle *S. mansoni*, ROUSSEAUX-PREVOST *et al.* (1982) ont reporté la persistance en anticorps IgE chez des rats immunisés avec de l'ovalbumine et injectés 14 jours plus tard avec les produits d'incubation des vers adultes. L'augmentation observée est cependant assez faible. Ces deux études n'apportent néanmoins aucun renseignement tant moléculaire que biologique sur la nature et le mode d'action des molécules impliquées. L'étude que nous avons réalisée sur ce sujet, et que nous présentons plus loin, a permis d'avancer certains éléments d'explication à ce phénomène.

B - ASSOCIATION NEGATIVE ENTRE PARASITOSE ET ALLERGIE

Cette potentialisation importante des IgE observée dans les infections par helminthes contraste avec la faible incidence des manifestations allergiques chez les individus parasités. Cette constatation est basée sur de nombreuses études épidémiologiques montrant que les sujets vivant en zone d'endémie ne présentent pas de manifestations allergiques, alors que les sujets exposés de façon sporadique aux parasites développent au contraire des réactions d'hypersensibilité immédiate. MERRET *et al.* (1976) ont même décrit l'apparition de manifestations allergiques à l'environnement chez des sujets de zone endémique émigrant dans les villes.

Ce paradoxe pourrait être une conséquence directe du phénomène de potentialisation précédemment décrit. On peut imaginer que la présence à la surface des mastocytes d'anticorps IgE de spécificité différente empêche l'induction de la dégranulation lors de l'introduction d'un allergène unique. La saturation préalable des récepteurs mastocytaires par de l'IgE non-spécifique peut en effet prévenir une sensibilisation passive (GODFREY & GRADIDGE, 1976). Néanmoins, JARRETT *et al.* (1980) ont montré que ces IgE non-spécifiques, bien qu'ayant la capacité de bloquer une sensibilisation passive chez des animaux infectés par *N. brasiliensis*, n'inhibent pas les réactions d'hypersensibilité médiées par les anticorps IgE produits de façon active par l'immunisation de ces animaux. De plus, les sujets infectés par *ascaris* mais sans manifestation allergique présentent une réponse de type immédiat aux tests cutanés avec l'antigène d'*ascaris* (TURNER *et al.*, 1978).

Une autre explication serait liée à l'existence d'anticorps bloquants. En 1981, OTTESEN *et al.* ont montré que le sérum chauffé de patients filariens inhibait la dégranulation mastocytaire induite par les IgE anti-filaire et l'antigène. Des anticorps de classe IgG4 seraient responsables de cet effet bloquant (HUSSAIN & OTTESEN, 1986).

Enfin, comme nous l'avons vu dans le cas de *S. mansoni*, des facteurs d'origine parasitaire (comme le SDIF) peuvent être aussi impliqués dans cette inhibition de la dégranulation des mastocytes.

TRAVAUX PERSONNELS

Quels étaient nos objectifs quand nous avons commencé cette étude ?

La réponse IgE est, comme nous l'avons souligné, l'une des composantes essentielles de l'immunité ant-*S. mansoni*. Les antigènes cibles et (ou) inducteurs de cette production d'IgE sont donc potentiellement protecteurs et la connaissance de leur nature s'avère d'un intérêt primordial dans la perspective d'une vaccination contre la schistosomiase. A l'époque où nous avons commencé ce travail, peu d'informations précises n'avaient été apportées sur ces molécules. La caractérisation de ces antigènes a constitué la première partie des travaux présentés dans ce mémoire.

Le choix entre deux stratégies scientifiques nous était offert pour aborder cette étude : soit partir du parasite, soit partir des anticorps IgE protecteurs. Partir du parasite, cela signifiait définir les stade et fraction parasitaires les plus pertinents pour réaliser cette étude. Partir des anticorps IgE, cela impliquait l'utilisation d'un outil monospécifique doué de propriétés effectrices.

Il nous a également paru important de replacer cette étude dans le contexte particulier de l'infection par schistosome et d'envisager non seulement l'induction de cette réponse IgE spécifique mais aussi la régulation par le parasite de la production de cet isotype d'immunoglobuline chez l'hôte infecté.

ARTICLE 1

Les allergènes de *Schistosoma mansoni*. I - Comparaison de la réponse IgE au cours de l'infection humaine et expérimentale dirigée contre des allergènes de produits d'incubation de vers adultes.

Nous avons abordé initialement l'étude des antigènes induisant une réponse IgE au cours de la schistosomiase humaine et expérimentale avec le schistosome adulte comme source de matériel antigénique. Deux raisons principales ont conditionné le choix de ce matériel parasitaire. La première est, comme nous l'avons souligné précédemment, le rôle important joué par le stade adulte dans l'établissement de l'immunité. La deuxième est l'absence de techniques très sensibles d'identification des antigènes reconnus par les IgE à l'époque où nous avons réalisé ce travail; seul le stade adulte peut être obtenu en quantité importante et donc permettre une étude biochimique classique.

Pour fractionner le matériel parasitaire, nous avons utilisé :

- 1-l'isoélectrofocalisation préparative (i.e. séparation des molécules en fonction de leur point isoélectrique),
- 2-La chromatographie de filtration sur gel (i.e. séparation selon la masse moléculaire),
- 3-l'affinité pour différentes lectines.

Les antigènes ainsi séparés ont été caractérisés pour leur réactivité avec les anticorps IgE anti-*S. mansoni* :

- 1-par un test d'anaphylaxie cutanée passive (test de PCA ou de Prausnitz-Küstner) dans le cas du rat,
- 2-par une méthode radioimmunologique (RAST, radio allergosorbent test) dans le cas de l'homme et du rat.

Cette étude a permis de montrer que :

1) Les produits d'incubation de vers adultes dans l'eau représentent une source importante d'allergènes.

2) La cinétique d'apparition des anticorps IgE dans le sérum de rats infestés par *S. mansoni* est différente selon le test utilisé, PCA ou RAST.

-- en RAST, le pic d'activité maximale est obtenu entre le jour 45 et le jour 60 d'infection ;

-- en PCA, le titre maximal est observé à J28 et est nettement plus faible à J45.

3) Les allergènes séparés par isoélectrofocalisation sont révélés de façon différente par les sérums de patients bilharziens et les sérums de rats infestés par *S. mansoni* :

-- les anticorps IgE humains révèlent un très large pic d'allergènes à un pH acide (pH4,4 à 6) ;

-- chez le rat : * en RAST, la réactivité maximale est localisée dans une zone de pH plus étroite (pH4,9 à 5,2) avec une réactivité plus faible dans la zone de pH4,4 à 5,

* en test de PK, une activité identique est obtenue pour ces deux zones de pH (4,9 à 5,2 et 4,4 à 4,6) avec une activité supplémentaire à pH alcalin (8,2 à 8,6).

4) les allergènes reconnus par les IgE anti-*S. mansoni* chez l'homme et le rat ont un poids moléculaire compris entre 70 et 150kDa et entre 12 et 25kDa pour le modèle humain.

5) La majorité des allergènes sont des glycoprotéines et présentent une affinité importante pour la ConA.

En conclusion, les anticorps IgE produits au cours de l'infection humaine ou expérimentale du rat à *S. mansoni* révèlent de nombreux allergènes chez le vers adulte, avec une certaine différence qualitative

et quantitative entre les deux modèles. Une fraction glycoprotéinique de p_i 4,9-5,2 et d'un poids moléculaire de 70 à 150kDa, reconnue de façon identique dans les deux modèles, représente une source d'antigènes inducteurs d'une réponse IgE importante.

Allergens of *Schistosoma mansoni*

I. Comparison of the IgE Response in Human and Experimental Infections towards Characterized Allergens from Adult Worm Products

Raymond J. Pierce, Claudie Verwaerde, Martine Damonville, Thérèse LePresle, André Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, Lille, France

Abstract. The reaction of adult worm products of *Schistosoma mansoni* with IgE antibodies in infected human and Fischer rat sera has been studied using the Prausnitz-Küstner test and the radioallergosorbent test. Incubation of worms in water released most of the soluble material reacting with both rat and human sera in the radioallergosorbent test. Sera from infected Fischer rats recognized a fraction with pI 4.9-5.2 separated by preparative isoelectric focusing throughout the time course of infection, whereas human sera reacted with material focusing between pI 4.4 and 6.0. A peak of allergenic activity with an apparent molecular weight between 70,000 and 150,000 was obtained by gel filtration. Human bilharzian sera also reacted with material in the molecular weight range 12,000-25,000. Allergenic material bound specifically to concanavalin A-Sepharose, *Lens culinaris* agglutinin-Ultrogel, and wheat germ agglutinin-Ultrogel, but substantial allergenic activity was also present in unbound fractions.

Introduction

Serum concentrations of IgE are extremely high in helminth infections in general [1, 2]. However, most of the increase can be attributed to the potentiation by the parasites of previous IgE responses to non-parasite antigens [2-4]. Only 5-10% of the total IgE in human schistosomiasis is antischistosomal [5], and similar results were found in experimental infections in rats for both high and low IgE responder strains [6].

The role of IgE in the immune response to *Schistosoma mansoni* was underlined by Sadun and Gore [7] who found a positive correlation between the ability to produce reagins and the degree of resistance to infection. In infected Fischer rats [6] the time course of appearance of *S. mansoni* specific IgE was very similar to that of the resistance to reinfection.

The demonstration that antibody-dependent cytotoxic mechanisms exist capable of killing schistosomes in vitro involving IgE and either macrophages [8, 9] or eosinophils [10] strongly suggests that antigens eliciting the IgE response released during infec-

tion by *S. mansoni* could be important in the development of immunity. The recent report that protection of mice against infection could be achieved by eliciting an IgE response with cercarial sonicates [11] further supports this view.

Harris [12] initially described two major allergenic fractions isolated from adult worm homogenates identified using a Prausnitz-Küstner (PK) type-reaction in Wistar rats. Further purification [13] showed a high degree of heterogeneity and led to the suggestion that the allergen-reagin axis is a multicomponent system in rat schistosomiasis. In contrast, an immunoelectrophoretic study using human infected sera [14] suggested the presence of two major allergenic components.

In the present study we have attempted to characterize further the allergens recognized by parasite-specific IgE in Fischer rat and human schistosomiasis. Allergens present in the incubation product of adult *S. mansoni* worms were detected using a radioallergosorbent test (RAST) and a modified PK reaction in rats.

Materials and Methods

S. mansoni Incubation Products and Homogenates

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was used in the study [15]. Adult worms were collected by liver perfusion 40 days after the infestation of hamsters (1,000 cercariae per animal). The worms (10,000) were repeatedly washed in 0.9% NaCl to remove foreign materials and allowed to settle before incubation with 10 ml H₂O at 37°C for 2 h. The supernatant fluid was then removed and the worms washed twice with 5 ml H₂O. The pooled supernatant and washings were centrifuged at 30,000 g for 1 h at 4°C, the final supernatant constituting the incubation product. Homogenates of adult worms were prepared as previously described [16].

Human and Rat Sera

IOPS Fischer rats (Iffa Credo, France) were infested with 1,000 cercariae per animal. Blood samples were taken at intervals from the retro-orbital venous plexus after light ether anaesthetic and sera stored at -20°C until used. Sera from Brazilian patients infected with *S. mansoni* were screened by immunoelectrophoresis against whole adult worm antigen and the RAST method (see below). Positive sera were arbitrarily classed as those giving at least four arcs of immunoprecipitation and a RAST score at least five times the upper limit for normal sera. Sera from 15 individuals satisfying these criteria were pooled and used as human anti-*S. mansoni* reaginic serum.

Antihuman and Rat IgE Antisera

Rabbit ¹²⁵I-labelled antiserum antihuman IgE was obtained from Pharmacia Diagnosis (Uppsala, Sweden). Rat myeloma IgE and rabbit antirat IgE antiserum were kindly provided by Prof. H. Bazin (Louvain, Belgium). Prior to radiolabelling the rabbit antirat IgE antiserum was further purified by passage on a column containing rat myeloma IgE immobilized on CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia). Briefly, 10 mg of IgE were linked to 1 g of activated Sepharose following the procedure of Axen et al. [17]. After washing the gel extensively with 0.5 M NaCl, 3 ml of antiserum were run onto the column. After further washing with 0.5 M NaCl the bound antibodies were eluted with 0.2 M glycine-HCl buffer pH 2.8. The eluate was immediately neutralized by the addition of 0.1 M NaOH and then dialyzed against 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.9% NaCl (PBS) for 16 h. Radiolabelling of the purified antibodies was effected using the chloramine T method [18], 25 µg of antibody being labelled with 0.25 mCi ¹²⁵I (Amersham, UK). After labelling, antibody was separated from unfixed ¹²⁵I by molecular sieving on a PD-10 column (Pharmacia) containing 10 ml Sephadex G-25 equilibrated in PBS containing 1% (w/v) bovine serum albumin (type V; Sigma, St. Louis, Mo., USA). The fractions containing the void volume peak of radioactivity were pooled and aliquoted before storage at -70°C. Specific activities obtained were typically 6-8 µCi/µg protein.

Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) and PK Tests

In order to determine the allergenicity of individual fractions the PK test was used as described by Augustin [19] with some modifications. Normal adult male outbred Wistar rats weighing 250-350 g were injected intradermally in a shaved area of the back with 0.1 ml of rat anti-*S. mansoni* reaginic serum diluted 10 times. After 72 h the intradermal challenge was carried out by injecting

0.1 ml of 0.9% NaCl containing 20 µg (protein) of the antigen to be tested, immediately followed by intravenous injection of 1 ml of 4% Evans blue in 0.9% NaCl. Quantification of the reaction was carried out by measuring opposing diameters of the blue zones and calculating the area of the zone in square millimetres. When positive reactions were obtained, the test was repeated in parallel with normal serum as a control, and the difference between the areas measured.

In order to compare different sera, or to measure allergen titres, the PCA test was used as described by Ovary [20]. In this test, 0.1 ml of the serum dilution was injected intradermally into the shaved area of the back of adult male Wistar rats, followed 72 h later by the intravenous injection of 2 mg of antigen together with 1 ml 4% Evans blue dye. 30 min after challenge the rats were killed, the skins removed, and the reaction quantified as before. For determinations of titre the highest serum dilution giving a blue zone of 5 mm in diameter was taken as the titre.

Radioallergosorbent Test

Antigen fractions were covalently fixed to diazobenzoxy-methyl-activated paper (DBM paper) as follows. Aminobenzoxy-methyl paper was prepared according to Alwine et al. [21] and converted to DBM paper [21] just before use. Pieces (2 × 5 cm) of DBM paper were incubated for 3 h at 4°C under agitation with the protein to be bound (50 µg protein for separated fractions) diluted in 1.5 ml PBS. After rinsing three times in PBS the papers were saturated by overnight incubation in PBS containing 3% (w/v) bovine serum albumin. The papers were then rinsed a further three times in PBS and dried by blotting with filter paper. Discs (6 mm in diameter) were cut from the papers (20 per 2 × 5 cm sheet) and used in the RAST assay. [22]. For the latter, discs were placed in 5 ml plastic test tubes (1 disc per tube) and incubated for 3 h at room temperature with 0.05 ml of human or rat serum (reaginic or control) diluted ten times in PBS containing 4% (v/v) fetal calf serum. After three 10 min washes in PBS they were incubated overnight at room temperature with 0.05 ml of ¹²⁵I-labelled antihuman (35,000 cpm) or antirat (100,000 cpm) IgE. The discs were washed a further five times (10 min per wash) in PBS and transferred to clean tubes before counting in a gamma scintillation counter (Intertechnique CG 4000, Plaisir, France). Results were expressed as specific bound counts per minute; i.e., mean counts per minute bound with reaginic serum minus mean counts per minute bound with control (normal) serum.

Preparative Isoelectric Focusing

Preparative flat-bed isoelectric focusing was carried out using an LKB multiphor apparatus (LKB, Bromma, Sweden) exactly as previously described [16].

Gel Filtration

Ultrogel AcA34 was obtained preswollen from IBF (Pharmindustrie, 92115-Clichy, France) and equilibrated in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 containing 0.3 M NaCl in a column (40 × 0.9 cm) at a flow rate of 3 ml/h at 4°C. Up to 5 mg of protein in 0.5 ml of running buffer was separated, and fractions (1 or 2 ml) were taken. Optical density at 280 nm was monitored using an LKB Uvikord S apparatus. Calibration was effected using blue dextran, catalase, bovine serum albumin, ovalbumin, and cytochrome C (all from Sigma).

Lectin Affinity Chromatography

Concanavalin A-Sepharose 4 B (ConA-Sepharose, Pharmacia), wheat germ agglutinin-Ultrogel (WGA-Ultrogel, IBF), and *Lens culinaris* agglutinin-Ultrogel (LCA-Ultrogel, IBF) were all obtained preswollen. ConA-Sepharose was thoroughly washed in 0.005 M sodium acetate buffer pH 5.2 containing 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 1 mM MnCl₂. To a column containing 10 ml of gel was added 15 mg (3 ml) of incubation product previously dialyzed against the elution buffer. Elution of the non-retained material was effected at room temperature at 10 ml/h. Retained material was eluted with 0.3 M methyl- α -D-mannopyranoside (Koch Light, Colnbrook, Bucks, UK) in the elution buffer and strongly retained material by 2.5 M MgCl₂. Non-retained material was always passed on the column a second time. For the other two lectins the conditions were similar except that for LCA-Ultrogel the elution buffer was 0.1 M sodium phosphate pH 7.4 containing 0.15 M NaCl. Retained material was eluted with the same buffer containing 0.3 M methyl- α -D-mannopyranoside and strongly bound material with 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.5. The corresponding solutions for WGA-Ultrogel were 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.15 M NaCl and to elute retained material the same buffer containing 0.05 M N-acetylglucosamine (Sigma). Strongly retained material was eluted with 0.05 M HCl.

Protein Assays

Protein was routinely assayed by the Folin method [23]. For very dilute solutions protein was also assayed using the fluorescence technique [24] with Fluram (Roche, Basel, Switzerland).

Results

Effect of Different Incubation Conditions on the Release of Allergenic Material by Adult Worms

We found that the great majority of the soluble material recognized by IgE antibodies in rat and human sera (allergenic material) was released by adult worms on incubation in water. This was confirmed by comparing the RAST activity of various preparations of incubation product and the corresponding activity in the denuded worms (table I). In this experiment batches of adult worms (about 2,500 individuals) were incubated in water or PBS, or subjected to a freeze-thaw cycle, in PBS (see table I). The supernatant material was centrifuged (100,000 g, 1 h), and 50 μ g of protein of the soluble fraction fixed to DBM paper. The denuded worms were homogenized (see 'Materials and Methods') and centrifuged as for the worm supernatants. Again 50 μ g of soluble fraction protein was fixed to DBM paper. The results of the RAST analysis of this material using both rat and human infected sera demonstrates that only the water incubation effectively denudes the worms of allergenic activity. After 1 h in PBS, very little of the released protein contains allergenic material, and whereas a 3-hour in-

Table I. Effects of different incubation procedures on released allergenic activity detected by RAST analysis

Incubation procedure	Rat day 45 infected serum		Human infected serum	
	incubation product	denuded worm homogenate	incubation product	denuded worm homogenate
H ₂ O 2 h	5,304 \pm 383	675 \pm 411	3,198 \pm 53	921 \pm 211
PBS 1 h	292 \pm 91	3,809 \pm 513	624 \pm 99	2,986 \pm 386
PBS 3 h	2,962 \pm 456	4,114 \pm 24	2,999 \pm 161	3,343 \pm 292
Freeze-thaw ¹	1,997 \pm 167	4,040 \pm 419	2,229 \pm 235	3,454 \pm 149

Results are the mean values of triplicate experiments and are expressed as specific bound cpm (mean bound cpm with infected serum - mean bound cpm with normal serum) \pm 1 SD.

¹ Freeze-thaw cycle: worms in PBS frozen rapidly in dry ice/acetone and allowed to thaw out at room temperature; repeated three times.

incubation is more effective, considerable activity resides with the worms. Since the RAST technique is only semiquantitative (the fixed allergenic material is saturable by the IgE present), a series of serum dilution curves would be necessary to determine more exactly the relative amounts of allergenic material released into the medium, or remaining with the worms. Subsequent experiments were always performed using the soluble (supernatant after ultracentrifugation) fraction of the incubation product released by adult worms after 2 h in water.

Time Course of the Appearance of *S. mansoni* Specific Antibodies in the Infected Fischer Rat

In order to determine the optimal period after infection for the use of rat sera to detect allergenic activity using the RAST assay, different groups of infected animals were bled at various days after infection. The sera were used in the RAST assay (fig. 1), and for one group the PCA test was carried out, using incubation product as the antigen in both cases. The results show that the peaks of PCA and RAST activity do not coincide. The peak of PCA activity occurred at day 28 after infection with a marked drop at day 45 and a slight rise at days 62 and 78 before falling once more on day 96. In contrast the RAST activity for the same group was maximal at day 62. For two other groups of infected animals the maximal RAST activity was detected at day 45 after infection, and thus in experiments to determine allergenic activity in separated fractions

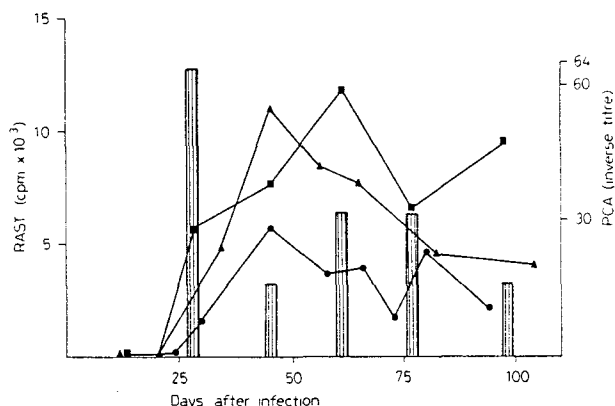


Fig. 1. Time course of the appearance of specific IgE in the serum of Fischer rats infected by 1,000 *S. mansoni* cercariae. Sera from 10 animals infected on day 0 were pooled at each time point. \blacktriangle = group 1; \bullet = group 2; \blacksquare = group 3, measured using the RAST technique and DBM paper discs coated with incubation product. Histograms represent inverse PCA titres for sera from group 3 animals against incubation product (see 'Materials and Methods').

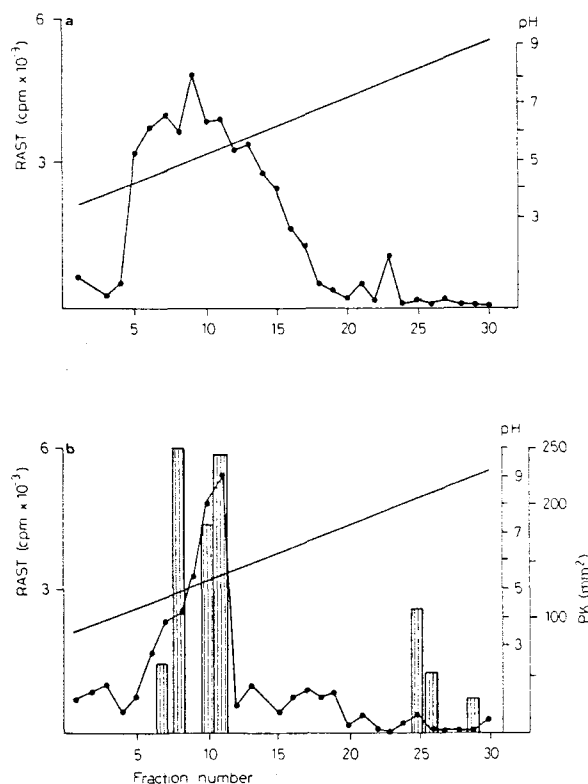


Fig. 2. Preparative flat-bed isoelectric focusing of incubation product. **a** RAST reactivity of individual fractions with pooled human-infected sera. **b** RAST — and PK reactivity (histograms) of individual fractions against day 45 infected rat serum.

day 45 infected serum with high RAST activity was used unless otherwise specified.

Preparative Isoelectric Focusing of Incubation Product

The incubation product was subjected to preparative flat-bed isoelectric focusing in the pH range 3.5–10 yielding 30 fractions. After extensive dialysis, protein concentrations were determined and the allergenicity of the fractions tested either by the PK technique in Fischer rats, or by the RAST assay using rat or human sera (see 'Materials and Methods'); the results of which are shown in figure 2. In figure 2a the profile for the RAST analysis of the fractions using the human serum pool demonstrates a broad peak of activity localized in the acid pH range (the profile shown is of a representative experiment). Little activity was detectable in the alkaline range of pI. The maximum of RAST activity was at pI 4.9–5.2. In contrast the RAST analysis of rat sera (day 45 after infection) showed a very much more localized activity (fig. 2b), the peak again being at pI 4.9–5.2, although a shoulder of activity was noticeable at pI 4.4–4.6. When sera from Fischer rats taken at different days after infection were used (days 25, 66 and 97), no differences in the profile were noted, although there were quantitative variations in relation with the amount of specific IgE present (results not shown). Figure 2b also shows the quantified PK test in those fractions giving a positive reaction. It is noticeable, comparing the PK to the RAST data, that the pI 4.4–4.6 material gives a PK response equal to that of the pI 4.9–5.2 material although giving a much feebler RAST response. In addition, a PK response was obtained with material focusing at alkaline pI (8.2–8.6), although these fractions gave no RAST response with sera from infected Fischer rats. Two possible explanations exist for the latter. Either the chemical nature of the allergenic material at pI 8.2–8.6 precludes its binding to the DBM-activated paper in the RAST assay, or a relatively low amount of IgE specific for this material exists in Fischer rat sera, and the RAST technique is not sufficiently sensitive to detect it.

The specificity of the RAST reaction for the various peaks was tested by performing the test with human sera with added protamine sulphate (1 mg/ml) as this has been shown to eliminate non-specific binding of IgE to allergen discs due to electrostatic interactions [25]. A slight reduction in the overall intensity of the reaction was noted, but this was spread over the

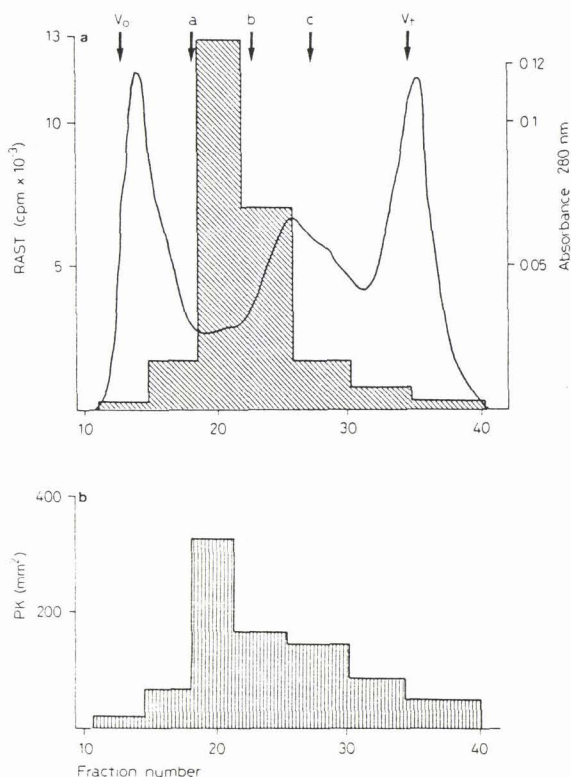


Fig. 3. Gel filtration chromatography of incubation product. **a** The solid line indicates the absorbance profile (280 nm). Histograms represent RAST reactivity of the pooled fractions against day 45 infected rat serum. **b** PK activity of pooled fractions with day 45 infected rat serum. MW markers shown are: a = aldolase, b = ovalbumin, c = chymotrypsinogen A. V_0 and V_t are the void and total column volumes, respectively.

whole focusing range. No individual peaks of activity were more affected than others (not shown).

Molecular Size Distribution of Allergenic Fractions

Passage of the incubation product on a column containing Aca34 Ultrogel yielded the profile shown in figure 3. Figure 3a shows the RAST reactivity against day 45 rat sera of seven fractions pooled after the separation. This profile, with the activity concentrated in one major peak tends to support the notion of one major allergenic fraction for Fischer rats. The approximate molecular weight (MW) of this material was between 70,000 and 150,000. The PK data were very similar (fig. 3b). Although the peak of reactivity was located in the same fraction, considerable activity was also present in fractions II, IV and V. When the human serum pool was used in the RAST assay, frac-

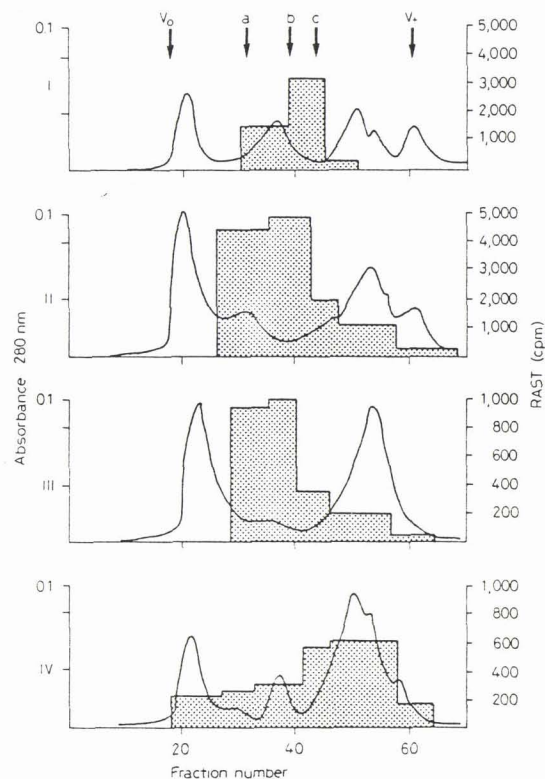


Fig. 4. Gel filtration chromatography of incubation product after preparative isoelectric focusing. Solid lines indicate A_{280} profile and histograms the RAST reactivity of the pooled fractions with pooled human sera. I = pI 4.4-4.6; II = pI 4.7-5.1; III = pI 5.1-6; IV = pI 6.2-6.8. MW markers are as for figure 3.

tion III again gave the highest level of specific bound counts (10.8%). However, a second peak of activity (MW 12,000-25,000) corresponding to fraction VI (7% B) was present.

The MW of the allergenic fractions was further analyzed by passage of the major allergenic fractions separated by preparative isoelectric focusing on a column (45 x 0.9 cm) containing Aca34 Ultrogel. Four fractions were taken after isoelectric focusing: I (pI 4.4-4.6), II (pI 4.7-5.2), III (pI 5.3-6), and IV (pI 6.2-6.8). After concentration on an Amicon PM 10 membrane (Amicon, Paris, France), 0.5 ml of each was separated as already stated. The protein (A_{280}) elution profiles and the reactivity with human sera in the RAST assay are shown in figure 4. This analysis shows that the low-MW material giving a positive RAST reaction was distributed towards the higher pI

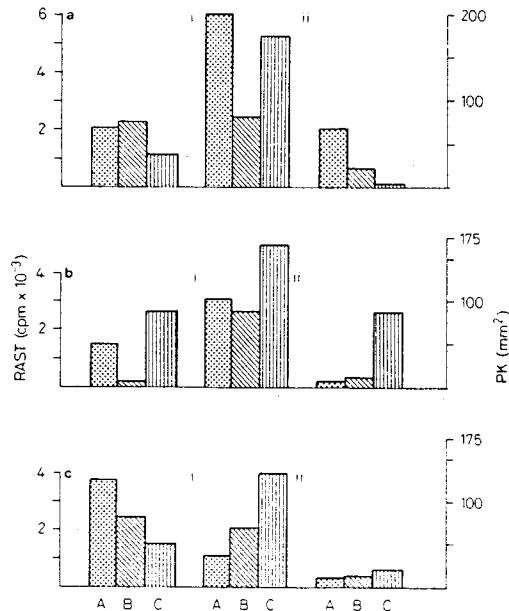


Fig. 5. Lectin affinity chromatography of incubation product. A = RAST reactivity with human infected sera; B = RAST reactivity with day 45 infected rat serum; C = PK reactivity with day 45 infected rat serum. a ConA-Sepharose eluted with starting buffer (0.005 M sodium acetate pH 5.2 containing 0.5 M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ and 1mM MnCl₂) followed by (i) the same buffer containing 0.3 M methyl- α -D-mannopyranoside and (ii) 2.5 M MgCl₂. b LCA-Ultrogel eluted with sodium phosphate buffer pH 7.4 and then successively by (i) the same buffer containing 0.3 M methyl- α -D-mannopyranoside and (ii) by 0.1 M sodium acetate pH 4.5. c WGA-Ultrogel eluted with 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.15 M NaCl followed by (i) the same buffer containing 0.05 M N-acetylglucosamine and (ii) 0.05 M HCl.

region and that the major peaks of RAST activity for the human had an approximate MW of 70,000–100,000. The RAST assay using day 45 rat serum gave a positive response only with focusing fractions 1 and 2, as would be expected from figure 2b. The MW distribution of the activity was the same as obtained with the separation of the incubation product. One major peak with approximate MW 70,000–150,000 was obtained.

Lectin Affinity Chromatography

The incubation product was submitted to chromatography on three different immobilized lectins: ConA-Sepharose, LCA-Ultrogel, and WGA-Ultrogel. The resulting fractions were tested for RAST activity using human and Fischer rat sera and in the PK test with Fischer rat sera. Figure 5 summarizes the re-

sults obtained. The fractions retained by the three lectins, and eluted with the corresponding competing monosaccharide, were the most active using the RAST technique. The material strongly bound to the three lectins, and eluted by the corresponding regenerating buffer had little or no RAST or PK activity. However, the non-bound material also retained considerable RAST and PK activity after passage on all three lectins, this even after repassage of the unbound material on the regenerated lectin column.

Discussion

The work described here had the object of determining the properties of the major allergenic fractions of *S. mansoni* adult worms expressed in both human and Fischer rat infections. The use of the RAST technique allowed semiquantitative estimations of allergenic potency that were confirmed for the rat by the PK test. During the rat infection one major allergenic fraction was found to have a pI of 4.9–5.2 and a MW of about 100,000–150,000. In human infections, however, this fraction is only one of several important allergens having a MW distribution between 20,000 and 150,000, and with pI values ranging between 4.4 and 6.0. The fact that most allergenic material was bound by ConA-Sepharose, LCA-Ultrogel and partially by WGA-Ultrogel indicates that the major allergens are glycoproteins.

The marked difference between the ranges of allergenic material in human and rat infections may be due to two factors. Since very few worms reach maturity in the rat infection, rats are not exposed to the whole gamut of *S. mansoni* allergens, particularly egg allergens. The incubation product used inevitably contains egg products to which the human sera may react. In addition, the Fischer rat is a low IgE responder [26] and was chosen since the investigations of in vitro cytotoxicity of IgE antibody with macrophages and eosinophils were carried out using this strain [8, 10]. The RAST technique may have lacked sensitivity for allergens reacting with IgE present at lower concentrations than that recognizing the major allergen. However, Willcox and Marsh [27] have suggested that human subjects with low IgE levels make restricted responses to some allergens and fail to respond altogether to others, whereas those with high IgE levels have an inherited tendency to respond to many different allergens, and that the total IgE level is regulated

by a single autosomal gene (R/r). This may clearly be extended to case of the Fischer rat. It is noteworthy that the PK test detected allergenic activity in the alkaline pI region and also gave a different MW distribution than the RAST test, similar to that shown with human sera.

Our results contrast with those obtained for the adult worm allergens by Harris [12, 13] who used infected Wistar rat sera and the PK test to assay the allergenicity of different fractions. In an exhaustive analysis of material separated by gel filtration and ion-exchange chromatography into 35 antigen fractions, at least 12 were shown to possess allergenic activity. The fact that in the Fischer rat infection we do not obtain the same degree of heterogeneity may be due to two possible explanations. First, as already mentioned, the Fischer rat is a relatively low IgE responder, and minor allergenic fractions may be missed, particularly in the RAST assay. Secondly, the procedure used for homogenization of the worms [12] may have led to the presence of degradation products. Vannier et al. [28] extensively investigated the allergenicity of a variety of adult worm preparations, concluding that the soluble material released after freezing and thawing the adult worms was the most reactive with rat sera from single infections. Extracts of the insoluble residue were active with sera from multiply infected rats. In our hands the material released by the worms on incubation in water contained most of the soluble material reacting with sera from singly infected rats and with human sera. This incubation product undoubtedly contained both tegumental and gut-derived material, and the relative importance of each in the IgE response remains to be defined.

We confirm the results obtained by Rousseaux-Prevost et al. [6] concerning the qualitative difference between the time course of the appearance of *S. mansoni* specific IgE as measured by the PCA technique and methods based on the fixation of IgE on immobilized *S. mansoni* antigen. In our case the peak of RAST activity occurred between days 45 and 60, depending on the group of rats, compared to a peak for the PCA titre on day 28 followed by a marked fall in titre on day 45. Rousseaux-Prevost et al. [6] noted a maximum for *S. mansoni* specific IgE measured by an immunosorbent technique around day 60 for two groups of rats. These rats gave a time course for the PCA titre identical to that described here although at a lower level of response. Two explanations for this phenomenon have been advanced [6]. Either high levels of non-spe-

cific IgE at 60 days after infection lead to a saturation of mast cell receptors and a corresponding decrease in PCA activity, or alternatively not all specific IgE antibody has reagin activity. Jarrett et al. [29] found that 'non-specific' IgE, whilst having the capacity to block passive sensitization (of animals infected with *Nippostrongylus brasiliensis*), did not inhibit hypersensitivity reactions mediated by an actively produced IgE antibody. However, experiments involving the passive transfer of sera containing 'non-specific' IgE were not performed. It is thus still difficult to conclude whether or not this 'non-specific' IgE effectively saturates mast cells in the passively sensitized animal, thereby partially blocking the immediate hypersensitivity response.

Our results show that a wide variety of molecules is likely to be involved in the reagin-allergen axis in human infections, but that the Fischer rat infection shows a somewhat simplified pattern. During the latter the resistance of the animal to reinfection correlates very well with the amount of circulating specific IgE antibody [5], the in vitro macrophage IgE dependent cytotoxicity, and the in vitro eosinophil-dependent cytotoxicity [30]. The glycoprotein focusing at pI 4.9–5.2 with a MW between 100,000 and 150,000 is, therefore, very likely to induce the formation of specific IgE antibodies cytotoxic for schistosomes in the presence of macrophages or eosinophils.

Acknowledgements

We are indebted to Suzanne Van Wingene and Hubert Caron for their expert technical assistance. We would also like to thank Marie France Massard and Claudine Colson for aid in the preparation of the manuscript. This work was supported by CNRS (ERA 422), Inserm (U 167) and WHO-UNDP special program for research and training in tropical diseases.

References

- 1 Hogarth-Scott, R.S.; Johansson, S.G.O.; Bennich, H.: Antibodies to Toxocara in the sera of visceral larva migrans patients: the significance of raised levels of IgE. *Clin. exp. Immunol.* 5: 619–625 (1969).
- 2 Jarrett, E.; Bazin, H.: Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 251: 613–614 (1974).
- 3 Orr, T.S.C.; Blair, A.M.J.N.: Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. *Life Sci.* 8: 1073–1077 (1969).
- 4 Rousseaux-Prevost, R.; Dessaint, J.P.; Capron, A.: Potentiated

- reagin response to ovalbumin in *Schistosoma mansoni* infected rats treated with a soluble metabolic product from adult worms. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 67: 187-190 (1982).
- 5 Dessaint, J.P.; Capron, M.; Bout, D.; Capron, A.: 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: 427-436 (1975).
 - 6 Rousseaux-Prevost, R.; Capron, M.; Bazin, H.; Capron, A.: IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S. mansoni*: a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology* 35: 33-39 (1978).
 - 7 Sadun, E.H.; Gore, R.W.: *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. *Exp. Parasitol.* 28: 435-449 (1970).
 - 8 Capron, A.; Dessaint, J.P.; Capron, M.; Bazin, H.: Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *S. mansoni* schistosomules. *Nature* 253: 474-475 (1975).
 - 9 Joseph, M.; Capron, A.; Butterworth, A.E.; Sturrock, R.F.; Houba, V.: Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro*: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. exp. Immunol.* 33: 48-56 (1978).
 - 10 Capron, M.; Bazin, H.; Joseph, M.; Capron, A.: Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immun.* 126: 1764-1768 (1981).
 - 11 Horowitz, S.; Smolarsky, M.; Arnon, R.: Protection against *Schistosoma mansoni* achieved by immunization with sonicated parasite. *Eur. J. Immunol.* 12: 327-332 (1982).
 - 12 Harris, W.G.: The allergens of *Schistosoma mansoni*. I. Initial separation and comparative assay. *Immunology* 24: 567-577 (1973).
 - 13 Harris, W.G.: The allergens of *Schistosoma mansoni*. II. Further separation by Sephadex G-200 and ion-exchange chromatography. *Immunology* 29: 835-844 (1975).
 - 14 Bout, D.; Dessaint, J.P.; Dupas, H.; Yarzabal, L.; Capron, A.: Characterization of allergens in *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* and *Echinococcus granulosus*. *Ann. Immunol., Paris* 128C: 687-698 (1976).
 - 15 Capron, A.; Capron, M.; Dupas, H.; Bout, D.; Petitprez, A.: Etude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. Etude *in vitro* de l'activité léthale d'immunsérum sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 4: 613-623 (1974).
 - 16 Auriault, C.; Pierce, R.; Cesari, I.; Capron, A.: Neutral protease activities at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. *Compar Biochem. Physiol.* 72B: 377-384 (1982).
 - 17 Axen, R.; Porath, J.; Ernback, S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 215: 1302-1304 (1967).
 - 18 Greenwood, F.C.; Hunter, W.; Bolver, J.S.: The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123 (1963).
 - 19 Augustin, R.: Demonstration of reagins in serum of allergic subjects; in Weir, *Handbook of experimental immunology*, p 1076 (Blackwell, Oxford 1967).
 - 20 Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis; in Ackroyd, *Immunological methods*, pp. 259-283 (Blackwell, Oxford 1964).
 - 21 Alwine, J.C.; Kemp, D.J.; Stark, G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. natn Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354 (1977).
 - 22 Wide, L.; Bennich, H.; Johansson, S.: Diagnosis of allergy by an *in vitro* test for allergen antibodies. *Lancet* ii: 1105-1107 (1967).
 - 23 Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem* 193: 265-275 (1951).
 - 24 Udenfriend, S.; Stein, S.; Böhlen, P.; Dairman, W.; Leingruber W.; Weigle, M.: Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomolar range. *Science* 178: 871-872 (1972).
 - 25 Aalberse, R.C.; Koshte, V.; Clemens, J.G.J.: Cross-reactions between vegetable foods, pollen and bee venom due to IgE antibodies to a ubiquitous carbohydrate determinant. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 66: suppl. 1, pp. 259-260 (1981).
 - 26 Rousseaux-Prevost, R.; Bazin, H.; Capron, A.: IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunology* 33: 501-505 (1977).
 - 27 Willcox, H.N.A.; Marsh, D.G.: Genetic regulation of antibody heterogeneity: its possible significance in human allergy. *Immunogenetics* 6: 209-225 (1978).
 - 28 Vannier, W.E.; Fireman, B.I.; Chestnut, R.Y.; Murrell, K.D.: *Schistosoma mansoni*: immediate hypersensitivity to adult antigens in the rat. *Expl Parasit.* 36: 45-61 (1974).
 - 29 Jarrett, E.; Mackenzie, S.; Bennich, H.: Parasite-induced 'nonspecific' IgE does not protect against allergic reactions. *Nature* 283: 302-304 (1980).
 - 30 Capron, A.; Dessaint, J.P.; Capron, M.; Joseph, M.; Torpier G.: Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 61: 41-66 (1982).

Received: March 1, 1983

Correspondence to: Dr. Raymond J. Pierce,
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Inserm U 167-CNRS ERA 422,
Institut Pasteur,
15, rue Camille Guérin,
F-59019 Lille Cédex (France)

ARTICLE 2

Les anticorps IgE anti-SRP (*S. mansoni* schistosomula-released products) sont cytotoxiques pour le schistosomule.

Dans cet article , nous avons abordé les deux questions suivantes :

- 1) Le stade larvaire du parasite *S. mansoni* intervient-il dans l'induction de la réponse IgE cytotoxique dirigée contre lui ?
- 2) Si oui, quels sont les antigènes cibles du schistosomule reconnus par ces IgE ?

Nous avons réalisé cette étude avec, comme matériel parasitaire, les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule (SRP, Schistosomula-released products). Cette fraction parasitaire est obtenue par une culture de 16h des larves dans un milieu isotonique. A la fin de cette incubation, les parasites présentent en microscopie optique une viabilité normale et une apparence analogue à celle de parasites cultivés en milieu complété avec du sérum. Après contrôle de l'absence de contamination, le SRP est récupéré par simple centrifugation.

Les principaux messages de cette analyse sont les suivants :

- 1) En RAST, les anticorps IgE de rats immuns à *S. mansoni* réagissent de façon intense avec des antigènes du schistosomule. Ces allergènes sont reconnus dès le 14^{ème} jour d'infection par des sérums obtenus chez 2 souches de rats bonnes répondeuses en IgE, le Brown Norway et le LOU/M et plus tardivement (J35) par le sérum de rat Fischer (plus faible répondeur en IgE, comparativement aux deux souches précédemment citées).
- 2) L'immunisation de rats avec ce SRP induit une forte production d'anticorps IgE spécifiques du schistosomule.

- 3) Cette réponse IgE est obtenue sans l'addition d'un adjuvant. L'utilisation de l'adjuvant *B. pertussis* entrainerait plutôt une baisse du niveau de la production de ces anticorps IgE.
- 4) Les IgE anti-SRP ainsi produites sont cytotoxiques *in vitro* pour le schistosomule en présence de macrophages, d'éosinophiles et de plaquettes. Le niveau de cytotoxicité est équivalent à celui obtenu avec un sérum d'infection.
- 5) Ces anticorps IgE anti-SRP allument la surface du schistosomule en technique d'immunofluorescence indirecte.
- 6) Les antigènes cibles de ces IgE anti-SRP sont deux molécules de 22 et 26kDa. La molécule de 26kDa est l'un des antigènes reconnus majoritairement par les IgE d'un sérum d'infection.

Ces résultats indiquent donc que le parasite induit une réponse IgE protectrice dès le début de l'infection. Cette production d'anticorps est principalement dirigée contre deux antigènes cibles de 22 et 26kDa présents à la surface du schistosomule. Les conditions expérimentales d'obtention d'IgE anti-SRP en l'absence d'adjuvant laisse supposer qu'un immunostimulant d'origine parasitaire pourrait accompagner les antigènes dans le matériel libéré par les schistosomules.

Eur. J. Immunol. 1984, 14, 132-138

Claude Auriault, Martine
Damonville, Claudie Verwaerde,
Raymond Pierce, Michel Joseph,
Monique Capron and André Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie
Parasitaire, INSERM U167-CNRS
ERA 422, Institut Pasteur, Lille

Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro**

The immunogenicity of molecules shed by schistosomula into culture medium (antigens present in schistosomula-released products, SRP-A) has been studied. The results obtained show that SRP-A preferentially induce an IgE response when injected into rats, without the need for adjuvants. Moreover, anti-SRP-A IgE is cytotoxic *in vitro* for the larvae in the presence of macrophages, eosinophils or platelets, which have previously been demonstrated as being the three efficient killer cells for schistosomula in the presence of specific IgE. Immunofluorescence analysis locates the target antigens at the schistosomulum surface. Among the antigens recognized by anti-SRP-A IgE, two molecules of 26 and 22 kDa have been identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis followed by western blotting.

1 Introduction

The analysis of the components of the immune response directed against the parasite *Schistosoma mansoni* reveals that this infection is characterized by an intense humoral response,

[1 4212]

* This work was supported by grants from CNRS (ERA 422), INSERM (U 167) and WHO UNDP special program for research and training in tropical diseases.

Correspondence: Claude Auriault, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM U167-CNRS ERA 422, Institut Pasteur, 15, rue Camille Guérin, F-59019 Lille, Cedex, France

Abbreviations: SRP-A: Schistosomula release products PK-test: Prautnitz Küstner test RAST: Radioallergosorbent test PBS: Phosphate-buffered saline MΦ: Macrophage(s) BSA: Bovine serum albumin PCA: Passive cutaneous anaphylaxis IRS: Infected rat serum NRS: Normal rat serum ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity FITC: Fluorescein isothiocyanate

in which a dramatic production of anaphylactic antibodies has been observed. The contribution to immunity of IgE-mediated reactions cannot be related only to the interaction of IgE with mast cells or basophils but also involves phagocytic cells able to kill the larval stage of the parasite under *in vitro* conditions. Indeed, numerous experiments have shown the participation of IgE in macrophage (MΦ)- [1], eosinophil- [2] and more recently platelet-[3] mediated cytotoxicity. The involvement of IgE in the killing reaction was explained by the bridging of the effector cells to the parasite membrane by the antibodies, at least for MΦ and eosinophils (the interaction of platelets with IgE is at present under investigation). This killing process is induced by the release of cytotoxic products by the effector cells thus activated, leading to worm damage.

It is now clear that IgE antibodies participate in protective immunity [4], even if, at the moment, there is only partial evidence of such a protective role *in vivo*. Indirect evidence was provided by the very close correlation between the existence of specific IgE in sera during an experimental schisto-

some infection and the development of immunity to reinfection [5]. On the other hand, passive serum transfer experiments after selective depletion of anaphylactic antibodies lead to a significant decrease of transferred immunity [6]. The *in vivo* interaction between IgE and M Φ has been recently demonstrated [7] after passive transfer of M Φ armed with IgE of an immune serum. These experiments emphasized the role of M Φ and IgE in the protective immunity against *Schistosoma mansoni*.

To account for the importance of IgE, their mode of induction during experimental schistosomiasis has been studied for several years in our laboratory, using the rat as model. In this experimental rodent infection the parasites are almost entirely rejected 3 to 4 weeks after the initial challenge. This rejection is followed by a strong and prolonged immunity to reinfection in which IgE is one essential component. In the present work, we demonstrate that among the products released by the schistosomula are secreted antigens able to induce an IgE response without the need for adjuvants. Moreover, the IgE thus produced are cytotoxic *in vitro* in antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). The induction of a protective IgE response by schistosomula themselves represents a new conception of the anti-parasite immunity.

2 Materials and methods

2.1 Parasite life cycle and preparation of schistosomula

A Puerto-Rican strain of *Schistosomula mansoni* was used throughout the study [8]. Schistosomula were obtained *in vitro* from cercariae by a mechanical procedure [9] to prepare the products of incubation or by the skin penetration method of Clegg and Smithers [10] for the cytotoxicity assays.

2.2 Preparation of antigens of schistosomula-released products (SRP-A) and of schistosomulum homogenate

Schistosomula were incubated for 4 h at 37°C in Hanks' balanced solution and then extensively washed in the same medium. The parasites, (20 000/ml) were then incubated for 16 h at 37°C. The absence of bacterial contamination was controlled at the end of incubation, together with the viability of the parasites which was always >95%. The parasite-free supernatant was recovered after centrifugation at 150 × g for 2 min and referred to as SRP-A. Culture medium did not contain protease inhibitors toxic for the schistosomula. Schistosomula were sonicated at 0°C, at 25 W using a Braun sonic 125 homogenisator (Quigley, Rochester, NY) and centrifuged for 1 h at 4°C, at 100 000 × g. The supernatant was used as the schistosomulum homogenate.

2.3 Sera

Inbred Fischer rats (Iffa Credo, L'Arbresle, France) exposed percutaneously to 1000 *S. mansoni* cercariae 4-7 weeks previously were the source of immune sera (IRS) used in the cytotoxicity assays. Brown Norway rats (CSEAL, CNRS, Orléans, France), used to obtain anti-SRP-A, were injected i.p. (1 ml SRP-A/rat) followed by a second injection 1 month later. Sera were recovered 4 days after the second injection. In

some experiments, the first injection of SRP-A was carried out with *Bordetella pertussis* vaccine (1 ml; Institut Pasteur Production, Paris, France). Rabbit anti-rat IgE antiserum was kindly provided by Prof. H. Bazin (Louvain, Belgium) and purified according to the method described by Pierce et al. [11].

Human immune sera were obtained from Brazilian patients whose sera were tested for mono-infection by *S. mansoni*, by immunoelectrophoresis and the radioallergosorbent test (RAST) method (see Sect. 2.6). Positive sera were classed as those giving a RAST score at least 5 times the upper limit for normal sera. A normal human serum pool was obtained from nonexposed European subjects.

2.4 Passive cutaneous anaphylaxis test (PCA)

To compare different anti-SRP-A antisera or to control IgE adsorptions, the PCA test was used as described by Ovary [12]. In this test, 0.1 ml of the serum dilution was injected i.d. into a shaved area of the back of adult male Wistar rats, followed 72 h later by the i.v. injection of 2 mg of schistosomula antigen together with 1 ml of 4% Evans blue dye. Thirty minutes after challenge the rats were killed, the skins removed and the reaction quantified by the determination of the titer. For the latter the highest serum dilution giving a blue zone of 5 mm in diameter was taken as the titer.

2.5 Prausnitz-Küstner test (PK-test)

The antigenicity of SRP-A antigens was demonstrated by a PK-test according to the method described by Augustin [13] with some modifications. Normal adult male outbred Wistar rats were injected i.d. in a shaved area of the back with 0.1 ml of rat anti-SRP-A diluted 2, 4 and 8 times. After 72 h, the intradermal challenge was carried out by injecting 0.1 ml of 0.9% NaCl containing 20 µg (protein) of schistosomula antigens to be tested, immediately followed by i.v. injection of 1 ml of 4% Evans blue in 0.9% NaCl. Quantification of the reaction was carried out by measuring opposing diameters of the blue zones and calculating the area of the zone in mm². When positive reactions were obtained, the test was repeated in parallel with normal serum as a control and the difference between the areas measured.

2.6 RAST

Schistosomula antigenic fractions were covalently fixed to diazobenzoxy-methyl-activated paper (DBM paper) according to the procedure described by Pierce et al. [11]. Briefly, aminobenzoxy methyl (ABM) paper was prepared according to Alwine et al. [14] and converted to DBM paper just before use. Pieces (2 × 5 cm) of DBM paper were incubated for 3 h at 4°C under agitation with the protein of the schistosomula antigenic fractions to be bound (50 µg protein for separated fractions) diluted in 1.5 ml phosphate-buffered saline (PBS). Protein was routinely assayed by the Folin method [15]. After rinsing 3 times in the same medium the papers were saturated by overnight incubation in PBS containing 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO). The papers were then rinsed a further 3 times in PBS and dried by blotting with filter paper. Discs (6 mm diameter) were cut from the

paper and used in the RAST assay [16]. For the latter, discs were placed in 5-ml plastic test tubes and incubated for 3 h at room temperature with 50 μ l of rat serum (reaginic or control) diluted 10 times in PBS containing 4% (v/v) fetal calf serum. After three 10-min washes in PBS, they were incubated overnight at room temperature with 50 μ l of 125 I-labeled anti-rat IgE (50 000 cpm). The discs were washed a further 5 times in PBS and transferred to clean tubes before counting in a gamma scintillation counter (Intertechnique CG 4000, Plaisir, France). Results were expressed as specific cpm bound.

2.7 Cytotoxicity assays

2.7.1 M Φ ADCC

Fischer rat resident M Φ were purified by the removal of nonadherent cells at the end of a 2 h culture. The adherent cell population (40% of the peritoneal cells) contained more than 95% M Φ and less than 0.5% mast cells. The cells were then incubated overnight in minimum essential medium (MEM) with 10% normal heat-inactivated rat sera. The cytotoxicity assay was carried out as previously described [17] by a 6-h preincubation of the effector cells with anti-SRP-A antiserum (10%), 42 day *S. mansoni* immune serum (IRS) or normal rat serum (NRS) as control (10%). After 18 h of incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with 50 skin-filtered schistosomula, the killed larvae were counted. Schistosomula were counted as dead if they were immobile, granular and opaque and were surrounded by one layer or several layer of cells. Statistical analysis has indicated to us that a percentage of cytotoxicity over 25% is significant.

2.7.2 Eosinophil ADCC

The method has been described by M. Capron et al. [2]. Fifty skin-prepared schistosomula were dispensed into each well of a flat-bottomed microtiter plate (Nunc, Roskilde, Denmark) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with 50 μ l of anti-SRP-A, IRS or NRS as controls. After overnight incubation, an eosinophil-rich population (90 to 95% eosinophils) was added prepared from nonadherent peritoneal cells according to the method described by Lynch et al. [18] (6000 effector cells to 1 target). The percentage of cytotoxicity was measured after 48 h of contact between effector cells and targets by microscopical examination.

2.7.3 Platelet ADCC

Uninfected rat platelets were prepared from 2 ml heparinized blood diluted with 18 ml heparinized Eagle's MEM (EMEM) and centrifuged for 15 min at 4°C and 400 \times g. Platelets in the supernatant were washed with heparinized EMEM and centrifugation for 20 min at 4°C and 5000 \times g. They were counted in a hemocytometer under phase contrast microscopy after dilution in London staining mixture.

Platelets (7.5×10^7) in 0.1 ml EMEM were dispensed in flat-bottomed microplates and incubated with 20 μ l IRS, NRS, anti-SRP-A or IgE-depleted anti-SRP-A rat antisera and 50 schistosomula in 80 μ l EMEM for 24 h at 37°C and 5% CO₂.

2.8 Indirect immunofluorescence test

Sections of schistosomula were incubated for 30 min with anti-SRP-A antiserum diluted 10 times. After 3 washes with 0.9% NaCl, the sections were preincubated for 30 min with rabbit anti-rat IgE (Miles Lab., Elkhart, IN) and washed as before. The presence of IgE was revealed by incubation for 30 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-rabbit IgG (Fc specific) (Miles). After 3 further washes with 0.9% NaCl, the parasites were examined under a fluorescence microscope. To control nonspecific fluorescence, some sections were treated in a similar manner, but leaving out the incubation with anti-SRP-A antiserum.

2.9 Western blotting of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels

SDS-PAGE was carried out on slab gels according to the Laemmli method [19] using an LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden). Gels were composed of a 5% acrylamide stacking gel and a homogenous 13% acrylamide separating gel. Samples were dissolved in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% sucrose and 0.005% bromophenol blue (sample buffer) and heated at 65°C for 15 min before loading on gels. A mixture of molecular weight marker proteins (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) was run in parallel.

Proteins were transferred from the separating gel to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schüll, Dassel, FRG) using procedures based on those of Towbin et al. [20]. The unstained gel was placed in direct contact with a nitrocellulose sheet previously wetted in the transfer buffer (20 mM Tris, 150 mM glycine and 20% methanol). A sandwich was then formed with successively, two sheets of Whatman 3 paper and 2 Scotchbrite scouring pads, again soaked in transfer buffer. The sandwich was placed between the electrodes of an E-C electroblot apparatus (E-C apparatus Corp., St. Petersburg, FL) and transfer performed for 90 min (0.75 mm thick gels) at 24 V/0.5 A (Destainer power supply, Pharmacia) at 4°C. The nitrocellulose sheet was then incubated at least 2 h in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 containing 0.15 M NaCl and 3% BSA

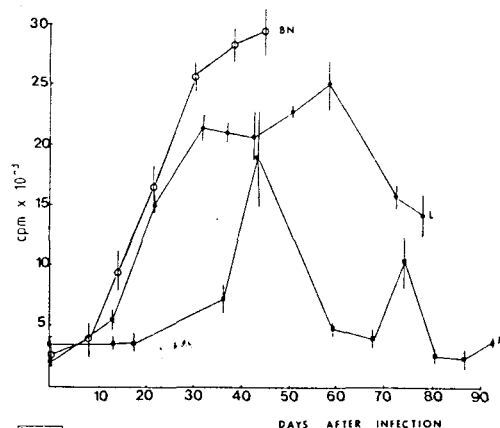


Figure 1. Time course of the specific IgE response directed against schistosomula antigens during Brown Norway (BN), Lou C (L) and Fischer (F) infections assessed by RAST, using discs coated with the schistosomulum homogenate.

to block unreacted sites. The paper was then incubated with infected, immunized or control rat sera at 1/100 dilution in the same buffer for 6-16 h at 4 °C. The sheet was then washed for 10 min each in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl, twice in the same buffer containing 0.05% Nonidet-P40 (BDH Chemicals Ltd., Poole, GB) and once more in the buffer without detergent. Fixed IgE was revealed by incubation with ¹²⁵I-labeled rabbit anti-rat IgE purified and labeled as previously described [11]. Sheets were incubated for 6 h with 5 × 10⁵ cpm of radiolabeled antibody in the Tris buffer containing 3% BSA. After another wash cycle as above, the sheets were allowed to dry before autoradiography with Kodak X-omat XAR-5 film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) and using intensifying screens (Cronex lightning plus, E. I. Du Pont de Nemours & Co., Wilmington, DE). Protein molecular weight standards were stained directly on the nitrocellulose sheet for 5 min in 0.025% coomassie blue in methanol: acetic acid: water (5:1:5, v/v/v) and destaining in the solvent solution until sufficient definition was attained (Dr. S. Grundy, personal communication).

2.10 Immunosorbents

To deplete sera in IgE, immunosorbents were used. Five mg of anti-rat IgE antisera (Miles) were immobilized on 1 g of CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) according to the method of Axén et al. [21].

3 Results

3.1 Time course of the specific IgE response directed against schistosomula antigens during the rat infection

The young larval stage of schistosome has been described as being susceptible to various killing processes. The parasite seems to lose its susceptibility to *in vitro* effector mechanisms within a period of 2 to 3 days. For this reason, the study by RAST of the IgE response directed against the day-0 schistosomula antigens was carried out. Three different strains of rat differing in their ability to develop an IgE response were used. The Fischer rat has been shown to be a low responder and the Lou/M and Brown Norway strains high responders using dinitrophenylated ovalbumin as antigen [22, 23]. Fig. 1 shows that schistosomula-specific IgE appeared between day 14 and day 20 with the high responders, while in the Fischer rat, though exhibiting a significant specific IgE response, this appeared later around day 35 to 45 after infection. The other discrepancy between the different strains was the maintenance of a high specific IgE level up to day 75 in the Lou rats. In contrast, IgE specific for schistosomula antigens decreased after 45 days of infection in the low responder strain.

3.2 Rat and human IgE responses directed against SRP-A

The main purpose of this work was to study the induction of the IgE response with a particular emphasis on the IgE involved in the protective mechanisms. The molecules secreted by the larvae were supposed to play a key role, firstly, due to their presentation in a soluble form and, secondly, for their capacity to target specific T lymphocytes as well as antibody-producing cells at a distance from the site of infection.

Table 1. RAST of rat and human IgE directed against SRP-A

	RAST reactivity (cpm ± SD) ^{a)} Antigens ^{b)}	
	Schistosomula homogenate	SRP-A
<i>S. mansoni</i> -Brown Norway		
IRS (day 35)	8545 ± 1810 ^{c)}	2610 ± 110
Anti-SRP-A antiserum		
obtained with BPA ^{d)}	4786 ± 45	1275 ± 25
obtained without BPA	6200 ± 963	1445 ± 50
NRS	3035 ± 114	495 ± 5
Sera from patients infected		
with <i>S. mansoni</i>	10899 ± 1150	3613 ± 281
Normal human sera	1514 ± 144	1342 ± 87

- Experiments were performed in triplicate.
- Corresponding to 5 µg protein/disc for schistosomula homogenates and 1 µg protein/disc of SRP-A.
- 50 000 cpm of labeled anti-rat IgE were added to each disc.
- Bordetella pertussis* adjuvant.

Table 2. PK-test and IgE immunofluorescence of anti-SRP-A

Antisera, diluted 1/10	PK-test ^{a)} (mm ²)	Indirect immunofluorescence ^{b)}
NRS	43 ± 40	-
IRS (day 35)	242 ± 65	+++
Anti-SRP-A antisera prepared		
without BPA ^{b)} ; secondary response	160 ± 11	++
with BPA (day 14); primary response	198 ± 50	+
with BPA (day 35); secondary response	148 ± 67	+

- Ten µg of schistosomula homogenate were used.
- The degree of IgE immunofluorescence against schistosomulum surface was estimated visually and graded from + to +++. Sections of schistosomula were incubated successively with anti-SRP-A antiserum, anti-rat IgE (rabbit) and revealed by FITC-labeled anti-rabbit IgG (Fc specific).

To test his hypothesis, schistosomula were incubated for 16 h in Hanks' balanced solution at 37 °C and the material secreted was analyzed. Table 1 shows that antigens were present in SRP-A that could be detected by specific IgE in RAST using *S. mansoni*-IRS or infected patients sera. The immunogenicity of these antigens was then tested. Brown Norway rats were injected i.p. with SRP-A (1 ml/rat) either with *Bordetella pertussis* (BP) adjuvant or without adjuvant. The sera thus prepared (anti-SRP-A antiserum) possessed significant amounts of specific IgE as revealed by RAST (Table 1) or by a PK-test (Table 2). Moreover, these results showed that anti-schistosomula-specific IgE was produced whether SRP-A was injected with BP or without adjuvant, suggesting the presence of parasite-derived immunomodulators in SRP-A. The IgE antibodies from the immunized rats recognized the schistosomulum surface in an indirect fluorescence test (Table 2), indicating the surface location of the target antigens.

3.3 M Φ ADCC with anti-SRP-A antisera

Peritoneal rat M Φ were preincubated for 6 h with anti-SRP-A antisera and then incubated with skin-filtered schistosomula during a 16 h period. The results presented in Fig. 2 show that M Φ armed with antibodies present in the anti-SRP-A antisera obtained without adjuvant and IRS were highly cytotoxic (Fig. 2A,B) (90% mortality) for schistosomula after 16 h of incubation. The involvement of IgE in the cytotoxicity of anti-SRP-A antisera was demonstrated after heating or IgE depletion by immunoadsorption (titer 0 controlled by PCA) by a dramatic decrease of cytotoxicity (Fig. 2C-E). The involvement of complement can be discounted, since the addition of NRS after heating did not restore the cytotoxic effect (Fig. 2D). The presence of both M Φ and specific IgE was necessary, since neither M Φ preincubated with NRS (Fig. 2F) nor anti-SRP-A alone (Fig. 2G) affected the ability of the schistosomula.

3.4 Platelet ADCC with anti-SRP-A antisera

The IgE antibody-dependent schistosomula cytotoxicity of platelets has recently been demonstrated [3]. Fig. 3 shows that, in the presence of either anti-SRP-A antisera obtained without adjuvant or IRS, platelets killed 63 and 80%, respectively, of schistosomula (Fig. 3A,B). After depletion of the IgE in the anti-SRP-A antiserum by immunosorption the level of cytotoxicity significantly decreased (12%, Fig. 3C). Platelets incubated with NRS or anti-SRP-A alone were unable to kill schistosomula (Fig. 3D,E).

3.5 Eosinophil ADCC with anti-SRP-A antisera

As with the two other effector cells tested, eosinophils became efficient killer cells when the targets were previously incubated with either IRS or anti-SRP-A antisera prepared without adjuvant (Fig. 4A,B). The IgE dependence of the killing mechanism was evidenced by heating and IgE depletion of the anti-SRP-A antisera (Fig. 4C,D). Among the three effector cells tested, only eosinophils have been described as capable of killing schistosomula in cooperation with specific IgG (IgG_{2a} in the rat) [6]. The involvement of IgG present in the anti-SRP-A antisera is unlikely, since after heating practically all the cytotoxic effect was abolished. In the presence of NRS, eosinophils were unable to kill schistosomula. The other control confirmed that anti-SRP-A antisera incubated alone with the larvae did not affect their viability.

3.6 Characterization of schistosomula antigens recognized by IgE anti-SRP-A antisera

To define the target antigens of schistosomula recognized by the IgE anti-SRP-A antisera, SDS-PAGE using schistosomula homogenate (50 μ g) or SRP-A (20 μ g) was performed, followed by western blotting. The nitrocellulose sheets were then incubated for 16 h with an anti-SRP-A antiserum obtained without adjuvant and revealed by incubation with ¹²⁵I-labeled rabbit anti-rat IgE (Fce specific). Fig. 5 shows that two major bands were thus revealed with 26 and 22 kDa (Fig. 5A) which were absent when NRS supplemented with nonspecific hybridoma IgE (20 μ g/ml) was used as a control (Fig. 5B). When

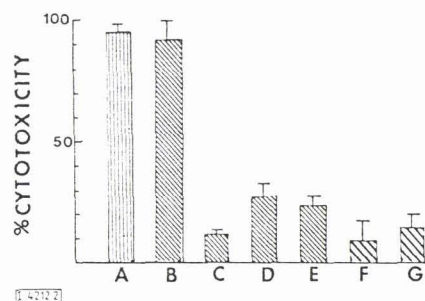


Figure 2. ADCC directed against schistosomula with M Φ and anti-SRP-A antisera. The M Φ were preincubated with different sera. (A) Serum of infection (day 42); (B) anti-SRP-A antiserum (15%); (C) heated anti-SRP-A antiserum (15%); (D) heated anti-SRP-A antiserum supplemented with NRS (10%); (E) anti-SRP-A antiserum depleted in IgE (control PCA titer 0); (F) NRS (15%) and (G) control anti-SRP-A antiserum without M Φ .

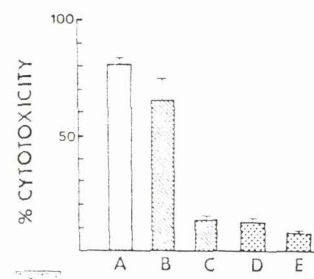


Figure 3. ADCC against schistosomula with platelets and anti-SRP-A antisera. The platelets and the schistosomula are incubated with different sera. (A) Serum of infection (day 46); (B) anti-SRP-A antiserum (10%); (C) anti-SRP-A antiserum (10%) depleted in IgE (control: PCA titer 0); (D) NRS (10%) and (E) control anti-SRP-A antiserum without platelets.

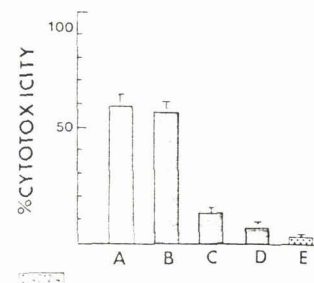


Figure 4. ADCC directed against schistosomula with eosinophils and anti-SRP-A antisera. The eosinophils are added to the schistosomula preincubated with different sera. (A) Serum of infection (day 54); (B) anti-SRP-A antiserum (1:8); (C) Anti-SRP-A antiserum (1:8) depleted in IgE (control: PCA titer 0); (D) heated anti-SRP-A antiserum (1:8) and (E) NRS (1:8).

the anti-SRP-A antisera were previously depleted in IgE by immunosorption (control PCA titer 0) these bands were absent (Fig. 5C). The 26-kDa antigen was a major antigen revealed by the IgE of IRS (Fig. 5D). In contrast, the 22 kDa antigen was not revealed by the same serum. The results presented in Fig. 5 are representative of six experiments.

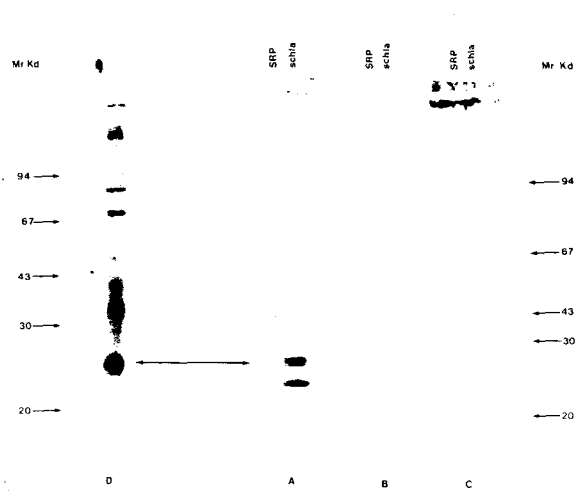


Figure 5. SDS-PAGE of schistosomula antigens followed by western blotting using: (A) anti-SRP-A antiserum; (B) NRS supplemented with 20 μ g/ml of nonspecific hybridoma IgE; (C) anti-SRP-A antiserum depleted in IgE by immunosorption; (D) IRS (day 49). Development was carried out using 125 I-labeled rabbit anti-rat IgE (F₁ specific). The position of marker proteins (in kDa) is arrowed.

4 Discussion

The main conclusions that can be drawn from the data presented in this report are: (a) a significant and persistent IgE response was developed against the schistosomula antigens during the rat infection. Schistosomula-specific IgE antibodies appeared as early as 10 to 15 days after the initial infection in high responder (Brown-Norway and Lou/c rats) and 25 to 30 days after the infection in low responders (Fischer rats); (b) Schistosomula liberated antigenic molecules which were recognized by the IgE of both rat and human infected sera; (c) after rats were injected with SRP-A, these antigens were able to induce an IgE response without the need for a classical adjuvant, suggesting either the presence of immunostimulating molecules in SRP-A or an autoadjuvant effect of the antigens themselves; (d) anti-SRP-A antisera were highly cytotoxic in *in vitro* ADCC tests involving M Φ , eosinophils or platelets as effector cells; (e) IgE played a preponderant role in the killing of larvae by anti-SRP-A antisera in ADCC whatever the effector cell involved; (f) the major target antigens of anti-SRP-A IgE or IgE of IRS were two molecules of 26 and 22 kDa.

Taken together these results suggest that schistosomes liberate antigens inducing a protective IgE response from the beginning of the infection. To account for all the phenomena observed, these liberated antigens are probably surface antigens, recognized by IgE active in the effector mechanisms. This hypothesis is corroborated by the work of Samueison and Caulfield [24], who have demonstrated the loss of molecules from the surface of schistosomula during a 10-15-h culture in defined medium. Most of these molecules were glycoproteins and appeared to be shed intact. Among them molecules in the range of 22-26 kDa represent one of the major fractions described. Thus, the parasite, by secreting selected surface antigens at the time of the initial infection, could initiate a protective antibody response particularly involving the IgE isotype. In addition, these antigens are shed together with an immunostimulant able to induce the antibody response, but

likewise able to potentiate effector mechanisms depending on eosinophils [25]. The 26-kDa molecule is a major antigen recognized by IgE of IRS, but it is also possible that the same molecule (25 kDa) was immunoprecipitated by sera of infected mice [26]. In this latter case, the affinity for protein A of precipitating antibodies implies that essentially IgG was involved. However, no indication of their eventual participation in protective mechanisms was given. In contrast, in our hands the 22-kDa molecule was not revealed by IgE of IRS suggesting either that this antigen is minor and unable to induce an antibody response during a natural infection or, more likely, that it is a degradation product of the 26-kDa molecule, that cannot be recognized in SRP-A, owing to the small quantity of material contained in SRP-A. Indeed previous results have shown the presence of proteases in SRP-A [27].

These results have to be related to those obtained by Horowitz et al. [28] who have demonstrated the partial protection of mice against infection with *S. mansoni* after immunization with crude cercarial sonicates adsorbed on aluminium hydroxide gel adjuvants. The immunization procedure induced high levels of specific antibodies of the IgE class and the authors attributed the protective effect to these IgE, although their exact function was not clear. Both their results with mice and ours, with rats as experimental models emphasized the key role played by IgE directed against young larvae in anti-schistosome immunity.

Recent studies in our laboratory show that immunization of naive rats with SRP-A or passive transfer of anti-SRP-A antisera gave partial protection against infection (manuscript in preparation). SRP-A provides an excellent model for the investigation of the dynamics of the IgE response during schistosomiasis in relation to the search for potentially vaccinating molecules.

The authors would like to thank Anne Delannoye, Anne Loyens, Jean Paul Papin and Han Vorng for their expert technical assistance. We wish also to thank Suzanne Van Wingen for the preparation of parasites and Claudine Colson and Marie France Massard for secretarial expertise.

Received July 12, 1983; in revised form September 19, 1983.

5 References

- 1 Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. and Bazin, H., *Nature* 1975. 253: 474.
- 2 Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A., *J. Immunol.* 1981. 126: 1764.
- 3 Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorn, H. and Viens, P., *Nature* 1983. 303: 810.
- 4 Capron, A. and Dessaint, J. P., *Pathol. Biol.* 1977. 25: 287.
- 5 Capron, A., Dessaint, J. P., Joseph, M., Torpier, G., Capron, M., Rousseaux, R., Santoro, F. and Bazin, H., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977. 26: 39.
- 6 Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M. and Pestel, J., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980. 29: 849.
- 7 Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J. P. and Capron, A., *J. Immunol.* 1983, in press.
- 8 Capron, A., Capron, M., Dupas, H., Bout, D. and Petitprez, A., *Int. J. Parasitol.* 1974. 4: 613.
- 9 Ramalho-Pinto, G., Gazzinelli, G., Howells, R. E., Mota-Santos, T. A., Figueiredo, E. A. and Pellegrino, J., *J. Exp. Parasitol.* 1974. 36: 360.

- 10 Clegg, J. A. and Smithers, S. R., *Int. J. Parasitol.* 1972. 2: 79.
- 11 Pierce, R. J., Verwaerde, C., Damonville, M., Lepresle, T. and Capron, A., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1983, in press.
- 12 Ovary, Z., in Ackroyd, J. F. (Ed.), *Immunological Methods*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1964, p. 259.
- 13 Augustin, R., in Weir, D. M. (Ed.), *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1978, chapter 45.
- 14 Alwine, J. C., Kemp, D. J. and Stark, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977. 74: 5350.
- 15 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.* 1951. 193: 265.
- 16 Wide, L., Bennich, H. and Johansson, S., *Lancet* 1967. ii: 1105.
- 17 Capron, A., Dessaint, J. P., Joseph, M., Rousseaux, R., Capron, M. and Bazin, H., *Eur. J. Immunol.* 1977. 7: 315.
- 18 Lynch, S. M., Austen, K. F. and Wasserman, S. L., *J. Immunol.* 1972. 121: 1394.
- 19 Laemmli, U. K., *Nature* 1970. 227: 680.
- 20 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979. 76: 4350.
- 21 Axén, R., Porath, J. and Ernback, S., *Nature* 1967. 214: 1302.
- 22 Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B. and Vanderstraeten, M., *J. Immunol. Methods* 1977. 18: 133.
- 23 Bazin, H., Querinjean, P., Beckers, A., Heremans, J. F. and Dessy, F., *Immunology* 1977. 26: 713.
- 24 Samuelson, J. C. and Caulfield, J. P., *J. Cell. Biol.* 1982. 94: 363.
- 25 Auriault, C., Capron, M. and Capron, A., *Cell. Immunol.* 1982. 66: 59.
- 26 Taylor, D. W., Hayunga, E. G. and Vannier, W. E., *Mol. Biochem. Parasitol.* 1981. 3: 157.
- 27 Auriault, C., Ouaisi, M. A., Torpier, G., Eisen, H. and Capron, A., *Parasite Immunol.* 1981. 3: 33.
- 28 Horowitz, S., Smolarsky, M. and Arnon, R., *Eur. J. Immunol.* 1982. 12: 327.

ARTICLE 3

Etude de la réponse anticorps IgG anti-SRP (*S. mansoni* schistosomula-released products) au cours de l'infection humaine et expérimentale.

Dans cet article, nous montrons que les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule constituent également un mode de présentation dynamique des antigènes pour l'induction d'une réponse IgG protectrice.

L'immunoprécipitation du SRP marqué à l'¹²⁵I par des sérums de rats infestés par *S. mansoni* indique que de nombreux antigènes présents dans le SRP sont reconnus au cours de l'infection (au moins 12). Ces anticorps IgG apparaissent vers la 4^{ème} semaine d'infection pour atteindre un maximum vers la 8^{ème} semaine. Chez l'homme, le profil des antigènes révélés est très variable selon l'individu considéré. Et aucune corrélation n'est observée entre l'âge du patient et la reconnaissance préférentielle de certains antigènes.

Puisque le schistosomule libère en culture des antigènes ou de surface ou associés au métabolisme membranaire, l'immunisation de rats avec du SRP doit conduire à la formation d'anticorps dirigés contre ces molécules, cibles des mécanismes effecteurs. En effet, l'immunoprécipitation du matériel de surface marqué à l'¹²⁵I par des sérums anti-SRP révèle des antigènes majeurs de PM de 32 à 38kDa et de 21kDa. Ce profil est identique à celui obtenu avec des sérums d'infection, excepté pour l'antigène de 21kDa qui est reconnu plus faiblement et à une période plus tardive de l'infection.

Etant donné i) que les sérums anti-SRP reconnaissent un antigène de 38kDa, ii) que cette molécule est l'un des antigènes cibles des mécanismes effecteurs de la réponse immune, les sérums anti-SRP ont été analysés en test de cytotoxicité *in vitro* dépendant d'éosinophiles. Une mortalité importante (60%) des schistosomules est observée avec les sérums anti-SRP.

Nous avons par ailleurs confirmé la production de ces anticorps cytotoxiques chez des rats immunisés avec du SRP par la technique d'hybridation cellulaire décrite par KÖHLER & MILSTEIN (1975). La fusion de cellules immunes de rat (prélevées 3 jours après la seconde immunisation par 1ml de SRP) avec un myélome de rat a conduit à la production d'un anticorps monoclonal de classe IgG_{2a} présentant les propriétés suivantes :

1) une activité cytotoxique *in vitro* pour le schistosomule en présence d'éosinophiles,
 2) une réactivité avec une molécule de 38kDa précédemment décrite comme un antigène cible majeur par GRZYCH *et al.* (1982) à l'aide de l'anticorps monoclonal IPL Sm1. Cette reconnaissance a été démontrée par :

- l'immunoprécipitation d'un antigène de 38kDa à partir du matériel de surface de schistosomule marqué à l'¹²⁵I,
- l'inhibition de la fixation de l'anticorps IPL-Sm1 (marqué à l'¹²⁵I) à son antigène par une technique radio-immunologique.

Les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule représentent donc un matériel antigénique capable de mimer l'infection par le parasite vivant en ce qui concerne l'induction de la réponse anticorps IgG dirigée contre des antigènes cibles de membrane.

IgG response of rats and humans to the released products of schistosomula of *Schistosoma mansoni*

CLAUDIE VERWAERDE, C. AURIAULT,
MARTINE DAMONNEVILLE, J.-M. GRZYCH, R. PIERCE
and A. CAPRON

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité Mixte INSERM U 167-CNRS 624,
Institut Pasteur, 15 rue Camille Guérin, 59019 Lille cedex, France*

(Accepted 24 October 1984)

SUMMARY

The participation of products released from *Schistosoma mansoni* schistosomula (SRP-A) in the IgG antibody response of infected Brown-Norway rats and infected humans has been studied using immunoprecipitation with various antigenic preparations and in *in vitro* cytotoxicity assays. A large number of SRP-A molecules with a wide range of molecular weights was recognized by infected rat and human sera. Anti-SRP-A antibodies appeared in rat sera from day 28 after infection. In infected humans, a variable pattern of SRP-A recognition was observed between individuals. IgG antibodies obtained by immunization of rats with SRP-A without addition of adjuvants reacted with 3 major schistosomula surface proteins with molecular weights of 38, 32 and 21 kDa. These latter molecules were also revealed strongly by infected rat sera. Moreover, these antibodies were able to kill schistosomula *in vitro* in the presence of complement or eosinophils.

INTRODUCTION

The intense humoral response observed during infection by the parasite *Schistosoma mansoni* appears to play a major role in rat immunity to reinfection against schistosomes. Passive transfer experiments of immune sera confer a significant protection to rats against a challenge infection (Capron, Dessaint, Capron, Joseph & Torpier, 1982). Moreover, the suppression of immunoglobulin synthesis by anti- μ treatment of rats decreases their immunity to reinfection (Bazin, Capron, Capron, Joseph, Dessaint & Panwels, 1980). *In vitro* experiments have shown that, to be effective, rat anti-*S. mansoni* antibodies require either the presence of complement (Capron, Capron, Dupas, Bout & Petitprez, 1974) or the collaboration of effector cells (Capron, Dessaint, Capron & Bazin, 1975; Capron, Capron, Torpier, Bazin, Bout & Joseph, 1978; Capron, Bazin, Joseph & Capron, 1981; Joseph, Auriault, Capron, Vorng & Viens, 1983). The study of the target antigens of these killing mechanisms was first approached by the use of monoclonal antibodies. A rat IgG_{2a} monoclonal antibody, cytotoxic for *S. mansoni* schistosomula in the presence of eosinophils, permitted characterization of a surface antigen with a molecular weight of 38 kDa (Dissous, Grzych & Capron, 1982; Capron, Bazin & Capron, 1982). This antigen seemed to be a marker not only of rat infection but also in various hosts including man (Dissous *et al.* 1982). More recently, studies performed on schistosomula-released products (SRP-A) suggested that this material provides an excellent model for investigation of the dynamics of the antibody response during experimental schistosomiasis in relation to the search for the target antigens of protective mechanisms (Auriault *et al.* 1984). This antigenic preparation

results either from membrane turnover or from metabolic products of the larvae, and it introduces the notion of presentation by the parasite of antigens in a soluble form. The antigens, being disseminated in the organism, could thereby come into contact with various antigen-presenting cells such as macrophages, Langerhans cells or Kupffer cells. In a previous paper, we showed that SRP-A was able to induce, in the absence of adjuvant, the production of antibodies of the IgE class, cytotoxic *in vitro* for schistosomula in the presence of various effector cells (Auriault *et al.* 1984). Immunoreactivity of the IgE antibodies directed against SRP-A led to the characterization of two parasite antigens of molecular weights of 22 and 26 kDa. Recent experiments have shown that significant protection against a challenge infection could be achieved by prior immunization with SRP-A (M. Damonville, unpublished results). Although IgE plays an important role, this protection is not due exclusively to this immunoglobulin class, suggesting the participation of other isotypes. In the present paper, we have therefore attempted to characterize SRP-A antigens recognized by IgG antibodies and to investigate their intervention in the rat and human immune response.

MATERIALS AND METHODS

Parasite life-cycle and preparation of schistosomula

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was used throughout the study (Capron *et al.* 1974). To prepare products of incubation (SRP-A), schistosomula were obtained from cercariae by a mechanical procedure (Ramalho-Pinto *et al.* 1974). For the cytotoxicity assays, schistosomula were collected *in vitro* after skin penetration by cercariae, according to the technique described by Clegg & Smithers (1972).

Preparation of antigens of schistosomula-released products (SRP-A)

SRP-A was prepared as previously described by Auriault *et al.* (1984). Briefly, 4-h-old schistosomula were incubated for 16 h at 37 °C in Hank's Balanced Solution (20000 parasites/ml). After controlling the absence of bacterial contamination and viability of the parasites, the parasite-free supernatant fluid was recovered by centrifugation at 150 g for 2 min and referred to as schistosomula-released products (SRP-A).

Sera

Brown-Norway rats (CSEAL, CNRS, Orléans, France) weighing 150–180 g were used in the study. Rats previously exposed percutaneously to 1000 cercariae of *S. mansoni* (Smithers & Terry, 1965) were the source of infected rat serum (IRS). Anti-SRP-A sera were obtained from rats injected intraperitoneally with 1 ml of SRP-A/rat, followed by a second injection 1 month later. Sera were collected 5 days after the second injection. Sera from Brazilian patients infected with *S. mansoni* (kindly donated by Dr Prata, University of Brasilia, Brazil) were screened by immunoelectrophoresis against whole adult worm antigens. The positive sera selected were those giving at least 4 arcs of precipitation.

Preparation of ¹²⁵I schistosomula surface proteins and ¹²⁵I-SRP-A antigens

Skin-prepared schistosomula were surface labelled with ¹²⁵I using the Iodogen method (Markwell & Fox, 1978) at 0.5 mCi ¹²⁵I for 10000 schistosomula. Isolation of surface

proteins was performed according to Dissous, Dissous & Capron (1981). A 100 μ l sample of concentrated SRP-A solution (equivalent to 3–4 ml initial SRP-A solution concentrated on a PM 10 membrane (Amicon)) was labelled by the chloramine-T method (Greenwood, Hunter & Bolver, 1963).

Characterization of immunoreactive proteins

Analysis was performed as described by Dissous *et al.* (1981) by immunoprecipitation of antigens with immune sera using protein-A Sepharose. Briefly, aliquots of 125 I-labelled proteins (equivalent to 10^6 c.p.m.) were incubated with 10 μ l of serum in the appropriate buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl; 2 mM EDTA, 2% Triton X-100, 100 U/ml aprotinin) for 18 h at 4 °C with continuous agitation. The immune complexes were then transferred onto 10 mg of protein A-Sepharose previously coated with 10 μ l of rabbit anti-rat IgG or 10 μ l of rabbit anti-human IgG (Nordic, Netherlands) in the same buffer. After agitation overnight at 4 °C, the Sepharose beads were washed with buffer until the radioactivity in the supernatant fraction was negligible, and then washed twice with 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer. Products retained on protein-A-Sepharose were finally eluted with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS; 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue) at 100 °C for 3 min. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the eluted material was carried out on slab gels according to the method of Laemmli (1970) using an LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden). Gels were composed of a 5% acrylamide stacking gel and a homogenous 13% acrylamide separating gel. A mixture of molecular weight marker proteins (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) was run in parallel. After migration, gels were stained for 30 min in 0.08% Coomassie Brilliant Blue R in methanol:acetic acid:water (5:1:5 by vol.) destained in methanol:acetic acid:water (2:0.7:7.3) and then dried onto Whatman no. 1 paper in a Pharmacia gel slab drier GSD-4. Autoradiography was performed by contact of dried gels with Kodak X-Omat XAR-5 film (Eastman Kodak Co, Rochester, N.Y.) between Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, France) at -70 °C.

In vitro cytotoxicity assays

(a) Complement-dependent cytotoxicity

Lethal antibody activity was quantified as described by Capron *et al.* (1974). Briefly, 50 schistosomula were incubated with 100 μ l of heated (4 h, 56 °C) normal, day 56 infected or anti-SRP-A rat sera and with 40 μ l of fresh guinea-pig serum as a source of complement in the wells of a flat-bottomed microtitre plate (Nunc, Denmark) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The percentage cytotoxicity was measured after 48–72 h by microscopic examination.

(b) Eosinophil-dependent cytotoxicity

The cytotoxicity assay was performed on *S. mansoni* schistosomula as previously described by Capron *et al.* (1978). Briefly, 50 schistosomula were dispensed into each well of a flat-bottomed microtitre plate and incubated overnight with 100 μ l of normal, day 35 infected or anti-SRP-A rat sera at a final dilution of 1/16 (sera previously heat-inactivated for 4 h at 56 °C). After incubation for 18 h at 37 °C, an eosinophil-rich population was added at a ratio of 6000 effector cells to 1 schistosomulum. The percentage cytotoxicity was measured by microscopic examination after incubation for 48 h at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂.

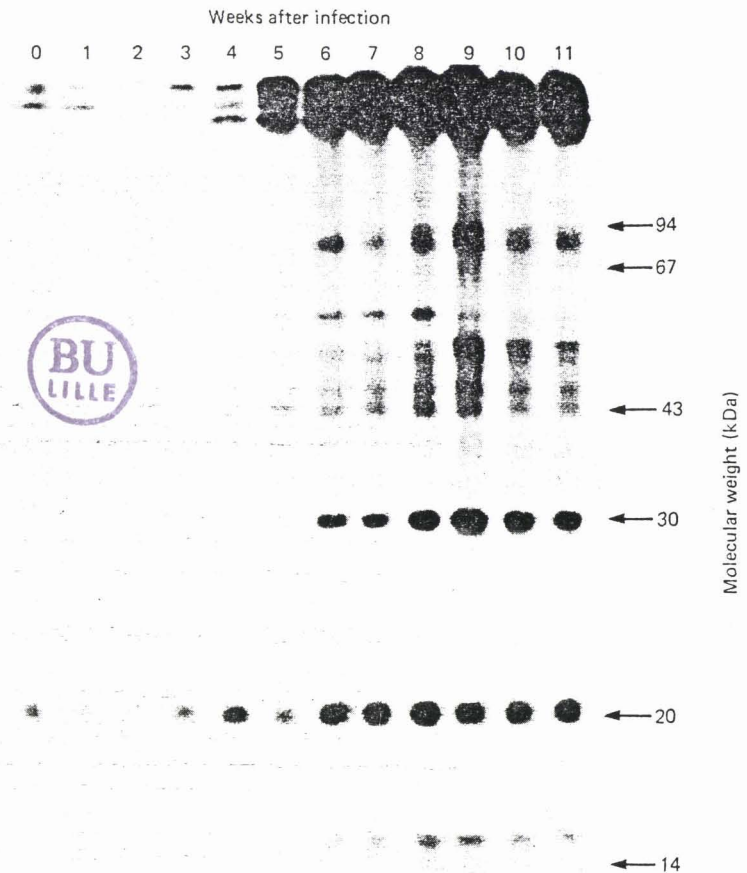


Fig. 1. Time-course of the appearance of anti-SRP-A antibodies in *Schistosoma mansoni*-infected rat serum. ^{125}I -labelled SRP-A was incubated with 10 μl of rat serum collected before (0) or after 1–11 weeks of *S. mansoni* infection. Immune complexes were adsorbed on anti-rat IgG protein A-Sepharose. Eluted products were then analysed by SDS-PAGE as described in the Materials and Methods section.

RESULTS

Time-course of recognition of SRP-A antigens during rat infection

In order to investigate the antigens present in the SRP-A material, particularly those which elicit an IgG antibody response during *S. mansoni* rat infection, immunoprecipitations were performed with ^{125}I -labelled SRP-A and Brown-Norway rat sera collected at different times after *S. mansoni* infection. Immunoreactive proteins were then analysed by SDS-PAGE and revealed by autoradiography. Numerous antigens of SRP-A, ranging in apparent molecular weight from 14 kDa to > 150 kDa, were recognized by infected rat sera (Fig. 1). Although some antigens were seen at week 4 post-infection, maximal recognition was reached after week 6.



Fig. 2. Identification of immunoreactive SRP-A molecules with infected human sera. Immunoprecipitations were performed with normal human serum (A), serum from a patient infected with *Ascaris lumbricoides* (B) or various sera from *S. mansoni*-infected human sera (C) (age of patients: lane 1, 17; lane 2, 14; lane 3, 40; lane 4, 48; lane 5, 58; lane 6, 47; lane 7, 40; lane 8, 45). The protocol is the same as in the legend of Fig. 1 except that protein A-Sepharose was coated with anti-human IgG.

Characterization of SRP-A antigens with infected human sera

Sera of Brazilian patients with parasitologically confirmed schistosomiasis and of various ages were tested for their antibody reactivity against SRP-A using the same methodology as for infected rat sera. Numerous antigens of SRP-A material, having a wide range of molecular weights, participated in the human immune response during *S. mansoni* infection (Fig. 2C). A wide variation in intensity and quality of immunoreactivity of infected human sera with SRP-A was observed between individuals. Control tests performed with normal (Fig. 2A) or *Ascaris lumbricoides*-infected (Fig. 2B) human sera indicated the *Schistosoma* genus specificity of the immunoprecipitated antigens.

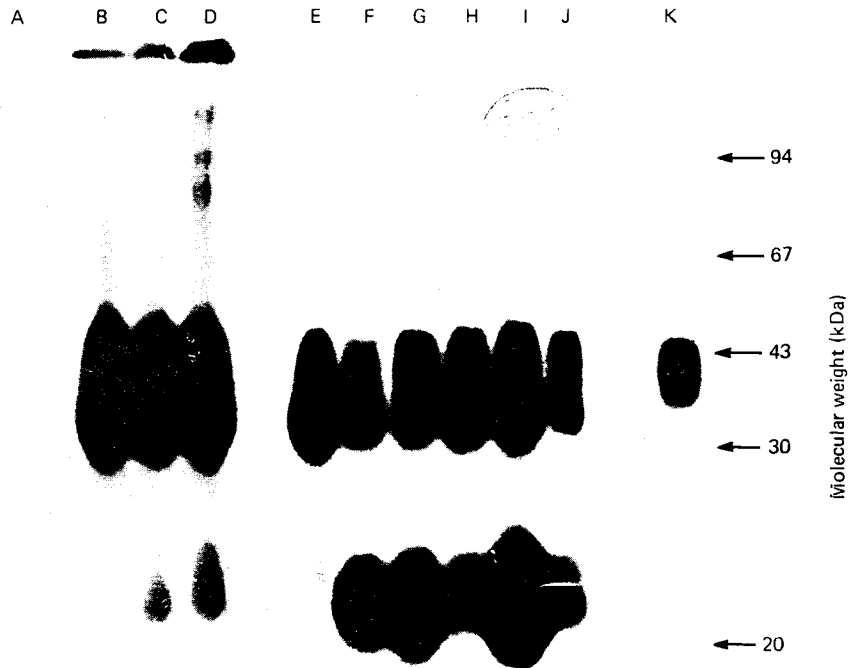


Fig. 3. Identification of schistosomula surface proteins reacting with *Schistosoma mansoni*-infected rat sera and anti-SRP-A antisera. A detergent extract of ^{125}I surface-labelled skin schistosomula was incubated with $10\ \mu\text{l}$ of NRS (A), $10\ \mu\text{l}$ of IRS at day 35 (B), day 56 (C) or day 78 (D), $10\ \mu\text{l}$ of different anti-SRP-A antisera (E-J) or $10\ \mu\text{l}$ of IPLSml ascitic fluid (K). Immunoreactive proteins were analysed as described in the legend of Fig. 1.

Surface antigens defined by anti-SRP-A sera

Cultured schistosomula appear to lose surface proteins by shedding them into the medium (Samuelson & Caulfield, 1982), and we have investigated whether the antibodies present in anti-SRP-A sera were directed against surface molecules. Skin transformed schistosomula were surface-labelled by the Iodogen method. Surface molecules were extracted by detergent and immunoprecipitated with anti-SRP-A sera or rat sera taken on different days after infection with *S. mansoni*. Three major bands having mean molecular weights of 38, 32 and 21 kDa were isolated with anti-SRP-A sera (Fig. 3, lanes E-J). Some variability in intensity, particularly for the 21 kDa protein, was observed. The pattern of recognition was nearly the same with infected rat sera (Fig. 3, lanes B-D). Nevertheless, a feebler recognition of the 21 kDa protein, but one which increased progressively during the course of infection, was noticed. As a positive control, a test was performed with IPL-Sml monoclonal antibody (anti-*S. mansoni* IgG_{2a} antibody) (Grzych *et al.* 1982) which characterized the major surface antigen of 38 kDa (Fig. 3, lane K) as previously described (Dissous *et al.* 1982).

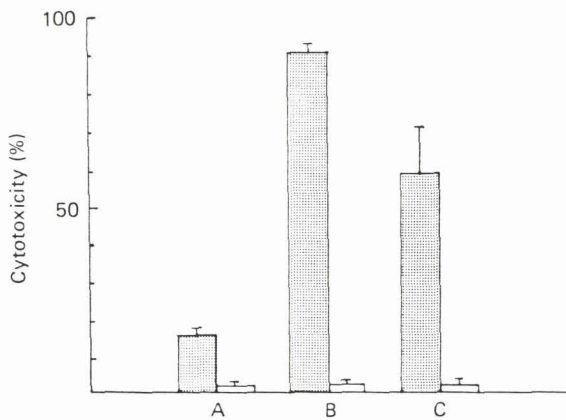


Fig. 4.

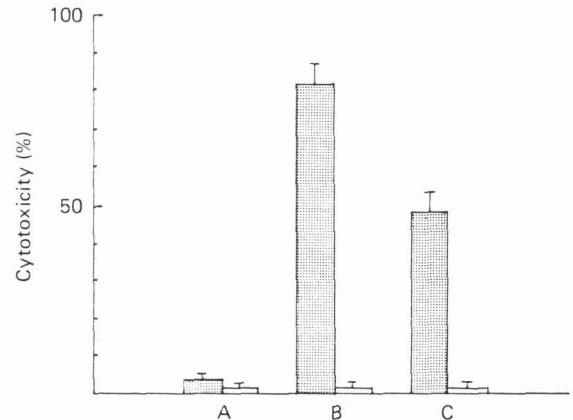


Fig. 5.

Fig. 4. Eosinophil-dependent cytotoxicity of anti-SRP-A antisera. The percentage cytotoxicity was evaluated after incubation of schistosomula for 48 h with NRS (A), IRS at day 28 (B) or anti-SRP-A antiserum (C) in the presence (▨) or absence (□) of eosinophils. Sera (final dilution: 1/16) were heated at 56 °C for 4 h. (Mean of 2 experiments \pm s.d.)

Fig. 5. Complement-dependent cytotoxicity of anti-SRP-A antibodies. Mortality was measured after incubation of schistosomula for 72 h with NRS (A), IRS at day 56 (B) or anti-SRP-A antiserum (C) in the presence of fresh guinea-pig serum (▨) or heated (30 min, 56 °C) guinea-pig serum (□). Sera (final dilution: 1/2) were heated at 56 °C for 4 h. Guinea-pig serum was used at a final concentration of 20%. (Mean of duplicate experiments \pm s.d.)

Eosinophil-dependent cytotoxicity of anti-SRP-A antisera

The collaboration of IgG antibodies and eosinophils in the *in vitro* killing of schistosomula was first demonstrated by Butterworth, Sturrock, Houba & Rees (1975) in man. The use of a rat model infection, in which this mechanism was also observed, led to a more precise study of this killing mechanism, particularly concerning the process of eosinophil activation and the nature of the antibody involved (Capron *et al.* 1978). When anti-SRP-A serum (heated at 56 °C for 4 h to inactivate IgE antibodies) was studied in the eosinophil-dependent cytotoxicity assay, a significant level of mortality was obtained (58%) (Fig. 4C), although it was inferior to the percentage obtained with IRS (90%) (Fig. 4B). No cytotoxicity was detected with NRS (Fig. 4A) or in controls performed in the absence of effector cells.

Complement-dependent cytotoxicity of anti-SRP-A antisera

The first demonstration of immune killing of schistosomula *in vitro* was by Clegg & Smithers (1972), who identified an IgG antibody lethal for larvae in the presence of complement in Rhesus monkey immune serum. This observation was confirmed in various other animal species (Capron *et al.* 1974). Incubation of schistosomula with IRS or with anti-SRP-A antiserum in the presence of guinea-pig serum resulted in the killing of respectively 85 and 50% of larvae (Fig. 5B, C). No activity was detected with NRS (Fig. 5A). Lethal activity of anti-SRP-A antiserum was complement dependent as demonstrated by heat-inactivation (56 °C, 30 min) of guinea-pig serum.

DISCUSSION

The main purpose of this work was to investigate the recognition of SRP-A antigens by human and rat IgG antibodies and their possible relevance in protection against schistosomiasis. This study led to the following conclusions: (1) SRP-A material contained a large number of antigens recognized by sera from infected rats and humans; (2) anti-SRP-A antisera revealed the three major schistosomula surface proteins (M_r 38, 32 and 21 kDa) recognized by sera from infected rats and (3) the heat-stable antibodies of anti-SRP-A sera were cytotoxic *in vitro* for schistosomula in the presence of complement or eosinophils.

Two hypotheses have been advanced to explain the escape of schistosomes from host immune attack during infection. Thus, either the parasite could coat itself with host molecules (Smithers, Terry & Hockley, 1969), or it could avoid the host defence process by losing some antigenic determinants (Dean, 1977). This last suggestion was corroborated by the work of Samuelson & Caulfield (1982) who showed the shedding by *S. mansoni* schistosomula of surface glycoproteins during cultivation *in vitro*. The SRP-A material was obtained by incubation of larvae in an isotonic medium for 18 h. Its protein content was very low since 1 ml of SRP-A solution (equivalent to the incubation of 20000 schistosomula, the dose injected into rats for immunization) contained approximately 6 μ g of proteins. Nevertheless, immunoprecipitation of 125 I-labelled SRP-A with infected rat sera revealed that numerous antigens of this preparation (at least 12) of various molecular weights induced an antibody response during *S. mansoni* infection (Fig. 1). These results imply that, contrary to the IgE response which is concentrated against two molecules of 26 and 22 kDa, the IgG response was more dispersed. By immunoprecipitation of 125 I-labelled SRP-A with anti-SRP-A IgG antibodies, these 26 and 22 kDa molecules were revealed amongst other proteins and to a greater or lesser extent depending on the sera tested (data not shown). In assays performed with infected human sera, we also observed a wide diversity in the antigens revealed with a large degree of variation between individuals (Fig. 2) and no correlation seemed to exist between the pattern of autoradiographic bands and the age of the patient. It should be interesting to investigate the presence of one or several antigens in association with the development of immunity by the use of immune or non-immune human sera.

In order to investigate the presence of antibodies directed against schistosomula surface molecules in the anti-SRP-A antiserum, immunoprecipitations were thus performed with 125 I-labelled schistosomula surface detergent extract. Three major surface molecules of M_r 38, 32 and 21 kDa were characterized with anti-SRP-A antisera (Fig. 3). The same pattern was obtained with infected rat sera except for the 21 kDa protein which appeared less intense and later on in the infection.

The results are, in part, in agreement with the previous work of Dissous *et al.* (1981) who identified 3 immunoreactive proteins of 40, 38 and 32 kDa, and of Knight, Simpson, Payares, Chandri & Smithers (1984) who described a 20 kDa protein as well as the 38 and 32 kDa molecules. This discrepancy could be attributed to the difference in surface-labelling methodology of schistosomula: with lactoperoxidase in the first case and with iodogen, as in this work, in the second.

While the 32–38 kDa complex was not seen in the autoradiography of Fig. 1, some molecules in this molecular weight range were detected after over-exposure of the autoradiography. At least in the case of the 38 kDa antigen, this molecule is present in the SRP-A since the monoclonal antibody IPLSml, directed against a 38 kDa

schistosomular surface antigen, recognized a 38 kDa molecule by immunoprecipitation with labelled SRP-A (data not shown). Schistosomula-released products thus represent an antigenic material able to mimic the infection by the living parasite in regard to the induction of an IgG antibody response against surface molecules.

Particular attention must be accorded to the 38 kDa surface protein. First, it represents a target antigen of an ADCC mechanism involving eosinophils (Grzych *et al.* 1982) and second, it is released by the schistosomula during incubation (Dissous *et al.* 1982). As described above, anti-SRP-A sera recognized a protein of this molecular weight. The activity of heat-stable eosinophil-dependent antibody was thus explored in the anti-SRP-A antisera. A significant level of cytotoxicity (50%) was achieved, although this was inferior to that obtained with infected rat sera (90%) (Fig. 4). This value was, however, significant in regard to the very low dose of antigenic preparation (6 μ g of proteins) used to immunize rats in the absence of adjuvant. These results seem to be in contradiction with our previous work on eosinophil-dependent cytotoxicity of anti-SRP-A serum in which only IgE antibodies were involved. However, Capron *et al.* (1978) have shown that IgG-dependent killing takes place only when schistosomula are pre-incubated with immune sera prior to addition of eosinophils. This pre-incubation is not necessary in the case of IgE-dependent cytotoxicity, which explains the difference observed. The demonstration of the biological activity of IgG is all the more interesting in the light of results of protection of naive rats against *S. mansoni* infection obtained by prior injection of eosinophil-dependent cytotoxic antibodies (Grzych *et al.* 1982) or by the injection of eosinophils from infected animals (Capron, Nogueira-Queiroz, Papin & Capron, 1984). Recently, the presence of eosinophil-dependent cytotoxic antibodies in anti-SRP-A serum was confirmed by hybridoma technology. We have obtained a rat IgG_{2a} monoclonal antibody, cytotoxic *in vitro* for schistosomula in the presence of eosinophils, by hybridization with immune cells of SRP-A immunized rats. Finally, anti-SRP-A antibodies exhibit an *in vitro* cytotoxic activity for schistosomula in the presence of complement (Fig. 5). Until now, no *in vivo* relevance of this killing mechanism has been proposed. Nevertheless, this result provides an additional argument for the intervention of SRP-A molecules in the immune response.

In conclusion, the schistosomula larvae appear to be a particularly dynamic stage in the host-parasite relationship. During the course of infection, the loss of surface proteins from schistosomula should thus not be regarded only as a means of escape from immune attack. By disseminating soluble material of membrane and metabolic origin, diffusable throughout the organism, the larvae probably initiate the immune response directed against further homologous infections. It is thus conceivable that the immunogenicity of the schistosomulum is not restricted to the presentation of antigens at its surface but is potentiated by the liberation of these antigenic molecules. This initial antibody response is then further amplified by antigens released by the adult worm. Concomittant immunity in schistosomiasis, until now attributed exclusively to the adult worms, would thus be initiated by the larval stage. In the case of a very few infecting schistosomula (as in human infection) the effect of SRP-A would not be negligible since, concurrent with the first infection, specific lymphocytes should be primed and the clonal expansion of the memory cells could occur after further infections.

We are indebted to Anne Delanoye, Catherine Vendeville and Stéphane Torres for their expert technical assistance. We also thank Claudine Colson for her help with preparation of the manuscript. This work was supported by CNRS (ERA 422), INSERM (U 167) and the WHO-UNDP Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

REFERENCES

- AURIAULT, C., DAMONNEVILLE, M., VERWAERDE, C., PIERCE, R. J., JOSEPH, M., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1984). Rat IgE directed against schistosomula released products (SRP-A) is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula. *European Journal of Immunology* **14**, 132-8.
- BAZIN, H., CAPRON, A., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J. P. & PAUWELS, R. (1980). Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies on immunity to schistosomes (*S. mansoni*) in the rat. *Journal of Immunology* **124**, 2373-7.
- BUTTERWORTH, A. E., STURROCK, R. F., HOUBA, C. & REES, P. M. (1975). Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature, London* **256**, 727-9.
- 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*. *Parasitology* **4**, 613-23.
- CAPRON, A., DESSAINT, J. P., CAPRON, M. & BAZIN, H. (1975). Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature, London* **253**, 474-5.
- CAPRON, A., DESSAINT, J. P., CAPRON, M., JOSEPH, M. & TORPIER, G. (1982). Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunological Reviews* **61**, 41-66.
- CAPRON, M., BAZIN, H., JOSEPH, M. & CAPRON, A. (1981). Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *Journal of Immunology* **126**, 1764-8.
- CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D. & JOSEPH, M. (1978). Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibodies and role of mast cells. *European Journal of Immunology* **8**, 127-33.
- CAPRON, M., NOGUEIRA-QUEIROZ, J. A., PAPIN, J. P. & CAPRON, A. (1984). Interactions between eosinophils and antibodies: *in vivo* protective role against rat schistosomiasis. *Cellular Immunology* **83**, 60-72.
- CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1972). The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*. *International Journal for Parasitology* **2**, 79-98.
- DEAN, D. A. (1977). Decreased binding of cytotoxic antibody by developing schistosomula: evidence for a surface change independent of host-antigen absorption and membrane turnover. *Journal of Parasitology* **63**, 418-26.
- DISSOUS, C., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1981). Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Molecular and Biochemical Parasitology* **3**, 215-25.
- DISSOUS, C., GRZYCH, J. M. & CAPRON, A. (1982). *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *Journal of Immunology* **129**, 2232-4.
- GREENWOOD, F. C., HUNTER, W. & BOLVER, J. S. (1963). The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *The Biochemical Journal* **89**, 114-23.
- GRZYCH, J. M., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1982). *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *Journal of Immunology* **129**, 2739-43.
- JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H. & VIENS, P. (1983). A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature, London* **303**, 810-12.
- KNIGHT, M., SIMPSON, A. J. G., PAYARES, G., CHAUDRI, M. & SMITHERS, S. R. (1984). Cell-free synthesis of *Schistosoma mansoni* surface antigens: stage specificity of their expression. *The EMBO Journal* **3**, 213-19.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680-5.
- MARKWELL, M. A. K. & FOX, C. F. (1978). Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eukaryotic cells using 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycosuril. *Biochemistry* **17**, 4807-17.
- RAMALHO-PINTO, G., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R. E., MOTA-SANTOS, T. A., FIGUEIREDO, E. A. & PELLEGRINO, J. (1974). *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Experimental Parasitology* **36**, 360-72.
- SAMUELSON, J. C. & CAULFIELD, J. P. (1982). Loss of covalently labelled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Cell Biology* **94**, 363-9.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. (1965). The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* **55**, 695-700.
- SMITHERS, S. R., TERRY, R. J. & HOCKLEY, D. J. (1969). Host antigens in schistosomiasis. *Proceedings of the Royal Society* **171**, 483-94.

ARTICLE 4

Production d'anticorps monoclonaux anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leurs activités biologiques.

ARTICLE 5

Propriétés fonctionnelles d'un anticorps monoclonal IgE anti-*Schistosoma mansoni*.

Dans le premier article, nous montrons que la technique d'hybridation cellulaire mise au point par KÖHLER et MILSTEIN (1975) peut être utilisée pour obtenir des anticorps monoclonaux anti-*S. mansoni* de classe IgG2a et IgE avec des activités biologiques comparables à celles d'anticorps polyclonaux de sérum d'infection. Ces anticorps monoclonaux ont été obtenus par hybridation hétérologue (cellules immunes de rat x myélome de souris) ce qui explique en partie leur instabilité ultérieure.

C'est pourquoi, nous avons sélectionné, à partir de plusieurs immunocytomes de rat, une souche de myélome présentant une capacité importante de fusion cellulaire, ne sécrétant pas d'immunoglobulines et permettant d'obtenir des hybridomes stables (BAZIN *et al.*, 1980b). Cette souche a été utilisée comme partenaire cellulaire pour des hybridations avec des cellules de rats soit infestés par *S. mansoni* soit immunisés avec différentes préparations antigéniques du parasite.

A partir de ces nombreuses expériences (au moins 50 hybridations), un anticorps monoclonal IgE anti-*S. mansoni* fut obtenu à partir d'animaux immunisés avec une fraction glycoprotéinique de produits d'incubation de vers adulte. Ce type d'immunisation entraîne en effet la production d'anticorps IgE cytotoxiques *in vitro*

pour la larve parasitaire, argument supplémentaire de l'intervention du stade adulte dans l'établissement de l'immunité.

La nature IgE de cet anticorps monoclonal est supportée par les caractéristiques immunochimiques et biochimiques suivantes :

-- réaction d'identité totale avec deux IgE myélomateuses en immunodiffusion contre un sérum anti-IgE ;

-- une chaîne lourde de PM de 92kDa, correspondant à celui de la chaîne des immunoglobulines et identique à celui d'autres IgE monoclonales.

Néanmoins, cette IgE monoclonale ne présente pas d'activité réaginique en test d'anaphylaxie cutanée passive, critère classique de définition de la nature IgE d'une immunoglobuline. Cette absence de fixation n'est pas due à une incapacité de liaison au FcE R du mastocyte puisque nous avons montré que cette IgE prévient la dégranulation mastocytaire par des sérums réaginiques quand elle est ajoutée à ces sérums. Cette activité inhibitrice est annulée si le fragment Fc de cette IgE est détruit (par chauffage à 56°C) et n'est pas observée avec une IgG2c monoclonale comme contrôle.

L'analyse de l'activité cytotoxique *in vitro* de cette IgE a souligné que :

1) Cet anticorps présente une activité schistosomicide importante en présence de macrophages (65% de mortalité), d'éosinophiles (50%) et de plaquettes (70%). Son activité est annulée par chauffage à 56°C et non restaurée par l'addition d'une source de complément frais.

2) La concentration en IgE requise est très faible, de l'ordre de 0,1 à 1µg/ml, dans les mécanismes de cytotoxicité dépendant des macrophages et des plaquettes, niveau compatible avec le taux en anticorps IgE présents dans le sérum de rats immuns à *S. mansoni*. Pour les éosinophiles, une concentration plus importante est nécessaire (2 à 5µg/ml). Ceci peut s'expliquer par la relative incapacité de cette IgE monoclonale à

faire dégranuler les mastocytes; et comme nous l'avons vu précédemment, les produits de dégranulation de ces cellules jouent un rôle primordial dans l'expression de l'activité cytocide des éosinophiles.

3) Dans les tests de cytotoxicité avec macrophages et éosinophiles, l'activité schistosomicide de l'IgE monoclonale ne s'exprime qu'en présence de complément homologue. Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer cette particularité :

-- la génération de facteurs chimiotactiques, après activation du complément par le schistosomule ou par les molécules d'IgE, jouant le rôle de facteurs attractants des cellules vers la cible parasitaire ;

-- une augmentation de l'adhésion cible-cellule, par la liaison de facteurs du complément générés à la surface du parasite à des récepteurs du complément sur la cellule effectrice, comme cela a été démontré dans le cas de la cytotoxicité des éosinophiles humains.

Dans le cas des plaquettes, un contact cible-cellule n'est pas nécessaire et explique que l'IgE monoclonale est efficace seule dans ce système.

L'effet protecteur *in vivo* de cette IgE a été estimé par des expériences de transfert passif à des rats avant leur infestation par *S. mansoni* . Une protection importante (45 à 65%) est obtenue chez ces animaux, comparée à des rats témoins.

L'antigène cible de cette IgE est une molécule de 26kDa présente dans les produits d'incubation du schistosomule (SRP).

L'IgE monoclonale anti-*S. mansoni* que nous avons étudiée présentent des propriétés protectrices contre la schistosomiase. Ces résultats constituent une preuve directe du rôle joué par les anticorps IgE dans l'immunité à *S. mansoni*. Enfin, cette étude confirme que l'antigène de 26kDa est l'un des antigènes cibles majeurs de la réponse IgE protectrice.

IMMUNOLOGIE. — *Production d'anticorps monoclonaux anti Schistosoma mansoni. Étude préliminaire de leurs activités biologiques.* Note (*) de **Claudie Verwaerde, Jean-Marie Grzych, Hervé Bazin, Monique Capron et André Capron**, transmise par Jean-François Bach.

Les anticorps monoclonaux anti *Schistosoma mansoni* ont été produits par hybridation de lymphocytes spléniques de Rats infectés par ce parasite et des cellules P3-X63-Ag8 BALB/c.

L'étude des activités biologiques des surnageants a permis de caractériser la production d'anticorps IgE à forte activité réaginique et d'anticorps qui, soit en présence de complément, soit en coopération avec des éosinophiles, ont témoigné d'une activité cytotoxique marquée pour des schistosomules *in vitro*. Cette méthodologie ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude des fonctions des anticorps antiparasites et l'isolement des antigènes cibles.

Monoclonal antibodies against Schistosoma mansoni have been produced by fusion of splenic lymphocytes from S. mansoni infected Rats and P3-X63-Ag8 BALB/c cells.

In vitro and in vivo studies of the biological activities of these antibodies have led to the identification of IgE antibodies with a high reagenic activity and antibodies which in a complement dependent or eosinophil dependent system were shown to have a marked cytotoxicity for schistosomules in vitro.

This methodology seems to open new perspectives for the study of antibody function in immunity against parasites as well as for the isolation of the corresponding target antigens.

INTRODUCTION. — La relation originelle de Kohler et Milstein ([1], [2]) concernant la possibilité de production d'hybrides cellulaires synthétisant des anticorps monoclonaux a ouvert le champ à de nombreux travaux intéressants de multiples domaines de l'immunologie.

La récente démonstration du rôle joué par certains anticorps d'isotype IgE ou IgG dans les mécanismes immunitaires au cours de la schistosomiase humaine ou animale [3], nous a conduit à étudier la possibilité d'utiliser cette méthodologie pour la production d'anticorps anti-parasitaires d'activité biologique connue.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les techniques de fusion cellulaire utilisées dans le présent travail ont été directement inspirées des études de Howard et coll. [4], MacKearn et coll. [5] et Clevinger et coll. [6].

La fusion est réalisée entre des cellules P3-X63-Ag8 BALB/c et des lymphocytes spléniques de Rats mâles Fisher consanguins infestés depuis 25 à 35 jours, par 1 000 cercaires de *Schistosoma mansoni*.

La caractérisation des classes d'immunoglobulines présentes dans le surnageant de culture de cellules hybrides a été réalisée par des techniques d'immunodiffusion utilisant des antisérums spécifiques anti-immunoglobulines de Rat [7]. L'existence d'une spécificité anticorps antischistosome a été démontrée par technique indirecte d'immunofluorescence effectuée sur coupe de schistosomules. L'activité biologique a été explorée par des techniques de cytotoxicité *in vitro* pour les anticorps de classe IgG et IgM ([8]-[9]) et par la technique d'anaphylaxie cutanée passive (PCA) pour les anticorps de classe IgE [10].

RÉSULTATS. — Au cours de trois expériences successives de fusion cellulaire ayant donné lieu à la production d'environ 250 populations cellulaires (non clonées), 25 ont témoigné d'une activité spécifique antischistosome clairement décelée par les réactions d'immunofluorescence.

L'exploration systématique des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* de ces 25 surnageants a conduit à l'identification dans deux cas d'anticorps de classe IgE, possédant une activité réaginique démontrée par des réactions de PCA d'un titre de l'ordre de 1/256. Ces anticorps ont permis par ailleurs d'induire après addition d'antisérum anti- ϵ de Rat l'activation de macrophages péritonéaux de Rat suivant la technique décrite par Dessaint et coll. [11].

Dans cinq cas, des anticorps possédant une activité cytotoxique dépendante du complément vis-à-vis de schistosomules cultivés *in vitro* ont été identifiés. L'activité létale a varié de 25 à 90 %, ces taux étant superposables à ceux couramment observés dans les sérums de Rats infectés par *S. mansoni* (Tableau I) [9].

TABLEAU I

Activité cytotoxique dépendante du complément vis-à-vis de schistosomules *in vitro*

	Cytotoxicité ^(a) (%)	
	Présence de complément	Sans complément
Surnageants de cellules hybrides ^(b) :		
non chauffés.....	67,8 ± 12,3 ^(d)	13,8 ± 1,7
chauffés (30 mn. 56°C).....	40,6 ± 5,0	22,6 ± 6,6
Surnageants contrôles ^(b)	19,9 ± 5,3	14,9 ± 5,8
Sérum de Rat infecté ^(c)	47,6 ± 11,6	8,2 ± 3,0
Sérum de Rat sain ^(c)	6,0 ± 6,0	9,2 ± 6,4

^(a) Le pourcentage de cytotoxicité est mesuré après 4 jours d'incubation à 37° de schistosomules, de surnageant de culture de cellules et de sérum de Cobaye frais ou inactivé par chauffage (moyenne ± écart-type de la moyenne).

^(b) Les surnageants de culture de cellules (hybrides ou contrôles) sont concentrés deux fois par lyophilisation et incubés à raison de 100 µl de surnageant pour 60 µl de suspension contenant 50 schistosomules et 40 µl de sérum de Cobaye par alvéole.

^(c) Le sérum de Rat est utilisé à raison de 100 µl de sérum de Rat non dilué (soit du sérum de Rat infecté depuis 5 à 6 semaines, soit du sérum de Rat normal).

^(d) Significativement supérieur aux contrôles ($P < 0,05$) et non différent du sérum de Rat infecté (n : sept expériences concernant cinq surnageants de culture).

Dans quatre cas, des anticorps spécifiques de classe IgG2a ont été caractérisés. Leur utilisation dans un système de cytotoxicité *in vitro* dépendant d'éosinophiles a permis d'observer des pourcentages de létalité variant de 30 à 80 %. Un clone cellulaire, obtenu à partir de l'un d'entre eux présente en présence d'éosinophiles une cytotoxicité de l'ordre de 90 %, similaire à l'activité observée dans les sérums de Rats infectés depuis 35 jours (tableau II) [8].

DISCUSSION. — Le présent travail, bien que préliminaire, démontre que l'utilisation de lymphocytes prélevés chez des animaux en cours d'une infection parasitaire permet l'obtention d'anticorps monoclonaux dotés d'une activité biologique vis-à-vis de cibles parasitaires, comparable à celle observée dans les sérums d'animaux infectés.

La nature des lymphocytes immuns utilisés n'est peut être pas étrangère au pourcentage relativement élevé d'hybrides producteurs et à la qualité fonctionnelle des anticorps produits.

Dans l'état actuel de nos expériences, aucune corrélation n'a pu être encore établie entre l'activité biologique des surnageants de culture des populations hybrides et leur concentration en anticorps spécifiques. Il est néanmoins permis de penser, à la lumière des présents résultats que l'obtention de ces anticorps monoclonaux ouvre des perspectives entièrement nouvelles pour l'étude de la fonction des anticorps dans la réponse immune vis-à-vis des parasites ainsi que pour la caractérisation et l'isolement des antigènes cibles.

TABLEAU II

Activité cytotoxique dépendante d'éosinophiles vis-à-vis de schistosomules in vitro

	Cytotoxicité (%)	
	Présence d'éosinophiles	Sans éosinophiles
Surnageants de cellules hybrides ^(b) :		
non chauffés.....	47,2 ± 2,1	3,2 ± 1,9
chauffés (2 H, 56°).....	64,6 ± 13,2 ^(d)	7,4 ± 3,4
Surnageants contrôles ^(b)	16,6 ± 5,3	3,4 ± 1,9
Sérum de Rat infecté ^(c)	65,1 ± 1,9	2,3 ± 1,2
Sérum de Rat sain ^(c)	14,1 ± 5,4	7,8 ± 7,0

^(a) Le pourcentage de cytotoxicité (moyenne ± écart-type de la moyenne) est mesuré après 48 H d'incubation à 37° de schistosomules sensibilisés au préalable par les surnageants ou le sérum de Rat et de cellules péritonéales de Rat normal enrichies en éosinophiles (rapport cellule effectrice/cible = 6 000/1) [8].

^(b) Les surnageants de culture de cellules (hybrides ou contrôles) sont concentrés deux fois par lyophilisation et incubés à raison de 150 µl de surnageant pour 50 µl de suspension contenant 50 schistosomules par alvéole.

^(c) Les cibles sont présensibilisées par du sérum de Rat infecté depuis 4 semaines par *S. mansoni* ou du sérum de Rat sain à raison de 50 µl de sérum dilué au 1/8 pour 50 µl contenant 50 schistosomules.

^(d) Significativement supérieur aux contrôles ($P < 0,05$) et non différent du sérum de Rat infecté (n : quatre expériences concernant trois surnageants de culture).

Les descriptions minutieuses de la technique de fusion et leur aide dans sa maîtrise ont été données par les professeurs F. W. Fitch (Université de Chicago), J. Davie et B. Clevinger (Université de Saint-Louis). La lignée cellulaire P3-X63-Ag8, nous a été donnée par le professeur F. W. Fitch; elle a été développée par G. Kohler et C. Milstein. La réalisation des réactions de PCA sont de M^{me} R. Rousseaux-Prévoist et les réactions d'activation des macrophages péritonéaux du docteur M. Joseph. Aide technique de M^{me} A. M. Schacht.

(*) Remise le 17 septembre 1979 et acceptée le 24 septembre 1979.

[1] G. KOHLER et C. MILSTEIN, *Nature*, 256, 1975, p. 495-497.

[2] G. KOHLER et C. MILSTEIN, *Eur. J. Immunol.*, 6, 1976, p. 511-519.

[3] A. CAPRON, J. P. DESSAINT et M. CAPRON, *Colloques de l'I.N.S.E.R.M.*, dans *Immunity in Parasitic Diseases*, 72, 1977, p. 217-230.

[4] J. C. HOWARD, G. W. BUTCHER, G. GALFRE et C. MILSTEIN dans *Current Topics in Microbiology and Immunology*, F. MELCHERS, M. POTTER et N. L. WARNER, éd., 81, 1977, p. 54-60.

[5] T. J. MCKEARN, M. SARMIENTO, A. WEISS, F. P. STUART et F. W. FITCH dans *Current Topics in Microbiology and Immunology*, F. MELCHERS, M. POTTER et N. L. WARNER, éd., 81, 1977, p. 61-65.

[6] B. CLEVINGER, D. HANSBURG et J. DAVIE, dans *Current Topics in Microbiology and Immunology*, F. MELCHERS, M. POTTER et N. L. WARNER, éd., 81, 1977, p. 110-114.

[7] H. BAZIN, A. BECKERS et P. QUERINJEAN, *Eur. J. Immunol.*, 4, 1974, p. 44-48.

[8] M. CAPRON, A. CAPRON, G. TORPIER, H. BAZIN, D. BOUT et M. JOSEPH, *Eur. J. Immunol.*, 8, 1978, p. 127-133.

[9] A. CAPRON, M. CAPRON, H. DUPAS, D. BOUT et A. PETITPREZ, *Parasitology*, 4, 1974, p. 613-623.

[10] Z. OVARY, *Prog. Allergy*, 5, 1958, p. 459-508.

[11] J. P. DESSAINT, A. CAPRON, M. JOSEPH et H. BAZIN, *Cellular Immunology*, 46, 1979, p. 24-34.

Centre d'Immunologie et de Biologie parasitaire et Service d'Immunologie expérimentale,

Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille;

Unité d'Immunologie expérimentale, Université de Louvain, Bruxelles, Belgique.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF A RAT MONOCLONAL IgE ANTIBODY SPECIFIC FOR *SCHISTOSOMA MANSONI*¹

CLAUDIE VERWAERDE², MICHEL JOSEPH, MONIQUE CAPRON, RAYMOND J. PIERCE, MARTINE DAMONNEVILLE, FLORENCE VELGE, CLAUDE AURIAULT, AND ANDRÉ CAPRON

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, France

A rat monoclonal antibody of IgE isotype (B48-14) raised against *Schistosoma mansoni* has been generated by the fusion of mesenteric lymph node cells from LOU/M rats immunized with a preparation of adult schistosome worms and IR973F nonsecreting rat myeloma cells. Investigation of the in vitro effector functions of this IgE antibody showed a high level of cytotoxicity against *S. mansoni* schistosomula in the presence of eosinophils, macrophages, and platelets. A significant level of protection (40 to 60%) against a challenge infection with *S. mansoni* cercariae was achieved by passive transfer experiment of B48-14 IgE to naive recipient rats. By immunoprecipitation, B48-14 IgE antibodies were shown to react with an antigen of 26 kDa present in excretion-secretion products of schistosomula, previously described as a potential immunogen eliciting a protective IgE response against schistosomiasis.

Helminth infections are characterized by a dramatic increase of IgE in the serum of infected hosts (1, 2). The in vivo functions of IgE during *Schistosoma mansoni* infections are supported by several observations. Protection of naive rats by passive transfer of rat immune serum was significantly decreased by selective depletion of the serum in IgE (3). Neonatal suppression of the IgE response in rats led to a greater susceptibility to *S. mansoni* infection (4). Finally, experimental immunizations with various antigenic preparations, in the conditions of IgE production, conferred a partial protection against a challenge infection by *S. mansoni* (5, 6).

In vitro studies allowed the demonstration that rat anti-*S. mansoni* IgE antibodies killed schistosomula, the larval stage of the parasite, in collaboration with various effector cells (7-9). Macrophages, eosinophils, and platelets, either incubated with immune serum or taken from animals at particular periods after the infection, were cytotoxic for schistosomula. Heat-inactivation or selective IgE depletion of immune serum by immunoabsorption showed that IgE was involved in these antibody-

dependent mechanisms (ADCC).³ These effector mechanisms, initially found in the rat model, were also subsequently reported in man (9-11).

Besides the several lines of evidence for the in vivo relevance of such IgE antibodies in immunity against schistosomiasis, studies were carried out to determine the antigens eliciting this IgE response. Investigations first focused on adult worm allergens revealed a wide diversity in the allergenic components which were mainly glycoproteins (12-15). More recent studies performed on soluble antigens released by *S. mansoni* schistosomula (SRP, schistosomula-released products) allowed the characterization of two antigens of 22 and 26 kilodaltons (kDa) inducing a strong IgE antibody response (16). These IgE antibodies were cytotoxic in vitro in the presence of the effector cells, and experiments with both passive and active immunization led to a significant protection of rats against a challenge infection (6).

In support of the role of IgE in immunity against schistosomiasis, this paper reports the production of an anti-*S. mansoni* monoclonal IgE antibody, obtained by hybridoma technology (17), cytotoxic in vitro for schistosomula and conferring a significant level of protection against a challenge infection by passive transfer. The target antigens of this IgE monoclonal antibody were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Parasites, antigenic preparations, and sera. A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters, as described (18). The antigenic material used for immunization was a glycoprotein-enriched fraction of adult worms (19). Briefly, 100 mg of *S. mansoni* incubation products (obtained by a 16-hr incubation of adult worms in H₂O) subsequently dialyzed against acetate buffer (CH₃COONa 0.1 M, NaCl 1 M, CaCl₂ 10⁻³ M) were loaded onto a column of concanavalin A-Sepharose equilibrated in the same buffer. After extensive washing, bound material was eluted with 10⁻² M methyl- α -mannopyranoside. The eluate was then dialyzed against distilled water and concentrated (PM10; Amicon, Danvers, MA). The protein content of this fraction was tested by the Lowry method (20), and allergenic function was shown by the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) (21). SRP were prepared as described (16) and concentrated by membrane filtration (PM10) before labeling. Infected rat serum (IRS) was collected from animals exposed percutaneously to 1000 cercariae of *S. mansoni* (22).

Immunization of animals. Male LOU/M rats (200 to 250 g) were immunized by an initial i.p. injection of 10 μ g of the *S. mansoni* antigenic preparation together with 10¹⁰ *Bordetella pertussis* organisms (Perthyrdral; Institut Pasteur Production, France), followed

Received for publication December 4, 1986.

Accepted for publication March 6, 1987.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the WHO-UNDP Programme for Research and Training in Tropical Diseases, CNRS 624 and INSERM 167.

² Address correspondence to: C. Verwaerde, C.I.B.P., Institut Pasteur, 1, rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex, France.

³ Abbreviations used in this paper: PCA, passive cutaneous anaphylaxis; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; medium A, DMEM supplemented with 15% (v/v) FCS; RAST, radioallergosorbent test; NRS, normal rat serum; IRS, infected rat serum; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; kDa, kilodalton; SRP, schistosomula-released products.

1 to 2 mo later by the injection of 5 μ g of antigen alone i.p. Two to three days later, mesenteric lymph nodes were removed for cell fusion.

Construction of hybridoma. The cell line used for hybridization was IR983F, a nonsecreting myeloma cell line derived from a LOU/C rat immunocytoma (23). Cell fusion was performed according to the method of Galfre et al. (24), slightly modified by the use of a mixture of polyethylene glycol (PEG) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (70% PEG 1500, 12.8% DMSO, in phosphate-buffered saline (PBS)) as the fusogenic agent (25).

Screening of IgE hybridoma clones. IgE-secreting cellular clones were identified by radioimmunoassay (RIA), performed by using microplates coated with 100 μ l of anti-rat IgE serum (1/200; Miles Laboratories, Elkhart, IN) and saturated with 1% bovine serum albumin. Culture supernatant (100 μ l/well) was added, and the plates were incubated 1 hr at room temperature and overnight at 4°C. After washing, the presence of IgE in the culture supernatants was revealed by the addition of 100 μ l of 125 I-labeled anti-rat IgE immunoglobulins (80,000 cpm/well). The IgE nature of the antibody was confirmed by immunodiffusion analysis with two rat myeloma IgE (IR 162 and IR 965) (kindly provided by Prof. H. Bazin, University of Louvain, Belgium) as reference immunoglobulins. The isotype specificity was verified by the Ouchterlony test with specific antisera to IgA, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgM immunoglobulins (26). IgE-positive clones were then tested for their antibody activity by radioallergosorbent test (RAST), using *S. mansoni* adult worm antigens coated on diazobenzoxymethyl activated paper (27) as described (15) and by PCA. Selected hybrid cells were cloned by limiting dilution in 96-well microtiter plates (Linbro, New Haven, CT), with normal BALB/c mouse peritoneal adherent cells used as a feeder layer. Subcloning was carried on until 100% of clones were positive in the screening test.

Passage of hybridoma on animals. Approximately 10^6 hybrid or myeloma cells were injected subcutaneously into LOU/M rats. After 2 to 3 wk, the rats were bled (to obtain tumor-bearing rat serum), and the solid tumor was removed and reinjected, after homogenization, into the peritoneal cavity of LOU/M rats. Ascitic fluid was removed 8 to 15 days later. The IgE concentration in ascitic fluids and in sera from tumor-bearing rats was measured by the method of Carson et al. (28).

Inhibition of PCA reaction. PCA inhibition experiments were performed according to a slightly modified procedure of the method of Lehrer et al. (29). Briefly, 100 μ l of reaginic antisera (anti-DNP serum or IRS day 48) at the appropriate dilution were incubated with 100 μ l of sera from tumor-bearing animals (monoclonal IgE concentration adjusted to 100 μ g/ml with normal rat serum [NRS], or anti-*S. mansoni* monoclonal IgG2c at the same concentration as control) at 25°C for 30 min. Test samples (100 μ l) were injected intradermally into a shaved area of the back of male Fischer rats. After 48 hr, animals were challenged with an i.v. injection of 1 ml of 4% Evans blue containing 2 mg of antigens (*S. mansoni* incubation products or DNP-ovalbumin). After 30 min, animals were killed and their skins were removed. The titer was defined as the highest dilution giving a blue zone of 5 mm in diameter.

In vitro labeling of monoclonal antibody. Hybrid cells (10^5) were cultured in 5 ml of medium A³ in the presence of 7 μ Cl of L-[14 C] leucine (sp. act. 2.1 MBq/mM atom). After 24 hr incubation, culture supernatants were harvested and adjusted to 40% (NH₄)₂SO₄. Ammonium sulfate was then added to the supernatant to give 60% saturation. Material precipitating at this concentration was collected by centrifugation, resuspended in PBS, and dialyzed exhaustively against the same buffer. Biosynthetically labeled hybridoma products were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method of Laemmli (30).

For autoradiography, the dried gel was placed in contact with Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Co. Rochester, NY) between Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, France) at -70°C.

Identification of immunoreactive proteins. A 100- μ l sample of concentrated SRP solution (equivalent to 3 to 4 ml initial SRP fraction of approximately 20 μ g protein) was labeled by the chloramine-T method (31). A 125 I-SRP sample was incubated with 10 μ l of serum or ascitic fluid, and immune complexes were absorbed on protein A-Sepharose beads (32). Immune complexes eluted from protein A-Sepharose were electrophoresed in 13% acrylamide gels according to the procedure of Laemmli (30), and gels were analyzed by autoradiography.

IgE-dependent macrophage cytotoxicity. The cytotoxicity assay was performed according to Capron et al. (7). Briefly, rat peritoneal adherent cells were incubated with 150 μ l of diluted ascitic fluids plus NRS (10% final) or serum samples (6-wk IRS or NRS; dilution 1/5) for 6 hr. Then 50 *S. mansoni* schistosomula were added in 50 μ l, and mortality was measured 24 to 48 hr later by microscopic

examination.

IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. The experimental procedure was previously described by Capron et al. (8). Briefly, 50 samples of the schistosomula suspension were incubated with 50 μ l of diluted ascitic fluids plus NRS (6% final) or serum sample (8-wk IRS or NRS; starting dilution 1/8) and 100 μ l of nonadherent peritoneal cell suspension (50 to 70% eosinophils) (6000 effector cells: 1 target). After 24 to 48 hr, the percentage of cytotoxicity was measured by microscopic examination.

IgE-dependent platelet cytotoxicity. The test was performed according to Joseph et al. (9). Rat platelets (150×10^6) were incubated in flat-bottom microplates in 100 μ l MEM supplemented with 20 μ l of diluted ascitic fluids plus NRS (10% final) or control sera (6-wk IRS or NRS) to be tested and 75 schistosomula in 80 μ l MEM. After 24 hr at 37°C in 5% CO₂, schistosomula were observed by light microscopy.

Passive transfer experiments. Tumor-bearing rat serum (0.5 ml) was injected i.p. into LOU/M rats (3 mo, 180 to 200 g), which were infected 1 hr later with 800 *S. mansoni* cercariae. The parasite burden was evaluated 3 wk later by liver perfusion. Control rats were injected with serum (0.5 ml per rat) of IR 983 myeloma-bearing rats or nonrelevant IgE hybridoma-bearing rats (adjusted at the same IgE concentration with NRS). The percentage of protection was calculated by the formula

$$(A - B)/A \times 100$$

where A = the number of worms recovered from rats injected with physiological saline, and B = the number of worms recovered from rats injected with tumor-bearing rat serum (B48-14 clone or control).

RESULTS

Effector function of polyclonal IgE antibodies directed against adult worm antigens. Sera of rats immunized with an adult worm preparation (see *Materials and Methods*) were tested for their cytotoxic activities against schistosomula in the ADCC mechanism involving macrophages as effector cells. As illustrated in Figure 1 a significant killing of parasites (75%) was obtained in these conditions. No mortality was observed after heating of immune sera at 56°C for 3 hr. Addition of NRS did not

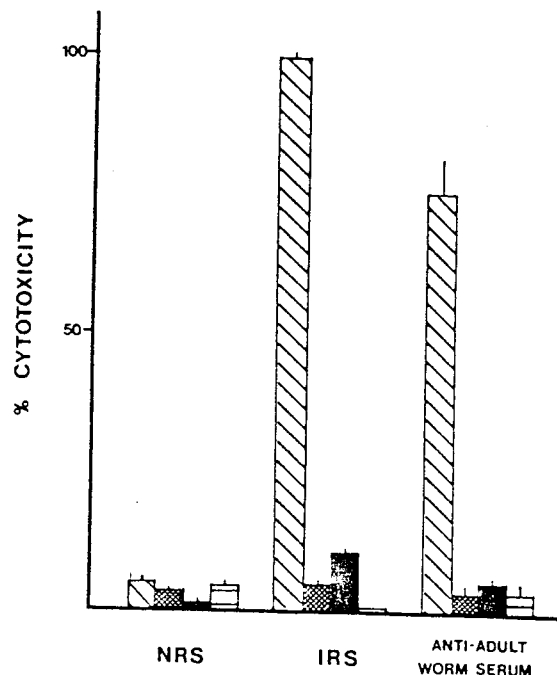


Figure 1. Anti-schistosomulum activity of serum of rats immunized with adult worm antigens. NRS, 8-wk IRS, or anti-adult worm serum (final dilution, 1/10) were added to schistosomula in the presence of macrophages (native serum, □; heated serum, ▨) or in the absence of cells (native serum, ▤; heated serum, ▥). Mean of the cytotoxicity of five individual rat sera (\pm SE).

restore the cytotoxicity. This adult worm material, easy to prepare, seemed therefore to represent a good candidate for obtaining IgE antibodies with biological activities. Immune cells of rats immunized with this antigenic preparation in conditions of IgE production were thus used for cell fusion.

Production of monoclonal IgE antibodies. Among 400 hybrid cell populations obtained from four cell experiments, 14 demonstrated IgE production detectable by RIA. Only one of these IgE, named B48-14, possessed an antibody activity in RAST.

The IgE nature of an antibody is usually defined by its ability to induce degranulation of mast cells in the presence of the corresponding antigen. B48-14 antibodies failed to induce a positive reaction in PCA. Nevertheless, they bound to the mast cell membrane as demonstrated by PCA inhibition experiments (Table I, results of a representative experiment). When added to anti-DNP antiserum or to *S. mansoni* IRS, B48-14 IgE inhibited completely or to a great extent the PCA reactions of these antisera. IgG2c monoclonal antibodies, used as control at the same concentration, did not affect the reactions. Heating of the monoclonal IgE completely abolished its capacity for PCA inhibition.

Immunochemical analysis of B48-14 IgE. Immunodiffusion analysis against anti-IgE antiserum revealed a reaction of total identity of monoclonal B48-14 IgE with two rat myeloma IgE (Fig. 2A). No arc of precipitation

was observed with antisera directed against the other immunoglobulin classes (data not shown).

The result of SDS-PAGE analysis of biosynthetically ^{14}C -labeled IgE is shown in Fig. 2B. The apparent m.w. calculated from a standard curve of protein markers were about 92 kDa (± 2.5) and 27 kDa (± 0.25) for heavy and light chains, respectively.

Schistosomula antigen defined by B48-14 IgE. The schistosomulum target antigen of B48-14 was characterized by immunoprecipitation with ^{125}I -labeled SRP. Ascitic fluid of IR983F myeloma or unrelated IgE hybridoma was used as control. Immunoreactive proteins were then analyzed by SDS-PAGE and revealed by autoradiography. As illustrated by Figure 3, a molecule of 26 kDa was recognized specifically by anti-*S. mansoni* monoclonal IgE.

In vitro activity of monoclonal IgE antibodies. IgE monoclonal antibodies were tested for their anti-schistosomulum activity in ADCC mechanism involving macrophages, eosinophils, or platelets as effector cells. As shown in Figure 4, a significant killing of larvae was obtained in the three assays (up to 50%). The minimum final concentration of IgE antibodies to reach the maximal effect was 0.1 to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ADCC involving macrophages or platelets and 2 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ADCC involving eosinophils (Fig. 5). In the three assays, the lethal activity of B48-14 antibodies was abolished by heating the ascitic fluid at 56°C for 4 hr. No mortality was achieved by an unrelated monoclonal IgE used at the same concentration. As shown in Table II, a heat-labile factor present in NRS was required for the expression of the cytotoxicity in the ADCC involving macrophages and eosinophils, but

TABLE I
PCA inhibition reactions of reaginic antisera by B48-14 IgE monoclonal antibodies

Pretincubation of Sera with	Serum Titer	
	Anti-DNP serum ^a	<i>S. mansoni</i> -IRS ^b
None	32	1024
B48-14 IgE	0	8
Monoclonal IgG2c	32	1024
Heated B48-14 IgE ^c	32	ND ^d

^a Serum from rats immunized with 5 μg of DNP-ovalbumin with 10^{10} *B. pertussis* organisms.

^b Eight-week infected LOU/M rat serum.

^c Heating 4 hr at 56°C.

^d Not done.

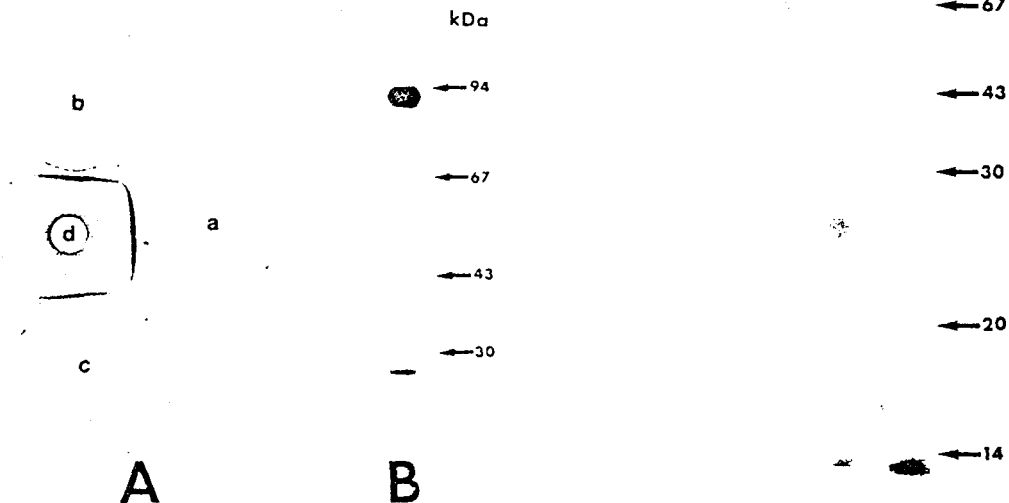


Figure 2. Chemical analysis of B48-14 IgE. A. Immunodiffusion analysis. 200 μl of B48-14 culture supernatant (a) or myeloma IgE solutions (IR 975 [b] and IR 162 [c]) were tested against 20 μl of anti-rat IgE antiserum (d). B. SDS-PAGE analysis of ^{14}C -labeled B48-14 IgE. Reduced radioactive material was electrophoresed on 13% acrylamide gel.

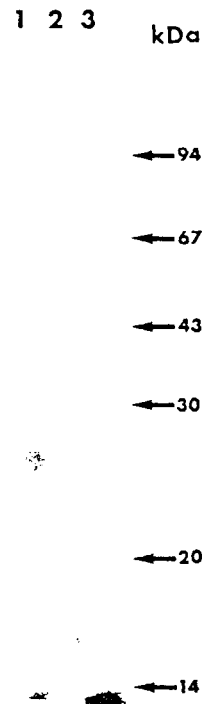


Figure 3. Identification of schistosomulum antigen reacting with B48-14 IgE. ^{125}I -labeled SRP were incubated with 10 μl of B48-14 IgE (1), unrelated monoclonal IgE (2), or IR 983 F (3) ascitic fluids. Immune complexes were absorbed on protein A-Sepharose and were then analyzed by SDS-PAGE.



4444

MONOCLONAL ANTI-*S. mansoni* IgE ANTIBODIES

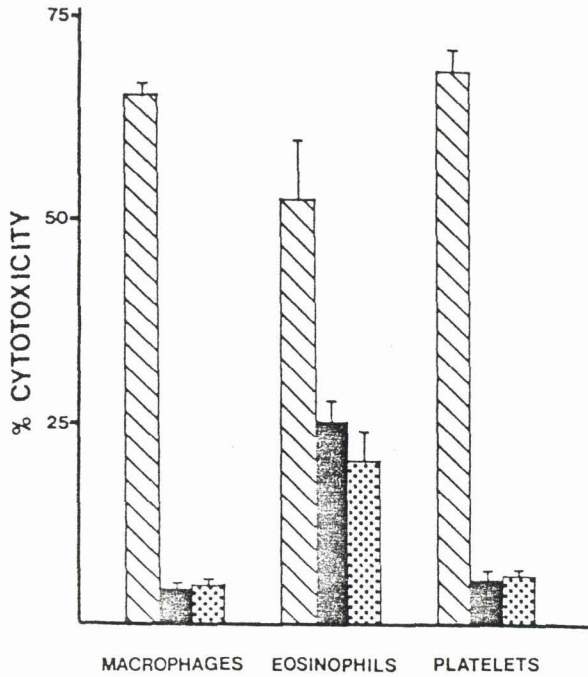


Figure 4. Killing of *S. mansoni* schistosomula by B48-14 IgE in the presence of various effector cells. Schistosomula were incubated with effector cells and with native (□) or heated (4 hr at 56°C) (■) B48-14 IgE or with unrelated monoclonal IgE (▨). The final IgE concentration used in the tests ranged between 0.1 and 1 µg/ml for ADCC involving macrophages or platelets and 2 to 5 µg/ml for ADCC involving eosinophils. The percentage of cytotoxicity were expressed after deduction of values obtained without effector cells (<10% in all cases). Mean of 11, four, and six experiments ± SE for ADCC involving respectively macrophages, eosinophils, and platelets.

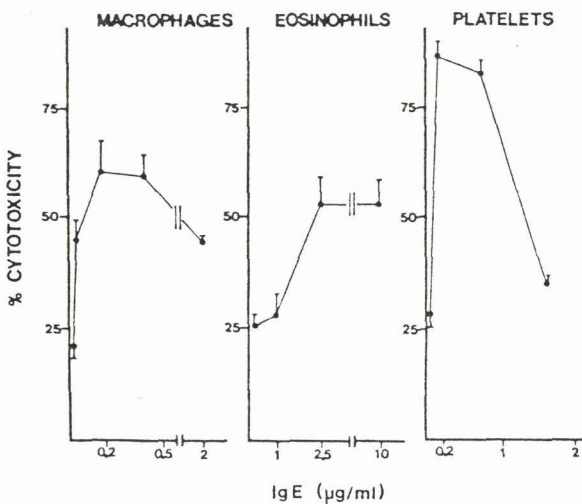


Figure 5. Dose-dependence cytotoxicity of B48-14 IgE in ADCC involving various effector cells. Anti-*S. mansoni* monoclonal IgE at various final concentrations was tested in ADCC involving macrophages, eosinophils and platelets as described in *Materials and Methods*.

not in the killing mediated by platelets. Moreover, the use of guinea pig or human serum instead of rat serum in the ADCC involving macrophages did not allow the recovery of the cytotoxic capacity of B48-14 IgE.

In vivo activity of B48-14 IgE. To investigate the protective role of monoclonal IgE antibodies, passive transfer experiments were performed. B48-14 hybridoma-bearing rat sera were injected i.p. 1 hr before infection of rats

TABLE II
Influence of heat-labile factor in ADCC mechanisms with B48-14 monoclonal IgE

Source	Addition of Serum ^a Heating (30 min, 56°C)	% Cytotoxicity ^b		
		Macrophages	Eosinophils	Platelets
Rat	-	64.4 ± 1.6 ^c	53.5 ± 2.0 ^d	65.5 ± 1.0 ^e
Rat	+	8.5 ± 2.4	16.1 ± 7.4	58.5 ± 11.8
Guinea pig	-	9.3 ± 5.8	ND ^f	ND
Human	-	13.0 ± 2.8	ND	ND

^a Final concentration: 10% for ADCC mediated by macrophages and platelets or 6% for ADCC mediated by eosinophils.

^b Percentage of cytotoxicity expressed after deduction of values obtained without effector cells.

^c Significantly higher than with heated rat serum or guinea pig and human sera ($p < 0.01$).

^d Significantly higher than with heated rat serum ($p < 0.05$).

^e Not significantly different than with heated rat serum.

^f Not done.

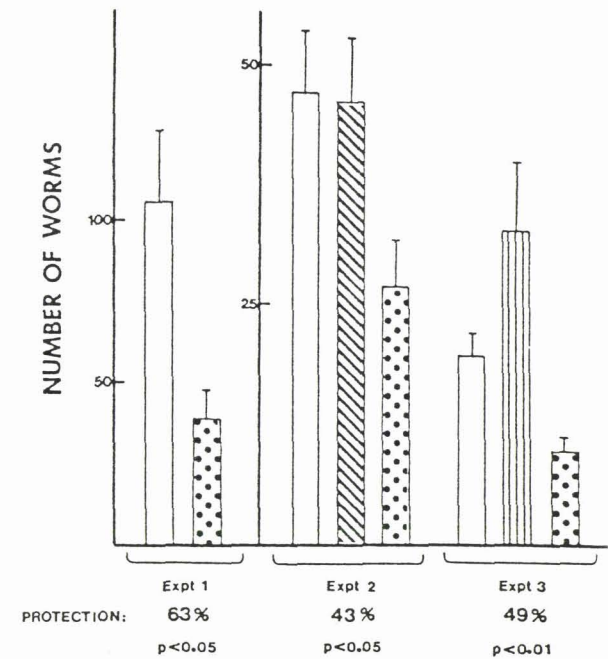


Figure 6. Passive transfer of B48-14 antibodies. Sera (0.5 ml) of rat bearing B48-14 hybridoma (▨), IR 983 F myeloma (□), or unrelated IgE hybridoma (□) were injected i.p. into LOU rats infected 1 hr later with 800 cercariae (groups of five rats were used for each test). Parasite burdens were evaluated 3 wk later by liver perfusion. The number of worms in rats injected with B48-14 IgE was compared with the parasite burden of rats injected with 0.5 ml of physiological saline (□).

with *S. mansoni* cercariae. IR983F myeloma-bearing rat sera or unrelated IgE hybridoma-bearing rat sera (adjusted at the same IgE concentration) were used as controls. The parasite burden was evaluated 3 wk later by liver perfusion. Results are shown in Figure 6. The level of protection conferred by injection of B48-14 IgE range between 43 and 64%.

DISCUSSION

The results presented in this manuscript provide direct demonstration of the participation of IgE antibodies in the immunity of rats against schistosomiasis by the use of a monoclonal anti-*S. mansoni* IgE antibody (B48-14). This IgE was obtained by hybridoma technology from cells of rats immunized with an adult worm glycoprotein-enriched preparation in conditions of IgE produc-

tion. This immunization protocol led to the production of IgE antibodies cytotoxic in vitro for the larval stage of the parasite, the target of ADCC effector mechanisms. This monoclonal antibody is of the IgE class as defined by i) its reaction of total identity with two myeloma IgE in immunodiffusion analysis; ii) the m.w. of its heavy chain (92 kDa), comparable to the value reported for other monoclonal IgE (33, 34); and iii) its binding to the FcE receptor present on the mast cell membrane as shown by experiments of PCA inhibition. However, B48-14 IgE did not induce a positive PCA reaction in the presence of the corresponding antigen. In the PCA reaction, the degranulation of mast cells is induced by bridging of cell bound IgE by multivalent antigen (35). If the epitope recognized by B48-14 IgE is present as a single copy on the antigen, it could be supposed that bridging via the allergen could not occur.

In the presence of macrophages, eosinophils, or platelets, B48-14 IgE mediated a high level of in vitro cytotoxicity against schistosomula (50 to 65%), close to that observed with polyclonal IgE antibodies present in IRS (7-9). No mortality was observed with an unrelated monoclonal rat IgE produced in the same conditions. The concentration of B48-14 antibodies required in the killing mediated by macrophages or platelets (0.1 to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was compatible with the IgE level in *S. mansoni* IRS (36). The higher amount of antibody necessary in eosinophil-dependent ADCC (2 to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) could be explained by the relative inefficiency of B48-14 IgE to induce the degranulation of mast cells. Indeed, it was demonstrated that mast cell degranulation products played an essential role for the expression of in vitro IgE-dependent cytotoxicity of eosinophils against schistosomula (8). In the ADCC assays in which macrophages or eosinophils were used as effector cells, a heat-labile factor present in NRS, probably complement, was required for the killing of larvae by B48-14 IgE. This dependence was species restricted, since it was not observed with other sources of complement (guinea pig or human). Further experiments will be necessary to elucidate precisely the interaction of B48-14 IgE and complement. Chemotactic factors, resulting from complement activation by schistosomula (37) or IgE molecules (38), could be necessary to attract macrophages and eosinophils. Besides, experiments performed with polyclonal IgE antibodies have suggested the participation of complement receptor type 3 (CR3) in ADCC involving eosinophils (39). In platelet-dependent cytotoxicity, complement might be unnecessary, since the adherence of platelets to the larvae is not required for killing (40). Moreover, platelets do not express CR3 (41) and anti-CR3 antibodies have no effect on platelet-mediated IgE-dependent cytotoxicity.⁴

Passive transfer of B48-14 IgE in rats challenged with *S. mansoni* cercariae resulted in a marked decrease of the parasite burden (45 to 64% of protection). This result confirms the previous work showing the role of IgE antibodies in the protection conferred on naive rats by transfer of rat immune serum and is the first report on an in vivo protection achieved with monoclonal IgE antibodies. Few anti-parasite monoclonal IgE have been described

⁴ Capron, M., M. D. Kazatchkine, E. Fischer, M. Joseph, A. E. Butterworth, J.-P. Kusnierz, L. Prin, J.-P. Papin, and A. Capron. Functional role of the α chain of complement receptor type 3 (CR3) in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against parasites. Submitted for publication.

as yet in the literature. In 1979, we reported the production of two rat anti-*S. mansoni* monoclonal IgE, obtained by heterologous (mouse/rat) hybridization, but their instability did not allow a complete characterization of their biological properties (42). More recently, Horowitz et al. (43) described the production of mouse anti-*S. mansoni* monoclonal IgE. Although cytotoxic in vitro for schistosomula with macrophages, this IgE failed to protect mice against experimental schistosomiasis (44).

The target antigen of the B48-14 IgE is a molecule of 26 kDa present among the products released by schistosomula in vitro (SRP). These results must be related to previous work performed on SRP where we described an allergen recognized by polyclonal IgE in IRS and having the same m.w. (16). Moreover, the immunization of rats with SRP led to the production of IgE antibodies preferentially directed against two molecules of 22 and 26 kDa. These IgE antibodies exhibited a high cytotoxic cell-dependent activity in vitro against schistosomula, and partly supported the protection conferred to normal rats against experimental schistosomiasis by the passive transfer of anti-SRP antiserum (6).

In conclusion, results presented in this paper provide a strong argument for the in vivo role of the ADCC described in vitro involving IgE antibodies. The description in human schistosomiasis of killing mechanisms analogous to those described in the rat enhances the interest of these observations. Finally, the monoclonal IgE described here represents an interesting probe to approach the different functional properties of IgE antibodies in immunity against schistosomes. As demonstrated recently by Kigoni et al. (4), the skin reaction at the site of a cercarial challenge was significantly decreased in IgE-suppressed rats. In view of the low half-life of monoclonal IgE (12 hr) (45) and the timing of injection of B48-14 IgE in passive transfer experiments (1 hr before infestation), our results also indicated a role for IgE antibodies in the early immunity of rats against an *S. mansoni* infection. The injection of monoclonal anti-*S. mansoni* IgE at various times before or after infection could thus allow the analysis of the time course of action of IgE antibodies in the development of immunity.

Acknowledgments. We thank Prof. H. Bazin (Louvain University, Brussels, Belgium) and Dr. J. M. Grzych for helpful discussions. We are indebted to Ms. A. M. Schacht, Mr. P. Fressancourt, Mr. H. Vorng, and Mr. J.-P. Papin for their expert technical assistance. We also thank Ms. C. Colson and M. F. Massard for help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Hogarth-Scott, R. S., S. G. O. Johansson, and H. Bennich. 1969. Antibodies to Toxocara in the sera of visceral *Larva migrans* patients: the significance of raised levels of IgE. *Clin. Exp. Immunol.* 5:619.
- Jarrett, E., and H. Bazin. 1974. Elevation of total serum IgE in rat following helminth parasite infection. *Nature* 251:613.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, and J. Pesteil. 1980. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:849.
- Kigoni, E. P., P. P. X. Elsas, H. L. Lenzi, and A. J. Dessein. 1986. IgE antibody and resistance to infection. II. Effect of IgE suppression on the early and late skin reaction and resistance of rats to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.* 16:589.
- Horowitz, S., M. Smolarsky, and R. Arnon. 1982. Protection against *Schistosoma mansoni* achieved by immunization with sonicated parasite. *Eur. J. Immunol.* 12:327.

6. Damonville, M., C. Auriault, C. Verwaerde, A. Delanoye, R. Pierce, and A. Capron. 1986. Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A): role of IgE antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 65:244.
7. Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, and H. Bazin. 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* 253:274.
8. Capron, M., H. Bazin, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:1764.
9. Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810.
10. Joseph, M., A. Capron, A. E. Butterworth, R. F. Sturrock, and V. Houba. 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro*: Induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 33:48.
11. Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A. E. Butterworth, R. J. Pierce, M. A. Ouassii, and A. Capron. 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.
12. Harris, W. G. 1973. The allergens of *Schistosoma mansoni*. Initial separation and comparative assay. *Immunology* 24:567.
13. Harris, W. G. 1975. The allergens of *Schistosoma mansoni*. II. Further separation by Sephadex G200 and ion-exchange chromatography. *Immunology* 29:835.
14. Bout, D., J. P. Dessaint, H. Dupas, L. Yarzabal, and A. Capron. 1979. Characterization of allergens of *Schistosoma mansoni*. *Fasciola hepatica* and *Echinococcus granulosus*. *Ann. Immunol. (Paris)* 128C:687.
15. Pierce, R. J., C. Verwaerde, M. Damonville, T. Lepresle, and A. Capron. 1983. Allergens of *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of the IgE response in human and experimental infections towards characterized allergens from adult worm products. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 72:219.
16. Auriault, C., M. Damonville, C. Verwaerde, R. J. Pierce, M. Joseph, M. Capron, and A. Capron. 1984. Rat IgE directed against schistosoma-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14:132.
17. Köhler, C., and G. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
18. Capron, A., M. Capron, H. Dupas, D. Bout, and A. Petitprez. 1974. Etude *in vivo* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de *S. mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 4:613.
19. Chellali, A., J. Fruit, M. Vindimian, O. Tabet-Derraz, and A. Capron. 1982. Total and specific IgE in urinary schistosomiasis (*S. haematobium*). *Mol. Biochem. Parasitol.* (suppl.) *Fifth International Congress of Parasitology, Toronto (Canada)*, 7-14 August 1982, p. 100.
20. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
21. Ovary, Z. 1964. Passive cutaneous anaphylaxis. In *Immunological Methods*. J. F. Ackroyd, ed. Blackwell, Oxford, p. 259.
22. Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. Naturally acquired resistance to experimental infection to *S. mansoni* in the rhesus monkeys (*Maccaca mulatta*). *Parasitology* 55:695.
23. Bazin, H., J. M. Grzych, C. Verwaerde, and A. Capron. 1980. A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. *Ann. Immunol.* 131D:359.
24. Galfre, G., S. C. Howe, C. Milstein, G. W. Butcher, and J. C. Howard. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266:550.
25. Grzych, J. M., M. Capron, H. Bazin, and A. Capron. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J. Immunol.* 129:2739.
26. Bazin, H., A. Beckers, and P. Guerinjean. 1974. Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins. *Eur. J. Immunol.* 4:44.
27. Alwine, J. C., D. J. Kemp, and G. R. Stark. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5350.
28. Carson, D., H. Metzger, and H. Bazin. 1975. A simple radio-immunoassay for the measurement of human and rat IgE levels by ammonium sulfate precipitation. *J. Immunol.* 115:561.
29. Lehrer, S. B., M. L. McCants, P. N. Farris, and H. Bazin. 1981. Passive cutaneous anaphylaxis inhibition: evidence for heterogeneity in IgE mast cell interaction. *Immunology* 44:711.
30. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
31. Greenwood, F. C., W. Hunter, and J. S. Bolver. 1963. The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemical J.* 89:114.
32. Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
33. Eshhar, Z., M. Ofarim, and T. Waks. 1980. Generation of hybridomas secreting murine reaginic antibodies of anti-DNP specificity. *J. Immunol.* 124:775.
34. Liu, F.-T., J. W. Bohn, E. L. Ferry, H. Yamamoto, C. Molinaro, L. A. Sherman, N. R. Klinman, and D. H. Katz. 1980. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody preparation, isolation and characterization. *J. Immunol.* 124:2728.
35. Ishizaka, T., K. Ishizaka, D. H. Conrad, and A. Froese. 1978. A new concept of triggering mechanism of IgE-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 61:320.
36. Rousseaux-Prevost, R., H. Bazin, and A. Capron. 1977. IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunology* 33:501.
37. Santoro, F., P. J. Lachman, A. Capron, and M. Capron. 1979. Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula: killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. *J. Immunol.* 123:1551.
38. Medgyesi, G. A., G. Fust, J. Gergely, and H. Bazin. 1978. Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochemistry* 15:125.
39. Capron, M., M. D. Kazatchkine, E. Fischer, A. E. Butterworth, T. Jouault, J. P. Kusnierz, and A. Capron. 1986. Role of membrane receptors in eosinophil effector function. *Sixth International Congress of Immunology, Toronto (Canada)*, 6-11 July 1986. Publication, Sales and Distribution National Research Council Canada, Ottawa, Canada, p. 654.
40. Joseph, M., C. Auriault, M. Capron, J. C. Ameisen, V. Pancré, G. Torpier, J. P. Kusnierz, G. Ovlaque, and A. Capron. 1985. IgE-dependent platelet cytotoxicity against helminths. *Adv. Exp. Med. Biol.* 184:23.
41. Fearon, D. T. 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leucocyte and monocyte. *J. Exp. Med.* 152:20.
42. Verwaerde, C., J. M. Grzych, H. Bazin, and A. Capron. 1978. Production d'anticorps monoclonaux anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. *C. R. Acad. Sci.* 289:725.
43. Horowitz, S., R. Tarrab-Hazdai, Z. Eshhar, and R. Arnon. 1983. Anti-schistosome monoclonal antibodies of different isotypes: correlation with cytotoxicity. *EMBO J.* 2:193.
44. Horowitz, S., V. Brenner, and R. Arnon. 1985. *In vivo* protection against *Schistosoma mansoni* infection by monoclonal antibodies. *Immunol. Lett.* 9:69.
45. Bazin, H., A. Beckers, M. Morianne, B. Platteau, J. Naze-Demetz, and J. P. Kints. 1974. LOU/C/Wsi rat monoclonal immunoglobulins. *FEBS Lett.* 86:117.



ARTICLE 6

Rôle des sérine protéases du schistosomule de *Schistosoma mansoni* dans la régulation de la synthèse des IgE

Nous avons montré précédemment que l'injection de SRP à des rats induisait la production d'une réponse IgE cytotoxique importante et ceci sans l'addition d'un adjuvant. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce matériel parasitaire renfermait une ou plusieurs molécules régulant de façon positive la synthèse d'IgE.

Cet effet modulateur du SRP sur la réponse IgE a été exploré :

- 1) *in vitro* par des expériences de synthèse d'IgE à partir de cellules de ganglions mésentériques de rats immunisés avec du DNP-OA (Dinitrophényl-Ovalbumine) et des cellules du sang périphérique de patients filariens.
- 2) *in vivo* sur une réponse anticorps anti-DNP de rats immunisés avec du DNP-OA en réponse I^{aire} ou II^{aire}.

La présence dans le SRP d'une substance augmentant la synthèse d'IgE a été démontrée :

- *in vitro*, par une augmentation de la synthèse d'IgE par des cellules immunes humaines ou de rat, essentiellement par la fraction non-dialysable du SRP.
- *in vivo* et en réponse IgE II^{aire}, par une réponse anti-DNP plus élevée chez les rats immunisés avec du DNP-OA en présence de SRP comparée aux témoins (rats immunisés avec du DNP-OA seul).

L'effet de ce facteur stimulant se rapproche plus d'un effet potentiateur d'une réponse IgE préexistante que d'un effet adjuvant. Si ce SRP est administré avec le DNP-OA lors d'une immunization I^{aire}, la réponse IgE spécifique n'est pas augmentée mais au contraire très nettement supprimée. Par contre, on assiste à une

élévation importante, comparée au témoin, du niveau des IgE sériques. De plus, nous montrons que dans certains cas l'injection de SRP seul à des rats pré-immunisés avec du DNP-OA (à une période où la réponse IgE anti-DNP n'est plus détectable) entraîne chez ces animaux une réponse IgE anti-DNP de type II^{aire}.

L'action de ce facteur modulateur sur la synthèse d'IgE passe par **activité enzymatique de type sérine protéase**.

En effet, l'inactivation (par des inhibiteurs ou des substrats spécifiques) ou l'élimination (par un ligand spécifique) des sérine protéases du SRP se traduit :

-- *in vitro*, par une disparition totale de son effet potentiateur sur la synthèse d'IgE par les cellules humaines ou de rat, en culture ;

-- *in vivo*, par une très forte inhibition (60%) de l'augmentation de la réponse IgE II^{aire} induite par le SRP.

Nous avons, d'autre part, montré dans ce travail que **l'intervention des sérine protéases** dans la régulation de la synthèse des immunoglobulines **ne se limite pas à l'isotype IgE**. A l'inverse des IgE, l'addition de SRP diminue le taux de base de la synthèse d'IgM par des cellules en culture de rat immun. Par contre, une augmentation importante des IgM est obtenue si les sérine protéases du SRP sont inactivées, comparée au témoin.

Les facteurs d'excrétion-sécrétion du schistosomule de *S. mansoni* contiennent une (ou plusieurs) molécule modulant de façon positive la synthèse d'IgE aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, reproduisant les effets observés avec le vers vivant. Cette molécule régulatrice agit par une activité enzymatique de type sérine protéase.

Role of Serine Proteases of *Schistosoma mansoni* in the Regulation of IgE Synthesis

C. VERWAERDE, C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE,
J.L. NEYRINCK, C. VENDEVILLE & A. CAPRON

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167, CNRS 624,
Institut Pasteur, Lille, France

Verwaerde, C., Auriault, C., Damonville, M., Neyrinck, J.L., Vendeville, C. & Capron, A. Role of Serine Proteases of *Schistosoma mansoni* in the Regulation of IgE Synthesis. *Scand. J. Immunol.* 24, 509-516, 1986

The regulation of the IgE response by schistosomula-released products (SRP) was studied either in vitro with rat and human cell cultures or in vivo by injection into rats of SRP with an unrelated allergen at primary or secondary immunization. The results obtained in vitro showed that non-dialysable factors present in SRP potentiate the IgE synthesis by rat and human cells. This enhancing effect was supported by molecules with serine protease activities. On the other hand, the inhibition or depletion of SRP in serine proteases induced a weak synthesis of IgM by rat cells in vitro. The injection of SRP into rats on day 0 with an unrelated allergen led to a potentiation of total IgE production, but an inhibition of specific IgE response. In contrast, a marked elevation of specific IgE response was obtained when SRP was injected upon secondary immunization. Serine proteases of SRP were partly responsible for this potentiative effect.

C. Verwaerde, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France

The production of IgE during various infections or after immunization with allergens is subject to a strict regulatory mechanism that limits the production of this isotype in the organism. Helminth infections are an exception, being characterized not only by a specific IgE antibody response but also by a dramatic elevation of the non-specific IgE level [10, 20]. The most commonly used parasite in studies of the IgE stimulating effect of helminths has been the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. Infection by this parasite leads to a specific secondary IgE response in rats after a primary immunization by an unrelated antigen [14, 17]. This potentiative effect is probably due to products from both larval and adult parasites [15]. In most cases, this potentiation was provoked by living worms. Only two studies show a similar effect in vivo with a preparation derived from parasites. Stromberg demonstrated that the administration of a purified antigen of *Ascaris suum* at the same time as or shortly after a second immunization of guinea pigs with ovalbumin (OA) led to an increased anti-OA IgE production [21]. In

1980, Rousseaux *et al.* reported a slight potentiation of the IgE response to OA of rats treated with soluble metabolic products from *Schistosoma mansoni* adult worms, on day 14 after immunization [19]. Nevertheless, the mechanism whereby these parasite materials enhanced the IgE production remained unknown.

The study of the induction of the IgE response during *S. mansoni* infection was approached recently by the use of schistosomula-released products (SRP) [2]. The injection of SRP into rats or monkeys induced a marked production of specific IgE antibodies, cytotoxic for schistosomula in vitro in the presence of various effector cells [1]. Immunochemical analysis revealed that the rat anti-SRP IgE were directed against two schistosomula antigens with molecular weights (MW) of 22,000 and 26,000 [2]. This humoral response induced by SRP was obtained without addition of adjuvant, suggesting the presence of parasite factor(s) regulating the IgE response among the molecules shed by the young larval stage of schistosomes. The induc-

510 C. Verwaerde *et al.*

tion of the IgE response by SRP could provide useful information on the mechanism of IgE regulation during schistosomiasis. It can be speculated that concomitant release of target antigens together with factors modulating the IgE response by the larvae initiates protective immunity soon after infection. The present experiments were undertaken to study the effect *in vitro* and *in vivo* of SRP on IgE production by rat and human cells.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of dinitrophenyl conjugates and SRP. DNP-OA (2,4-dinitrophenylated ovalbumin) and DNP-BSA (2,4-dinitrophenylated bovine serum albumin) were prepared according to Eisen *et al.* [8].

SRP was obtained as previously described [2]. Briefly, schistosomula (Puerto-Rican strain of *Schistosoma mansoni*) were recovered *in vitro* from cercariae by a mechanical procedure [18]. The larvae were incubated and washed for 3 h at 37°C in Hank's balanced salt solution (HBSS). The parasites (20,000/ml HBSS) were incubated for 16 h at 37°C. After checking the absence of bacterial contamination and viability of the schistosomula, the parasite-free supernatant was recovered by centrifugation at 150 g for 2 min, and is referred to as schistosomula-released products (SRP).

Treatment of SRP. Dialysed SRP was prepared by dialysis of 1 ml SRP against HBSS (11) overnight. Treatment with protease inhibitors was performed by incubation of SRP at room temperature with 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride, Eastman Kodak Co., Rochester, USA) for 1 h. At the end of the incubation, the solution was extensively dialysed against HBSS. The passage of SRP on para-aminobenzamide agarose (PAB-agarose) (Pierce, Rockford, USA) was performed by incubation of 1 ml SRP with one bed volume of PAB-agarose (previously washed in HBSS) at 4°C overnight. The effluent was recovered by centrifugation at 150 g for 2 min and is referred to as PAB-SRP.

Immunization of animals. Brown-Norway rats (CSEAL, CNRS, Orléans, France) weighing 150–180 g were used in the study. The effect of SRP on the IgE response of rats immunized with DNP-OA was measured at a primary or a secondary immunization. For the primary response, the rats were injected intraperitoneally (i.p.) with 10 µg of DNP-OA adsorbed on 10 mg Al(OH)₃ in 1 ml HBSS or in 1 ml of native or treated SRP. For the secondary response, the rats were first injected i.p. with 10 µg of DNP-OA with 10 mg Al(OH)₃ in 1 ml HBSS, and then boosted i.p. 30–45 days later with 1 µg of DNP-OA in 1 ml HBSS or 1 ml native or treated SRP. Sera were collected at various times after the immunizations to measure the total and specific anti-DNP IgE responses.

Rat cell cultures. Mesenteric lymph node cells from DNP-OA immunized rats (day 9 after immunization)

were resuspended in Click's medium [7] supplemented with 10% normal rat serum, 5×10^{-2} M 2-mercaptoethanol. Cells (4×10^6 in 2 ml) were dispensed in each well of 24-well culture plate (Nunc, Roskilde, Denmark) and DNP-OA was added at a final concentration of 2 µg/ml. After addition of the various samples to be tested, the plates were incubated in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂ for 5 days. As controls, one set of cultures either had cycloheximide (100 µg/ml) added or were treated prior to initial culture with HCl (0.05 N, 1 min) and NaOH (0.05 N, 1 min). At the end of the incubation, the cell culture supernatants were recovered and tested for their immunoglobulin contents: Each experiment was carried out at least in duplicate.

Human cell cultures. The donors were patients infected by the parasites described elsewhere in the text. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were prepared from heparinized blood by Ficoll-Hypaque differential sedimentation and cultured in RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10% fetal calf serum in 24-well culture plates. Each well contained 1×10^6 cells in a total volume of 1 ml. After an 8-day incubation, cell culture supernatants were recovered and tested for their IgE content.

Measurement of anti-DNP IgE antibodies. Anti-DNP IgE antibodies were assayed by a radioallergosorbent test (RAST) [24]. Polystyrene beads (Seroa, Monaco, France) were coated with DNP-BSA (100 beads in 25 ml of carbonate buffer (Na₂CO₃, 15 mM-NaHCO₃, 35 mM, pH 9.6) containing 10 mg DNP-BSA) for 3 h at room temperature and saturated for 2 h with PBS (phosphate-buffered saline)—0.3% BSA. Beads were stocked until use at 4°C in PBS-0.1% BSA-0.01% NaN₃. For the test, beads were incubated with 250 µl of rat serum diluted in PBS-0.3% PEG (polyethylene glycol 6000, Serva, Heidelberg, FRG) overnight at room temperature with gentle shaking. After three washes with 0.1% Tween 20 in saline, ¹²⁵I-labelled anti-rat IgE (ε-chain specific, MIAB, Uppsala, Sweden) was added in 250 µl (corresponding to 14 ng of antibodies per tube). After overnight incubation at room temperature, the beads were thoroughly washed and the radioactivity was counted in a gamma spectrophotometer (Clinigamma 1272, LKB Wallace, Sweden). Results are expressed as B/T were B=bound radioactivity and T=total radioactivity).

Measurement of immunoglobulins produced in vitro. The dosage of rat IgE was carried out by radioimmunoassay (RIA) using a competition method according to Neyrinck *et al.* [16].

Briefly, cell culture supernatant (100 µl) from lymphocyte culture or IgE standard solution (purified monoclonal IgE IR 162, 10 pg to 50 µg/ml) were incubated with 100 µl of anti-IgE antibodies (diluted 1:100,000) (Miles Laboratories, Elkhart, Ind., USA) for 6 h. One hundred microlitres of ¹²⁵I-labelled IgE (purified IgE IR 975) was added for a second 96 h incubation. Anti-sheep gamma globulin (Cambridge Medical Diagnostics, Middlesex, USA) (100 µl, diluted 1:20) was then added for a final 2 h period. The precipitates were collected by centrifugation at 2500 g for 10 min and washed twice with 0.15 M NaCl solution.

The radioactivity was measured in a gamma spectrometer.

Rat IgM and IgG and human IgE were measured by similar competitive radioimmunoassay using ^{125}I -labelled purified immunoglobulins.

RESULTS

Effect of native and dialysed SRP on in vitro rat IgE synthesis

Mesenteric lymph node cells ($3.5\text{--}4 \times 10^6$) from DNP-OA primed rats were cultured for 5 days with $2 \mu\text{g/ml}$ of DNP-OA in 2 ml of Click's medium with or without the addition of various quantities of native or dialysed SRP. As shown in Fig. 1, a significant increase in the IgE level was obtained in supernatants of cells cultured in the presence of dialysed SRP. Native SRP had little or no effect on the production of IgE. The optimal concentration of dialysed SRP necessary to obtain this potentiation was variable with different SRP preparations but was generally

relatively low (1–2% by volume). When the same experiments were performed in the presence of cycloheximide ($100 \mu\text{g/ml}$) or after acid-base treatment at day 0, no IgE increase was observed (data not shown). This implied a *de novo* synthesis and not a release of preformed IgE. Incorporation of ^3H thymidine by the cells at the end of the culture clearly indicated that this IgE synthesis is probably not due to a mitogenic effect of SRP (data not shown).

Potentiation of in vitro rat IgE synthesis by serine proteases present in SRP

The participation of serine proteases in the regulation of IgE synthesis has been indicated during the last few years by the work of Iwata *et al.* [12, 13]. To define the involvement of such enzymes in the regulation of IgE production by SRP factors during rat schistosomiasis, SRP was treated prior to addition to the DNP-

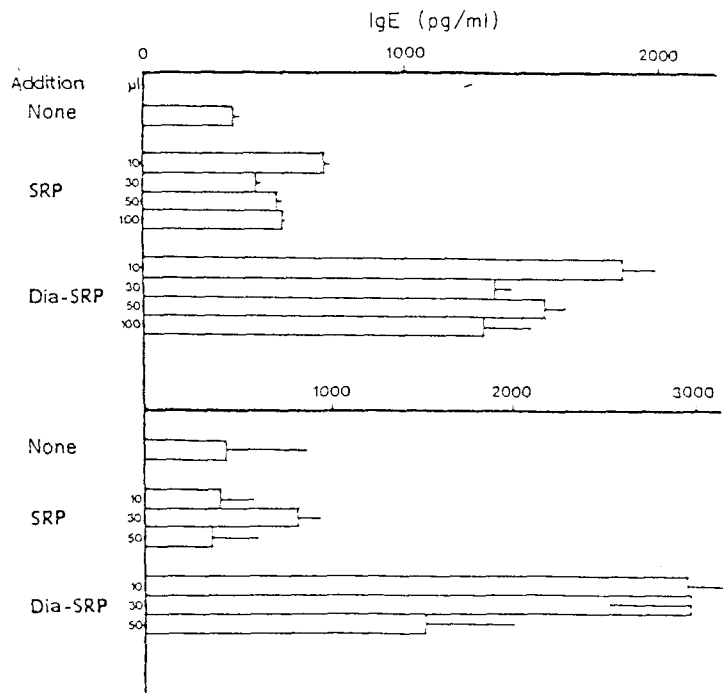


FIG. 1. Potentiation effect of SRP on rat IgE synthesis in vitro. For experimental details, see Materials and Methods. Results of two experiments of culture with or without SRP and dialysed SRP of MLN cells from rats immunized with DNP-OA. After 5 days' culture, supernatants were collected and tested for their IgE content.

512 C. Verwaerde et al.

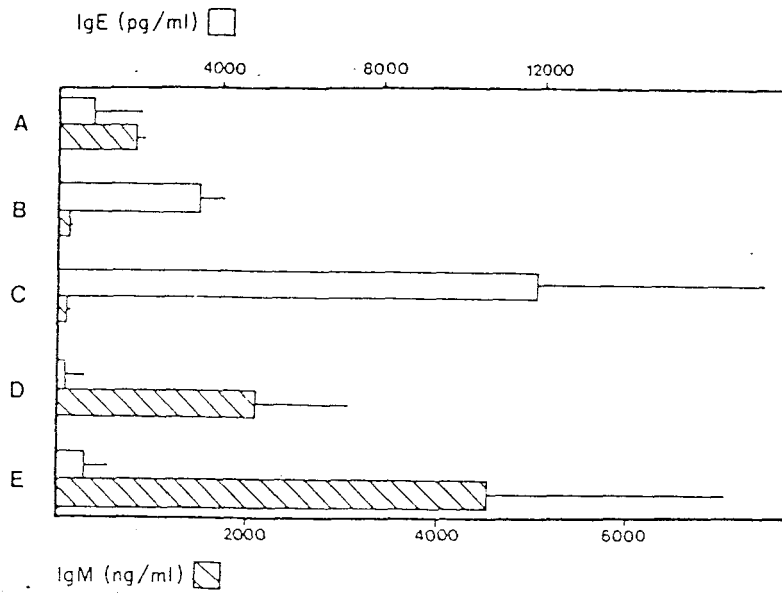


FIG. 2. Role of serine proteases present in SRP on rat immunoglobulin synthesis in vitro. Cultures were performed with DNP-OA primed rat cells in the absence (A) or presence (B) of 10 μ l of SRP, of dialysed SRP (C), of PMSF-treated SRP (D) or of PAB-SRP (E). After 5 days' culture, IgE (pg/ml) (\square) and IgM (ng/ml) (\boxtimes) were measured in the cell culture supernatants.

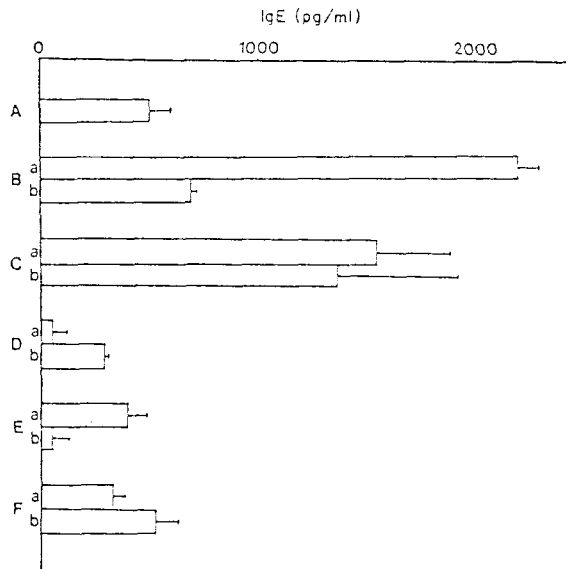


FIG. 3. Increase in in vitro human cell IgE synthesis caused by serine proteases present in SRP. PBL from a filarian patient were cultured without (A) or with 10 μ l (a) or 20 μ l (b) of SRP (B), dialysed SRP (C), PAB-SRP (D), SRP plus BAME (E) or SRP plus L-lysine ethyl ester diHCl (F). After 7 days' culture, supernatants were collected and tested for their IgE content.

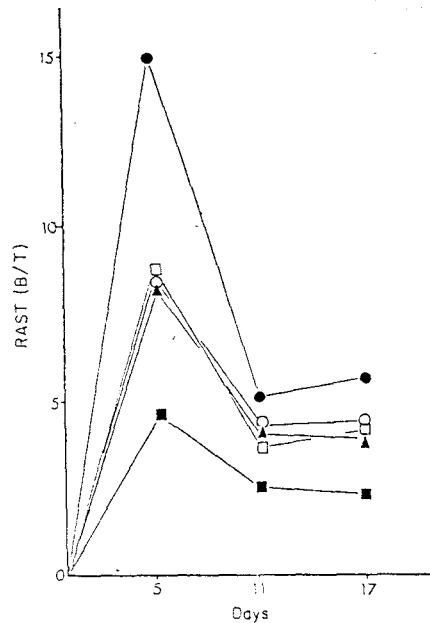


FIG. 4. Kinetics of the production of specific IgE in DNP-primed rats boosted with DNP-OA with or without SRP. DNP-OA primary immunized rats were boosted with 1 μ g of DNP-OA in 1 ml of HBSS (■) or in 1 ml of SRP (▲), dialysed SRP (●) or PMSF-treated SRP (□) or PAB-SRP (○). Sera were collected at various times after the second immunization and tested for their anti-DNP IgE activities by RAST, as described in Materials and Methods.

OA-primed cells. Incubation with phenylmethylsulphonide fluoride (PMSF), an inhibitor of serine proteases, or passage over a column of PAB-agarose which retained serine proteases were used to inactivate or eliminate these enzymes from SRP. As indicated in Fig. 2, such treatments completely abolished the potentiative effect of SRP.

Effect of SRP on *in vitro* synthesis of other Ig isotypes

Concurrently with IgE, the synthesis of IgG and IgM isotypes was measured in the culture supernatants. SRP had no significant effect on IgG synthesis whatever the treatment. However, *in vitro* IgM production was regulated. Indeed, intact or dialysed material had an inhibitory effect on IgM synthesis. But when SRP was depleted in serine proteases, a 2- to 6-fold and a 20- to 50-fold increase of IgM pro-

duction was observed compared to the control or to incubation with intact SRP, respectively (Fig. 2D and E). This suggests that the presence or absence of serine proteases led to the preferential synthesis of different immunoglobulin isotypes.

Potentialiation of human IgE synthesis *in vitro* by SRP

A control of human IgE synthesis *in vitro* by SRP, similar to that obtained with rat cell cultures, was obtained when PBL obtained from a consenting patient (infested with the parasite *Loa loa*) (kindly provided by Dr J. Chandener, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) were cultured with or without SRP. Fig. 3 illustrates the results obtained. The addition of SRP to the human cells led to a marked elevation in IgE synthesis (Fig. 3B and 3C). The IgE potentiative effect of SRP was completely abolished by passage on PAB-agarose (Fig. 3D) or by the addition to the culture of two serine protease substrates: *N* α -benzoyl-L-arginine methylester (BAME) (1 mM) (Fig. 3E) or L-lysine ethyl ester diHCl (1 mM) (Sigma) (Fig. 3F).

In vivo effect of SRP on IgE production

The *in vivo* action of SRP was tested on the production of IgE by rats immunized with DNP-OA during both the primary and the secondary response as described in Materials and Methods. The effect of SRP on IgE production *in vivo* can be summarized as globally positive. This potentiative effect was particularly observed when rats, immunized initially with DNP-OA, were reinjected with the same antigen concomitantly with SRP. As illustrated by Fig. 4, two potentiative effects were observed. Like the situation *in vitro*, the more marked enhancement of IgE production compared to the control was achieved with the non-dialysable fraction of SRP (three-fold increase, $P < 0.01$). However, when dialysed SRP was depleted in serine proteases (by treatment with PMSF or passage on PAB-agarose) a significant potentiative effect was still obtained (two-fold increase compared with the control, $P < 0.05$) similar to that observed with intact SRP.

The injection of native or dialysed SRP on day 0 with DNP-OA led to a dramatic decrease in the



514 C. Verwaerde et al.

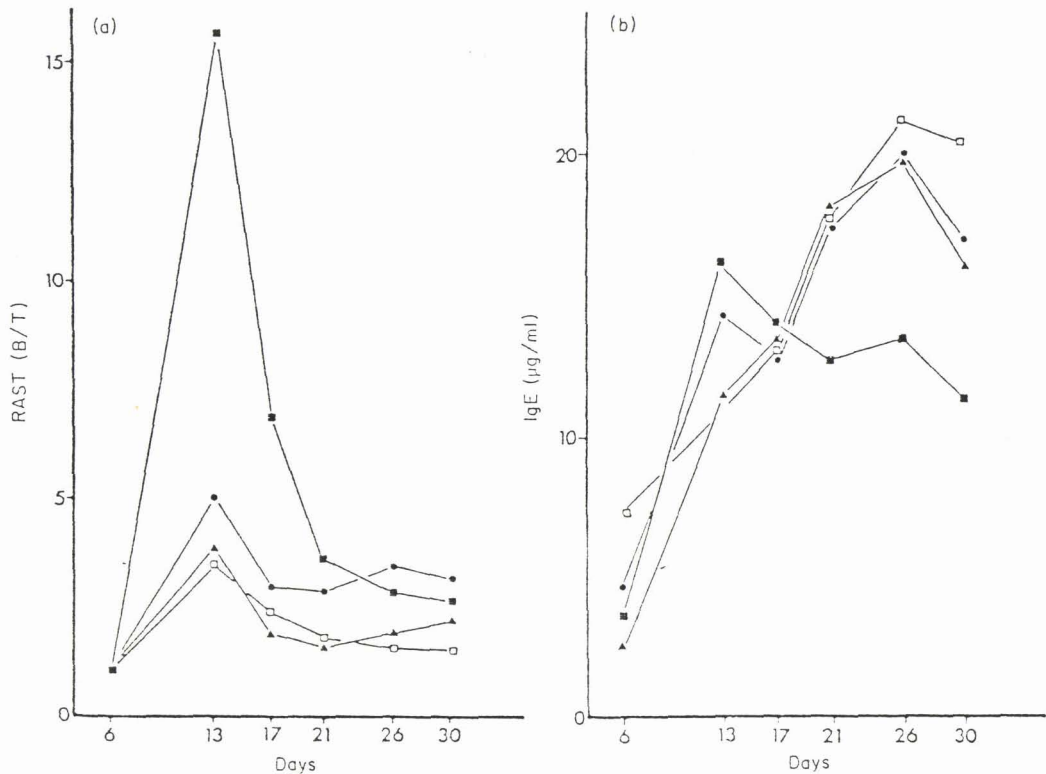


FIG. 5. Influence of SRP on the production of specific and total IgE in rats immunized with DNP-OA. Rats were injected at day 0 with 10 µg of DNP-OA absorbed on Al(OH)₃ alone (■), or with 1 ml of SRP (▲), dialysed SRP (●), or PMSF-treated SRP (□). Sera were collected at various times after immunization and tested for their anti-DNP IgE activities (a) and their total IgE level (b).

level of specific anti-DNP-IgE antibodies compared with the control ($P < 0.01$) (Fig. 5a). Treatment with PMSF did not remove this inhibition, which would tend to exclude the involvement of serine proteases. In contrast, the level of total serum IgE revealed that the injection of SRP, whatever the previous treatment, later potentiated the non-specific IgE compared with the control ($P < 0.05$ at day 26) (Fig. 5b).

DISCUSSION

The data presented in this paper clearly show that schistosomula-released products are the material of choice to approach the regulation of the IgE response during *S. mansoni* infection. This regulatory effect was tested on the production of unrelated IgE in vitro and in vivo.

In vitro, the addition of SRP to mesenteric lymph node cells from DNP-OA immunized rats

or to PBL of patients infected by *Loa loa* led to a selective potentiation of IgE synthesis. This result was essentially obtained with non-dialysable molecules of SRP. The use of specific inhibitors or substrates strongly suggested that this enhancing effect was supported by serine proteases. Previous studies have shown the presence of major serine protease activity exclusively expressed at the larval stage of the parasite and present in the SRP fraction [4, 5]. This specific larval localization indicates that the potentiative factor present in the adult worm of *S. mansoni* [19] is probably different from the active molecules described here. A particular role attributed to these enzymes was the cleavage of immunoglobulins bound to the schistosomula surface receptor, a mechanism of escape from the host immune response developed by the parasite [3]. Another interesting feature was the balance observed between IgE and IgM synthesis in rat cell cultures.

Whereas the inactivation or elimination of serine proteases abolished the enhancing action of SRP on IgE synthesis, they led to a marked elevation in IgM production. The IgG level was unchanged whatever the preparation used. Therefore, enhancing properties of complete SRP on immunoglobulin synthesis *in vitro* seemed to concern the IgE isotype exclusively. The selective action of serine proteases present in SRP on IgE production could be explained either by a switch of B μ cells to B ϵ cells or by a selective stimulating effect on the B ϵ lymphocytes and a blocking activity on the B μ cells. The question remained whether the simultaneous potentiation of IgE synthesis and inhibition of IgM production resulted from the same action of serine proteases or of their cleavage products.

Experiments performed with SRP *in vivo* also underlined and confirmed the potentiative properties of SRP on the IgE response. This effect was particularly observed when SRP was administered together with DNP-OA in a secondary immunization. Non-dialysable factors present in SRP seemed to provoke the more pronounced increase of specific anti-DNP IgE antibodies. The inactivation of serine proteases diminished this enhancing effect confirming the role of these enzymes in the regulation of IgE production, but this inhibition was only partial. A significant increase of specific IgE remained, possibly suggesting the intervention *in vivo* of active molecules other than serine proteases. In contrast, the concomitant injection of SRP with DNP-OA in a primary immunization led to a pronounced decrease in specific IgE production. This inhibition was independent on serine proteases. No such observations have been described until now, and further experiments are needed to explore the mechanism behind this phenomenon. Nevertheless, the total serum IgE level was increased some time after the animals had been injected with SRP together with DNP-OA antigen. Moreover, in some cases, a single injection of SRP was able to boost a specific anti-DNP IgE response in rats primed with DNP-OA (data not shown). The influence of SRP could thus be summarized as a negative control of the induction of specific IgE synthesis and a positive regulation of previous IgE responses. This was in part in agreement with the previous findings of Jarrett *et al.*, who showed that parasitic infection did not cause *de novo* synthesis reagins to unrelated antigens but

was only capable of potentiating an already existing reagin response [14].

Studies are in progress to define the target cells of IgE-enhancing factors present in SRP. Previous authors have shown that serine proteases such as trypsin could substitute for helper T cells in the control of *in vitro* antibody synthesis [6, 9]. A direct action on T cells could also be considered. Indeed, Suemura & Ishizaka have demonstrated a specific enhancement of the IgE response by T lymphocytes from *N. brasiliensis* infected rats [22]. Moreover, the work of Ishizaka's laboratory has pointed out that GEF (glycosylation enhancing factor), a T-cell product with a serine protease activity, led T lymphocytes to produce the IgE potentiating factor (reviewed in 11). The production of this factor is under the control of two antagonist T-cell products: GEF, which facilitates its synthesis, and GIF (glycosylation-inhibiting factor), which promotes the production of IgE suppressive factor. SRP could act by replacing native factors of cellular origin potentiating IgE production.

In a previous work, we have shown that schistosomes, as early as the larval stage, were able to induce a specific humoral response and particularly a production of protective IgE by the release of antigens [1, 23]. The data presented in this paper show that schistosome liberate molecules which regulated the synthesis of particular immunoglobulin isotypes and which in particular control the level of specific and unrelated IgE.

Whether the adjuvant molecules regulating the production of anti-SRP IgE are identical to the factors potentiating the unrelated IgE response is now under investigation as well as the possible relationship between antigens and these factors.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr J. Y. Cesbron for his aid in obtaining human material and Dr R. J. Pierce for his help with preparation of the manuscript. We also wish to thank Claudine Colson for secretarial assistance. This work was supported by the WHO-UNDP Programme for Research and Training in Tropical Diseases, CNRS 624 and INSERM 167.

REFERENCES

- 1 Auriault, C., Damonville, M., Joseph, M., Capron, M., Verwaerde, C., Billaut, P. & Capron, A. 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, 1986.
- 2 Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R.J., Joseph, M., Capron, M. & Capron, A. Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro. *Eur. J. Immunol.* 14, 132, 1984.
- 3 Auriault, C., Ouaisi, M.A., Torpier, G., Heisen, H. & Capron, A. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptors of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 3, 33, 1981.
- 4 Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J.P. & Capron, A. Interactions between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of B-glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62, 15, 1981.
- 5 Auriault, C., Pierce, R., Cesari, I.M. & Capron, A. Neutral protease activities at different development stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 377, 1982.
- 6 Chi, D.S. & McDaniel, M.C. Enhancement of in vitro antibody responses in human serum proteins cleaved by trypsin. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 81, 1985.
- 7 Click, R.E., Benck, L. & Alter, B.J. Immune responses in vitro. I. Culture conditions for antibody synthesis. *Cell. Immunol.* 3, 264, 1972.
- 8 Eisen, H.N., Belman, S. & Carlsen, M.E. The reaction of 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid with free aminogroups of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4583, 1953.
- 9 Gisler, R.H., Vischer, T.L. & Dukor, P. Trypsin increases in vitro antibody synthesis and substitutes for helper T cells. *J. Immunol.* 116, 1354, 1976.
- 10 Hogarth-Scott, R.S., Johansson, S.G.O. & Bennich, H. Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral larva migrans patients: the significance of raised levels of IgE. *Clin. Exp. Immunol.* 5, 619, 1969.
- 11 Ishizaka, K., Huff, T.F., Jardieu, P., Moore, K.W. & Maertens, C.L. IgE-binding factors. Selective regulation of the IgE response by T cell factors. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 77, 13, 1985.
- 12 Iwata, M., Huff, T.F. & Ishizaka, K. Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. V. The role of glycosylation-enhancing factor and glycosylation-inhibiting factor in determining the nature of IgE-binding factors. *J. Immunol.* 132, 1286, 1984.
- 13 Iwata, M., Munoz, J.J. & Ishizaka, K. Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. IV. Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikrein-like enzyme. *J. Immunol.* 131, 1954, 1983.
- 14 Jarrett, E.E.E. & Stewart, D.C. Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. Simultaneous potentiation of separate reagins. *Immunology* 23, 749, 1972.
- 15 Jarrett, E.E.E. & Stewart, D.C. Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by *Nippostrongylus brasiliensis* infection: effect of modification of life cycle of the parasite in the host. *Clin. Exp. Immunol.* 15, 79, 1973.
- 16 Neyrinck, J.L., Dessaint, J.P., Auriault, C. & Capron, A. Measurement of picogram quantities of rat IgE from in vitro culture supernatants of B lymphocytes in experimental helminth infections. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 80, 342, 1986.
- 17 Orr, T.S.C. & Blair, A.M.J.N. Potentiated reagin response to egg-albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. *Life Sci.* 8, part II, 1073, 1969.
- 18 Ramalho-Pinto, G., Gazzinelli, G., Howells, R.E., Mota-Santos, T.A., Figuerio, E.A. & Pellegrino, J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula in vitro. *Exp. Parasitol.* 36, 360, 1974.
- 19 Rousseaux-Prévost, R., Dessaint, J.P. & Capron, A. Potentiated reagin response to ovalbumin in *Schistosoma mansoni* infected rats and in rats treated with a soluble metabolic product from adult worms. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 67, 187, 1982.
- 20 Sadun, E.H. Homocytotropic antibody response to parasitic infections. Pp. 97-129 in Soulsby, E.J.L. (ed.) *Immunity to Animal Parasites*. Academic Press, New York, 1972.
- 21 Stromberg, B.E. Potentiation of the reaginic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. *J. Immunol.* 125, 833, 1980.
- 22 Suemura, M. & Ishizaka, K. Potentiation of IgE response in vitro by T cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* 123, 918, 1979.
- 23 Verwaerde, C., Auriault, C., Damonville, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. & Capron, A. IgG response of rats and human to the release products of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 90, 509, 1985.
- 24 Wide, L., Bennich, H. & Johansson, S.G.O. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* ii, 1105, 1965.

Received 10 April 1986

ARTICLE 7

Propriétés des sérine protéases du schistosomule de *S. mansoni* impliquées dans la régulation de la synthèse d'IgE.

Dans cet article, nous avons précisé les caractéristiques moléculaires et enzymatiques de la substance potentiatrice de la réponse IgE présente dans le SRP et abordé les évènements cellulaires qu'elle entraîne.

L'analyse des propriétés enzymatiques du facteur étudié révèle :

- 1) une sensibilité aux inhibiteurs généraux des sérine protéases : soit artificiels comme le DFP (Diisopropyl fluorophosphate) et le PMSF (Paraméthyl sulfonic acid), soit naturel comme l' α -1 P (α -1 proteinase inhibitor).
- 2) une spécificité enzymatique apparamment assez étroite, mais se rapprochant plus d'une activité de type trypsine que α -chymotrypsine.

La caractérisation moléculaire de ces sérine protéases a été réalisée par un marquage utilisant l'inhibiteur DFP marqué au tritium. Deux molécules sont révélées ainsi dans le SRP : une majeure de PM 27,5kDa et une mineure de PM 29kDa. Ces deux enzymes sont présentes également à la surface du schistosomule et de la cercaire et dans une préparation totale de schistosomules.

Etant donné l'importance du récepteur pour les IgE (FcE R) dans la régulation de la synthèse de cette immunoglobuline, nous avons testé l'**effet du SRP sur l'expression du FcE R *in vitro*** par des cellules de rat en culture. Cette analyse a été réalisée par la technique de fixation d'IgE marquée à l'¹²⁵I. Les résultats obtenus sont les suivants :

- 1) Les cellules cultivées en présence de SRP expriment un nombre de FcE R significativement plus grand que les cellules témoin.
- 2) L'augmentation de l'expression du FcE R est induite sous l'action des sérine protéases du SRP, le prétraitement au DFP annulant l'apparition de ces récepteurs à la surface des cellules.

Les sérine protéases sont présentes dans le SRP sous forme de 2 molécules : une majeure de 27,5kDa et une mineure de 29kDa. Une distribution identique de ces enzymes est observée à la surface du schistosomule et de la cercaire et dans un homogénat de schistosomule. Leur intervention dans la régulation de la synthèse d'IgE pourrait résulter de l'augmentation du nombre de FcE R.

**PROPERTIES OF SERINE PROTEASES
OF *S. MANSONI* SCHISTOSOMULA INVOLVED
IN THE REGULATION OF IgE SYNTHESIS**

C. VERWAERDE, C. AURIAULT, J.L. NEYRINCK & A. CAPRON

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624

Institut Pasteur, LILLE (France)

Running title : *S. mansoni* enzymes involved in IgE regulation

ABSTRACT

The regulation *in vitro* and *in vivo* by schistosomula-released products (SRP) of the IgE synthesis has been shown to be dependent on the presence of serine proteases. The present paper concerns the characterization of the enzymes involved. The labelling of SRP with ^3H -DFP revealed two molecules, one major of 27.5 kDa and one minor of 29 kDa. The same pattern was obtained by labelling of schistosomula or cercariae surface as well as of the total schistosomulum homogenate. The properties of these enzymes were studied using various specific substrates or inhibitors of serine proteases. A relatively strict specificity was put in, but with some similarity with trypsin. When added onto lymphoid rat cells in culture, SRP induced an increased expression of receptors for the Fc fragment of IgE (Fc ϵ RII). This suggests that the IgE enhancing property of SRP was due to serine protease activities which could act by enhancing the lymphocyte Fc ϵ RII.

Address correspondence to :

C. VERWAERDE, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019 LILLE Cédex, France.

INTRODUCTION

During *Schistosoma mansoni* infection, parasite proteases seem to play a major role not only during the phase of skin penetration, but also in the host-parasite relationship. In 1981, Auriault *et al.* (4) reported the cleavage of IgG bound onto the membrane of *S. mansoni* larvae (schistosomula) by proteolytic enzymes secreted by the parasite. A single tripeptide TKP (Thr-Lys-Pro), resulting of this cleavage, was described as inhibiting various macrophage functions ranging from the inhibition of IgE-dependent cytotoxicity to the reduction of granuloma formation (3, 12). Moreover, proteases present in schistosomula-released products (SRP) were shown to enhance eosinophil activity, particularly their antibody-dependent cytotoxicity against schistosomula and the expression of Fc γ receptors (1). Recently, we demonstrated the involvement of schistosomulum enzymes in the increase of IgE production observed during *S. mansoni* infection (24). Indeed, serine proteases present in SRP exert a potentiating effect onto the *in vitro* IgE synthesis by rat and human cells and onto the *in vivo* IgE response of rats against an unrelated allergen. The enhancing properties of SRP on immunoglobulin synthesis *in vitro* seemed to concern the IgE isotype exclusively, the production of IgG and IgM being respectively unaffected and reduced.

The present study was undertaken to define the enzymatic and biochemical characteristics of the schistosomulum molecules regulating the IgE synthesis. Moreover, the role of the schistosomulum serine proteases in the expression of Fc ϵ RII onto the lymphocyte membrane was also investigated.

MATERIAL and METHODS

Parasite life-cycle and preparation of parasite material. A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was used throughout the study (6). Schistosomula were obtained from cercariae by a mechanical procedure (21). Schistosomula-released products (SRP) and schistosomulum homogenate (SH) were prepared as previously described (2). Briefly 3h-old schistosomula were incubated for 16 h at 37°C in Hank's balanced salt solution (HBSS) (20 000 parasites/ml). The parasite-free supernatant was recovered by centrifugation and referred as SRP. For schistosomulum homogenate preparation, schistosomula were sonicated at 4°C at 25 W using a Braun sonic 123 homogenisator (Quigly, Rochester, NY) and centrifuged for 30 min at 40 000 g. After centrifugation, the supernatant was used as SH.

Rat cell cultures. Cultures were performed as described in a previous paper (24). Briefly, mesenteric lymph node cells from DNP-OA (2,4-dinitrophenylated ovalbumin) immunized rats (day 9 after immunization) were cultured in 24-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) (4×10^6 cells/well) in Click's medium (7) supplemented with 10 % normal rat serum, 5×10^{-3} M 2-mercaptoethanol, 2 µg/ml DNP-OA and the various samples to be tested. Dialysed SRP was prepared by dialysis of 1 ml of SRP against HBSS. Treatments by protease inhibitors were performed by incubation of SRP with inhibitors (1 mM final) for 30 min. At the end of the incubation, the solutions were extensively dialysed against HBSS. Enzyme substrates were added in the culture medium at a final concentration of 1 mM. After 5 days culture, the cell culture supernatants were recovered and tested for their IgE content (20). Each experiment was carried out at least in triplicate.

Enzyme assays. Schistosomulum homogenate (10 to 50 µg in 200 µl) was incubated with 1.5ml of azocoll substrate (Sigma, St Louis, Missouri) (final concentration : 2 % in 0.1M phosphate buffer, pH7.2), at 37°C for 2-10h under

agitation. The hydrolysis of azocoll was measured directly at 540nm. Kallikrein-like activity was tested according to Morita *et al.* (19) using fluorogenic substrates of plasma kallikrein (Z-Phe-Arg-MCA) or pancreatic and urinary kallikrein (Pro-Phe-Arg-MCA).

³H-DFP labelling. 200 µl of 50-fold concentrated SRP in HBSS (approximately 50 µg of protein) or 100 µg of SH in Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8, were labelled with 1.85 MBq of [1,3-³H] DFP (Di-isopropyl phosphofluoridate) 148 GBq/mM (Amersham, England) for 2 h at 37°C. Free radioactivity was removed by extensive dialysis against HBSS.

For surface labelling of cercariae or schistosomula, parasites (10 000 in 1 ml of HBSS) were incubated for 2 h at 37°C with 1.85 MBq of [1,3-³H] DFP. After several washes, surface material was isolated according to Dissous *et al.* (9).

SDS-PAGE. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of labelled material was carried out on slab gel according to the method of Laemmli *et al.* (16) using LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden). Gels were composed of a 5 % acrylamide stacking gel and a homogenous 13 % acrylamide separating gel. A mixture of molecular weight marker proteins (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) was run in parallel. After migration and staining, gels were incubated for 30 min in an amplify solution (Amersham, Buckinghamshire, England), and dried onto Whatman N°1 paper in a Pharmacia gel slab drier GSD-4. Autoradiography was performed by contact of dried gels with Kodak X-Omat XAR-5 film (Eastman Kodak Co, Rochester, N.Y.) between Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, France) at -70°C.

Binding of radiolabelled IgE. Monomeric myeloma protein (IR 162) (kindly provided by Dr H. Bazin, Brussels, Belgium) was labelled with ¹²⁵I by the chloramine T technique (11) to a specific activity of 36.3 KBq/µg. Rat cells,

cultured for 5 days without or with different preparations of SRP (see above), were collected and washed in PBS-0,1 % BSA (bovine serum albumine). Cells (3×10^6 in 120 μ l) were incubated for 90 min at 4°C with 120 μ l of 125 I-IgE at concentrations varying between 0.1 to 4 μ g/ml. At the end of incubation, duplicate 100 μ l-aliquotes were analyzed by centrifugation through a 25 % sucrose cushion in a microfuge (Beckman, Palo Alto, Ca) at 8500g for 2 min. The radioactivity of the cell sediment was measured in a gamma scintillation spectrometer (Clinigamma 1272, LKB, Wallace, Sweden). Results were analysed by Scatchard analysis.

RESULTS

Effect of DFP treatment of SRP on in vitro IgE synthesis

Mesenteric lymph node cells (4×10^6) from DNP-OA primed rats were cultured for 5 days with 2 μ g/ml of DNP-OA in 2 ml of Click's medium without or with the addition of SRP or SRP treated with DFP (1 mM final). As shown previously (24), the addition of SRP to the rat cells led to a marked elevation in IgE synthesis (Fig. 1) (results of a representative experiment). When SRP was pretreated with DFP, its IgE potentiating effect was completely abolished and even a decrease in IgE synthesis was observed compared to the control

Biochemical characterization of the active molecules

In order to characterize the enzymatic molecule(s) involved in the regulation of IgE synthesis, SRP was labelled with 3 H-DFP. Labelling was also performed on living cercariae and schistosomula and on schistosomulum homogenate (SH). Results were presented on Fig. 2. Two molecules present in SRP were-revealed after SDS-PAGE and autoradiography : one major with a molecular weight of 27

500 (\pm 110) , and a minor with a MW of 29 000 (\pm 180) (mean values of 6 experiments). The same pattern was obtained by surface-labelling of cercariae and schistosomula as well as by labelling of a total preparation of schistosomula. No modification in the molecular weight was observed in reductive conditions (data not shown).

Enzymatic characteristics of active molecules

As SRP and SH present the same pattern in ^3H -DFP labelled serine proteases, SH was used to precise the nature of the enzymes involved. Enzymatic activity was tested using azocoll as substrate in the presence of various specific inhibitors or substrates of proteases. Some of them were also tested on the potentiating effect of SRP on *in vitro* IgE synthesis. Results obtained with the inhibitors are presented in Table I. As expected, general artificial (PMSF : phenyl methylsulfonide fluoride and DFP) or natural (α -1P : α -1 proteinase inhibitor) inhibitors of serine proteases inhibited completely or at a great extent the enzymatic activity of schistosomula as well as the *in vitro* effect of SRP. But specific inhibitors of trypsin (TLCK : N α -p-Tosyl-L-Lysine chloromethyl ketone, and SBTI : soybean trypsin inhibitors), and of α -chymotrypsin (TPCK : L-1-Tosylamide-2-phenyl-ethylchloromethyl ketone) have no or few effect on the two activities characterized. Moreover, BAPNA (N α -Benzoyl- DL-Arginine p-nitroanilide), a classic substrate of trypsin, was not hydrolysed by schistosomula (data not shown). We reported previously that specific substrates of trypsin (BAME : N α -Benzoyl-L-Arginine methylester and L-Lysine ethyl ester di HCl) inhibited the *in vitro* IgE potentiating effect of SRP, when added in the culture medium (24). Indeed, in contrast with the result obtained with inhibitors, these both trypsin substrates blocked in a dose-dependent manner the enzymatic activity of SH (Fig. 3). A specific substrate of α -chymotrypsin (ATEE : N-Acetyl-L-Tyrosine ethyl ester)

also showed an inhibiting effect but at a degree much lower. No hydrolysis was observed with specific fluorescent substrates of kallikreins (Pro-Phe-Arg-MCA ; Z-Phe-Arg-MCA). The majority of the hydrolysis of azocoll by SH was supported by serine proteases since no or few effect was observed by the use of metallo (EDTA : ethylene diamine tetracetique acid or 1.10-phenanthroline) or thiol (2-mercaptoethanol) protease inhibitors.

Increase in the number of FcεRII by SRP

As it is known that receptors for IgE (Fcε RII) are potentially involved in the regulation of IgE synthesis (17, 18, 22), we investigated the effect of SRP on the expression of Fcε RII by lymphoid rat cells in culture. After culture, as described in Material and Methods sections, cells were collected and tested for their capacity to bind ¹²⁵I-labelled IgE. As illustrated in Fig. 4, a significant increase in Fcε R on cells was observed after addition of dialysed SRP. The binding of radiolabelled IgE was significantly inhibited (60% of inhibition) by a preincubation with a 33-fold excess of unlabelled IgE (data not shown). In contrast, when SRP serine proteases were inactivated by DFP, a marked reduction of Fcε R expression was obtained, compared to the control. This variation in the amount of Fcε R correlates with the level of IgE synthesis measured in the cell culture supernatants (see Fig. 1).

DISCUSSION

The purpose of this work was to further characterize the serine proteases of SRP involved in the regulation of IgE synthesis ; but the very low concentration in protein of SRP (approximatively 6 µg/ml) excluded to purify these enzymes from this material. As pretreatment of SRP with DFP, a general inhibitor of serine proteases, led to a total inhibition of the IgE potentiating of SRP *in vitro*, we envisaged to use ³H-labelled DFP to perform this study. After labelling of SRP with

^3H -DFP, two molecules are revealed : one major of 27.5 kDa and a minor of 29 kDa. The same pattern was observed by the labelling of schistosomula surface or schistosomulum homogenate. Moreover, an identical result was obtained with cercarial material. This overlap between schistosomula and cercariae was previously underlined by Keene *et al.* (14) who showed an identity in the enzymatic activity of newly transformed schistosomula and of the cercarial preacetabular gland secretions. Indeed, other investigators have described the persistence of this preacetabular gland material in schistosomula for several hours *in vivo* and several days in culture (5).

Because of the major role played by cercarial enzymes in the mechanism of skin penetration, the maximum of knowledge was brought by works performed on the enzymes of this parasitic stage. Similarly to our results, Gazinelli *et al.* (10) reported the ineffectiveness of TLCK and TPCK to inhibit cercarial enzymes but found some degree of identity with α -chymotrypsin activity by the use of specific substrates. Landsperger *et al.* (15) also showed that cercarial enzymes resemble the vertebrate chymotrypsin rather than trypsin or elastase by using various inhibitors in spite of a weak difference in amino-acid composition. In contrast, by the use of other enzymatic substrates, our results suggested a trypsin-like activity rather than a chymotrypsin-like one. The lack of inhibition by TPCK and TLCK suggested a kallikrein-like activity (8). But cercarial enzymes failed to liberate bradykinin from bradykinogen, the natural kallikrein substrate (10). In addition, no inhibition was observed with specific inhibitors of this enzyme. In fact, it appeared that schistosomulum serine proteases could present partial similarities with one or other well-known enzymes upon the nature of the substrates or inhibitors used in the study, which explained the controversial results obtained. The parasite serine proteases probably exhibited very specific and particular activity impairing a real comparison with vertebrate enzymes. Beside the major serine protease activity, a minor metalloprotease activity was also found in the schistosomulum preparation as shown by the inhibitory effect of O-phenantroline. This enzyme was previously described as specific for the schistosomulum stage, appearing in newly-transformed

larvae to be the major enzyme after one day' culture (14).

The IgE synthesis appeared to be regulated in a multifactorial manner and different theories have emerged from works performed in several laboratories. Nevertheless, the probable involvement of IgE-binding factors in the IgE regulation is unanimously admitted. It is the reason why the role of SRP on the Fc ϵ R expression was carried out. The culture of rat cells in the presence of SRP led to a significant increase of Fc ϵ RII expression. This was essentially the fact of the presence of serine protease activity in the SRP, since pretreatment with DFP totally abolished and even diminished the Fc ϵ RII expression on the cell membrane. The cell population used for these experiments suggests that essentially lymphocytes were concerned but the precise definition of the target cell is presently in course. Receptors for IgE on both B and T lymphocytes were shown to be implicated in the IgE regulation. The IgE-potentiating factor described by Suemura and Ishizaka (22) was derived from Fc ϵ RII on T cells and its binding to IgE-bearing B cells facilitated the differentiation of IgE-B memory cells (13, 23). On the other hand, Marcelletti and Katz (17, 18) reported that the triggering of Fc ϵ RII on B cells by IgE resulted in the production of EIR_B (IgE-induced regulant) which directly induced the expression of Fc ϵ RII on B cells and the production by T cells of EIR_T that led to the expression of Fc ϵ RII on T cells and enhanced IgE production. The only study concerning the modulation of the expression of Fc ϵ RII on rat lymphocytes during helminth infection was performed in the model of infection by the parasite *Nippostrongylus brasiliensis* (25). In this report, Yodoï and Ishisaka described a marked increase in cells expressing Fc ϵ RII, a significant number of Fc ϵ R-bearing cells being detected in the T cell population. In conclusion, this report brings evidence that the events leading to the increase in Fc ϵ RII expression and in IgE synthesis during schistosome infection are not only the fact of T cell lymphokines but also of parasite regulatory factors.

TABLE I : Effect of various protease inhibitors on the enzymatic activities of schistosomula and on the *in vitro* IgE potentiating effect of SRP

% inhibition of			
Inhibitors of	mM	Enzymatic activity of SH ^a	In vitro effect of SRP ^b
Serine proteases			
PMSF	1	100	100
DFP	1	100	100
α 1-P	1	87	ND ^c
Trypsin			
TLCK	1	10	0
SBTI (100 μ g/ml)	-	12	ND
α-chymotrypsin			
TPCK	1	0	0
Metalloproteases			
EDTA	30	0	ND
1-10 phenantroline	1	20	ND
Thiolproteases			
2-mercaptoethanol	15	0	ND

^a : 10 to 50 μ g of schistosomulum homogenate were incubated at 37°C with azocoll

substrate in the presence of inhibitors without preincubation.

^b : SRP was treated 30 min at room temperature with inhibitors, and extensively dialysed before being tested on *in vitro* rat IgE synthesis.

^c : not done.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1 : Effect of treatment of SRP with DFP on rat IgE synthesis *in vitro*. Cultures were performed with DNP-OA primed rat cells in the absence or presence of various aliquots of dialysed SRP or SRP pretreated with 1 mM DFP. After 5 day's culture, supernatants were collected and tested for their IgE content.

Figure 2 : Identification of ^3H -DFP labelled enzymes of various *S. mansoni* extracts. For experimental details, see Materials and methods. Results of SDS-PAGE analysis of ^3H -DFP labelled SRP (A), schistosomulum homogenate (B), schistosomulum surface (C) and cercariae surface (D).

Figure 3 : Dose-dependent inhibition of schistosomulum azocolytic activity by specific enzyme substrates. Enzymatic activity of schistosomulum homogenate was measured using azocoll substrate, in presence of various concentrations of trypsin substrates (BAME and L-Lysine ethyl ester di HCl) or α -chymotrypsin substrate (ATEE).

Figure 4 : *In vitro* effect of SRP on the expression of Fc ϵ RII. DNP-OA primed rat cells were cultured without (----) or with 10 μl (●), 20 μl (▲) or 30 μl (■) of dialysed SRP (—) or DFP-treated SRP (••••). After 5 day's culture, cells were collected and tested for their capacity of ^{125}I -IgE binding. Results were expressed after Scatchard analysis.

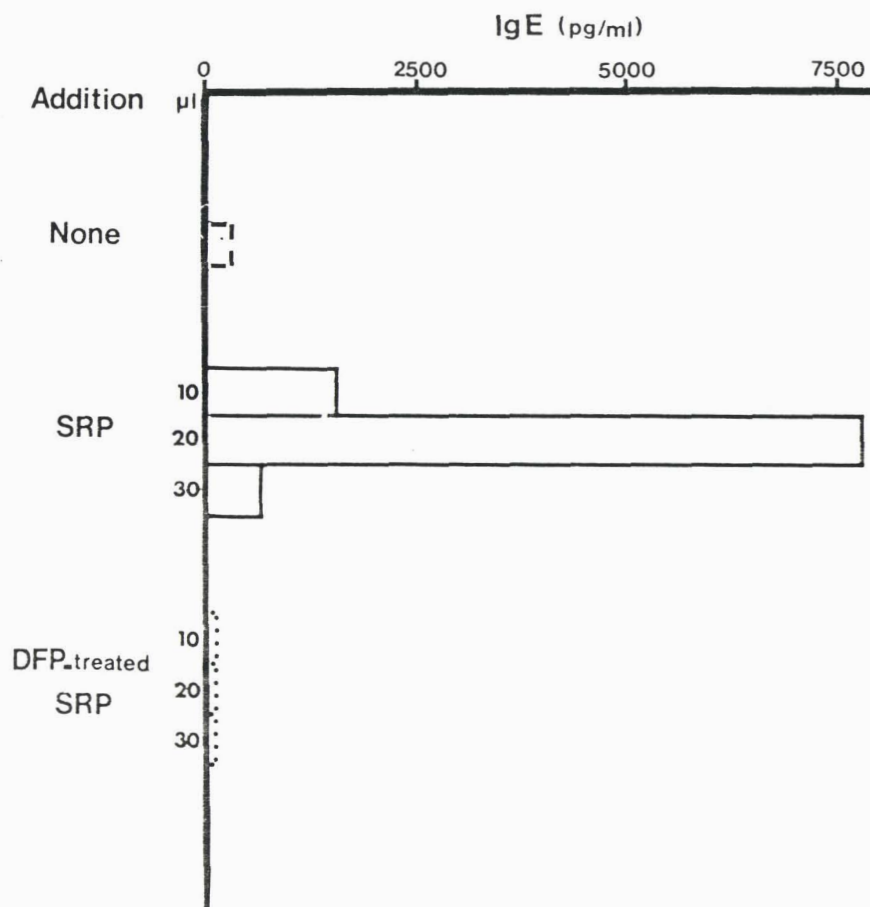


Figure 1

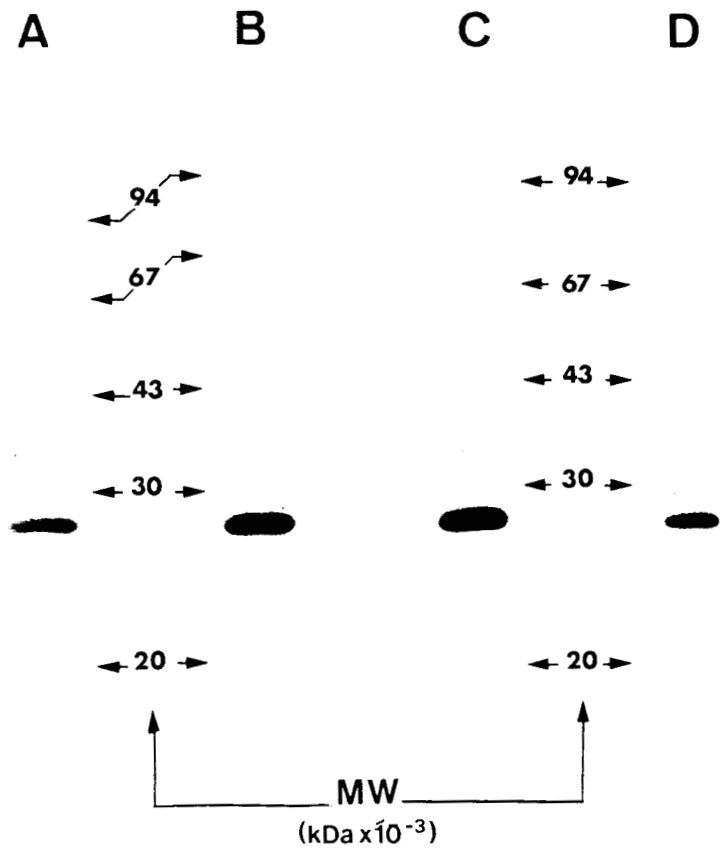


Figure 2

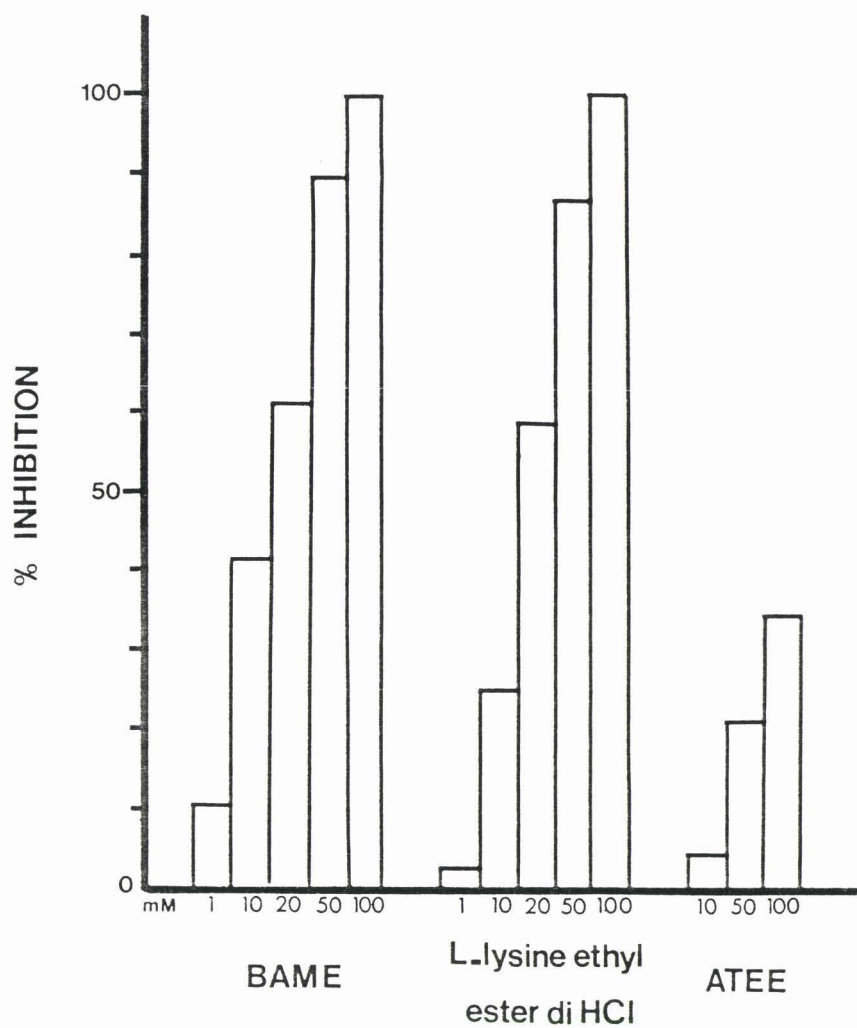


Figure 3

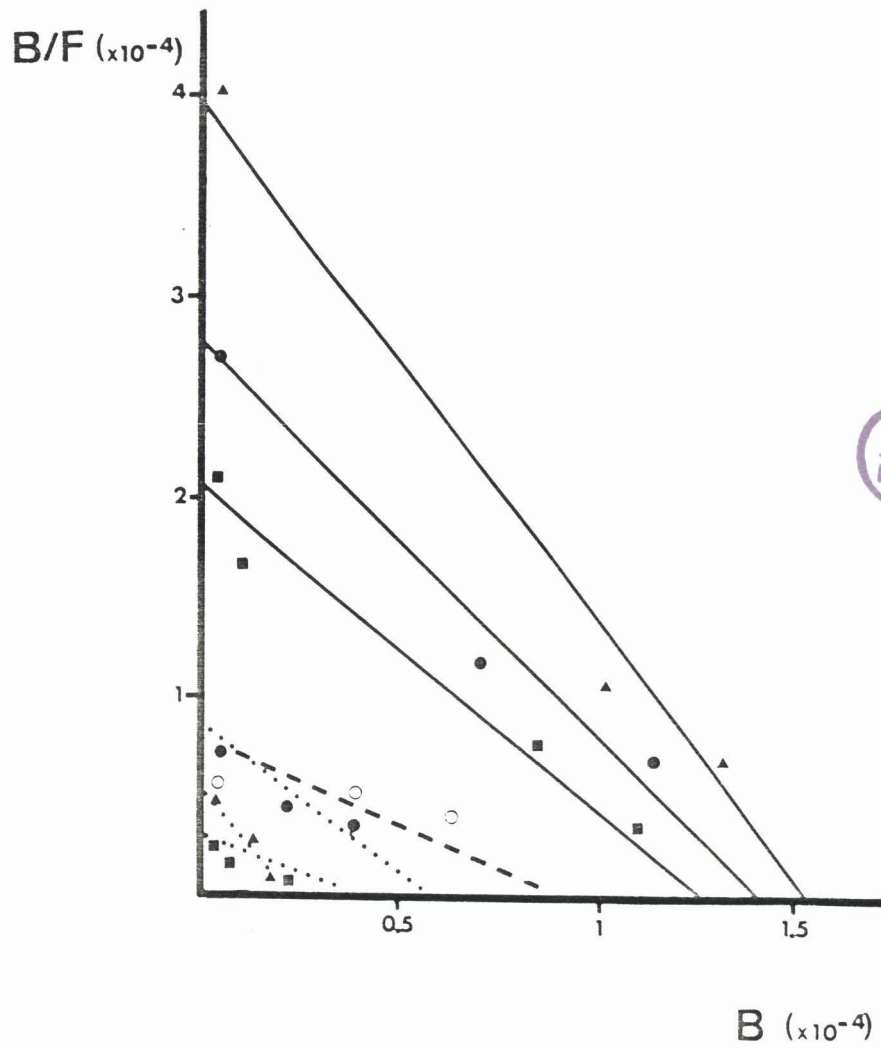


Figure 4

REFERENCES

- 1 Auriault, C., Capron, M., Cesari, I.M. & Capron, A. : Enhancement of eosinophil effector function by soluble factors released by *S. mansoni* : Role of proteases. *J. Immunol.* **131**, 464, 1983.
- 2 Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R.J., Joseph, M., Capron, M. & Capron, A. : Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. *Eur.J. Immunol.* **14**, 132, 1984.
- 3 Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A.B. & Capron, A.: Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of Immunoglobulin G. I. Inhibition of rat and human macrophage activities. *Int. J. Immunopharmacol.* **7**, 73, 1985.
- 4 Auriault, C., Ouaissi, M.A., Torpier, G., Eisen, H. & Capron, A. : Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* **3**, 33, 1981.
- 5 Brink, L.H., Mc Laren, D.J. & Smithers, S..R. : *Schistosoma mansoni* : a comparative study of artiificially transformed schistosomula and schistosomula recovered after cercarial penetration of isolated skin. *Parasitology* **74**, 73, 1977.
- 6 Capron, A., Capron, M., Dupas, H., Bout, D. & Petitprez, A. : 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*. *Parasitology* **4**, 613, 1974.
- 7 Click, R.E., Benck, L. & Alter, B.J. : Immune responses *in vitro*. I. Culture conditions for antibody synthesis. *Cell. Immunol.* **3**, 264, 1972.
- 8 Diniz, C.R., Pereira, A.A., Barroso, J. & Mares-Guia, M. : Studies on the specificity of kinin-forming enzymes. The inhibition of the kininogenic activity of

- trypsin and kallikreins by model compounds. pp. 175-183 (in Erdös, E.G., Back, N. & Sicuteri, F. (Eds), Hypotensive peptides. Springer-Verlag, New York, 1966).
- 9 Dissous, C., Dissous, C. & Capron, A. : Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 215, 1981.
- 10 Gazinelli, G., Mares-Guia, M. & Pellegrino, J. : Reaction of the main proteolytic fraction of *Schistosoma mansoni* cercarial enzymes with synthetic substrates and inhibitors of proteolytic enzymes. *Exp. Parasitol.* **32**, 21, 1972.
- 11 Greenwood, F.C., Hunter, W. & Bolver, J.S. : The preparation of I-131 labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114, 1963.
- 12 Himmi, E.H., Auriault, C., Pierce, R.J., Joseph, M., Tartar, A. & Capron, A. : Regulatory role of a peptide from the second constant domain of immunoglobulin G. II. *In vitro* effect on granuloma formation around *S. mansoni* eggs. *Int. J. Immunopharmacol.* **7**, 231, 1985.
- 13 Hirashima, M., Yodoï, J. & Ishizaka, K. : Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. V. Formation of IgE-potentiating factor by T lymphocytes from rats treated with *Bordetella pertussis* vaccine. *J. Immunol.* **126**, 838, 1981.
- 14 Keene, W.E., Jeong, K., McKerrow, J.H. & Werb, Z. : Degradation of connective tissue matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. II. Degradation by newly transformed and developing schistosomula *in vitro*. *Lab. Invest.* **49**, 201, 1983.
- 15 Landsperger, W.J., Stirewalt, M.A. & Dresden, M.H. : Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* **201**, 137, 1982.
- 16 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680, 1970.

- 17 Marcelleti, J.F. & Katz, D.H. : FcR ϵ ⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. I. A new class of molecules, termed IgE-induced regulants (EIR), which modulate FcR ϵ expression by lymphocytes. *J. Immunol.* **133**, 2821, 1984a.
- 18 Marcelleti, J.F. & Katz, D.H. : FcR ϵ ⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. II. FcR ϵ ⁺ B lymphocytes initiate a cascade of cellular and molecular interactions that control FcR expression and IgE production. *J. Immunol.* **133**, 2829, 1984b.
- 19 Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. & Sakakibara, S. : New fluorogenic substrates for α -trypsin, factor Xa, kallikreins and urokinase. *J. Biochem.* **82**, 1495, 1977.
- 20 Neyrinck, J.L., Dessaint, J.P. Auriault, C. & Capron, A. : Measurement of picogram quantities of rat IgE from *in vitro* culture supernatants of B lymphocytes in experimental infections. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **80**, 342, 1986.
- 21 Ramalho-Pinto, G., Gazinelli, G., Howells, R.E., Mota-Santos, T.A., Figueiredo, E.A. & Pellegrino, J. : *Schistosoma mansoni* : defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **36**, 360, 1974.
- 22 Suemura M. & Ishizaka, K. : Potentiation of IgE response *in vitro* by T cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* **123**, 918, 1979.
- 23 Suemura, M., Yodoï, J., Hirashima, M. & Ishizaka, K. : Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanism of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor. *J. Immunol.* **125**, 148, 1980.
- 24 Verwaerde, C., Auriault, C., Damonville, M., Neyrinck, J.L., Vendeville, C. & Capron, A. : Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.* **24**, 509, 1986.
- 25 Yodoï, J. & Ishizaka, K. : Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. I. Presence of human and rat T lymphocytes with Fc ϵ receptors. *J. Immunol.* **122**, 2577, 1979.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Marie-France Massard for secretarial assistance. This work was supported by the WHO-UNDP Programme for Research and Training in Tropical diseases, CNRS 624 and INSERM 167.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les travaux que nous présentons dans ce mémoire peuvent être classés schématiquement en deux chapitres :

- L'étude des antigènes inducteurs et (ou) cibles de la réponse IgE spécifique au cours de la schistosomiase à *S. mansoni* ;
- La régulation de la réponse IgE en général au cours de cette infection parasitaire.

Afin de rendre cette discussion plus claire, nous traiterons ces deux sujets séparément, pour conclure en replaçant les données obtenues dans un contexte biologique plus général et en soulignant les perspectives que soulèvent ces résultats.

I - LES ANTIGENES INDUCTEURS ET (OU) CIBLES DE LA REPOSE IgE ANTI-S. MANSONI

La persistance de la réponse anticorps IgE observée au cours de la schistosomiase ne peut s'expliquer que par la présence des vers adultes dans l'organisme qui, par une libération constante d'antigènes, maintiennent un taux élevé en anticorps IgE. Nous avons donc entrepris l'étude des antigènes induisant une réponse IgE sur ce matériel parasitaire et montré en effet une reconnaissance très intense des antigènes par les IgE anti-*S. mansoni* d'un sérum d'infection. L'utilisation de sérums de patients bilharziens et de sérums de rat Fischer infestés ont permis de définir une fraction allergénique majeure de pi 4,9-5,2 et de PM compris entre 70 et 150kDa. Dans le cas du rat, une fraction supplémentaire est révélée aussi à un pH alcalin mais uniquement en test d'anaphylaxie cutanée passive, ce qui s'explique soit par une sensibilité plus grande que le test de RAST, soit par une non-fixation de ces allergènes sur le support utilisé en RAST, soit encore par une hétérogénéité des IgE comme nous le discuterons plus tard. Cette étude révèle donc que le vers adulte, de par les nombreux allergènes qu'il renferme, représente

un élément essentiel dans le statut d'immunité à IgE. Mais cette hétérogénéité rend difficile une analyse plus précise. En effet, parmi tous ces allergènes, quelles sont les molécules présentant des épitopes IgE communs avec les antigènes cibles présents à la surface du schistosomule ? Partir du vers adulte ne semble donc pas être la meilleure approche pour cerner ces antigènes cibles.

En fait, l'induction de la réponse IgE spécifique n'est pas limitée au schistosome adulte. Des IgE anti-schistosomule sont détectées dans le sérum de rats LOU/M et Brown Norway (bons répondeurs IgE) dès le 14^{ème} jour d'infection, c'est-à-dire bien avant que le parasite ait atteint le stade adulte. Cette observation nous a conduit à considérer le stade larvaire et pour cela nous avons choisi les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule (SRP). En effet, comme nous l'avons signalé dans le chapitre "Généralités", l'une des raisons invoquées pour expliquer la perte de susceptibilité du parasite à la réponse immune de l'hôte est la libération spontanée de ses antigènes de surface. Ce SRP nous a paru refléter le mieux la situation *in vivo* et donc représenter le matériel le plus adapté pour étudier d'un point de vue dynamique la réponse IgE effectrice induite par la larve du parasite. L'immunisation de rats par cet extrait parasitaire, sans l'addition d'un adjuvant, entraîne une forte production d'anticorps IgE cytotoxiques *in vitro* pour le schistosomule en présence de macrophages, d'éosinophiles et de plaquettes, comparable en activité aux IgE d'un sérum d'infection. Un résultat analogue a été obtenu dans le modèle primate par immunisation de singes (*Erythrocebus patas*) avec ce SRP (AURIAULT *et al.*, 1985a). Cette réponse IgE protectrice chez le rat est dirigée contre deux antigènes de 22 et 26kDa, la molécule de 26kDa étant reconnue majoritairement sur le schistosomule par les IgE d'un sérum d'infection. Il faut préciser que, bien que faiblement concentré en protéine (environ 6µg/ml), le SRP renferme de nombreuses molécules (au moins 20), ce qui implique une certaine sélectivité de la réponse IgE. Ces deux antigènes de 22 et 26kDa sont de nature glycoprotéinique mais leur partie carbohydrate ne semble pas indispensable pour

l'induction de cette réponse IgE (DAMONNEVILLE *et al.*, 1986a).

Parallèlement à ces travaux menés à partir des antigènes parasitaires, nous avons abordé cette étude par le biais des anticorps IgE. La technique d'hybridation cellulaire décrite par KÖHLER et MILSTEIN (1975), nous offrait la possibilité d'obtenir un anticorps monoclonal IgE anti-*S. mansoni*, sonde idéale pour explorer de façon directe l'implication des IgE dans le statut immunitaire et caractériser la cible moléculaire de cette IgE effectrice à la surface du parasite.

Obtenir un anticorps IgE doué de propriétés effectrices et protectrices analogues à celles des IgE d'un sérum d'infection s'avérait être une aventure délicate quand on connaît le pourcentage très faible de lymphocytes B ϵ et la régulation très stricte de cet isotype d'immunoglobuline. C'est pourquoi nous avons utilisé soit des cellules immunes d'origine diverse : rats infestés, rats immunisés avec des fractions parasitaires choisies en fonction des études précédemment décrites (fraction glycoprotéinique des produits d'incubation de vers adultes, SRP) soit des cellules après un traitement facilitant (traitement des rats par de la cyclophosphamide ou une faible dose de rayons X, sélection des LyB ϵ au trieur de cellules). Dans une de ces hybridations réalisée à partir de cellules de rat immunisé avec la fraction antigénique de vers adulte, nous avons obtenu un anticorps monoclonal IgE anti-*S. mansoni*. En collaboration avec différentes cellules effectrices (macrophages, éosinophiles et plaquettes), cette IgE tue un pourcentage important de schistosomules, à un taux comparable à celui obtenu avec les IgE d'un sérum d'infection ou les IgE anti-SRP. Cet effet protecteur observé *in vitro* a été confirmé *in vivo* par l'injection de cette IgE à des rats avant leur infestation par *S. mansoni* où on observe une réduction importante de la charge parasitaire comparée aux témoins ayant reçu une IgE monoclonale non-spécifique, protection identique à celle conférée par transfert passif d'un sérum de rat immun. Ce résultat représente une preuve directe de la participation des anticorps IgE dans l'établissement de l'immunité à *S. mansoni*. Par une suppression sélective de la réponse IgE par un traitement anti- ϵ chez des rats à

la naissance, KIGONI *et al.* (1986) ont apporté récemment la contre-expérience de notre analyse, en décrivant une immunité à la réinfection plus faible chez les animaux supprimés en IgE comparée aux rats témoins. Enfin, cet anticorps monoclonal reconnaît dans les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule un antigène cible de 26kDa.

Ainsi donc, les deux approches que nous avons poursuivies conduisent à la même conclusion, à savoir que l'antigène de 26kDa représente un antigène cible majeur de la réponse IgE anti-*S. mansoni* protectrice chez le rat. Ce résultat se trouve d'autre part renforcé par les travaux de DAMONNEVILLE *et al.* (1986b) qui ont montré une protection significative de rat sain contre la schistosomiase par transfert passif de sérums anti-SRP ou anti-fractions 22-30kDa, protection en partie supportée par les anticorps IgE de ces sérums. A côté de cet antigène de 26kDa, BALLOUL *et al.* (1987) ont montré récemment la présence, chez le schistosome, d'un autre antigène inducteur d'une réponse IgE protectrice, d'un poids moléculaire de 28kDa.

A côté du message principal apporté par cette sonde monoclonale, son étude a permis de souligner deux points particuliers.

Le premier est la participation du complément de même espèce dans les mécanismes effecteurs dépendant des IgE en présence de macrophages et d'éosinophiles, où un contact cellule-cible est nécessaire. Cette collaboration IgE-complément avait été soit ignorée soit écartée précédemment, excepté dans une étude récente, réalisée sur les éosinophiles humains, impliquant le récepteur CR3 (M.CAPRON *et al.*, 1986). Ce récepteur CR3 intervient de façon importante dans les phénomènes d'adhésion et de phagocytose de particules recouvertes de C3bi par des cellules phagocytaires. Au niveau du parasite, ce CR3 pourrait se fixer soit au C3bi présent à la surface du schistosomule (SANTORO *et al.*, 1979; DIAS da SILVA *et al.*, 1980), soit à des déterminants glycaniques, ce récepteur ayant des propriétés de type lectine (ROSS *et al.*, 1985). Enfin, DING *et al.* (1987) ont récemment

montré, par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CR3, que ce récepteur pouvait jouer un rôle direct dans l'activation de macrophages péritonéaux de souris en entraînant notamment une augmentation de la production d' H_2O_2 . Ce CR3 pourrait donc intervenir à 2 niveaux dans les mécanismes de cytotoxicité dépendant d'IgE vis-à-vis du schistosomule : 1) en favorisant le contact cible-cellule et donc la reconnaissance de l'antigène cible par les anticorps IgE fixés à la cellule effectrice, 2) en activant directement la cellule effectrice entraînant ainsi une augmentation de l'efficacité de la cytotoxicité cellulaire.

La seconde particularité est l'absence d'activité réaginique de cette IgE monoclonale. L'explication la plus simple est que, si l'épitope reconnu sur la molécule de 26kDa est unique, le pontage entre deux molécules d'IgE ne peut se faire et donc entraîner la dégranulation du mastocyte. Mais, cette observation peut être aussi rapprochée de l'étude de LEHRER *et al.* (1981) sur la capacité d'inhibition de la dégranulation des mastocytes par plusieurs IgE myélomateuses. Ces travaux révèlent des différences importantes selon l'immunoglobuline testée et pose le problème de l'existence de sous-classes d'IgE et (ou) de plusieurs types de récepteurs à la surface des mastocytes. Cette hétérogénéité possible des molécules d'IgE pourrait être aussi avancée pour expliquer la différence que nous décrivons entre les profils d'allergènes reconnus au cours de l'infection, obtenus soit par un test de RAST soit par un test de PCA. Plus récemment, REINER et ZAHNER (1986), à partir d'une étude comparative entre le titre en PCA et le taux en anticorps homocytotropiques obtenus par différents protocoles d'infestation de rat, apportent le même type de conclusion. L'existence de différents types d'IgE pourrait expliquer en partie pourquoi le taux important en anticorps IgE durant les infections par helminthes ne s'accompagne pas de manifestations allergiques.

Enfin, cette IgE monoclonale, obtenue à partir d'une fraction de vers adulte et reconnaissant un antigène du schistosomule, souligne l'existence "d'épitopes-IgE"

communs aux deux stades de développement du parasite.

Le schistosomule par l'intermédiaire de ses produits d'exécution-sécrétion, apparaît donc comme un stade important dans l'induction de la réponse IgE anti-schistosome, et nous nous sommes demandé si ce concept pouvait s'étendre à la réponse anticorps de type IgG. Les résultats de cette étude montre que :

- 1) Contrairement à la réponse IgE, la réponse anticorps IgG est très diversifiée (i.e. de nombreux antigènes du SRP sont révélés par les anticorps IgG d'un sérum d'infection) ;
- 2) La reconnaissance des antigènes de surface du schistosomule par les IgG anti-SRP est très proche de celle obtenue avec les sérums d'infection ;
- 3) L'immunisation de rat avec du SRP génère la production d'anticorps IgG2a cytotoxique *in vitro* pour le schistosomule en présence d'éosinophiles.

La réponse IgG protectrice dirigée contre les antigènes de surface de la larve parasitaire induite par le vers vivant peut donc être reproduite par injection de SRP.

En conclusion, la perte des molécules de surface du schistosomule ne doit pas être seulement considérée comme un moyen d'échapper aux attaques immunes de l'hôte parasité. Par cette dissémination de matériel, diffusable dans tout l'organisme, l'immunogénicité globale du schistosomule est considérablement augmentée. C'est donc le schistosomule qui initie vraisemblablement la réponse immune protectrice qui sera ensuite perpétuée et confortée par la présence du vers adulte.

Nous devons néanmoins tenir compte du fait que le SRP correspond aux produits d'incubation d'un grand nombre de larves, largement supérieur au niveau d'une infection naturelle. Mais, d'une part, le SRP est obtenu après 16 heures d'incubation et contient des enzymes (AURIAULT *et al.*, 1981a), ce qui implique une certaine dégradation ou inactivation des molécules qu'il renferme. D'autre part, il faut replacer cette situation dans un contexte local et la considérer avant tout

comme agissant sur un environnement proche du parasite. Enfin, même dans le cas d'une infection très légère, on peut supposer que le peu de matériel libéré par le schistosomule suffise pour éduquer des lymphocytes, l'expansion clonale de ces cellules mémoires se faisant sous l'action du vers adulte ou d'infections ultérieures.

II - LA REGULATION DE LA REPONSE IgE PAR LE SCHISTOSOMULE

Parallèlement à l'induction d'une réponse spécifique, nous avons vu (voir le chapitre Généralités) que le schistosome, comme d'autres helminthes, agit comme un facteur potentialisant de la réponse IgE totale chez l'hôte infesté (ROUSSEAU-PREVOST *et al.*, 1982). Ces mêmes auteurs ont montré que le stade adulte intervenait dans ce phénomène de potentialisation, en décrivant la persistance d'une réponse IgE anti-ovalbumine par l'injection de produits d'incubation de schistosomes.

Pour obtenir une réponse IgE contre un antigène, l'utilisation d'un adjuvant est quasiment obligatoire, l'immunisation avec un antigène seul n'entraînant qu'une très faible production d'IgE spécifiques (PAUWELS *et al.*, 1979). Pourtant, l'injection de SRP à des rats induit une réponse IgE spécifique et ceci sans l'addition d'aucun adjuvant. Ceci impliquait qu'il existait dans le SRP des molécules régulant la synthèse d'IgE, responsables peut-être de la potentialisation observée lors de l'infection par *S. mansoni*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de travailler dans un système hétérologue (i.e. tester l'effet du SRP sur une synthèse d'IgE non anti-*S. mansoni*) pour éviter l'éventuelle participation des antigènes et ne considérer que la régulation spécifique de l'isotype IgE.

L'effet du SRP a été étudié soit *in vitro* sur des cellules de patients filariens ou des cellules de rat immunisé avec du DNP-OA, soit *in vivo* sur la réponse IgE anti-DNP I^{aire} et II^{aire} de rat immunisé avec du DNP-OA.

In vitro, l'addition de SRP aux cellules en culture se traduit par une forte augmentation (de 5 à 10 fois le taux de base) de la production d'IgE, et ceci à des doses relativement faibles. Le même effet est observé *in vivo* sur la production d'IgE anti-DNP en réponse II^{aire} chez des rats injectés avec du DNP-OA en présence de SRP. Dans les deux cas, cette potentialisation est essentiellement obtenue avec la fraction non-dialysable du SRP. A l'inverse, l'administration de SRP avec le DNP-OA lors d'une première immunisation n'augmente pas mais au contraire supprime la réponse IgE spécifique. Par contre, le niveau des IgE sériques totales se trouve amplifié sous l'action du SRP. Ceci implique que l'effet du SRP n'affecte que les réponses IgE préexistantes, ce qui le distingue d'un effet adjuvant. Ceci nous amène à admettre que l'induction de la réponse IgE pourrait être le fait des antigènes eux-mêmes et que des facteurs immunostimulants amplifient la réaction. Le SRP reproduit donc la régulation de la synthèse d'IgE observée avec le vers vivant, c'est-à-dire i) une suppression si l'injection se fait en même temps que la première immunisation, ii) une potentialisation d'une réponse IgE précédente.

Il était difficile à ce stade de notre étude d'aller plus loin dans l'investigation de la (des) molécule(s) impliquée(s) dans cette régulation, leur purification étant impossible à partir du SRP. Nous avons alors envisagé que les facteurs responsables pouvaient être des enzymes, cette hypothèse étant basée sur les faits suivants :

1) De nombreuses protéases participent de façon directe dans les mécanismes régulant les interactions cellulaires. On peut citer le cas de lymphokines comme le LIF (Leucocyte inhibitory factor) (GOETZL et ROCKLIN, 1978) ou le TRF (T cell replacing factor) (MIKI *et al.*, 1982), deux enzymes appartenant au groupe des sérine protéases; également le cas de monokines comme le LAF (Lymphocyte activating factor), enzyme à activité carboxypeptidasique.

2) Des enzymes du schistosome peuvent contrôler les mécanismes immunitaires de l'hôte parasité. Cette régulation se fait soit directement comme dans

le cas des éosinophiles par une enzyme de type collagénase (AURIAULT *et al.*, 1982b), soit par l'hydrolyse des IgG de l'hôte par des enzymes libérées par le schistosomule, conduisant à des peptides inhibiteurs de l'activité des macrophages (AURIAULT *et al.*, 1980).

3) La description, particulièrement importante en ce qui nous concerne, du rôle essentiel joué par une sérine protéase, le GEF (Glycosylation-enhancing factor), dans la régulation spécifique d'IgE (IWATA *et al.*, 1983).

4) Le fait que l'activité du(des) facteur(s) potentiateur(s) que nous étudions est thermolabile (activité annulée par chauffage 2min à 100°C).

Pour vérifier l'hypothèse d'une nature enzymatique des facteurs impliqués, l'action de différents inhibiteurs ou substrats spécifiques a été étudiée sur l'activité potentiatrice du SRP, à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, l'effet du SRP est totalement annulé après traitement par des inhibiteurs du groupe des sérine protéases. Une très forte inhibition est aussi observée *in vivo* mais seulement partielle (environ 60%), ce qui laisse supposer l'existence dans le SRP de facteurs modulateurs de la réponse IgE autres que ces enzymes. Lorsqu'on s'intéresse à l'effet du SRP *in vitro* sur la synthèse des autres immunoglobulines, on s'aperçoit que le taux en IgG produit n'est pas modifié, mais que la production en IgM est bouleversée. Un schéma inverse de régulation est obtenu pour les IgM comparativement aux IgE. Si du SRP non traité est utilisé, la synthèse d'IgM est sensiblement diminuée. Par contre, l'inactivation des sérine protéases du SRP se traduit par une augmentation très importante de la production d'IgM. Tout ce passe donc comme si ces enzymes se comportaient comme des facteurs "switchant" en faisant commuter les cellules de la production des IgM vers la production des IgE. Nous avons vu dans le chapitre "Généralités" qu'une lymphokine, l'IgE-potentiating factor, intervient de façon positive dans la régulation de la synthèse des IgE, en induisant la différenciation des cellules B μ, δ, ϵ en cellules B ϵ . La production de cet IgE-PF se faisant par une libération de FcE R (YODOI *et al.*, 1980), nous avons donc analysé l'effet du SRP sur l'expression de ce récepteur. Les résultats obtenus

montrent que le SRP favorise l'apparition de FcE R au niveau de la membrane cellulaire et que cette activité est due une activité enzymatique de type sérine protéase. Il semble donc que le SRP pourrait agir en favorisant la production par les lymphocytes T de lymphokines orientant de façon positive la synthèse d'IgE. Cette régulation de la réponse IgE via les Ly T par le SRP a été soulignée récemment par les travaux de DAMONNEVILLE *et al.* (1987). Cette étude révèle que des lignées cellulaires T, obtenues à partir de rats immunisés avec du SRP, sont capables de transférer à des animaux sains une protection significative contre une infection ultérieure et d'entraîner chez ces rats une augmentation sélective de la réponse IgE totale. A ce stade de nos travaux, il est difficile de pousser la comparaison plus loin avec les mécanismes décrits de régulation de la réponse IgE et de dire si le mécanisme d'action des enzymes du SRP est identique à celui du GEF, enzyme qui induit la production de l'IgE-PF. On ne peut nier toutefois une certaine analogie entre les activités enzymatiques du GEF et du SRP. Cette étude souligne une fois de plus la remarquable capacité qu'a le schistosome d'intervenir dans la réponse immunitaire de l'hôte.

Par marquage avec un inhibiteur spécifique, le DFP (Diisopropyl fluorophosphate), marqué au tritium, nous montrons que ces enzymes sont présentes dans le SRP sous 2 formes moléculaires : une majeure de 27,5kDa et une mineure de 29kDa. Ces molécules sont exprimées à la surface de la cercaire et du schistosomule. L'étude de leur spécificité enzymatique ne permet pas de les classer dans un type bien défini de sérine protéases, malgré une certaine analogie avec la trypsine. Toute comparaison avec des enzymes connues ne peut être qu'indicative, ces molécules présentant certainement un spectre d'action très étroit.

Le fait qu'essentiellement la fraction non-dialysable du SRP présente une activité laisse supposer l'existence d'inhibiteurs enzymatiques dans le matériel dialysable. Ces derniers pourraient avoir pour cible des enzymes produites par des cellules immunitaires et notamment pourraient être responsables en partie du manque d'efficacité des lymphocytes T cytotoxiques observée vis-à-vis du schistosomule,

activité cytotoxique passant par une activité enzymatique de type sérine protéase (CHANG & EISEN, 1980; PASTERNAK & EISEN, 1985).

III - CONCLUSION

Notre travail souligne que le schistosomule induit par l'excrétion-sécrétion d'antigènes une réponse IgE protectrice mais également contrôle cette réponse immune par la libération de molécules régulatrices. Cette observation implique donc que dans une stratégie de vaccination contre la schistosomiase, il faudra considérer non seulement les antigènes protecteurs mais aussi tenir compte des facteurs qui peuvent orienter la réponse immunitaire vers une production d'anticorps IgE protecteurs.

Une vaccination efficace contre la schistosomiase suppose non seulement une diminution de l'intensité de l'infection mais aussi une destruction aussi rapide que possible du parasite après sa pénétration, la mort du schistosome au niveau du poumon ou du foie pouvant avoir des conséquences anatomo-pathologiques indésirables. Les travaux de KIGONI *et al.* (1986) et ceux que nous décrivons à l'aide d'un anticorps monoclonal IgE laissent supposer une intervention précoce des IgE dans l'élimination du parasite. Néanmoins, une réponse précise à cette question est essentielle et pourra être apportée en partie par l'injection de cette IgE monoclonale à des rats à des intervalles de temps connus avant ou après leur infestation.

L'utilisation de la molécule de 26kDa à des fins vaccinales apparaît assez limitée en raison de la faible quantité de cet antigène. Grâce à la préparation d'un anticorps monoclonal IgE anti-26kDa, il est permis d'envisager une production d'anticorps anti-idiotypes. Ces derniers pourraient servir de substitut à l'antigène comme cela a été réalisé pour l'antigène de 38kDa par GRZYCH *et al.* (1985). Ces

auteurs ont pu, en effet, par injection d'un anticorps monoclonal anti-IPL Sm1 (anticorps dirigé contre la molécule de 38kDa; GRZYCH *et al.*, 1982) reproduire la réponse immune protectrice dirigée contre cet antigène. Le deuxième intérêt présenté par ces anticorps anti-idiotypes est d'aborder leur participation dans le maintien d'une immunité anti-schistosome même après l'élimination du parasite. De plus, il serait intéressant de regarder si ces anticorps anti-idiotypes (Ab2), dirigés contre un anticorps anti-26kDa d'isotype IgE (Ab1) induisent une réponse anticorps (Ab3) de même isotype et de même activité que l'Ab1. Cet aspect particulier de recherche est actuellement étudié dans notre équipe par F. VELGE.

Enfin, on peut se demander si l'association enzyme et potentialisation de la réponse IgE que nous décrivons dans le cas de la schistosomiase représente une observation particulière ou un concept applicable aux autres helminthiases et si, d'une façon plus générale, cette observation peut être étendue aux phénomènes d'allergie où une réponse IgE anormale est observée.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AURIAULT C., CAPRON M. & CAPRON A. (1982a)

Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. Cell. Immunol., **66**, 59.

AURIAULT C., CAPRON M., CESARI I. & CAPRON A. (1983)

Enhancement of eosinophil effector function by soluble factors released by *S. mansoni* : role of proteases. J. Immunol., **131**, 464.

AURIAULT C., DAMONNEVILLE M., JOSEPH M., CAPRON M.,
VERWAERDE C., BILLAUT P. & CAPRON A. (1985a)

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.

AURIAULT C., DESSAINT J.P., MAZINGUE C., LOYENS A. & CAPRON A.
(1984)

Non-specific potentiation of T and B lymphocyte proliferation at the early stage of infection by *Schistosoma mansoni* : role of factors secreted by the larvae. Parasite Immunol., **6**, 119.

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

Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by schistosoma larvae proteases. Immunol. Letters, **2**, 135.

AURIAULT C., JOSEPH M., TARTAR A., BOUT D., TONNEL A.B. &
CAPRON A. (1985b)

Regulatory role of a tripeptide (TKP) from the second constant domain of immunoglobulin G - I- Inhibition of rat and human macrophage activities. Int. J. Immunopharmac., **7**, 73.

AURIAULT C., OUASSI M.A., TORPIER, G., EISEN H. & CAPRON A. (1981a)

Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. Parasite Immunol., **3**, 33.

AURIAULT C., PESTEL J., JOSEPH M., DESSAINT, J.P. & CAPRON A. (1981b)

Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula : Role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. Cell Immunol., **62**, 15.

AURIAULT C., PIERCE R.J., CESARI I.M. & CAPRON A. (1982b)

Neutral protease activities at different developmental stages of *S. mansoni* in mammalian hosts. Comp. Biochem. Physiol., **72**, 377.

BALLOUL J.M., SONDERMEYER P., DREYER D., CAPRON M., GRZYCH J.M., PIERCE R.J., CARVALLO D., LECOCQ J.P. & CAPRON A. (1987)

Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature, **326**, 149.

BAZIN H., CAPRON A., CAPRON M., JOSEPH M., DESSAINT J.P. & PAUWELS R. (1980a)

Effect of neonatal infection of anti- μ antibodies on immunity to schistosomes (*S. mansoni*) in the rat. J. Immunol., **124**, 2373.

BAZIN H., GRZYCH J.M., VERWAERDE C. & CAPRON A. (1980b)

A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridoma. Ann. Immunol., **131D**, 359.

BICKLE Q., BAIN J., Mc GREGOR A. & DOENHOFF M. (1979)

Factors affecting the acquisition of resistance against *S. mansoni* in the mouse.
II-The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance
to reinfection. Trans. R. Trop. Med. Hyg., **73**, 37.

BLOCK K.J., OHMAN J.L., WALTIN J. & CYGAN R.W.(1973)

Potentiated reagin response : Initiation with minute doses of antigen and alum
followed by infection with *N. brasiliensis*. J. Immunol., **110**, 197.

BOU 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.

BOU D., JOSEPH M., PONTET M., VORNG H., DESLEE D. & CAPRON A.
(1986)

Rat resistance to schistosomiasis : Platelet-mediated cytotoxicity induced by
C-reactive protein. Science, **231**, 153.

BUTTERWORTH A.E., CAPRON M., CORDINGLEY J.S., DALTON P.R.,
DUNNE D.W., KARIUKI H.C., KOECH D., MUGAMBI M., OUMA J.M.,
PRENTICE M.A., RICHARDSON B.A., KARAP SIONGOK R.F. & TAYLOR
(1985)

Immunity after treatment of human schistosomiasis. II- Identification of resistant
individuals and analysis of their immune responses. Trans. R. Soc. Trop. Med.
Hyg., **79**, 393.

BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA C. & REES P.M. (1975)

Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistosomula.
Nature, **256**, 727.

- BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F., HOUBA C. & TAYLOR R. (1976)
Schistosoma mansoni in baboons. Antibody-dependent cell-mediated damage to ^{31}Cr -labeled schistosomula. Clin. exp. Immunol., **25**, 95.
- BUTTERWORTH A.E., VADAS M.A., MATZ E. & SHER A. (1979)
 Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni* but fail to induce damage. J. Immunol., **122**, 1314.
- CAMUS D., DESSAINT J.P., FISCHER E. & CAPRON A. (1979)
 Nonspecific suppressor cell activity and specific cellular unresponsiveness in rat schistosomiasis. Eur. J. Immunol., **9**, 341.
- CAMUS D., NOSSEIR A., MAZINGUE C. & CAPRON A. (1981)
 Immunoregulation by *Schistosoma monsoni*. Immunopharmacol., **3**, 193.
- CAPRON A., BIGUET J., ROSE F. & VERNES A. (1965)
 Les antigènes de *S. mansoni*. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S. mansoni*. Ann.Inst. Pasteur, **109**, 798.
- CAPRON A., CAPRON M. & DESSAINT J.P. (1980b)
 ADCC as primary mechanisms of defence against metazoan parasites. Dans : Immunology 80, Progress in Immunology IV, eds. M.FOUGEREAU & J. DAUSSET. Pp 7893. New York : Academic.

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 *S. mansoni*. Int. J. Parasitol., **4**, 613.

CAPRON A., DESSAINT J.P. & CAPRON M. (1980c)

Immunoregulation of parasite infections. J. Allergy Clin. Immunol., **66**, 91.

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

Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. Nature, **253**, 474.

CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M. & JOSEPH M. (1983)

Effector mechanisms against schistosomes. Dans : Immunology 80, Progress in Immunology V, eds. Y.YAMAMURA & T.TADA. Pp 1305-16. Tokyo : Academic.

CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M., JOSEPH M., AMEISEN J.C. & TONNEL A.B. (1986)

From parasites to allergy : a second receptor for IgE. Immunology Today, **7**, 15.

CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M., JOSEPH M. & PESTEL J. (1980a)

Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg., **29**, 849.

CAPRON A., DESSAINT J.P., JOSEPH M., ROUSSEAUX R. & BAZIN H.
(1976)

Macrophage cytotoxicity mediated by IgE. Dans : Molecular and biological aspects of the acute allergic reaction, eds : JOHANSSON, STRANDBERG & UVNÄS. Pp 1953-68, Plenum Press, New York.

CAPRON M., BAZIN H., JOSEPH M. & CAPRON A. (1981a)

Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., **126**, 1764.

CAPRON M., CAMUS D., CARLIER Y., FIGUEIREDO J.F.M., PRATA A. & CAPRON A. (1977)

Immunological studies in human schistosomiasis. II. Cytotoxic antibodies for *S. mansoni* schistosomula. Am. J. Trop. Med. Hyg., **26**, 248.

CAPRON M., CAPRON A., ABDEL-HAFEZ S.K., BAZIN H., JOSEPH M. & PHILLIPS S.M. (1983)

Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. J. Immunol., **131**, 1475.

CAPRON M., CAPRON A., GOETZL E.J. & AUSTEN K.F. (1981b)

Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. Nature, **289**, 71.

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

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

CAPRON M., CARLIER Y., NZEYIMANA H., MINOPRIO P., SANTORO F. & CAPRON A. (1980)

In vitro study of immunological events in human and experimental schistosomiasis : relationships between cytotoxic antibodies and circulating schistosoma antigens. Parasite Immunol., **2**, 223.

CAPRON M., KAZATCHKINE M., FISCHER E., BUTTERWORTH A.E., PRIN L. & CAPRON A. (1986)

Role of membrane receptors in eosinophil effector function. 6th International Congress of Immunology. Toronto. 6-11 July. Pp 654, n°5.26.27.

CAPRON M., NOGUEIRA-QUEIROZ J.A., PAPIN J.P. & CAPRON A. (1984b)

Interaction between eosinophils and antibodies : *in vivo* protective role against rat schistosomiasis. Cell. Immunol., **3**, 60.

CAPRON M., SPIEGELBERG H.L., PRIN L., BENNICH H., BUTTERWORTH A.E., PIERCE R.J., OUASSI M.A. & CAPRON A. (1984a)

Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. Immunol., **132**, 462.

CAPRON M., TORPIER G. & CAPRON A. (1979)

In vitro killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats : role of cytophilic antibodies. J. Immunol., **123**, 2220.

CARDOSO W. (1953)

A esquistossomiase mansonica no negro. Medicina, Cirurgia, Farmacia, **202**, 89.

CHANG T.W. & EISEN H.N. (1980)

Effects of n-tosyl-L-lysyl-chloromethylketone on the activity of cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol., **124**, 1028.

CHIORAZZI N., FOX D.A. & KATZ D.H. (1976)

Hapten-specific antibody response in mice. VI. Selective enhancement of antibody production by low doses of X-irradiation and cyclophosphamide. J. Immunol., **117**, 1629.

CLEGG J.A. & SMITHERS S.R. (1972)

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

COFFMAN R.L. & CARTY J. (1986)

A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon γ . J. Immunol., **136**, 949.

DAMIAN R.T. (1964)

Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am.Nat., **98**, 129.

DAMIAN R.T., GREENE N.D. & HUBBARD W.J. (1973)

Occurrence of mouse 2-macroglobulin antigenic determinants on *S. mansoni* adults with evidence as their nature. J. Parasitol., **59**, 64.

DAMONNEVILLE M., AURIAULT C., THOREL T., VERWAERDE C., PIERCE A., STRECKER G. & CAPRON A. (1986a)

Induction of a protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens to schistosomulum-released products : Immunochemical properties of the target antigens. Int. Archs Allergy appl. Immun., **79**, 320.

DAMONNEVILLE M., AURIAULT C., VERWAERDE C., DELANOYE A., PIERCE R. & CAPRON A. (1986b)

Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula-released products antigens (SRP-A) : role of IgE antibodies. Clin. exp. Immunol., **65**, 244.

DAMONNEVILLE M., VELGE F., VERWAERDE C., PESTEL J., AURIAULT C. & CAPRON A.

Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula-released products (SRP-A). Clin. exp. Immun. (sous presse).

DEAN D.A. (1977)

Decreased binding of cytotoxic antibody by developing *Schistosoma mansoni*. Evidence for a surface change independent of host antigen adsorption and membrane turnover. J. Parasitol., **63**, 418.

DEAN D.A., MINARD P., STIREWALT M.A., VANNIER W.E. & MURREL K.D. (1978)

Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. Am. J. Trop. Med. Hyg., **27**, 951.

DEAN D.A. & SELL K.W. (1972)

Surface antigens of *S. mansoni*. II. Adsorption of a Forssman-like antigen by schistosomula. Clin. exp. Immunol., **12**, 525.

DEAN D.A., WISTAR R. & MURREL K.D. (1974)

Combined *in vitro* effects of rat antibody and neutrophilic leucocytes on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **23**, 420.

DESSAINT J.P., BOUT D., WATTRE P. & CAPRON A. (1975a)

Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. Immunology, **29**, 813.

DESSAINT J.P., CAMUS D., FISCHER E. & CAPRON A. (1977)

Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by *Schistosoma mansoni*. Eur. J. Immunol., **7**, 624.

DESSAINT J.P., CAPRON M., BOUT D. & CAPRON A. (1975b)

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.

DIAS da SILVA W. & KAZATCHKINE M.D. (1980)

Schistosoma mansoni : activation of the alternative pathway of human complement by schistosomula. Exp. Parasitol., **50**, 278.

DING A., WRIGHT S.D. & NATHAN C. (1987)

Activation of mouse peritoneal macrophages by monoclonal antibodies to MAC-1 (Complement receptor type 3). J. Exp. Med., **165**, 763.

ELLNER J.J., OLDS G.R., LEE C.W. & KLEINHERZ M.E. (1982)

Destruction of the multicellular parasite *Schistosoma mansoni* by T lymphocytes.

J. Clin. Invest., **70**, 369.

FINKELMAN F.D., KATONA I.M., URBAN J.F., SNAPPER C.M., OHARA J.
& PAUL W.E. (1986)

Suppression of *in vivo* polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **83**, 9675.

FORD, M.J., BICLE Q.D., TAYLOR M.J. & ANDREWS B.J. (1984)

Passive transfer of resistance and the site of immune dependent elimination of the challenge infection in rats vaccinated with highly irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Parasitology, **89**, 461.

GERSHON R.K., CARTER R.L. & KONDO K. (1967)

On concomitant immunity in tumor-bearing hamsters. Nature, **213**, 674.

GODFREY R.C. & GRADIDGE C.F. (1976)

Allergic sensitization of human lung fragments prevented by saturation of IgE binding sites. Nature, **259**, 484.

GOETZL E.J. & ROCKLIN R.E. (1978)

Amplification of the activity of human leucocyte inhibitory factor (LIF) by the generation of a low molecular weight inhibitor of PMN leucocyte chemotaxis. J. Immunol., **121**, 891.

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

Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. Clin. exp. Immunol., **26**, 131.

GRZYCH J.M., CAPRON M., BAZIN H. & CAPRON A. (1982)

In vitro and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. J. Immunol., **129**, 2739.

GRZYCH J.M., CAPRON M., DISSOUS C. & CAPRON A. (1984).

Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. J. Immunol., **133**, 998.

GRZYCH J.M., CAPRON M., LAMBERT P.H., DISSOUS C., TORRES S. & CAPRON A. (1985)

An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. Nature, **316**, 74.

HERZENBERG L.A., BLACK S.J., LOKEN M.R., OKUMURA K., Van der LOO W., OSBORNE B.A., HEGWILL D., GODING J.W., GUTMAN G. & WARNER N.L. (1976). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **41**, 33.

HIMMI E.H., AURIAULT C., PIERCE R.J., JOSEPH M., TARTAR A. & CAPRON A. (1985)

Regulatory role of a peptide from the second constant domain of immunoglobulin G. II. *In vitro* effect on granuloma formation around *S. mansoni* eggs. Int. J. Immunopharmac., **7**, 231.

HIRASHIMA M., YODOI J. & ISHIZAKA K. (1980a)

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. II. IgE-specific suppressive factor with IgE-binding activity. J. Immunol., **125**, 1442.

HIRASHIMA M., YODOI J. & ISHIZAKA K. (1980b)

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. IV. Formation of IgE-binding factors in rats treated with complete Freund's adjuvant. J. Immunol., **125**, 2154.

HIRASHIMA M., YODOI J. & ISHIZAKA K. (1981)

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. V. Formation of IgE-potentiating factors by T lymphocytes from rats treated with *Bordetella pertussis* vaccine. J. Immunol., **126**, 838.

HSÜ S.L., HSÜ H.F. & OSBORNE J.W. (1969)

Immunization of rhesus monkeys against schistosome infection by cercariae exposed to high doses of X-radiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**, 1146.

HSÜ S.Y.L., LUST G.L. & HSÜ H.F. (1971)

The fate of challenge schistosome cercariae in a monkey immunized by cercariae exposed to high doses of X-irradiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **136**, 727.

HUFF T.F., UEDE T., IWATA M. & ISHISAKA K. (1983)

Modulation of IgE-binding factors. III. Switching of a T cell hybrid clone from the formation of IgE-suppressive factor in the formation of IgE-potentiating factor. J. Immunol., **131**, 1090.

HULDT G., JOHANSSON S.G.O. & LANTTO S. (1973)

Echinococcosis in Northern Scandinavia. Immune reactions to *Echinococcus granulosus* in kantokeino lapps. Arch. Environ. Health, **26**, 36.

HUSSAIN R. & OTTESEN E.A. (1986)

IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. J. Immunol., **136**, 1859.

INCANI R.N. & Mc LAREN D.J. (1981)

Neutrophil-mediated cytotoxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro* : studies on the kinetics of complement and/or antibody dependent adherence and killing. Parasite Immunol., **3**, 107.

ISHIZAKA K. (1976)

Cellular events in the IgE antibody response. Adv. Immunol., **23**, 1.

ISHIZAKA K. (1985)

Isotype-specific T cell factors for the IgE response. CRC Critical reviews in Immunol., **5**, 229.

IWATA M., AKASAKI M. & ISHIZAKA K. (1984)

Modulation of the biological activation of IgE-binding factors. VI. The activation of phospholipase by glycosylation-enhancing factor. J. Immunol., **133**, 1505.

IWATA M., MUNOZ J.J. & ISHIZAKA K. (1983)

Modulation of the biological activation of IgE-binding factors. IV. Identification of glycosylation-enhancing factor as a kallikrein-like enzyme. J. Immunol., **131**, 1954.

JAMES S.L., LABINE M. & SHER A. (1981)

Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with irradiated cercariae. I. Analysis of antibody and T lymphocyte responses in mouse strains developing different levels of immunity. Cell. Immunol., **65**, 75.

JARRETT E.E.E. (1972)

Potential of reagenic (IgE) antibody to ovalbumin in the rat following sequential trematodes and nematode infections. Immunol., **22**, 1099.

JARRETT E.E.E. (1976)

Production of IgE and reagin antibody in rats in relation to worm infection. Dans : Molecular and Biological Aspects of the Acute Allergic reaction. Eds S.G.O. JOHANSSON, K. STRANDBERG & B. UVNAS. Pp 105, Plenum, New York.

JARRETT E.E.E. & BAZIN H. (1974)

Evaluation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. Nature, **251**, 613.

JARRETT E.E.E. & FERGUSON A. (1974)

Effect of T cell depletion on the potentiated reagin response. Nature, **250**, 420.

JARRETT E.E.E., HENDERSON D., RILEY P. & WHITE R.G. (1972)

Effect of various adjuvant regimens and of nematode infection on the reaginic antibody response to egg-albumin in the rat. Int. Archs Allergy appl. Immun., **42**, 775.

JARRETT E.E.E. , Mc KENZIE S. & BENNICH H. (1980)

Parasite-induced "non-specific" IgE does not protect against allergic reactions. Nature, **283**, 302.

JARRETT E.E.E. & STEWARD D. (1972)

Potentialiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. Simultaneous potentialiation of separate reagins. Immunology, **23**, 749.

JARRETT E.E.E. & STEWARD D. (1973)

Potentialiation of rat reaginic (IgE) antibody by *Nippostrongylus brasiliensis* infection : effect of modification of life cycle of the parasite in the host. Clin. exp. Immunol., **15**, 79.

JOHANSSON S.G.O., MELLBIN T. & VALHQUIST B. (1968)

Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentration of immunoglobulin E (IgND). Lancet, **1**, 1118.

JOSEPH M., AURIAULT C., CAPRON A., VORNG H. & VIENS P. (1983)

A role for platelets in IgE-dependent killing of schistosomes. Nature, **303**, 810.

JOSEPH M., CAPRON A., BUTTERWORTH A.E., STURROCK R.F. & HOUBA V. (1978)

Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro* : induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. Clin. exp. Immunol., **33**, 48.

JOSEPH M., DESSAINT J.P. & CAPRON A. (1977)

Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. Cell. Immunol., **34**, 247.

KAGAN I.G. (1958)

Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. Rice. Inst. Pamph., **45**, 151.

KASSIS A.I., AIKAWA M. & MAHMOUD A.A.F. (1979)

Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., **122**, 398.

KATZ D.H., BARGATZE R.F., BOGOWITZ C.A. & KATZ K. (1979)

Regulation of IgE antibody production by serum molecules. IV. Complete Freund's adjuvant induces both enhancing and suppressive activities detectable in the serum of low and high responder mice. J. Immunol., **122**, 2184.

KATZ D.H. & TUNG A.S. (1978)

Regulation of IgE antibody production by serum molecules. II. Strain-specificity of the suppressive activity of serum from complete Freund's adjuvant immune low responder mouse donors. J. Immunol., **120**, 2060.

KELLERMEYER R.W., WARREN K.S., WALDMANN T.S., COOK J.A. & JORDON P. (1973)

Concentration of serum immunoglobulins in St Lucians with schistosomiasis *mansoni* compared with matched uninfected St Vincentians. J. Infect. Dis., **127**, 557.

KHALIFE J., CAPRON M., CAPRON A., GRZYCH J.M., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE D.W. & OUMA J.H. (1986)

Immunity in human schistosomiasis *mansoni*. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. J. Exp. Med., **164**, 1626.

KIGONI E.P., ELSA P.P.X., LENZI H.L. & DESSEIN A.J. (1986)

IgE antibody and resistance to infection. II. Effect of IgE suppression on the early and late skin reaction and resistance of rats to *Schistosoma mansoni* infection. Eur. J. Immunol., **16**, 589.

KÖHLER C. & MILSTEIN C. (1975)

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, **26**, 495.

KOJIMA S., YOGOGAWA M. & TADA T. (1972)

Raised levels of serum IgE in human helminthiases. Amer. J. Trop. Med. Hyg., **21**, 913.

LANGLET C., MAZINGUE C., DESSAINT J.P. & CAPRON A. (1984)

Inhibition of primary and secondary IgE response by a schistosome-derived inhibitory factor. Int. Archs Allergy appl. Immunol., **73**, 225.

LEHRER S.B., Mc CANTS M.L., FARRIS P.N. & BAZIN H. (1981)

Passive cutaneous anaphylaxis inhibition : evidence for heterogeneity in IgE mast cell interaction. Immunol., **44**, 711.

Mac KEAN J.R. & ANSWAR A.R.E. (1981)

Schistosoma mansoni : complement and antibody damage mediated by eosinophils and neutrophils, in killing schistosomula *in vitro*. Exp. Parasitol., **51**, 307.

Mac KENZIE C.D., RAMALHO-PINTO F.J., Mc LAREN D.J. & SMITHERS S.R. (1977)

Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *S. mansoni* *in vitro*. Clin. exp. Immunol., **30**, 97.

Mc LAREN D.J., PEARCE E.J. & SMITHERS S.R. (1985)

Site potential for challenge attrition in mice, rats and guinea pigs vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol., **7**, 29.

MADDISON S.E., NORMAN L., GEIGER S.J. & KAGAN I.G. (1970)

S. mansoni infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected reexposed and antigen sensitized animals. J. Parasitol., **56**, 1058.

MAERTENS C.L., JARDIEU P., TROUNSTINE M.L., STUART S.G., ISHIZAKA K. & MOORE K.W. (1987)

Potentiating and suppressive IgE-binding factors are expressed by a single clone gene. Proc. Natl. Acad.Sci., **84**, 809.

MAHMOUD A.A.F., PETERS P.A., CIVIL R.H. & REMINGTON J.S. (1979)

In vitro killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by BCG and *C. parvum* activated macrophages. J. Immunol., **122**, 1655.

MAHMOUD A.A.F., WARREN K.S. & PETERS P.A. (1975)

A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by anti-eosinophil serum. J. Exp. Med., **142**, 805.

MARCELLETI J.F. & KATZ D.H. (1984a)

FcRE⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. II. FcRE⁺ B lymphocytes initiate a cascade of cellular and molecular interactions that control FcRE expression and IgE production. J. Immunol., **133**, 2829

MARCELLETI J.F. & KATZ D.H. (1984b)

FcRE⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. III. Suppressive factor of allergy (SFA) is produced during the *in vitro* expression cascade and displays corollary physiologic activity *in vivo*. J. Immunol., **133**, 2837.

MARCELLETI J.F. & KATZ D.H. (1984c)

FcRE⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. IV. Delineation of target cells and mechanisms of action of SFA and EFA in inhibiting *in vitro* induction of FcRE expression. J. Immunol., **133**, 2845.

MARCELLETI J.F. & KATZ D.H. (1984d)

FcRE⁺ lymphocytes and regulation of the IgE antibody system. I. A new class of molecules, termed IgE-induced regulants (EIR), which modulate FcRE expression by lymphocytes. J. Immunol., **133**, 2821.

MAZINGUE C., CAMUS D., DESSAINT J.P., CAPRON M. & CAPRON A. (1980)

In vitro and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. Int. Archs Allergy appl. Immun., **63**, 178.

MAZINGUE C., DESSAINT J.P., SCHMITT-VERHULST A.M., CEROTTINI J.C. & CAPRON A. (1983)

Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome-derived inhibitory factor is independent of an inhibition of the production of interleukine 2. Int. Archs Allergy appl. Immun., **72**, 22.

MAZINGUE C., STADLER B.M., QUATANNENS B., CAPRON A. & de WECK A. (1986)

Schistosome-derived inhibitory factor : an immunosuppressive agent preferentially active on T lymphocytes. Int. Archs Allergy appl. Immun., **80**, 347.

MERRET T.G., MERRET J. & COOKSON J.B. (1976)

Allergy and parasites : the measurement of total and specific IgE levels in urban and rural communities in Rhodesia. Clin. Allergy, **6**, 131.

MIKI Y., KISHI H., MURAGUCHI A., KISHIMOTO S. YAMAMURA Y. & KISHIMOTO T. (1982)

The requirement for esterase activation in T-cell replacing factor (TRF)-induced IgG production in a human B blastoid cell line. J. Immunol., **128**, 675.

MOSER G., WASSON D. & SHER A. (1980)

Studies of the antibody-dependent killing of schistosomula of *S. mansoni* employing haptenic target antigens. I. Evidence that the loss in susceptibility of immune damage undergone by developing schistosomula involves a change unrelated to the masking of parasite antigens by host molecules. J. Exp. Med., **152**, 41.

MOSSMAN T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W., GIEDLIN M.A. & COOFMAN R.L. (1986)

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol., **136**, 2348.

OLGIVIE B. (1964)

Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasite. Nature, **204**, 91.

OLGIVIE B. & JONES V.E. (1969)

in Cellular and Humoral Mechanisms of Anaphylaxis and Allergy. p. 13. (Ed. : Movat H.Z.), Karger S., Basel, New York.

ORR T.S.C. & BLAIR A.M.J. (1969)

Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. Life Sci., **8/II**, 1077.

ORR T.S.C., RILEY P.A. & DOE J.E. (1971)

Potentiated reagin response to egg albumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. II. Time course of the reagin response. Immunology, **20**, 185.

ORR T.S.C., RILEY P.A. & DOE J.E. (1972)

Potentiated reagin response to egg albumin in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. III. Further studies on the time course of the reagin response. Immunology, **22**, 211.

OTTESEN E.A., KUMARASWAMI V., PARANJAPE R., POINDEYTER R.W. & TRIPATHY S.P. (1981)

Naturally occurring blocking antibodies modulate immediate hypersensitivity response in human filariasis. J. Immunol., **127**, 2014.

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 schistosomula. Amer. J. Trop. Med. Hyg., **26** (Sup.), 134.

PANCRE V., AURIAULT C., JOSEPH M., CESBRON J.Y., KUSNIERZ J.P. & CAPRON A. (1986)

A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. J. Immunol., **137**, 685.

PANCRE V., JOSEPH M., MAZINGUE C., WIETZERBIN N.J., CAPRON A. & AURIAULT C. (1987)

Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines : role of gamma interferon. J. Immunol., **138**, 4490.

PASTERNAK M.S. & EISEN H.N. (1985)

A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. Nature, **314**, 743.

PAUWELLS R., BAZIN H., PLATTEAU B. & Van der STRAETEN M. (1979)

The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies. Ann. Immunol., Paris, **130C**, 49.

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

Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat : measurement of immunity by the lung recovery technique. Parasitology, **69**, 349.

PHILLIPS S.M., BENTLEY A.G., LINETTE G., DOUGHTY B.L. & CAPRON M. (1983)

The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance. J. Immunol., **131**, 1466.

RAMALHO-PINTO F.J., Mc LAREN D.J. & SMITHERS S.R. (1978)

Complement-mediated killing of schistosomula of *S. mansoni* by rat eosinophil *in vitro*. J. Exp. Med., **147**, 147.

REINER G. & ZAHNER H. (1986)

IgE responses of Wistar rats to *Schistosoma mansoni* infections. Int. Archs Allergy appl. Immun., **79**, 90.

ROSS G.D., GAIN J.A. & LACHMAN P.J. (1985)

Membrane complement receptor type three (CR3) has lectine-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymozan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. J. Immunol., **134**, 3307.

ROUSSEAUX R., BOUT D., BAZIN H. & CAPRON A. (1980)

Homocytropic antibody response during murine schistosomiasis. A follow up study of both total immunoglobulins and *Schistosoma mansoni* specific antibodies. Int. Archs Allergy appl. Immun., **62**, 86.

ROUSSEAUX-PREVOST R., CAPRON M., BAZIN H. & CAPRON A. (1978)

IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S. mansoni* : A follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. Immunol., **35**, 33.

ROUSSEAU-PREVOST R., DESSAINT J.P. & CAPRON A. (1982)

Potentiated reagin response to ovalbumin in *Schistosoma mansoni* infected rats and in rats treated with a soluble product from adult worms. Int. Archs Allergy appl. Immun., **67**, 187.

RUMJANEK F.D. & Mc LAREN D.J. (1981)

Schistosoma mansoni : modulation of schistosomular lipid composition by serum. Mol. Biochem. Parasitol., **3**, 239.

SAMUELSON J.C. & CAULFIELD J.P. (1982)

Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Cell Biol., **94**, 363.

SAMUELSON J.C., SHER A. & CAULFIELD J.P. (1980)

Newly transformed schistosomula spontaneously lose surface antigens and C3 receptor sites during culture. J. Immunol., **124**, 2055.

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.

SANTORO F., PESTEL J., LEPRESLE T., LIEBART M.C. & CAPRON A. (1980)

Schistosoma mansoni anticomplementary antigens (SACA). Detection in schistosomula and in adult worms. Immunol. Letters, **2**, 43.

SHER A., HALL B.F. & VADAS M.A. (1978)

Acquisition of murine histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med., **148**, 46.

SHER A., SMITHERS S.R. & Mc KENZIE C.D. (1975)

Passive transfer of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in laboratory mice. Parasitology, **70**, 347.

SIMPSON A.J.G. & CIOLI D. (1982)

The key of the schistosome's success. Nature, **296**, 809.

SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1965a)

Acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the albino rat. Parasitology, **55**, 711.

SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1965b)

Naturally acquired resistance to experimental infection of *S. mansoni* in the rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). Parasitology, **55**, 701.

SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1967)

Resistance to experimental infection by *S. mansoni* in rhesus monkeys induced by the transfer of adult worms. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg., **61**, 517.

SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1969)

Immunity in schistosomiasis. Ann. N. Y. Acad. Sci., **160**, 826.

SMITHERS S.R., TERRY R.J. & HOCKLEY D.J. (1969)

Host antigens in schistosomiasis. Pro. R. Soc., ser.B, **171**, 483.

SPIEGELBERG H.L., O'CONNOR R.D., SIMON R.A. & MATHISON D.A. (1979)

Lymphocytes with immunoglobulin E-Fc receptors in patients with atopic disorders. J. Clin. Invest., **64**, 714.

STROMBERG B.E. (1980)

Potential of the reaginic (IgE) antibody response to ovalbumine in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. J. Immunol., **125**, 833.

SUEMURA M., YODOI J., HIRASHIMA M. & ISHIZAKA K. (1980)

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanisms of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor. J. Immunol., **125**, 148.

TADA T., TANIGUCHI M. & OKUMURA K. (1971)

Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. II. Effect of X-irradiation. J. Immunol., **106**, 1012.

TORPIER G., CAPRON A. & OUASSI M.A. (1979)

Receptor for IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. Nature, **278**, 447.

TUNG A.S.N., CHIORAZZI N. & KATZ K. (1978)

Regulation of IgE antibody production by serum molecules. I. Serum from complete Freund's adjuvant immune donors suppresses irradiation-enhanced IgE production in low responder mouse strains. J. Immunol., **120**, 2050.

TURNER K.J., QUINN E.H. & ANDERSON H.R. (1978)

Regulation of asthma by intestinal parasites. Investigation of possible mechanisms. Immunology, **35**, 281.

UEDE T., HIRATA F., HIRASHIMA M. & ISHIZAKA K. (1983)

Modulation of the biological activities of IgE-binding factors. I. Identification of glycosylation inhibiting factor as a fragment of lipomodulin. J. Immunol., **130**, 878.

UEDE T., HUFF T.F. & ISHIZAKA K. (1982)

Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. V. Effect of adjuvant for the priming immunization on the nature of IgE-binding factors formed by antigenic stimulation. J. Immunol., **129**, 1384.

UEDE T. & ISHIZAKA K. (1984)

IgE-binding factors from mouse T lymphocytes. II Strain differences in the nature of IgE-binding factors. J. Immunol., **133**, 359.

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

A new method for purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., **122**, 1228.

VON LICHTENBERG F., SHER A., GIBBONS N. & DOUGHTY B.L. (1976)

Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin immune to *Schistosoma mansoni*. Amer. J. Pathol., **84**, 479.

WATANABE N., KOJIMA S. & OVARY Z. (1976)

Suppression of IgE antibody production in SJL mice. I. Nonspecific T cells.
J. Exp. Med., **143**, 833.

YODOI J., HIRASHIMA M., HIRATA F., De BLAS A.L. & ISHIZAKA K.
(1981a)

Lymphocytes bearing Fc receptor for IgE. VII. Possible participation of phospholipase A2 in the glycosylation of IgE-binding factors. J. Immunol., **127**, 477.

YODOI J., HIRASHIMA M. & ISHIZAKA K. (1980)

Regulatory role of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. II. Glycoprotein nature and source of IgE-potentiating factor. J. Immunol., **155**, 1436.

YODOI J., HIRASHIMA M. & ISHIZAKA K. (1981b)

Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. V. Effect of tunicamycin on the formation of IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor by ConA activated lymphocytes. J. Immunol., **126**, 877.

YODOI J., HIRASHIMA M. & ISHIZAKA K. (1981c)

Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. VI. Suppressive effect of glucocorticoids on the expression of FcE receptors and glycosylation of IgE-binding factors. J. Immunol., **127**, 471.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
<u>GENERALITES</u>	13
INTRODUCTION	14
CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION PAR <i>S. MANSONI</i>	16
<u>I-LE CYCLE DE <i>S. MANSONI</i></u>	
<u>II-L'IMMUNITE A <i>S. MANSONI</i></u>	18
A -IMMUNITE NATURELLE	
B - IMMUNITE ACQUISE	19
<u>1-Concept de l'immunité concomitante</u>	
a-Définition	
b-Support de l'immunité concomitante	20
<u>2-La réponse humorale</u>	21
<u>3-Les mécanismes effecteurs spécifiques de l'immunité</u>	
a-Cytotoxicité par anticorps létaux	
b-Cytotoxicité cellulaire	22
-- Cytotoxicité des neutrophiles	23
-- Cytotoxicité des macrophages dépendante d'IgE	
-- Cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps	24
-- Cytotoxicité des plaquettes dépendante d'IgE	25
-- Récepteurs membranaires impliqués dans la cytototoxicité dépendante d'IgE	26
-- Pertinence <i>in vivo</i> des mécanismes effecteurs	27
<u>4-Les mécanismes effecteurs non spécifiques</u>	29
<u>5-Mécanismes d'évasion et de régulation de la réponse immune</u>	30
<u>par le parasite</u>	
a-Modification de la surface du parasite	31
-- Acquisition d'antigènes d'hôte	

-- Modulation membranaire	32
b-Régulation de la réponse immune par des facteurs d'origine parasitaire	33
-- Régulation de l'activité lymphocytaire	
-- Régulation de l'activité des macrophages	34
-- Régulation de l'activité des éosinophiles	
* par le SDIF	
* par des enzymes de schistosomes	35
* par des anticorps bloquants	
REGULATION DE LA REPOSE IgE	37
<u>I- CARACTERISTIQUES GENERALES</u>	
A - DISSOCIATION ENTRE LA REPOSE ANTICORPS IgE et IgG	
B - LA REGULATION SPECIFIQUE D'ISOTYPE IgE	38
<u>1-Mise en évidence</u>	
<u>2-Facteurs mis en évidence par l'équipe de KATZ</u>	
<u>3-Facteurs mis en évidence par l'équipe d'ISHIZAKA</u>	41
a-Corrélation entre la réponse IgE et la nature des IgE-BF produites	43
b-Origines et propriétés des IgE-BF	44
-- "IgE-potentiating factor"	
-- "IgE-suppressive factor"	
c-Comparaison de l'IgE-PF et de l'IgE-SF	
d-Mécanisme de détermination de la nature des IgE-BF	46
<u>4-Régulation de la réponse IgE par l'interleukine 4 et l'interféronγ</u>	47

<u>II-REGULATION DE LA REPONSE IgE AU COURS DE L'INFECTION</u>	49
<u>PAR S. MANSONI</u>	
A - PHENOMENE DE POTENTIALISATION	
B - ASSOCIATION NEGATIVE ENTRE PARASITOSE ET ALLERGIE	51
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	53
ARTICLE 1 : Les allergènes de <i>Schistosoma mansoni</i> . I - Comparaison de la réponse IgE au cours de l'infection humaine et expérimentale dirigée contre des allergènes de produits d'incubation de vers adultes.	55
ARTICLE 2 : Les anticorps IgE anti-SRP (<i>S. mansoni</i> schistosomula-released products) sont cytotoxiques pour le schistosomule.	66
ARTICLE 3 : Etude de la réponse anticorps IgG anti-SRP (<i>S. mansoni</i> schistosomula-released products) au cours de l'infection humaine et expérimentale.	75
ARTICLE 4 : Production d'anticorps monoclonaux anti- <i>Schistosoma mansoni</i> . Etude préliminaire de leurs activités biologiques.	87
ARTICLE 5 : Propriétés fonctionnelles d'un anticorps monoclonal IgE anti- <i>Schistosoma mansoni</i> .	87
ARTICLE 6 : Rôle des sérine protéases de <i>Schistosoma mansoni</i> dans la régulation de la réponse IgE.	99
ARTICLE 7 : Propriétés des sérine protéases du schistosomule de <i>S. mansoni</i> impliquées dans la régulation de la synthèse d'IgE.	109
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	132
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	145