

50376
1987
331

50376
1987
331

N° d'Ordre : 757

UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES de LILLE

FLANDRE ET ARTOIS

THESE

présentée à l'Université de LILLE I

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



par

Jean-Marie GRZYCH

*

Approche isotypique et idiotypique de la réponse immune spécifique de la glycoprotéine 38 kDa du *Schistosoma mansoni*

*

Présentée le 27 Novembre 1987 devant la
commission d'examen



Membres du jury: Président M:J.MONTREUIL
Rapporteurs M:A.CAPRON
M^{me}:M.CAPRON
M^{me}:G.SPIK
M:P.H.LAMBERT
Examinateur M:J.KREMBEL

A mes parents,

à Dominique.

A mon directeur de recherche,

Monsieur le professeur André CAPRON

Vous m'avez accueilli dans votre groupe de recherche et honoré de votre confiance. Que ce travail soit le témoignage modeste de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon Président de thèse,

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL.

Qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde gratitude .

A Madame le Docteur Monique CAPRON.

Vous m'avez accueilli au sein de votre remarquable groupe de recherches tout imprégné de votre dynamisme et de votre enthousiasme. Permettez moi de joindre à mes sentiments de grande admiration , l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Paul-Henri LAMBERT.

Vous m'avez initié aux mystères de l'idiotypie et avez accepté de juger ce travail, soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

A Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK.

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à la constitution de ce jury
veuillez accepter l'expression de ma très sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean KREMBEL.

Qui m'a fait l'honneur de participer à la constitution de ce jury,
je tiens à exprimer ma profonde et sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail.

- H. BAZIN (Université de Louvain, Bruxelles).
- A.E. BUTTERWORTH (Université de Cambridge, U.K.)
- P. CREPIEUX (C.I.B.P., Lille.)
- C. DISSOUS (C.I.B.P., Lille.)
- M. JOSEPH (C.I.B.P., Lille.)
- J. KHALIFE (C.I.B.P., Lille.)
- G. OVLAQUE (C.I.B.P., Lille.)
- C. VERWAERDE (C.I.B.P., Lille.)

Je tiens tout particulièrement à remercier M Stéphane TORRES qui m'a toujours témoigné une loyale amitié et qui par son expertise m'a efficacement secondé dans la réalisation technique de ce travail.

Ainsi que:

- A. CARON.
- C. COLSON.
- M.C. COTTREZ DERVILLE.
- A. DEGROS.
- J. DERICK.
- P. FRESSANCOURT.
- S. LAFITTE.
- M.F. MASSARD.
- J.P. PAPIN.
- C. DROLEZ.
- A.M. SCHACHT.
- S. VAN WIGENE.

*Ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité mixte INSERM U 167 - CNRS 624., Institut Pasteur de Lille, sous la
direction du Professeur André CAPRON.*

Ces travaux ont bénéficié de l'appui financier de:

- I.N.S.E.R.M.
- C.N.R.S
- O.M.S. (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases)
- Edna Mc Connell Clark Foundation.
- C.E.E.

Nos travaux ont donné lieu aux articles et communications suivantes:

Articles originaux:

Verwaerde C., Grzych J.M., Bazin H., Capron M. & Capron A. 1979. Production d'anticorps anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. *C.R. Acad. Sci.*, 289 : 725-727.

Bazin H., Grzych J.M., Verwaerde C. & 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. 1982. Production d'anticorps monoclonaux contre *Schistosoma mansoni*. Etude de leurs activités biologiques. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur de 3ème cycle en Biochimie présentée le 30 juin 1982, à l'Université de Lille I.

Dissous C., Grzych J.M. & Capron A. 1982. *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. *J. Immunol.*, 129 : 2232-2234.

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 : 2739-2743.

Des Moutis I., Ouassis A., Grzych J.M., Yarzabal L., Haque A. & Capron A. 1983. *Onchocerca volvulus* : Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 : 533-542.

Grzych J.M., Capron M., Dissous C. & Capron A. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 133 : 998-1004.

Jouvin-Marche E., Grzych J.M., Boullet C., Capron M. & Benveniste J. 1984. Formation of PAF-acether by human eosinophils. *Fed. Proc.*, 43 : 1924 (Résumé).

Khalife J., Capron M., Grzych J.M., Bazin H. & Capron A. 1985. Extracellular release of rat eosinophil-peroxidase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J. Immunol.*, 134 : 1968-1974.

Verwaerde C., Auriault C., Damonneville M., Grzych J.M., Pierce R. & Capron A. 1985. IgG response of rats and humans to the released products of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 90 : 509-518.

Dissous C., Grzych J.M. & Capron A. 1985. Biochemical studies of the 30-40 kD *Schistosoma mansoni* surface antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16 : 277-288.

Khalife J., Capron M., Grzych J.M., Bazin H. & Capron A. 1985. Fc receptors on rat eosinophils : isotypic regulation of cell activation. *J. Immunol.*, 135 : 2780-2784.

Grzych J.M., Capron M., Lambert P.H., Dissous C., Torres S. & Capron A. 1985. An anti-idiotope vaccine against schistosomiasis. *Nature*, 316 : 74-76.

Balloul J.M., Pierce R., Grzych J.M. & Capron A. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kDa antigen present in the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17 : 105-114.

Dissous C., Grzych J.M. & Capron A. 1986. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, 332 : 443-445.

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 : 1626-1640.

Butterworth A.E., Bensted-Smith A., Capron A., Capron M., Dalton P.R., Dunne D.W., Grzych J.M., Kariuki H.C., Khalife J., Koech D., Mugambi M., Ouma J.H., Arap Sionok T.K. & Sturrock R.F. 1987. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*.94:281.

Balloul J.M., Grzych J.M., Pierce R.J. & Capron A. 1987. A purified 28 kDa protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138:3448.

Grzych J.M., Dissous C., Capron M., Torres S., Lambert P.H. & Capron A. 1987. *Schistosoma mansoni* shares with keyhole limpet hemocyanin a protective carbohydrate epitope. *J. Exp. Med.* 165 : 865-878.

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 against schistosomiasis. *Nature* 326 : 149.

Revues générales et communications

Verwaerde C., Grzych J.M., Bazin H., Capron M. & Capron A. 1979. Production of monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. Preliminary studies on their biological activities. Proceedings of Symposium "The use of monoclonal antibodies in the study of parasitic diseases" held in Lausanne, Switzerland, 1-5 october 1979 (ed. UNDP, World Bank/WHO), pp. 139-145.

Grzych J.M., Capron M., Verwaerde C., Nogueira-Queiroz J.A., Bazin H. & Capron A. 1981. Monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. A summary of the recent progresses. Proceedings of a Symposium held at the National University of Singapore, 19-23 october 1981. (Ed. UNDP, World Bank/WHO, Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, 1982), pp. 105-109.

des Moutis I., Ouaissi A., Grzych J.M., Yarzabal L., Haque A. & Capron A. 1982. *Onchocerca volvulus* : Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. International Symposium on monoclonal antibodies, Venice, 14.6.1982 (G. Cini Foundation, Italy), p. 48.

Capron A., Grzych J.M., Capron M. & Verwaerde C. 1982. Apport des anticorps monoclonaux à l'analyse des mécanismes immunitaires et au diagnostic des maladies parasitaires. Journée Scientifique de la Société Française de Biologie Clinique, Hôpital Necker, 10 décembre 1982. "Les Hybridomes : leurs applications en Biologie Clinique".

Dissous C. , Grzych J.M. & Capron A. 1983. Schistosome antigens defined by protective monoclonal antibodies. UCLA Symposia, Los Angeles, 30 janvier - 4 février 1983.

Capron A. & Grzych J.M. 1983. Les hybridomes et leurs applications. Santé du Monde (Immunologie), 18-21 Novembre 1983.

Capron A. & Grzych J.M. 1983. Making hydridomas work for us. World Health (Immunology), November 18-21, 1983.

Grzych J.M., Capron M., Lambert P.H., Dissous C., Torres S. & Capron A. 1985. Prodution d'anticorps anti-idiotypes contre un anticorps monoclonal protecteur spécifique de *Schistosoma mansoni*. Réunion Scientifique de la Société Française d'Immunologie (SFI), 30-31 mai 1985, Grenoble.

Capron A., Grzych J.M., Balloul J.M., Dissous C., Capron M., Auriault C. , Damonneville M., Verwaerde C. & Pierce R. 1985. Protective antigens in experimental schistosomiasis. The Immunology and Molecular Biology of Schistosomiasis. Londres, 10 juin 1985.

Capron A., Grzych J.M., Balloul J.M., Dissous C., Capron M., Auriault C., Damonneville M., Verwaerde C. & Pierce R. 1985. New trends in vaccine development against schistosomiasis. VIIth International Conference on the global impacts of applied microbiology. Helsinki, 12-16 août 1985 (Abstract).

Capron A., Grzych J.M., Balloul J.M., Dissous C., Capron M., Auriault C., Damonneville M., Verwaerde C. & Pierce R. 1985. Protective antigens in experimental schistosomiasis. Meeting on the "Molecular Biology of Schistosomes", Boston, Massachussetts, 1-4 décembre 1985.

A. Capron, J.M. Grzych, J.M. Balloul, C. Dissous, M. Capron, C. Auriault, M. Damonneville, C. Verwaerde & R.J. Pierce. 1986. Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in regulation of IgE synthesis. TDR Meeting on "Immunological intervention in Human schistosomiasis". O.M.S. Genève, 9 - 11 octobre 1986.

A. Capron, J.M. Balloul, R.J. Pierce, J.M. Grzych & C. Dissous. 1986. Molecular approaches towards vaccine against schistosomes. International Symposium "Parasitology and Tropical diseases : Present frontiers and future trends" Hambourg, 4 - 5 septembre 1986.

Grzych J.M., Capron M., Khalife J., Dissous C. & Capron A. 1986. Functions of a 38 kDa glycoprotein in the immune response to *Schistosoma mansoni*. 6th International Congress of Immunology, Toronto (6-11 july 1986), p. 627, n° 5.22.3.

Cesbron J.Y., Hayasaki M., Lutsch C., Joseph M., Grzych J.M., Wandji K., Karam M. & Capron A. 1986. Anti-idiotype antibodies as specific antigen signal for the microfilaricidal cytotoxicity of DEC-treated platelets. 6th International Congress of Immunology, Toronto (Canada) (6-11 july 1986), p. 637, n° 5.25.17.

Butterworth A.E., Bensted-Smith R., Capron A., Capron M., Dunne D., Grzych J.M., Koech D., Mugambi M., Ouma J., Siogok T., Sturrock R. 1986. Blocking antibodies in human schistosomiasis. 6th International Congress of Immunology, Toronto (Canada) (6-11 july 1986), p. 635, n° 5.25.5.

Capron A. & Grzych J.M. 1986. Les anticorps monoclonaux en Parasitologie. Biofutur, mars 1986, 79-82.

Dessaint J.P., Grzych J.M., Balloul J.M., Dissous C., Pierce R., Auriault C., Damonneville M., Khalife J., Capron M. & Capron A. 1986. Defined-antigen vaccine for schistosomiasis : research coordination meeting on the use of radiation and radionuclear in the development of a defined vaccine against schistosomiasis. Brisbane, Australia, 25-28 august, 1986.

Khalife J., Capron M., Grzych J.M. & Capron A. 1986. Regulation of eosinophil-mediated cytotoxicity by IgM blocking antibodies. Immunobiology, 173 : 387 (Abstract).

Grzych J.M., Capron A., Dissous C., Capron M. & Lambert P.H. 1986. A protective carbohydrate epitope of *Schistosoma mansoni* major immunogen is expressed by Keyhole limpet hemocyanin (KLH). Immunobiology, 173 : 245-246 (Abstract).

J.M. Balloul, P. Sondermeyer, M. Capron, J.M. Grzych, J.P. Lecocq & A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen against schistosomiasis. Molecular Parasitology Symposium, Hollande, 23 avril 1987.

Capron A., Grzych J.M., Balloul J.M., Dissous C., Capron M., Auriault C., Damonneville M., Verwaerde C. & Pierce R. 1987. Protective antigen in experimental schistosomiasis. Meeting O.M.S., Mai 1987. *Acta tropica* 44 :63.

Capron M., Capron A., Khalife J., Butterworth A.E. & Grzych J.M. Blocking antibodies and vaccine strategy in schistosomiasis. 1987. TDR Meeting on "Immunological Intervention in Human Schistosomiasis", O.M.S., Geneva, 26-28 mai 1987. *Acta tropica*.44:55.

Del Giudice G., Grzych J.M., Capron M., Capron A. & Lambert P.H.
1987. Problems with anti-parasite vaccines and potential use of anti-idiotypes. *In :*
Vaccines. New Concepts and Developments. Longman Group Limited, Harlow, U.K.,
sous presses.

Grzych J.M., Del Guidice G., Capron M., Capron A. et Lambert P.H. 1987. Can anti-idiotype vaccine help to circumvent parasite escape mechanisms?.
Monographs in allergy. sous presses.

SOMMAIRE.

<u>RESUME:</u>	21
<u>INTRODUCTION GENERALE:</u>	22
<u>CHAPITRE I: L'IMMUNITE DANS LA SCHISTOSOMIASE:</u>	24
<u>CHAPITRE II : IDIOTYPIE, ANTI-IDIOTYPIE ET IMMUNISATION</u> <u>ANTI- IDIOTYPIQUE :</u>	53
<u>CHAPITRE III: TRAVAUX EXPERIMENTAUX:</u>	88
<u>CHAPITRE IV: DISCUSSION ET CONCLUSION:</u>	162
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:</u>	181
<u>TABLE DES MATIERES:</u>	209

-RESUME-

L'application de la technique d'hybridation cellulaire dans le domaine de la schistosomiase, a permis la caractérisation d'un antigène 38kDa du *Schistosoma mansoni*. Cet antigène de nature glycoprotéique représente l'un des immunogènes majeurs de différents systèmes d'infection expérimentale et humaine.

L'étude des propriétés biologiques et fonctionnelles de deux anticorps monoclonaux d'isotypes respectif IgG2a et IgG2c spécifiques de cette molécule ont permis de définir sa capacité à induire la production d'anticorps effecteurs en présence d'éosinophiles et d'anticorps bloquant cette activité.

Ces investigations sont à l'origine de la démonstration chez l'homme d'anticorps d'isotype IgM doués d'activité bloquante vis-à-vis du rôle effecteur d'anticorps d'isotype IgG effecteurs.

Le rôle protecteur de l'épitope défini sur la glycoprotéine 38 kDa par l'anticorps monoclonal d'isotype IgG2a a été vérifié par la production d'anticorps anti-idiotypiques qui miment certains paramètres de l'infection par *S.mansoni*.

Enfin la démonstration de la répartition ubiquitaire de cet épitope oligosaccharidique sur des structures moléculaires présentes sur différents stades de maturation du parasite comme sa caractérisation sur différents mollusques d'eau douce ou marin, hôtes ou non hôtes des schistosomes pose le problème de la signification biologique d'une telle observation.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies parasitaires posent au niveau mondial l'un des problèmes les plus aigus de santé publique, on estime en effet à plus de 2 milliards le nombre d'individus touchés par ce redoutable fléau. Outre les aspects humanitaires, ces infections revêtent une connotation sociale et économique dramatique puisqu'elles représentent une entrave au développement des pays où elles sévissent (pays généralement regroupés sous le terme de nations en voie de développement). D'une manière presque contradictoire les progrès de la technologie par la multiplication des barrages et l'élaboration de programmes d'irrigation ont sensiblement contribué à l'extension de ces maladies, par la dissémination des hôtes intermédiaires vecteurs.

Les efforts engagés par le passé dans le contrôle de ces infections se sont surtout orientés vers la chimiothérapie et la destruction des hôtes intermédiaires. Pourtant l'apparition d'insectes vecteurs ou de parasites résistants à ces agents chimiques, le coût élevé de ces campagnes, ainsi que la fréquence de réinfection des populations autochtones (villages proches des sites d'infections) ont considérablement hypothéqué le succès de tels programmes. Aussi la mise au point de méthodes d'immunoprophylaxie efficaces reste le principal espoir dans la limitation de ces infections et justifie de fait les investissements considérables consentis depuis quelques années.

L'étude des maladies parasitaires a connu au cours de cette dernière décennie une extraordinaire mutation, qui l'a conduite du stade de l'observation phénoménologique et descriptive des acteurs de l'immunité anti-parasitaire, à une phase d'investigation moléculaire des mécanismes qui président à son expression.

Ce domaine a tout naturellement bénéficié de l'introduction des méthodologies les plus nouvelles notamment celles du clonage moléculaire et de l'hybridation cellulaire qui sont à l'origine de la caractérisation de molécules potentiellement vaccinantes.

C'est dans ce contexte que nous développerons dans le chapitre consacré à nos travaux expérimentaux, notre approche de l'identification des antigènes de *Schistosoma mansoni* par le biais d'anticorps monoclonaux spécifiques de ce parasite.

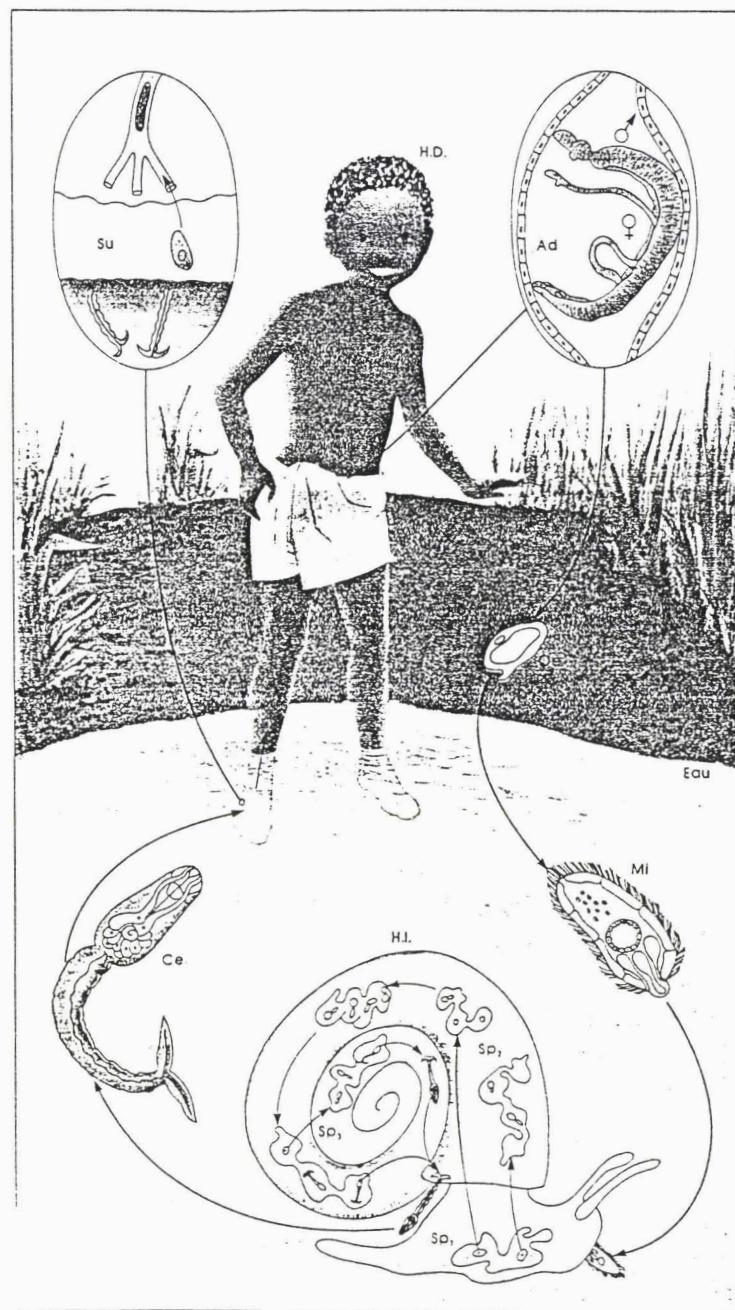
CHAPITRE I.

L'IMMUNITE DANS LA SCHISTOSOMIASE.

INTRODUCTION

L'infection par Schistosome se caractérise par la présence de vers bisexués dans les systèmes veineux portal et mésentérique de l'homme et de différents animaux de laboratoire. Le parasite peut y séjourner pendant de nombreux mois voire même plusieurs dizaines d'années. Cette situation résulte d'un cycle complexe de migration et de maturation du parasite où alternent des phases "libres" aquatiques et des stades "captifs" dans différents hôtes. Les femelles pondent des oeufs qui traversent la barrière intestinale et sont éliminés par les selles. Au contact de l'eau douce, les oeufs libèrent une larve ciliée, le miracidium, qui infecte l'hôte intermédiaire et donne naissance aux sporocystes qui, par multiplication asexuée, conduisent à l'émission, dans le milieu aquatique, de furcocercaires, formes infestantes pour l'homme. L'infection cercarienne se fait par pénétration active transcutanée. A ce stade la cercaire se transforme en schistosomule qui, par le courant sanguin, migre dans le poumon, puis dans les veines mésentériques de l'hôte définitif. Les phases de migration s'accompagnent de la maturation des parasites. Trente jours après la pénétration cercarienne, la ponte des oeufs débute, refermant ainsi le cycle parasitaire (Figure 1).

Bien que de nombreuses études cliniques et épidémiologiques aient permis l'étude de certains paramètres de l'immunité chez l'homme (BUTTERWORTH et al 1982, 1984, PHILLIPS et COLLEY 1978), la plupart des informations concernant les mécanismes de l'immunité a été acquise dans différents modèles d'infections expérimentales comme la souris, le hamster, le rat, et quelque fois les primates.

FIGURE 1:-LE CYCLE PARASITAIRE DE SCHISTOSOMA MANSONI-

(la RECHERCHE n°198: juin 1987)

A- L'IMMUNITE NATURELLE ET L'IMMUNITE ACQUISE :

1) Spécificité d'espèce et intraspécifique :

Le degré de résistance à l'infection par Schistosome est très variable selon les espèces animales étudiées et va de la résistance totale à l'infection jusqu'à la mort de l'individu, en passant par tous les stades possibles. Sur ces observations, (KAGAN 1958) propose une classification qui regroupe trois catégories : les animaux totalement résistants, les hôtes qui peuvent être infectés mais qui ne permettent pas le développement complet du parasite, et les animaux susceptibles.

Chez le hamster et la souris, considérés comme les hôtes les plus sensibles, les parasites se développent jusqu'au stade mature, s'accouplent et pondent des oeufs. L'homme se comporte comme un hôte susceptible et développe des infections pouvant durer plusieurs années, qui restent d'ailleurs stables dans les populations d'âge adulte. Parmi les différents systèmes d'infection, le rat tient une place particulière, et est considéré comme un hôte semi-permissif. Il peut être infecté par les cercaires de Schistosomes qui évoluent ensuite jusqu'au stade de la migration hépatique. Puis, à partir de la 3ème et de la 4ème semaine après l'infection, il rejette spontanément la population parasitaire qu'il héberge (SMITHERS et TERRY 1965b), (MADDISON *et al* 1970). Ce rejet est suivi d'une phase d'immunité intense et prolongée à la réinfection (CAPRON-DUPONT 1974), tandis qu'au niveau sérique s'expriment différents mécanismes immunitaires spécifiquement dirigés contre les formes larvaires d'infection du parasite, appelées schistosomules.

Outre les spécificités d'espèces que nous venons de décrire, il semble qu'il existe une différence de susceptibilité à l'infection au sein d'une même espèce que l'on appelle spécificité intraspécifique, observée chez l'homme et dans les modèles d'infections expérimentales (CARDOSO 1953) (KAGAN 1958).

2) L'immunité acquise :

Comme dans de nombreuses infections causées par des virus et des bactéries, l'hôte infecté élabore différents mécanismes de défense qui font intervenir soit des populations cellulaires sensibilisées (immunité cellulaire), soit des anticorps spécifiques de l'agent infectieux (immunité à médiation humorale).

a/La réponse cellulaire :

L'immunité à médiation cellulaire s'exprime différemment en fonction de l'hôte considéré. De nombreuses réactions témoignent de la participation cellulaire dans la défense de l'hôte vis-à-vis de l'infection parasitaire. Au niveau de l'épiderme, la pénétration cercarienne induit un afflux de leucocytes polynucléaires et de macrophages ; au niveau pulmonaire chez l'animal immun, une intense réaction inflammatoire se développe autour du schistosomule (VON LICHTENBERG et RITCHIE 1961).

Dans le cas particulier des hôtes permisifs (hôtes qui permettent la maturation parasitaire et la ponte des oeufs de Schistosome), l'immunité à médiation cellulaire se traduit par la formation d'un granulome périovulaire (constitué essentiellement de leucocytes polynucléaires et de macrophages) causé par la libération dans les tissus d'antigènes d'oeufs. La réaction de type granulome a été assimilée par WARREN *et al* (1967) à une manifestation d'hypersensibilité retardée, transférable à un hôte sain par l'injection de cellules ganglionnaires ou spléniques d'animaux infestés par *Schistosoma mansoni*, mais non pas par les sérum (VON LICHTENBERG *et al* 1962, 1963). La formation du granulome peut d'autre part être inhibée par la thymectomie ou le traitement par les sérum anti-lymphocytaires (DOMINGO *et al.* 1967, DOMINGO et WARREN 1968).

BORROS et WARREN (1970) ont montré que le matériel antigénique soluble de l'oeuf peut, en petite quantité, induire une réaction d'hypersensibilité retardée granulomateuse sans induire de formation d'anticorps détectables par la technique d'hémagglutination. La technique de formation de granulome *in vitro* a pu mettre en évidence le recrutement de macrophages, lymphocytes, éosinophiles et fibroblastes autour de l'oeuf, et a clairement montré la spécificité immunologique de la réaction (DOUGHTY et PHILLIPS 1981).

D'autres arguments en faveur de la participation des mécanismes cellulaires dans l'immunité vis-à-vis de la schistosomiase ont été apportés par les expériences de transfert de lymphocytes thymodépendants chez le rat (PHILLIPS *et al.* 1975), ainsi que par les expériences de rats thymectomisés (CIOLI et DENNERT 1976).

Il semble donc que l'on puisse impliquer les populations cellulaires thymodépendantes dans les mécanismes de défense de l'hôte, bien que les lymphocytes T d'animaux sensibilisés n'induisent *in vitro* aucune cytotoxicité significative de type CTL vis-à-vis du stade larvaire du Schistosome (BUTTERWORTH *et al.* 1979a). Il paraît donc encore difficile de définir précisément l'incidence réelle de la composante cellulaire de l'immunité, du fait de l'extrême complexité des paramètres mis en jeu. La participation thymique peut en effet faire intervenir directement les diverses sous-populations de lymphocytes T, ainsi que d'autres éléments effecteurs de la réponse immune tels que les anticorps thymodépendants de classe IgE ou IgG2a.

b/La réponse humorale :

Depuis 1958, de nombreuses méthodes de détection des anticorps spécifiques décrites ont permis l'étude des paramètres de la réaction humorale (KAGAN 1958 CAPRON *et al.* 1965, 1966, 1969, 1972 ; SMITHERS et TERRY 1969a). Pourtant, aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux des anticorps sériques et le statut

immunitaire de l'hôte infecté (NAIMARK *et al.* 1957 ; CAPRON *et al.* 1967). Par exemple, le rat Sherman est immun dès la 2ème semaine suivant l'infection, alors que le maximum d'anticorps spécifiques est détecté à la 12ème semaine d'infection (MADDISON *et al.* 1970).

Les expériences de transfert passif de sérum ont établi de façon indiscutable le rôle prépondérant des anticorps dans l'immunité vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*. PEREZ (1974) démontre que l'activité protectrice du sérum de rat infecté est portée par la fraction G des immunoglobulines ; SHER *et al.* (1975, 1977) établissent la même corrélation chez la souris. PHILLIPS *et al.* (1977) confirment ces observations chez le rat par l'injection de sérum de rat infecté depuis 49 jours. CAPRON *et al.* (1980), en transférant du sérum de rat Fischer infesté, préalablement déplété sélectivement en anticorps de classe IgE ou IgG2a, suggèrent le rôle prépondérant de ces 2 isotypes dans l'élaboration de l'immunité vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*.

Ces observations ont d'autre part été confortées par l'effondrement des paramètres de l'immunité à la réinfection induit chez le rat Fischer déplété sélectivement en cellules B productrices d'anticorps, par l'injection néonatale de sérum anti-chaîne lourde des immunoglobulines M (BAZIN *et al.* 1980a).

c/ L'immunité concomitante :

Des multiples travaux expérimentaux, comme des nombreuses études épidémiologiques réalisées chez l'homme, il apparaît clairement que la cible essentielle de la réponse immune est le stade larvaire d'infection, le schistosomule. Inversement, le parasite adulte, qui semble pourtant être le stimulus majeur de l'immunité, élude la réponse immune qu'il suscite, alors que le schistosomule est détruit. Cet aspect très particulier de la réponse

immune anti-parasitaire, originellement décrit par CLEGG et SMITHERS en 1971, a été appelé immunité concomitante, par analogie à l'immunité anti-tumorale, où la greffe d'une seconde tumeur sur des animaux porteurs d'une première tumeur ne permet pas le développement de la deuxième tumeur et entraîne un rejet de celle-ci.

L'immunité concomitante permet d'expliquer, tout au moins partiellement, la longue persistance des infections par Schistosome, grâce au maintien d'une charge parasitaire à peu près stable. Nous illustrerons dans le prochain paragraphe certains aspects de l'immunité concomitante, par la description des différents mécanismes effecteurs de l'immunité, dont la cible essentielle est le jeune Schistosome ou schistosomule.

B- APPROCHE IN VITRO DE L'IMMUNITE : LES MECANISMES EFFECTEURS.

L'étude *in vivo* de la réponse immune vis-à-vis d'un agent pathogène est difficile à mettre en oeuvre, compte tenu de la multiplicité des facteurs mis en jeu, comme l'isotypie des anticorps, les composants du complément, ou les différentes populations cellulaires qui peuvent elles-mêmes agir ensemble, ou indépendamment, à des périodes précises de l'infection.

Du fait de cette situation complexe, l'étude des mécanismes de l'immunité a été abordée *in vitro*, grâce à différentes techniques qui, certes, ne rendent pas compte de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réponse immune, mais présentent l'avantage d'une dissection fine, dans des "systèmes contrôlés", des évènements conduisant à la destruction des cibles parasites. Ces travaux, initiés en 1972 par CLEGG et SMITHERS, ont permis depuis la définition de nombreux mécanismes de cytotoxicité impliquant le complément, ainsi que différentes populations cellulaires effectrices comme le macrophage, l'éosinophile, la plaquette et le neutrophile (tableau 1).

TABLEAU 1:
-LES MECANISMES EFFECTEURS DE LA SCHISTOSOMIASE-

Mécanisme	Isotype	Complément	Hôtes	Références
Sérotoxicité				
Anticorps cytotoxique	IgG	C ⁺	Singe, Rhésus rat, lapin, homme	Clegg et Smithers 1972 Capron et al. 1972, 1973, 1974, 1977
Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps				
Anticorps + neutrophiles	IgG	C ⁺	Rat	Dean et al. 1974
Anticorps + neutrophiles	IgG ₂	C ⁺	Cobaye	Dean et al. 1975
Anticorps + éosinophiles	IgG	C ⁻	Homme	Butterworth et al. 1974
Anticorps + éosinophiles	IgG _{2a}	C ⁻	Rat	M. Capron et al. 1978a
Anticorps + éosinophiles	IgG	C ⁻	Souris	Ramalho-Pinto et al. 1979
Anticorps + éosinophiles	IgE	C ⁻	Rat, homme	M. Capron et al. 1981a
Anticorps + macrophages	IgE	C ⁻	Rat	A. Capron et al. 1975
Anticorps + macrophages	IgG ₁	C ⁻	Rat	Perez 1975
Anticorps + monocytes	IgE	C ⁻	Homme, babouin	Joseph et al. 1978
Anticorps + plaquettes	IgE	C ⁻	Rat, homme	Joseph et al. 1983

1) Mécanisme de sérotoxicité : anticorps létal

CLEGG et SMITHERS (1972) révèlent que le sérum de singe Rhésus infecté par *Schistosoma mansoni* est capable de détruire *in vitro*, en présence de complément de cobaye, 95 à 100 % d'une population de schistosomules. Chez le rat, le lapin, et l'homme, CAPRON *et al.* (1972a, 1973, 1974) démontrent le même mécanisme. Les anticorps responsables de la mortalité ont été identifiés dans ces différents modèles comme étant des anticorps de classe IgG dont la cytotoxicité vis-à-vis du schistosomule ne s'exprime qu'en présence de complément (CLEGG et SMITHERS 1972 ; CAPRON *et al.* 1972, 1973, 1974, 1977). Ces anticorps sont spécifiques d'espèces, ils ne sont détectés que dans les sérum humains infectés par *Schistosoma mansoni* et non chez les patients infectés par *Schistosoma bovis* (CAPRON *et al.* 1974), et présentent d'autre part une spécificité de stade puisqu'ils n'exercent aucune activité létale à l'encontre de schistosomules pulmonaires de *Schistosoma mansoni* prélevés 7 jours après l'infection, chez le hamster et la souris (CAPRON *et al.* 1974). Cette sensibilité s'explique par l'acquisition d'un certain nombre d'antigènes d'hôte qui protègent le ver contre les anticorps (CAPRON *et al.* 1965, 1968 ; DAMIAN 1964, 1967).

Bien que l'étude cinétique d'apparition de l'anticorps létal montre que les taux lytiques maximaux corrèlent avec la période d'immunité à la réinfection, et que le transfert passif de sérum de rats infectés à des rats sains ait permis d'obtenir des taux de protection élevés (jusqu'à 80 %) (CAPRON-DUPONT 1974, PHILIPPS *et al.* 1975), la pertinence biologique de ces anticorps cytotoxiques reste toutefois à préciser.

En effet, la nécessité d'une source de complément hétérologue et l'inefficacité démontrée du mécanisme en présence de complément homologue soulèvent de nombreuses interrogations. De plus, la synthèse d'anticorps létal a pu être induite chez le lapin par l'injection de fractions membranaires du Schistosome adulte (CAPRON *et al.* 1974) et par

un antigène isolé de la fraction membranaire (SHER *et al.* 1974a). Pourtant, les animaux immunisés selon ces méthodes ne développent aucune immunité à la réinfection. D'autre part, des taux élevés d'anticorps létal persistent chez l'animal ayant perdu toute immunité à la réinfection (PEREZ *et al.* 1974). SHER explique ce phénomène de la façon suivante :

- 1) *In vivo* les schistosomules sont moins fragiles qu'*in vitro* car ils acquièrent rapidement des antigènes d'hôte qui les protègent de l'action de cet anticorps.
- 2) La protection *in vivo* est médiée par un anticorps de même spécificité antigénique que l'anticorps létal mais de classe différente. Cet anticorps agirait dans les tissus à un niveau inaccessible à l'anticorps létal détecté dans le sérum.
- 3) L'anticorps létal n'agit pas seul et pourrait coopérer avec différents constituants humoraux ou cellulaires.

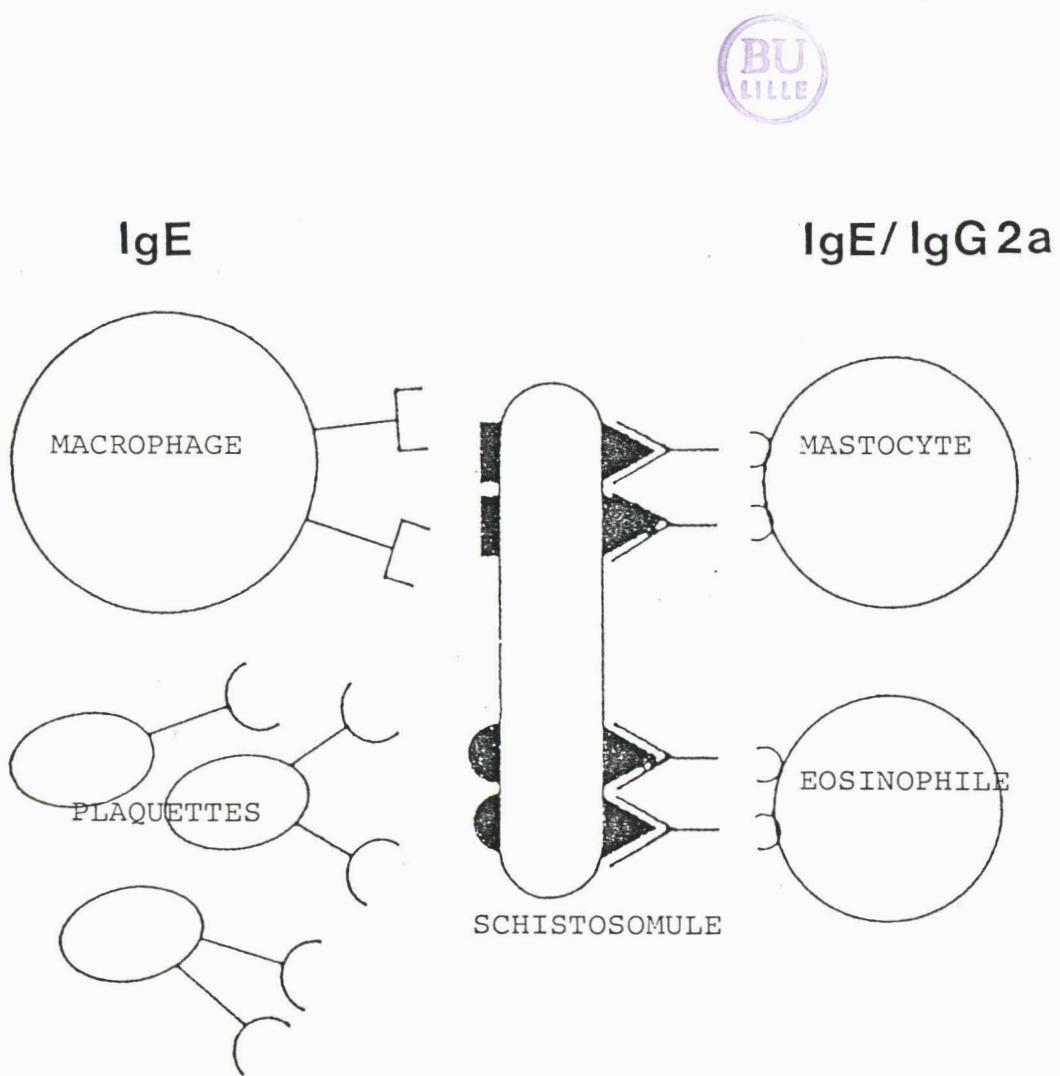
L'ensemble des arguments présentés ici ne permettent donc pas, pour le moment, d'établir le rôle précis de ce mécanisme de cytotoxicité dans l'expression de l'immunité à la réinfection. Il semble pourtant clair que les anticorps létaux ne représentent pas le seul mécanisme impliqué dans la protection vis-à-vis du *Schistosoma mansoni*.

2) La cytotoxicité dépendante de cellules :

L'une des caractéristiques majeures des mécanismes cellulaires que nous allons décrire réside dans le fait qu'ils n'impliquent pas les populations lymphoïdes habituellement décrites dans d'autres infections, mais plutôt des cellules phagocytaires, parmi lesquelles le macrophage et l'éosinophile tiennent une place importante (Figure 2).

D'une manière surprenante, et bien qu'il ait été démontré par de nombreux travaux expérimentaux la thymo-dépendance de la réponse anti-Schistosome, aucune information claire n'a pu révéler la participation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dans la destruction du Schistosome (BUTTERWORTH *et al.* 1979a). Cette absence de réponse

FIGURE 2:
-SCHEMA GENERAL DES MECANISMES EFFECTEURS-



CTL est d'autant plus surprenante qu'il a été démontré que les schistosomules peuvent acquérir à leur surface des produits K/D ou I du complexe majeur d'histocompatibilité de la souris (SHER *et al.* 1978 ; GITTER et DAMIAN 1982), ce qui est en principe une condition nécessairement requise pour qu'une activité CTL puisse s'exprimer. Bien qu'une réaction d'adhérence de lymphocytes alloréactifs de phénotype Lyt 1⁻2,3⁺ ait été observée sur des schistosomules, cette réaction est insuffisante pour détruire le parasite (BUTTERWORTH *et al.* 1979a ; VADAS *et al.* 1979).

On ne peut à ce stade que spéculer sur les raisons de l'absence de lyse des parasites par les CTL, bien qu'il existe une étape de reconnaissance et d'adhésion cellulaire. Certains mécanismes d'évasion pourraient soit limiter soit abolir l'efficacité des processus lytiques au niveau de l'interface CTL-parasite.

a/ La cytotoxicité dépendante du neutrophile :

La participation du polynucléaire neutrophile dans les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis du Schistosome a été suggérée par les travaux de DEAN *et al.* (1974, 1975). Ces auteurs démontrent que des schistosomules incubés en présence de sérum de rat infecté par *Schistosoma mansoni* et de neutrophiles de rat sain sont détruits après 24 à 48 heures d'incubation, et que le facteur responsable de la lyse parasitaire serait un anticorps de classe IgG. Ils rapportent d'autre part des observations similaires chez le cobaye et attribuent ce rôle cytotoxique aux anticorps de classe IgG2. Pour ces auteurs, le schistosomule serait opsonisé dans un premier temps par les anticorps spécifiques qui permettraient, dans un deuxième temps, la fixation des cellules effectrices, suivie d'un relargage des enzymes lysosomiales du neutrophile, induisant la mort du parasite.

Ces travaux ont été largement critiqués car les sérums utilisés expriment déjà une activité cytotoxique propre. D'autre part, les anticorps impliqués fixent le complément, et la participation des neutrophiles, dans ce cas, n'est plus nécessaire pour assurer la cytotoxicité. Des études plus récentes démontrent que les neutrophiles, bien que capables d'adhérer à la cible parasitaire, ne lui causent aucun dommage (DAVID *et al.* 1980). Aussi le débat reste-t-il ouvert.

b/ La cytotoxicité dépendante du macrophage :

Deux mécanismes distincts de cytotoxicité ont été attribués aux macrophages, l'un impliquant des anticorps de classe IgG, l'autre nécessitant la présence d'anticorps de classe IgE.

*La cytotoxicité liée aux anticorps IgG :

Des cellules d'xsudat péritonéal de rat, incubées 4 heures à 4°C en présence de sérum de rat immun inactivé par chauffage, présentent une forte adhérence aux schistosomules. Après 24 heures de contact, les schistosomules sont fortement endommagés, les immunoglobulines en cause sont des anticorps cytophilques de classe IgG1 (PEREZ 1975).

*La cytotoxicité liée aux anticorps IgE :

Des macrophages péritonéaux de rats sains, préincubés dans un sérum de rat immun vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*, adhèrent fortement aux schistosomules de *Schistosoma mansoni*, cette étape se traduit après 20 heures d'incubation par la destruction de 70 à 90 % des schistosomules (CAPRON *et al.* 1975a et b).

L'étude ultrastructurale révèle d'une part d'importantes lésions des structures membranaires des schistosomules agressés et que d'autre part ces lésions sont uniquement induites par le macrophage. Le sérum de rat immun contient donc un facteur qui se fixe sur les macrophages normaux, les rendant spécifiquement cytotoxiques du stade larvaire du Schistosome. Le facteur responsable de ce phénomène est l'IgE (CAPRON *et al.* 1975a, 1975b), il est détruit par chauffage 3 heures à 56°C, par le mercaptoéthanol, et l'immunoadsorption des sérums immuns par des anticorps spécifiques de la chaîne lourde epsilon des IgE abolit l'activité cytotoxique.

La présence de l'IgE à la surface du macrophage, incubé dans un sérum présentant une activité cytotoxique, a été visualisée par la technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps anti-IgE marqués à la fluorescéine et par la technique de formation de rosettes, dans laquelle les hématies sont couplées aux immunoglobulines de classe E.

Les immuns complexes à IgE présents dans les sérums de rats infectés sont aussi impliqués dans l'activation du macrophage, l'adsorption des sérums immuns par des quantités croissantes de sérum de lapin anti-*Schistosoma mansoni* inhibe sensiblement l'enrobement des schistosomules (CAPRON *et al.* 1975c).

La spécificité anti-parasitaire des IgE dans la réaction de cytotoxicité a été démontrée par adsorption d'un sérum de rat immun par des antigènes de *Schistosoma mansoni*. Celle-ci correspond à une décroissance de la cytotoxicité des macrophages IgE-dépendante, d'une manière dose-dépendante avec la concentration d'antigène utilisée. L'utilisation d'allergènes non parasitaires ou d'antigènes d'autres espèces de Schistosomes tel que *Schistosoma bovis* ne diminuait en aucun cas le taux de mortalité des larves .

L'interaction IgE-macrophages nécessite une étape de fixation de l'IgE à la membrane cellulaire. Les expériences de JOSEPH *et al.* (1977) et DESSAINT *et al.* (1979) démontrent l'existence d'un site de fixation spécifique et saturable pour l'IgE. En effet, la cytotoxicité dépendante du macrophage peut être inhibée de façon compétitive par des IgE agrégées chimiquement, alors que l'IgE monomérique n'a aucune action ; d'autre part,

aucune inhibition n'a été décrite par les IgG monomériques ou agrégées. La fixation de l'IgE entraîne une activation du macrophage qui se traduit par une augmentation du taux de GMP cyclique et par un relargage d'enzymes lysosomales et d'anions superoxydes (DESSAINT *et al.* 1980 ; JOSEPH *et al.* 1980). Seules les formes polymériques de l'IgE suscitent l'activation du macrophage, les formes dimères étant le seuil minimal de polymérisation permettant l'induction de la cytotoxicité.

Parallèlement au système établi chez le rat, les travaux de JOSEPH *et al.* (1978) décrivent un mécanisme similaire chez l'homme, où l'IgE active les monocytes humains normaux, les rendant cytotoxiques pour des schistosomules de *Schistosoma mansoni*. Si le mécanisme de cytotoxicité dépendante du macrophage n'est pas encore prouvé *in vivo*, le parallélisme étroit entre l'établissement chez le rat de l'immunité à la réinfection, de l'évolution du taux d'IgE sériques et de l'activité cytotoxique du macrophage est néanmoins à signaler.

c/ La cytotoxicité dépendante de l'éosinophile :

Les premières évidences du rôle cytotoxique de l'éosinophile ont été rapportées par BUTTERWORTH *et al.* (1974). Des éosinophiles humains normaux deviennent cytotoxiques pour le schistosomule quand celui-ci est incubé en présence de sérums de sujets parasités. Ce mécanisme, indépendant du complément, fait intervenir une IgG et ne nécessite pas une présensibilisation des cellules effectrices (BUTTERWORTH *et al.* 1975, 1977a et b).

Trois étapes successives conduisent à la destruction du stade larvaire du Schistosome par l'éosinophile.

La première étape se traduit par un contact étroit entre la cible et la cellule. L'adhérence de l'éosinophile au schistosomule est induite par un anticorps spécifique qui se

fixe par son fragment (Fab'_2) à la surface du schistosomule, et réalise le pontage avec l'éosinophile, qui se fixe à l'anticorps par l'intermédiaire d'un récepteur pour le fragment Fc de l'immunoglobuline.

La seconde étape est alors déclenchée : on observe une dégranulation intense de l'éosinophile qui libère à la surface du schistosomule son contenu granulaire. Les granules de l'éosinophile renferment une peroxydase (EPO), une protéine basique majeure (MBP) ainsi que d'autres protéines cationiques (ECP).

L'étape finale correspond à la lyse de la cible par ces différentes substances qui entraînent une désorganisation du tégument parasitaire (MC LAREN *et al.* 1977 ; BUTTERWORTH *et al.* 1979b ; OLSSON *et al.* 1977).

Le rôle de l'éosinophile a été étudié dans différents systèmes d'infection expérimentale à *Schistosoma mansoni*, ces résultats sont présentés dans le tableau 2. Les travaux de M.CAPRON *et al.* (1978a et b) révèlent un aspect très particulier de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles chez le rat, celui de l'activation de l'éosinophile par le mastocyte. Ces auteurs rappellent qu'en plus des éosinophiles, des mastocytes adhèrent à la surface du schistosomule opsonisé. Ils démontrent que le mastocyte seul n'induit aucune cytotoxicité, mais que la déplétion en mastocytes entraîne une chute considérable de l'activité cytotoxique. L'activité cytotoxique peut être restaurée par des produits de dégranulation mastocytaires, et tout particulièrement par l'ECF-A, "Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis". L'ECF-A agit au niveau de l'expression des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines G de l'éosinophile (M.CAPRON *et al.* 1981b). Par son action directe sur l'expression des récepteurs Fc des IgG, le mastocyte stimule l'activité cytotoxique de l'éosinophile. M.CAPRON *et al.* (1981b) décrivent un mécanisme similaire d'activation de l'éosinophile humain.

Chez le rat Fisher, l'opsonisation du schistosomule par IgG2a se manifeste dans les sérum de rats infectés pendant les 6 premières semaines de l'infection (M.CAPRON *et al.* 1978a). Pendant cette période, les éosinophiles de l'animal immun détruisent le stade larvaire du parasite en absence de sérum immun, les éosinophiles portant des anticorps cytophiles spécifiques. Puis l'activité cytotoxique décroît et s'accompagne d'un blocage des récepteurs Fc de l'éosinophile, parallèlement une diminution marquée de la production d'anticorps spécifiques de classe IgG2a est observée (M.CAPRON *et al.* 1979). Ces arguments plaident en faveur d'une réelle activité *in vivo* du mécanisme de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles.

L'investigation cinétique de la cytotoxicité chez le rat permet la découverte par M.CAPRON *et al.* (1981a) d'un mécanisme de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles lié à l'IgE, 8 semaines après l'infection parasitaire. Comme le mécanisme de cytotoxicité induit par l'IgG2a, la présence de mastocytes ou de facteurs mastocytaires est nécessaire. L'éosinophile possède, en plus d'un récepteur pour le fragment Fc des IgG, un récepteur spécifique pour l'IgE dont l'expression est modulée par l'ECF-A (M.CAPRON *et al.* 1981b). Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence entre le site de fixation de l'IgE et celui de l'IgG (M.CAPRON *et al.* 1981b).

Les mécanismes que nous venons de décrire nécessitent une phase de liaison étroite entre l'éosinophile et la cible parasitaire, cette liaison est assurée par un anticorps spécifique de classe IgG ou IgE, mais il faut cependant citer le rôle du complément dans les phénomènes d'adhérence de l'éosinophile au schistosomule. RAMALHO-PINTO *et al* (1978) décrivent en effet un système de cytotoxicité nécessitant une coopération entre l'éosinophile et le complément. Le composé C3b du complément permet la fixation de l'éosinophile à la surface parasitaire par le récepteur C3b de l'éosinophile. Le complément peut agir seul, ou en synergie avec des anticorps spécifiques (MC LAREN et RAMALHO-PINTO 1979 ; ANWAR *et al.* 1979) (Tableau 2).

TABLEAU 2:

-MECANISMES DE CYTOTOXICITE DEPENDANTS D'EOSINOPHILES
DANS L'INFECTION A *SCHISTOSOMA MANSONI*-



<i>Facteur de reconnaissance</i>	<i>Modèle</i>	<i>Première description</i>
IgG	Homme	Butterworth (1974)
IgG	Rat	Mackenzie (1977)
IgG _{2a}	Rat	M. Capron (1978a)
IgG ₁	Souris	Ramalho-Pinto (1979)
IgG	Souris	Kassis (1979)
IgE	Rat	M. Capron (1981a)
Complément	Rat	Ramalho-Pinto (1978)
Complément	Homme	Anwar (1979)

Cet aspect fascinant du rôle de l'éosinophile doit être abordé avec prudence quant à sa transposition dans l'expression réelle de l'immunité *in vivo*, du fait de l'extrême diversité des facteurs humoraux et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. Il faut cependant noter que les expériences de déplétion sélective en éosinophiles pratiquées chez la souris par MAHMOUD *et al.* (1975), déclenchent une diminution sensible de l'immunité à la réinfection, soulignant de fait la participation possible de l'éosinophile dans le mécanisme immunitaire.

d/ La cytotoxicité dépendante de plaquettes :

La participation des plaquettes sanguines dans les mécanismes de cytotoxicité vis-à-vis du schistosomule a été clairement définie et établie grâce aux travaux de JOSEPH *et al.* (1983). Ces auteurs démontrent que des plaquettes prélevées chez le rat Fischer infecté par *Schistosoma mansoni* tuent le schistosomule après quelques heures d'incubation. Cette activité cytotoxique corrèle avec l'état d'immunité à la réinfection et est maximale aux environs de 7 semaines. De plus, des plaquettes isolées de sujets humains normaux ou de rats sains peuvent être rendues cytotoxiques, si elles sont préalablement incubées en présence de sérum de rats ou d'individus parasités, suggérant de fait l'existence d'un facteur sérique toxique pour le parasite.

Des expériences ultérieures ont permis à ces mêmes auteurs la caractérisation du facteur responsable de la lyse parasitaire. La thermolabilité, la non-dépendance du complément, ainsi que l'abolition totale du potentiel cytotoxique des sérum après passage sur des colonnes d'affinité préparées à partir d'antisérum spécifiques des IgE, révèlent le rôle essentiel joué par l'IgE dans les manifestations cytotoxiques des plaquettes.

La pertinence biologique d'un tel mécanisme a pu être étudiée *in vivo* au cours d'expériences de transfert de plaquettes prélevées chez le rat infecté par *Schistosoma*

mansoni, à des animaux sains puis soumis à une infestation d'épreuve. Dans ces conditions, des degrés significatifs de protection (70 %) ont pu être obtenus, soulignant ainsi le rôle potentiel de ce mécanisme dans l'élaboration de l'immunité vis-à-vis du *Schistosoma mansoni*.

3) Mécanismes effecteurs et anticorps anaphylactiques :

L'étude des différents mécanismes de cytotoxicité souligne le rôle prépondérant joué par certains isotypes d'anticorps et particulièrement celui des anticorps dits anaphylactiques. En effet, ces anticorps habituellement associés à une fonction néfaste dans le cadre de l'anaphylaxie, se révèlent, dans le cas des infections parasitaires, doués de propriétés effectrices intenses, étroitement liées à l'expression de l'immunité anti-parasitaire.

a/ Les anticorps IgE :

Bien que l'élévation du taux d'IgE sérique au cours de la schistosomiase ait été un paramètre connu depuis les travaux de SADUN et GORE (1970), CAPRON *et al.* (1975a) sont les premiers à définir l'aspect positif de cette réponse humorale par la découverte du rôle cytotoxique qu'exercent *in vitro* des macrophages sensibilisés par l'IgE de rat, présente dans les sérum d'animaux infectés vis-à-vis de schistosomules de *Schistosoma mansoni*. Cette observation est à l'origine de nombreuses études.

ROUSSEAUX-PREVOST *et al.* (1977, 1978), dans le modèle de l'infection expérimentale du rat par *Schistosoma mansoni*, démontrent que la phase de rejet du parasite survenant entre la 3ème et la 4ème semaine d'infection, s'accompagne d'une

élévation importante du taux d'IgE totales et spécifiques de *Schistosoma mansoni*, décelable au niveau sérique. Dans ce même modèle, ROUSSEAUX-PREVOST *et al.* (1978) révèlent un étroit parallélisme entre le taux d'IgE spécifiques présent dans le sérum et la cinétique d'apparition de l'immunité à la réinfection. Ces observations reliées à la chute du taux d'immunité transférable par le sérum immun déplété en IgE, apportent un faisceau d'arguments en faveur du rôle positif de l'IgE dans l'immunité de protection vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*.

b/ Les anticorps IgG2a :

La participation d'une seconde classe d'anticorps anaphylactiques dans les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis de *Schistosoma mansoni* a été révélée par les travaux de M.CAPRON *et al.* (1978a). Ces auteurs établissent le rôle essentiel des anticorps de classe IgG2a dans l'induction de la destruction *in vitro* des schistosomules de *Schistosoma mansoni* par les éosinophiles de rats sains. L'IgG2a (IgGa) représente la classe majeure des immunoglobulines chez le rat (BAZIN *et al.* 1974). Elle a été définie par BLOCH (1968) comme la seconde classe d'anticorps anaphylactiques chez le rat. L'IgG2a se fixe au mastocyte et induit la libération des médiateurs de l'anaphylaxie comme la SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) (MORSE *et al.* 1968) et l'histamine (MORSE *et al.* 1969 ; BACH *et al.* 1971a, 1971b). L'IgG2a inhibe la fixation de l'IgE au niveau des mastocytes du rat et des cellules de basophiles leucémiques de rat (BACH *et al.* 1971b ; HALPER et METZGER 1976). Il faut cependant noter que la fixation de l'IgG2a au niveau des récepteurs mastocytaires est beaucoup plus labile que la liaison existant entre le mastocyte et l'IgE (BACH *et al.* 1971b).

L'étroit parallélisme existant entre la cinétique d'apparition de l'immunité à la réinfection et la manifestation, au niveau sérique de l'animal infecté, d'une cytotoxicité

dépendante de l'éosinophile, prend toute sa valeur dans le contexte des expériences de transferts passifs de sérum immun déplété sélectivement en anticorps de classe IgG2a (CAPRON *et al.* 1980). Il apparaît donc que les anticorps anaphylactiques, présents au niveau des sérum de rats infectés par *Schistosoma mansoni*, représentent le support essentiel de l'immunité à médiation humorale.

4) Signification biologique des mécanismes effecteurs :

Si l'efficacité des mécanismes effecteurs n'est plus à démontrer *in vitro* dans la lyse de cibles parasitaires, elle soulève néanmoins des interrogations quant à son expression réelle au cours des processus biologiques conduisant à l'expression de l'immunité anti-parasitaire. Il faut à ce niveau premièrement souligner qu'il existe une étroite relation entre le développement d'une immunité protectrice à la réinfection vis-à-vis du Schistosome tout au moins chez le rat, et l'évolution du taux d'anticorps anaphylactiques, de la quantité d'immuns complexes à anticorps anaphylactiques et l'expression dynamique *in vitro* des mécanismes effecteurs (CAPRON *et al.* 1980). D'autre part, la déplétion sélective en anticorps d'isotype IgG2a ou IgE des sérum de rats immuns conduit à un effondrement substantiel de l'immunité induite par transfert passif de ces sérum (CAPRON *et al.* 1980).

Si l'ensemble de ces données permet d'affirmer la participation des anticorps dans l'installation d'un état d'immunité, il n'autorise pourtant pas de préjuger des populations cellulaires entrant en jeu. Cependant, de récentes observations apportent de solides arguments à leurs interventions.

Dans le cas des éosinophiles, des degrés élevés de protection ont été induits chez le rat par l'injection, au niveau du site de pénétration cercarienne, d'éosinophiles prélevés chez le rat infecté par *Schistosoma mansoni* (M.CAPRON *et al.* 1984). Ces éosinophiles avaient d'autre part été démontrés porteurs d'anticorps cytophiles et capables de tuer les

schistosomules (M.CAPRON et al. 1979). Cette observation tient compte des données histopathologiques révélant la présence *in situ* d'éosinophiles autour des schistosomules attaqués (HSU *et al.* 1971 ; VON LICHTENBERG *et al.* 1976), et du fait que l'administration de sérum anti-éosinophiles affecte le taux de protection anti-parasitaire chez la souris (MAHMOUD *et al.* 1975).

Des résultats similaires ont été rapportés dans le cas des macrophages et des plaquettes prélevés chez le rat infecté dans les périodes où l'immunité à la réinfection est optimale (M.CAPRON *et al.* 1984 ; JOSEPH *et al.* 1983).

Aussi fragmentaires que puissent paraître ces résultats, l'expérimentation *in vivo* a néanmoins permis de confirmer les fonctions biologiques des anticorps et des cellules identifiées *in vitro* chez l'homme ou chez le rat, et leur parallélisme avec l'expression de l'immunité. La critique majeure que l'on pourrait apporter à ces systèmes demeure dans le fait qu'ils donnent une image simplifiée de l'enchaînement des événements suscités lors de la réponse immunitaire, et qu'ils ne tiennent pas compte de l'évolution dynamique de celle-ci. Ils occultent d'autre part les relations de modulation potentielles pouvant exister entre ces différents mécanismes, aussi bien synergiques qu'antagonistes. De plus, il faut aujourd'hui admettre que l'immunité vis-à-vis du Schistosome résulte plus d'une expression multifonctionnelle de ces mécanismes plutôt que de l'exaltation exclusive de l'un d'entre eux.

5) Régulation des mécanismes effecteurs :

Si les nombreuses recherches effectuées dans le domaine de la relevance biologique des mécanismes effecteurs suggèrent de fait leur participation dans l'expression de l'immunité *in vivo*, il semble néanmoins que leur efficacité d'expression soit soumise à différents mécanismes de régulation qui limitent leurs potentialités. D'autre part, il apparaît

clairement que le Schistosome a dû, au cours de l'évolution, s'adapter à son environnement et faire preuve d'une remarquable ingéniosité pour éluder la réponse immune qu'il suscite chez l'hôte. Nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux phénomènes directement impliqués dans l'expression des mécanismes effecteurs.

a/ Les molécules dérivées du parasite :

L'hypothèse selon laquelle certaines molécules du Schistosome peuvent agir comme agents inhibiteurs des fonctions de certaines cellules a été suggérée par la démonstration *in vivo* et *in vitro* de l'activité inhibitrice de certains produits métaboliques du *Schistosoma mansoni* sur la prolifération des lymphocytes (CAMUS *et al.* 1979, 1981 ; DESSAINT *et al.* 1977).

Ce facteur, dénommé SDIF pour *Schistosoma* Derived Inhibitory Factor, de faible poids moléculaire et thermolabile, inhibe la prolifération des lymphocytes T et tout particulièrement celle des CTL dans une culture lymphocytaire mixte, mais sans inhiber la production d'interleukine 2 IL2 (MAZINGUE *et al.* 1983). Des préparations purifiées du SDIF exercent une activité sélective sur la prolifération des cellules T IL2-dépendante, par contre, elles n'ont aucune activité sur les cellules B lymphocytaires, ou sur les macrophages.

Le SDIF possède de plus une activité inhibitrice marquée sur la réponse IgE primaire et secondaire, chez le rat immunisé par le système DNP-ovalbumine, quand celui-ci est injecté simultanément ou peu de temps après l'antigène (LANGLET *et al.* 1984). Cet effet peut être attribué à l'action du SDIF sur la prolifération lymphocytaire.

b/ Les peptides inhibiteurs du macrophage :

Certains peptides possèdent aussi une activité régulatrice de l'activation du macrophage. L'identification de ces peptides provient de 2 séries d'observations convergentes, l'une montrant l'existence d'un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines G à la surface du schistosomule (TORPIER *et al.* 1979), l'autre liée à la démonstration du relargage d'enzymes protéolytiques par les Schistosomes aux différents stades de leur maturation. Lorsque les molécules d'IgG se fixent au schistosomule par le récepteur Fc, différentes enzymes comme les sérine-protéases et les aminopeptidases sont capable de cliver les IgG et de conduire à la libération de différents peptides (AURIAULT *et al.* 1980, 1981a).

L'activité des peptides ainsi libérés a été étudiée dans différents systèmes effecteurs, et a conduit à la définition de leur rôle inhibiteur dans l'activation et dans l'activité cytotoxique du macrophage, ainsi que sur la production d'IL1 (AURIAULT *et al.* 1981a et b).

Des études plus récentes ont permis la caractérisation chimique des séquences peptidiques impliquées dans l'inhibition. Il s'agit d'un tripeptide Thr-Lys-Pro qui a depuis été synthétisé et reproduit l'ensemble des effets des peptides obtenus par clivage des IgG (AURIAULT *et al.* 1983, 1985). Ces deux aspects illustrent l'intérêt de ces molécules régulatrices, non seulement dans le contexte des relations qui lient l'hôte au parasite, mais aussi dans leur utilisation en tant qu'agents anti-inflammatoires et immunsupresseurs.

c/ La régulation par anticorps :

Ce dernier mécanisme a récemment permis de démontrer le rôle bloquant que peuvent exercer certains isotypes d'anticorps sur l'expression du rôle cytotoxique porté par d'autres isotypes d'anticorps. Nous développerons d'une manière plus détaillée cet aspect dans le chapitre consacré à nos travaux expérimentaux (article D).

d/ Modulation de la réponse immune par les complexes immuns :

Dans différentes infections parasitaires ou non parasitaires, les complexes immuns jouent un rôle régulateur de la réponse immune. Pour ce qui concerne la schistosomiase, il a été démontré que des éosinophiles prélevés à différents moments de l'infection sont cytotoxiques *in vitro* pour les schistosomules, sans nécessiter l'addition d'anticorps dans le système. Des études par la technique de formation de rosettes ont montré la présence d'anticorps cytophiles à la surface des éosinophiles cytotoxiques (M.CAPRON *et al.* 1979). Or, à certaines périodes après infection, essentiellement après une dizaine de semaines, les éosinophiles de rats immuns sont incapables de tuer des larves, même si des anticorps spécifiques leur sont ajoutés. A cette période, les récepteurs Fc sont bloqués, tout comme le sont des éosinophiles normaux incubés avec des sérums de cette période particulière (plus particulièrement le culot d'ultracentrifugation de ces sérums) de l'infection par Schistosomes. Par contre, à d'autres périodes, notamment après 6 semaines d'infection, les sérums n'induisent pas une telle inhibition de la cytotoxicité par éosinophiles. Ces expériences indiquent donc que la fonction effectrice des éosinophiles n'est pas constante au cours de l'infection mais peut être modulée à certaines périodes par des complexes immuns (M.CAPRON *et al.* 1979).

6) Les mécanismes effecteurs non spécifiques :

Certains composants humoraux ou cellulaires peuvent eux aussi agir directement sur la destruction des parasites, et sans pour cela qu'intervienne une phase de reconnaissance assimilable à la liaison spécifique qui lie l'anticorps à son antigène-cible.

Ainsi, l'activation du complément par la voie alterne, au niveau de la surface du schistosomule, conduit à une mortalité très significative de la larve parasitaire (SANTORO *et al.* 1979). Ce résultat illustre l'un des aspects possibles des mécanismes de l'immunité non spécifique. L'activité toxique du complément peut être amplifiée par la présence de cellules possédant les récepteurs pour certains composants C3b du complément, comme les éosinophiles, qui peuvent alors être activés en absence d'anticorps (ANWAR 1979 ; Mc KEAN et ANWAR 1981 ; RAMALHO-PINTO *et al.* 1978). Les expériences de déplétion en complément par l'injection du facteur du venin de cobra apportent un argument biologique à ce mécanisme, car dans ces conditions, on observe une chute sensible de l'immunité à la réinfection.

Inversement, la découverte de récepteurs pour les composants C1q (SANTORO *et al.* 1979 , OUAISSE *et al.* 1981) et C3b (OUAISSE *et al.* 1980 ; SAMUELSON *et al.* 1980) du complément à la surface du schistosomule, pourrait agir comme un mécanisme d'évasion du parasite à la réponse immune, par inhibition de l'activation de la cascade du complément (FAERON *et al.* 1980 ; IIDA et NUSSENZWEIG 1981).

Dans la schistosomiase murine, le rôle des cellules NK (Natural Killer) a aussi été évoqué par une argumentation parallèle du nombre de cellules et de leur état d'activation (ATTALAH *et al.* 1980 ; ABE *et al.* 1983). Des études beaucoup plus documentées concernant l'activité cytotoxique du macrophage de souris activé par les lymphokines, ont aussi été rapportées (BOUT *et al.* 1981 ; JAMES *et al.* 1982 ; KUBELKA *et al.* 1982 ; PECK *et al.* 1983). Poutant, ce mécanisme ne semble pas s'appliquer dans l'infection

humaine où l'activité cytotoxique des monocytes décroît au cours de l'infection (OLDS *et al.* 1981).

Parallèlement à ces observations, il est possible d'induire une forte résistance à l'infection ou à la réinfection par différents immunostimulants non spécifiques tels que le BCG, le corn factor, le muramyl dipeptide, ou l'induction d'une réaction inflammatoire par des agents chimiques ou bactériens (BOUT *et al.* 1977 ; MAHMOUD *et al.* 1979).

CHAPITRE II.

IDIOTYPIE ANTI-IDIOTYPIE ET IMMUNISATION

ANTI-IDIOTYPIQUE.

INTRODUCTION

L'étude des infections parasitaires a bénéficié depuis 1982, grâce aux travaux de SACKS *et al* d'une nouvelle méthodologie d'approche, par l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques permettant de construire des structures mimant les activités immunisantes de différents antigènes parasitaires.

Nous n'avons pas la prétention, dans ce chapitre, de présenter d'une manière exhaustive l'ensemble des données concernant l'idiotype des immunoglobulines accumulées depuis plus de 20 années, tant la littérature est abondante . Mais nous nous attacherons plutôt à présenter les aspects les plus marquants de ce domaine, pour justifier l'introduction des anticorps anti-idiotypiques dans notre approche de l'infection par *Schistosoma mansoni* .

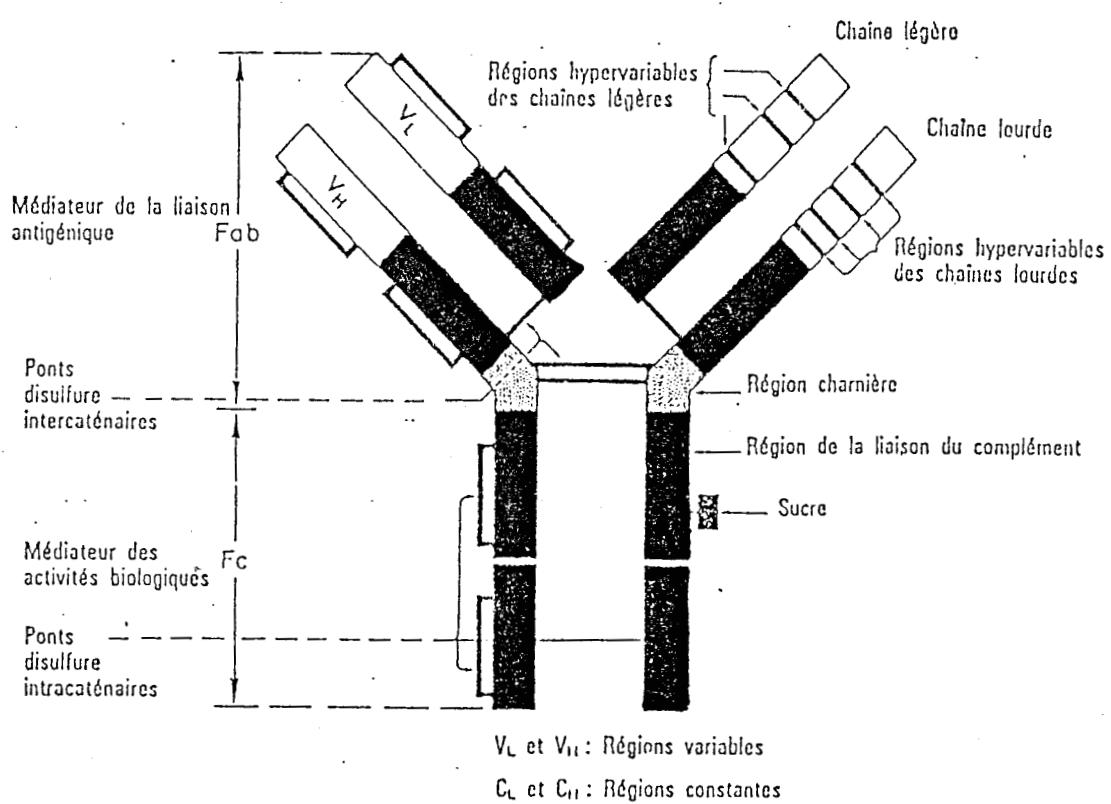
A- LA VARIABILITE DES IMMUNOGLOBULINES

Bien que toutes les immunoglobulines présentent une "architecture" moléculaire identique qui résulte de l'association de 2 chaînes lourdes H et de 2 chaînes légères L (Figure 3), ces glycoprotéines se caractérisent par une large diversité d'où l'on peut néanmoins définir 3 niveaux essentiels de variabilité. Cette variabilité est étroitement liée aux gènes codant leurs chaînes polypeptidiques constitutives.

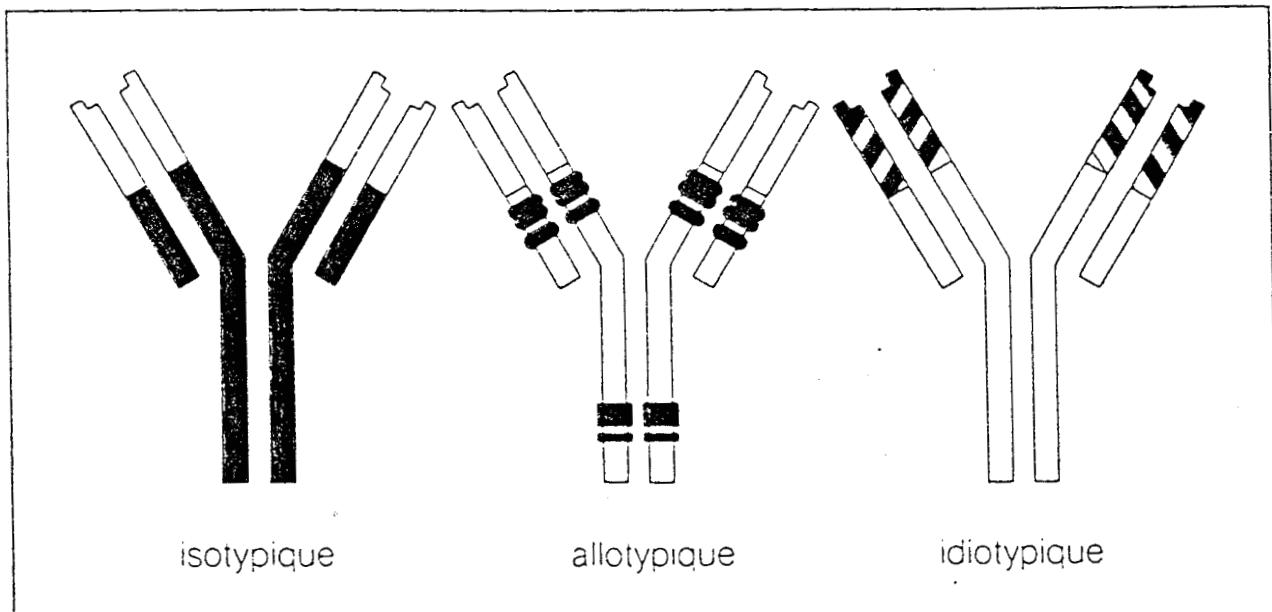
1) Les variations isotypiques :

Les gènes codant pour les variants isotypiques sont présents chez tous les individus d'une même espèce et définissent, par exemple chez l'homme, les différents isotypes. Ces isotypes sont codés par les gènes correspondant aux chaînes lourdes $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \mu, \alpha, \epsilon, \delta$, et aux chaînes légères κ, λ et η (Figure 4a).

FIGURE 3:
-TOPOLOGIE ET ARCHITECTURE FONCTIONNELLE DE LA
MOLECULE D'IgG-



(d'après Wasserman R.L. et Capra J.D., in The Glycoconjugates, M.I. Horowitz et W. Pigman eds, pp.323-348, Academic Press, New York 1977).

-FIGURE 4--LES DIFFERENTS NIVEAUX D'HETEROGENEITE DES
IMMUNOGLOBULINES-

2) Les variations allotypiques :

Elles dépendent de variations génétiques à l'intérieur d'une même espèce d'un groupe d'individus, et mettent en jeu différents allèles d'un même locus. C'est ainsi que les variants allotypiques G₃m(bo) de l'IgG3 correspondent à la présence d'un résidu phénylalanine situé en position 436 de la chaîne γ_3 qui n'est pas retrouvé chez tous les individus. Ces déterminants allotypiques sont généralement localisés dans les domaines constants des chaînes lourdes des immunoglobulines (Figure 4b)

3) Les variations idiotypiques :

Les parties variables, et plus particulièrement les régions hypervariables des immunoglobulines expriment des déterminants antigéniques qui leur sont propres, et distincts des marqueurs isotypiques et allotypiques. Chacun de ces déterminants est appelé IDIOTYPE ; la somme des idiotypes d'une partie variable constitue l'IDIOTYPE (Figure 4c).

Généralement, l'idiotype est spécifique d'un seul clone cellulaire : on parle alors d'IDIOTYPES PRIVES (Id I). Mais parfois, différents clones cellulaires peuvent exprimer le même déterminant idiotypique, appelé IDIOTYPE PUBLIC ou RECURRENT (Id X).

Ces différents marqueurs idiotypiques ont été abondamment étudiés pour détecter et comparer la structure des régions variables des immunoglobulines grâce à la production de différents anticorps spécifiques appelés anticorps anti-idiotypiques.

B- STRUCTURE ET LOCALISATION DES IDIOTOPES

1) Structure :

Toutes les parties des régions V_H et V_L des immunoglobulines peuvent être immunogènes, et définir de fait un idiotope. Ainsi, de nombreux déterminants idiotypiques ont été caractérisés dans les régions V_H et V_L des immunoglobulines, tant dans les parties hypervariables que dans l'"ossature". L'expression d'un idiotope nécessite parfois l'association d'une région V_H et V_L . Il est toutefois difficile d'établir une règle générale quant à la structure de ces motifs idiotypiques, les travaux de caractérisation ayant généralement utilisé des antisérum polyclonaux qui, bien que préparés vis-à-vis d'une immunoglobuline particulière, sont toujours multispécifiques. Ce dernier aspect se clarifie actuellement grâce à l'introduction des anticorps monoclonaux.

2) Localisation des déterminants idiotypiques :

De nombreux arguments plaident en faveur d'une localisation des idiotopes au niveau des régions variables et hypervariables des immunoglobulines.

- le fait que les spécificités idiotypiques sont liées à la fonction anticorps
- les fragments Fab, et dans certains systèmes les chaînes L et H isolées peuvent être reconnues par des anticorps anti-idiotypiques.
- le fragment Fc de la protéine myélomateuse murine MOPC 315 porte les déterminants antigéniques individuels de la protéine native.
- dans certains systèmes d'anticorps anti-haptène, il est possible d'inhiber partiellement ou totalement la fixation des anticorps anti-idiotypes sur l'idiotype par

l'haptène. Ce dernier argument démontre clairement que certains déterminants idiotypiques sont effectivement liés au site anticorps, bien que cette dernière localisation ne soit pas exclusive.

C-DECOUVERTE DE L'IDIOTYPIE.

Les premières observations concernant l'existence des spécificités individuelles des immunoglobulines ont été apportées presque simultanément en 1963 grâce aux travaux de OUDIN et MICHEL, dans le cas des anticorps de lapins immunisés contre *Salmonella typhii*, et chez l'homme par KUNKEL, MANNIK et WILLIAMS sur des anticorps humains spécifiques de déterminants antigéniques des globules rouges.

KUNKEL *et al* avaient déjà montré que les protéines de myélome possèdent des déterminants antigéniques qui leur étaient propres, localisés dans le domaine variable des immunoglobulines. En effet, des anticorps préparés contre une immunoglobuline monoclonale et absorbés de façon exhaustive avec d'autres protéines myélomateuses ou des immunoglobulines isolées de sérum humain normal, continuent à réagir spécifiquement avec l'immunoglobuline immunisante.

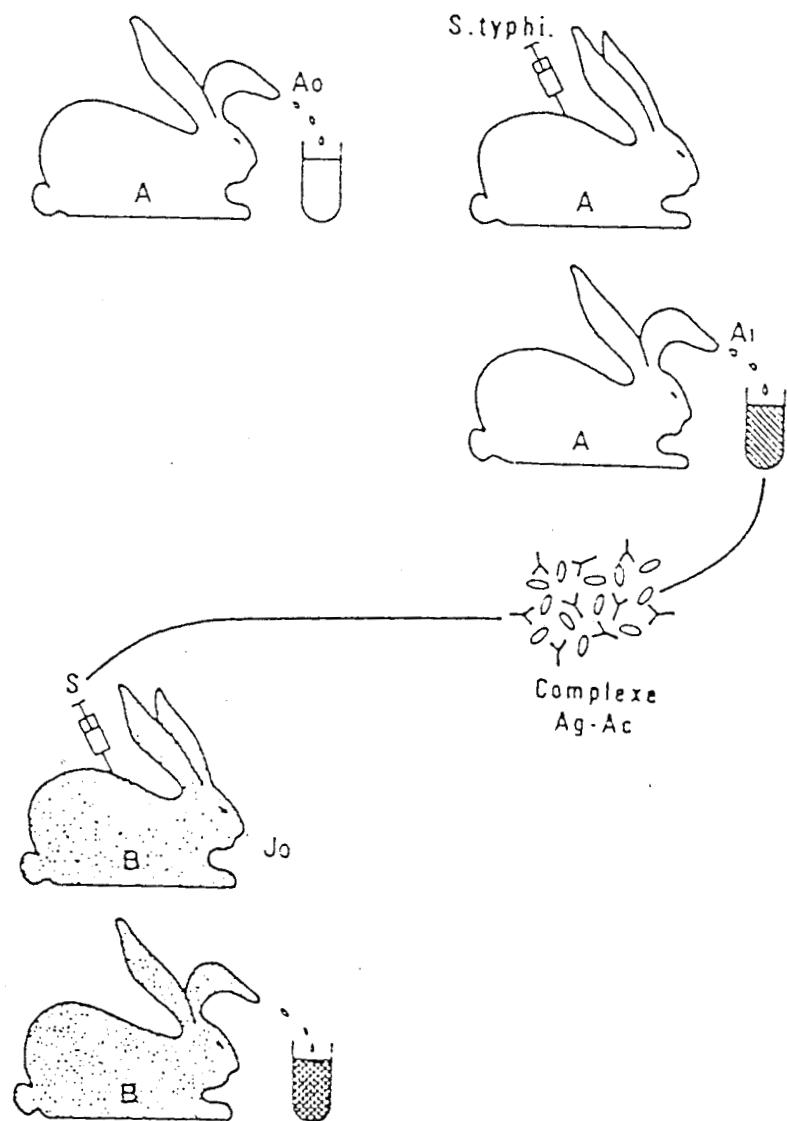
Ces spécificités antigéniques furent dénommées spécificités antigéniques individuelles des protéines de myélome. On sait aujourd'hui que l'idiotypie des anticorps et les spécificités antigéniques individuelles des protéines myélomateuses relèvent toutes deux du même phénomène regroupé sous le terme d'idiotypie.

1) Expérience d'Oudin et Michel ; l'idiotypie des anticorps anti-*Salmonella typhii* :

Au cours de cette expérience initiale réalisée sur des lapins présentant la même constitution allotypique (Figure 5), des anticorps anti-*Salmonella typhii* ont été préparés chez un lapin A.

-FIGURE 5-

-EXPERIENCE D'QUIN ET MICHEL : L'IDIOTYPIE DES ANTICORPS
ANTI-SALMONELLA TYPHII.-



Le lapin A est immunisé par *S.typhii*. Le lapin B, de même constitution allotypique que A est immunisé par un agglutinat de *S.typhii* anti-*S.typhii* de A. Le lapin B produit des anticorps anti-idiotypiques qui sont précipités par le sérum A₁, mais non pas par le sérum A₀.

Ces anticorps, recueillis lors d'une saignée A1, sont ensuite incubés en présence de la Salmonelle immunisante. Les agglutinats ainsi obtenus sont alors injectés chez le lapin B. Les sérums recueillis à partir du lapin B contiennent des anticorps qui ne réagissent que contre les anticorps anti-*Salmonella typhii* prélevés chez le lapin A, mais aucune réaction n'est observée avec le sérum du lapin A (A_O) prélevé avant immunisation, ni avec le sérum d'autres lapins immunisés par *Salmonella typhii*.. L'apparition dans ces conditions de nouveaux déterminants antigéniques dans le sérum du lapin A était donc bien liée à la production chez ce même lapin d'anticorps anti-*Salmonella typhii*. L'antisérum B fut donc appelé sérum anti-idiotypique puisqu'il reconnaît les idiotypes A, c'est-à-dire les anticorps anti-*Salmonella typhii* de A, qui sont eux-mêmes définis par leur spécificité idiotypique.

Les anticorps immunisants anti-*Salmonella typhii* et les anticorps anti-idiotypiques qui les reconnaissent, constituent le système idiotypique de *Salmonella typhii*.. Ce système idiotypique est révélé par une réaction de précipitation qui, selon la terminologie de Landsteiner, est appelée réaction homologue. Les nombreuses études réalisées par la suite ont permis à Oudin et Cazenave de tirer une conclusion paradoxale démontrant que les mêmes déterminants idiotypiques peuvent se retrouver sur des anticorps dirigés contre différents épitopes d'une même molécule d'antigène.

Dans le système idiotypique de *Salmonella typhii*, des réactions de précipitation entre le sérum anti-idiotypique et un antisérum anti-*Salmonella typhii* obtenu chez un lapin autre que le lapin A ont pu être observées et caractérisent, selon la nomenclature de Landsteiner, des réactions hétérologues. Ces réactions ont surtout été décrites dans d'autres systèmes et plus particulièrement avec des anticorps synthétisés chez le lapin contre les polysaccharides du Pneumocoque ou du Streptocoque.

2) Production d'anticorps ou de sérum anti-idiotypiques :

Des sérum anti-idiotypiques peuvent être préparés par xénoimmunisation, en injectant des anticorps humains à un lapin, mais dans ces conditions particulières il est nécessaire d'extraire préalablement des sérum anti-idiotypiques obtenus tous les anticorps dirigés contre les déterminants non idiotypiques. Outre ces techniques d'épuisement des sérum anti-idiotypiques, de tels sérum peuvent être obtenus chez le cobaye tolérisé préalablement par l'injection d'immunoglobulines normales d'un animal X, avant l'injection de l'anticorps produit chez ce même animal X. Ainsi le cobaye ne synthétise plus que des anticorps spécifiques des déterminants idiotypiques.

Ces études de l'idiotype se sont beaucoup développées chez la souris où l'on observe de nombreuses réactions hétérologues entre souris de la même lignée. Cependant, l'introduction de la technique des hybridomes dans ce domaine a largement contribué à la caractérisation et à la dissection des déterminants idiotypiques.

3) Evolution des idotypes au cours de la réponse immunitaire :

Au cours de la réponse immunitaire, les anticorps présentent une hétérogénéité moyenne et une affinité pour l'immunogène croissant avec le temps. Des observations similaires ont été réalisées dans le cas des systèmes idiotypiques.

En fonction du temps, on observe soit l'apparition, soit la disparition de nouvelles spécificités idiotypiques même si, dans le cas du système idiotypique de *Salmonella typhii*, on a pu observer la réapparition du même idotype après un intervalle de deux ans, doublée d'une évolution de la répartition moléculaire des spécificités idiotypiques. Les travaux de Oudin et Bordenave illustrent ce dernier point par la mise en évidence des mêmes déterminants idiotypiques sur des anticorps d'isotype IgM et IgG spécifiques qui apparaissent de manière séquencée au cours de la réponse immunitaire.

Ces résultats sont en accord avec le fait que les régions variables des chaînes lourdes s'associent aux divers C gamma ,C mu et C alpha.

Chez l'homme, les mêmes déterminants idiotypiques ont été retrouvés sur des IgM et des IgG₂ myélomateuses. Dans ce cas, l'analyse des séquences des régions variables montre qu'elles sont identiques.

Ces observations, tout comme la rareté des réactions hétérologues, traduisent l'hétérogénéité des populations d'anticorps, et indiquent que plusieurs molécules différentes peuvent reconnaître un même déterminant antigénique. D'autre part, l'utilisation de souris de même constitution génétique suggère que l'expression des idiotypes est contrôlée par un petit nombre de gènes puisque des souris différentes peuvent exprimer les mêmes déterminants idiotypiques.

D - LA THEORIE DU RESEAU IDIOTYPIQUE: LA REGULATION IDIOTYPIQUE.

La présence dans les régions variables des anticorps de déterminants idiotypiques spécifiques capables de susciter la production d'anticorps anti-idiotypiques soulève de nombreuses questions concernant le rôle de ces systèmes dans l'expression d'une modulation de la réponse immune. L'existence même d'anticorps anti-idiotypiques révèle la présence dans l'organisme de lymphocytes capables de reconnaître les idiotypes des différents anticorps. Ainsi, chaque molécule d'anticorps Ab1 porte des déterminants idiotypiques qui lui sont propres, capables d'induire la production d'un anticorps Ab2 qui le reconnaît spécifiquement. Cet anticorps Ab2 portera lui-même ses propres déterminants idiotypiques qui à leur tour pourront conduire à la production d'anticorps Ab3 qui par la suite seront reconnus par des anticorps Ab4, etc.

Les anticorps ainsi produits pourront soit être dirigés contre des idiotypes situés dans le site de liaison de l'anticorps à l'antigène (paratope), ou situés en dehors du paratope (Figure 6). Dans ces conditions, seuls les premiers seront capables d'inhiber la liaison de l'anticorps à son antigène-cible. Certains de ces anticorps, nous le verrons plus tard, peuvent mimer et jouer le rôle fonctionnel de l'antigène initial, et sont appelés anticorps anti-image interne de l'antigène, et peuvent de fait susciter différents effets modulateurs. Leur effet global dépend de différents facteurs dont la plupart n'ont pas encore été élucidés.

Outre les aspects modulateurs liés à l'identité structurale de ces anticorps anti-idiotypiques avec l'antigène, les anticorps anti-idiotypiques présentent la particularité, par rapport aux antigènes, de posséder un fragment Fc, et donc d'interagir avec différentes populations cellulaires immunocompétentes portant des récepteurs pour ce fragment Fc des immunoglobulines.

1) La théorie de Jerne :

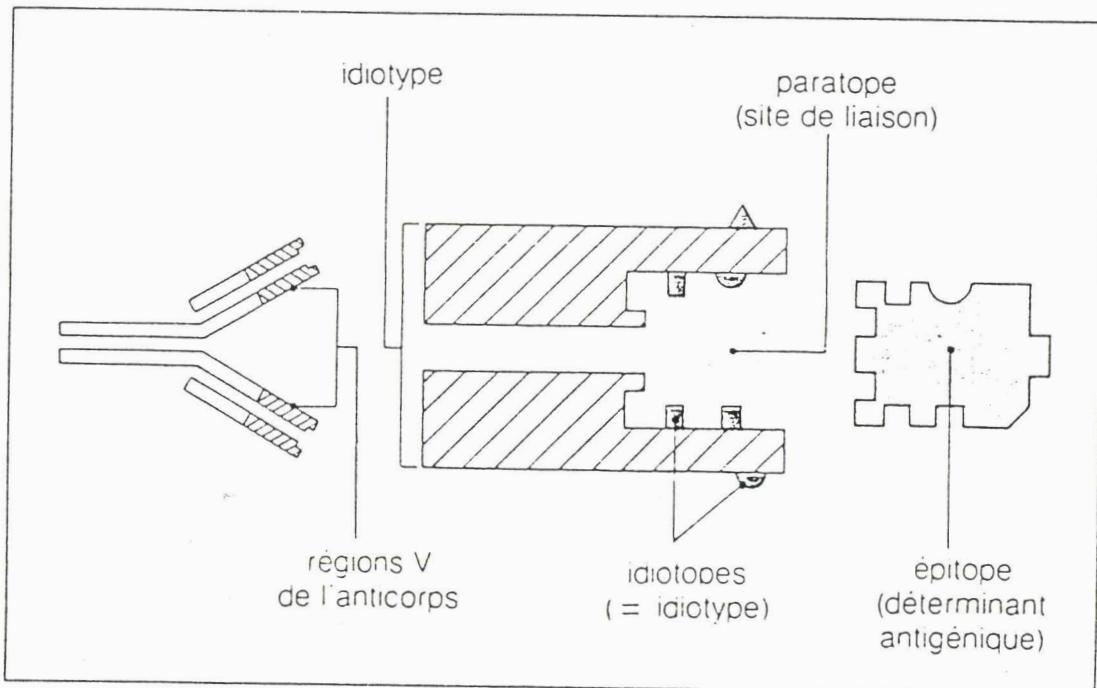
A partir de ces observations, JERNE (1974) a élaboré la théorie des réseaux idiotypiques, qui pourrait expliquer le maintien de l'homéostase du système immunitaire. Le concept central de la théorie de Jerne se base sur l'hypothèse qu'à chaque antigène ou épitope correspond un idiotype, son image interne, en d'autres termes, que "l'univers des antigènes se confond du point de vue conformationnel avec celui des idiotypes".

Dans la théorie du réseau, trois acteurs principaux interviennent :

- le déterminant antigénique ou EPITOPE
- le déterminant idiotypique ou IDIOTOPE
- le site de liaison de l'anticorps à l'antigène ou PARATOPE

FIGURE 6:

-REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REGION VARIABLE DES
ANTICORPS-

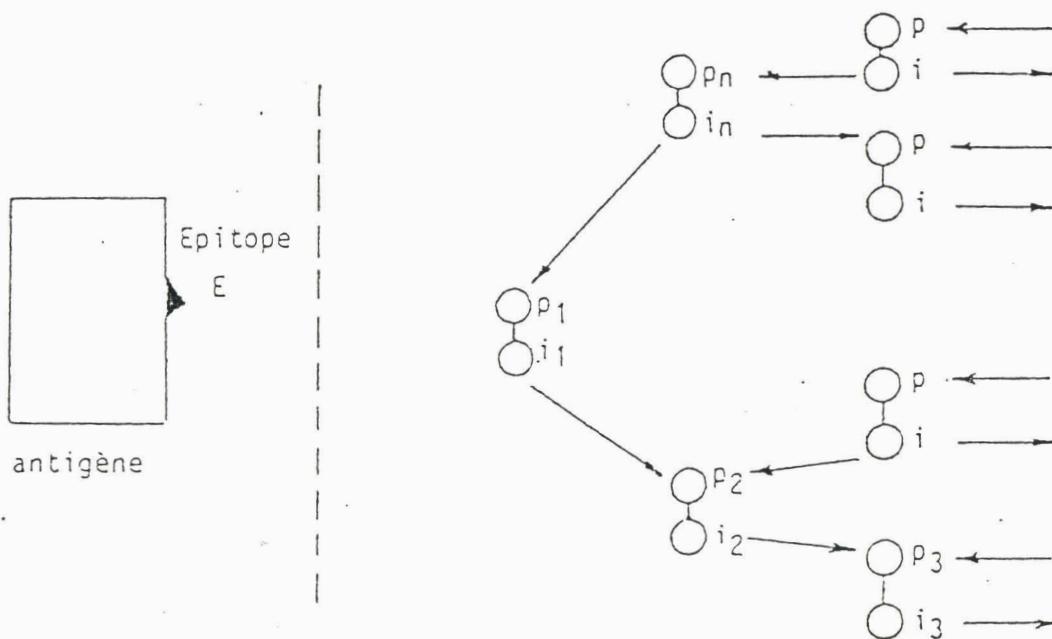


L'épitope E d'un antigène X introduit dans un organisme se combine à un paratope p_1 . Ce paratope p_1 exprime lui-même un idiotype i_1 qui sera lui-même reconnu par un paratope p_2 porteur d'un idiotype i_2 reconnu à son tour par un paratope p_3 . Dans cet ensemble, les idiotypes exercent un effet stimulateur, les paratopes un effet inhibiteur. Il arrive qu'un idiotype i_n , lié au paratope p_n , soit reconnu par le paratope p_1 d'idiotype i_n . L'idiotype i_n est appelé image interne de l'épitope E. Les molécules $p_n i_n$ qui portent l'image interne de l'épitope E ont un effet activateur sur l'ensemble $p_1 i_1$, l'ensemble $p_2 i_2$ exerce un effet inhibiteur sur l'ensemble $p_1 i_1$.

Ce schéma rend compte de la réponse immune de la manière suivante: l'élimination de l'ensemble $p_1 i_1$ (Ab1) par l'antigène supprime son effet inhibiteur sur l'image interne $p_n i_n$ en même temps que son effet stimulateur sur l'ensemble $p_2 i_2$. Ceci fait que les cellules $p_1 i_1$ échappent à la suppression et expriment leur potentialité. La régulation de la réponse immune s'opère quasi automatiquement car l'ensemble $p_1 i_1$ nouvellement formé stimule l'ensemble $p_2 i_2$ qui exerce son effet suppresseur sur lui. Cette cascade d'interactions s'accompagne d'un accroissement des cellules productrices de l'anticorps Ab1 spécifique de l'épitope à l'origine de la mémoire immunitaire.

Ce schéma rend d'autre part compte de l'effet suppresseur induit par les anticorps anti-idiotypiques. En absence de stimulation par l'épitope E les anticorps anti-idiotypiques $p_2 i_2$ injectés artificiellement dans ce système peuvent se combiner à l'ensemble $p_1 i_1$ qu'ils contribuent à éliminer, ce qui libère l'effet inhibiteur exercé sur l'image interne $p_n i_n$ qui stimule alors l'ensemble $p_1 i_1$ comme le ferait l'épitope E lui-même (Figure 7).

FIGURE 7:
-LA THEORIE DU RESEAU-



Bien que depuis 1974 certaines observations soient venues compliquer la compréhension du réseau idiotypique, comme :

1° - l'existence d'idiotypes différents de ceux des immunoglobulines sur les récepteurs des cellules T

2° - l'effet inhibiteur et non seulement stimulateur des anticorps anti-idiotypiques sur la production d'anticorps

3° - l'induction par un anticorps Ab1 de la production de plusieurs Ab2
ces études ne remettent pourtant pas fondamentalement en cause la théorie initiale de Jerne.

D'autres travaux sont compatibles avec la théorie et peuvent même être interprétés pour certains d'entre eux comme une véritable confirmation du réseau idiotypique.

2) Arguments expérimentaux :

De nombreux travaux expérimentaux ont permis de vérifier la réalité biologique du réseau idiotypique de Jerne. Ils ont d'autre part révélé les bases de l'activité immunorégulatrice des interactions idiotypiques dans l'expression de l'immunité, et ont également permis de démontrer la réalité biologique de la production spontanée d'anticorps anti-idiotypiques au cours de l'immunisation.

a/ Rôle immunorégulateur des interactions idiotypiques :

Selon les conditions expérimentales retenues, les anticorps anti-idiotypiques stimulent ou inhibent la synthèse des anticorps. Les expériences les plus démonstratives dans ce domaine ont été pratiquées chez la souris.

***La suppression de la réponse anticorps .**

Les souris Balb/c immunisées par la phosphoryl choline (PC) produisent des anticorps anti-PC qui expriment un idiotype prédominant appelé idiotype T15. L'injection d'antisérum anti-idiotypique spécifique de l'idiotype T15, préparé chez la souris ou le lapin, supprime la réponse anticorps anti-PC. Ces travaux menés par COSENZA et KOHLER (1972) conduisent à deux observations essentielles.

Chez la souris Balb/c adulte, l'injection de fortes doses de sérum anti-idiotypique supprime de façon transitoire la réponse immune anti-PC (3 à 4 semaines). Lorsque les souris adultes surmontent cette suppression de courte durée, elles produisent des anticorps anti-PC qui possèdent les déterminants idiotypiques T15.

Inversement les injections néonatales de sérum anti-idiotypique installent une suppression de la réponse anti-PC de longue durée (jusqu'à 15 semaines). Après cette période l'injection de la PC conduit à la production d'anticorps dépourvus de l'idiotype T15.

Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par le fait que les sérum de souris nouvellement nées contiennent de faibles quantités d'idiotype T15 contrairement aux souris adultes. Il est donc possible que les quantités importantes de l'idiotype T15 présentes chez la souris adulte neutralisent rapidement les anticorps anti-idiotypiques injectés.

Des expériences similaires de suppression ont été entreprises chez la souris A/J immunisée contre l'haptène phénylarsonate par HART *et al* 1972. Ces études révèlent que seuls les anticorps anti-idiotypiques natifs induisent cet effet suppresseur, à l'inverse de leurs fragments Fab ou Fab'₂, ce qui suggère de fait la participation des fragments Fc des anticorps qui pourraient agir par le biais du complément.

Il semble d'autre part que cette suppression idiotypique soit un mécanisme thymoindépendant puisqu'elle peut aussi bien être induite chez la souris Balb/c normale que chez la souris Balb/c nu/nu, quasiment déficiente en cellules T.

***Exaltation de la réponse immune :**

Par la technique de sélection clonale, EICHMANN *et al* (1975) sont parvenus à transférer chez la souris A/J un clone cellulaire A5A, producteur d'anticorps anti-polysaccharide du Streptocoque, obtenu à partir de souris immunisées par le polysaccharide du Streptocoque. Chez la souris A/J, environ 90% des animaux expriment le déterminant idiotypique A5A sur leurs anticorps anti-polysaccharide du Streptocoque, et chez chaque souris, environ 25% des anticorps anti-polysaccharide du Streptocoque possèdent ce même déterminant qui est de fait un déterminant idiotypique public.

Dans ces conditions, l'injection d'anticorps anti-idiotypiques anti-A5A, préparés chez le cobaye, peut induire ou supprimer la production d'anticorps anti-polysaccharide du Streptocoque. La fraction purifiée d'IgG2 anti-A5A exerce une activité suppressive sur la synthèse de l'idiotype A5A sans modifier les autres idiotypes. Cette capacité des IgG2 est sans doute en relation avec leurs aptitudes à fixer le complément. Cette suppression est de longue durée, et a pu être reliée à la présence de cellules suppressives.

Par contre, l'injection de la fraction purifiée des IgG1 anti-A5A sensibilise la souris à l'égard du polysaccharide du Streptocoque qui se traduit par une stimulation de la production des anticorps anti-polysaccharide du Streptocoque portant essentiellement l'idiotype A5A. Il semble donc que les IgG1 anti-A5A réagissent sur les lymphocytes B, très probablement par l'intermédiaire d'un récepteur capable de reconnaître le polysaccharide du Streptocoque qui semble porter les déterminants idiotypiques A5A.

In vitro, les expériences de TRENKNER et RIBLET (1975), réalisées sur des cellules de souris Balb/c immunisées par la PC indiquent que l'interaction des anticorps anti-idiotypiques avec les récepteurs appropriés des lymphocytes B induit la production d'anticorps anti-PC et que ces anticorps portent les déterminants idiotypiques contre lesquels les anticorps anti-idiotypiques utilisés étaient dirigés. A dose relativement faible, on obtient une stimulation des lymphocytes B tandis qu'à des doses 100 fois plus importantes, on induit une suppression idiotypique.

b/ Auto-anticorps anti-idiotypiques, les anticorps à fonction d'image interne.

La caractérisation de ces anticorps représente certainement l'un des arguments majeurs en faveur de la réalité physiologique du réseau idiotypique. L'existence de l'ensemble p_2i_2 correspondant aux auto-anticorps anti-idiotypiques spontanés, a été observée dans le cas des immunisations par différents antigènes chimiques et dans le cas des allogreffes. Dans ces systèmes on observe la production d'anticorps Ab2 parfois même d'Ab3.

Des anticorps anti-idiotypiques ayant fonction d'image interne ont été décrits . SEGE *et al* dès 1978 montrent que les anticorps anti-idiotypiques des anticorps anti-insuline peuvent mimer les effets de l'insuline. Dans ce cas, il existe une identité structurale suffisamment étroite entre l'insuline et l'anticorps pour que cette image interne reproduise les fonctions biologiques de l'hormone.

Des Ab2 spécifiques d'anticorps anti-acétylcholine ou anti-homologues structuraux de l'acétylcholine peuvent se lier au récepteur de l'acétylcholine. Dans le cas de l'immunisation de souris contre un analogue structural de l'acétylcholine, des anticorps Ab1 sont produits mais spontanément on observe des auto-anticorps Ab2 dont certains sont capables de se lier au récepteur de l'acétylcholine (CLEVELAND *et al* 1983).

Des anticorps Ab1, préparés contre l'allotype b6 de la région constante kappa des immunoglobulines de lapin, induisent par immunisation la production d'anticorps Ab2 qui reconnaissent tous les anticorps anti-b6. De plus, les anticorps Ab3 préparés vis-à-vis de cet anticorps Ab2 réagissent avec les immunoglobulines de lapin portant la spécificité allotypique b6, comme le faisait l'anticorps Ab1 (ROLAND et CAZENAVE 1981).

3) Conclusion :

Les travaux que nous venons de rapporter ici et qui ne représentent malheureusement qu'un trop bref résumé des nombreuses études réalisées dans ce domaine, indiquent néanmoins l'extraordinaire évolution de la notion d'idiotypie accomplie depuis la découverte en 1963 des variations idiotypiques.

Outre la caractérisation et la localisation moléculaire des motifs idiotypiques et l'étude de leur expression au niveau des immunoglobulines, les déterminants idiotypiques et les réponses immunes qu'ils suscitent ont permis de reconsidérer l'extrême complexité des mécanismes de régulation de la réponse immune. Ils ont conduit Jerne (1974) à proposer une théorie rendant compte de l'homéostase du système immunitaire.

Cette théorie du réseau idiotypique a permis de mieux appréhender les effets immunorégulateurs des interactions idiotypiques dans le maintien de l'équilibre dynamique du système immunitaire, et d'ouvrir de fait de nouvelles perspectives dans l'immunomanipulation de la réponse immune par le biais des potentialités propres des différents anticorps anti-idiotypiques, selon qu'ils sont induits par des idiotypes paratopiques ou non paratopiques. C'est dans ce contexte que nous développerons maintenant l'aspect de l'immunisation anti-idiotypique.

E- LES IMMUNISATIONS IDIOTYPIQUES.

1-Les différents anticorps anti-idiotypiques :

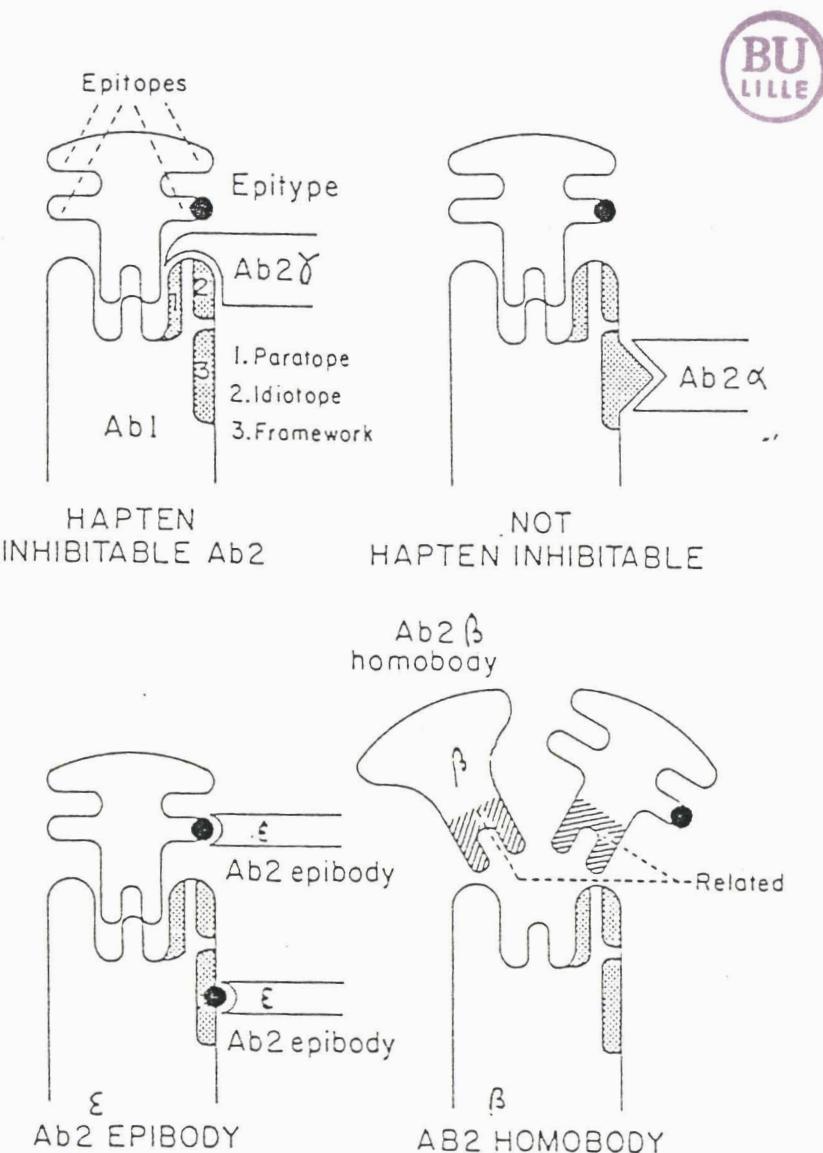
Comme nous l'avons déjà évoqué dans ce chapitre, l'injection dans un organisme d'un anticorps Ab1 conduit à la production d'anticorps Ab2 spécifiques des idiotypes de l'anticorps Ab1, mais qui expriment des propriétés très différentes selon qu'ils sont spécifiques d'idiotypes situés dans le paratope ou hors de celui-ci. C'est ainsi que sur la base de la reconnaissance des idiotypes, on peut définir 4 catégories d'anticorps anti-idiotypiques (Figure 8):

a)-les anticorps anti-idiotypiques alpha:,($Ab2\alpha$) aussi appelés selon Oudin anticorps anti-idiotype "vrais", spécifiques d'idiotypes non paratopiques

b)-les anticorps anti-idiotypiques beta ($Ab2\beta$) qui sont induits par des idiotypes paratopiques qui, puisqu'ils sont reconnus par l'anticorps Ab2 comme l'est l'épitope, portent l'image interne de l'épitope. Ces $Ab2\beta$ sont donc capables de mimer les propriétés immunologiques fonctionnelles de cet épitope, et sont de fait capables d'induire la production d'anticorps Ab3 qui doivent refléter les propriétés des anticorps Ab1 initiaux. Ces anticorps présentent d'autre part la propriété d'inhiber la réaction Ab1-épitope.

c)-les anticorps anti-idiotypiques gamma ($Ab2\gamma$) : ces anticorps, bien qu'ils inhibent la réaction Ab1-épitope, ne portent pas l'image interne de l'épitope. Ils sont généralement dirigés contre des idiotypes proches du site de liaison anticorps-antigène et exercent leur effet par inhibition stérique ou modification conformationnelle du site paratopique.

FIGURE 8 :
-LES DIFFERENTS ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES-
 (selon BONA *et al* 1986)



d)-les anticorps anti-idiotypiques epsilon (Ab2 ε) : ces anticorps représentent une catégorie un peu à part puisqu'ils reconnaissent d'une part les idiotypes présents sur l'anticorps Ab1, mais aussi des structures présentes sur l'antigène (BONA *et al* 1982).

Parmi les anticorps anti-idiotypiques, les Ab2 β tiennent une place toute particulière puisqu'ils portent l'image interne de l'épitope. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de leur possible utilisation comme antigènes de substitution, dans l'immunoprophylaxie des maladies transmissibles. Mais leurs propriétés ont aussi été exploitées dans des domaines aussi divers que la cancérologie, l'autoimmunité, la transplantation d'organe et le diagnostic.

Avant d'illustrer ces différents aspects des immunisations idiotypiques ,il semble opportun d'établir, grâce à quelques exemples les relations liant un épitope à son image interne portée par la molécule d'anticorps Ab2 β . Nous verrons comment au-delà d'une pure relation d'identité moléculaire on peut concevoir d'une manière plus large la notion d'identité conformationnelle. Nous illustrerons ces propos grâce aux modèles d'études décrits par ROITT *et al* 1985.

2)De la notion d'image interne vraie au concept d'antigène de substitution.

Considérons un épitope hypothétique défini au niveau d'un antigène par un enchaînement de 4 ou 5 acides aminés (Figure 9a). L'image de cet épitope portée par l'anticorps Ab2 β révèle la même séquence d'acides aminés dans sa région hypervariable (Figure 9a) . Les chances d'obtenir ce même motif sur l'anticorps Ab2 β sont difficiles à estimer , et bien que ce type de combinaison soit compatible avec la diversité des anticorps, cette séquence d'acides aminés doit aussi tenir compte , pour être efficace , de son environnement peptidique dans la molécule qui influe sur sa configuration spatiale et donc sur son degré d'identité avec l'épitope .

FIGURE 9:

-IMAGE INTERNE VRAIE-

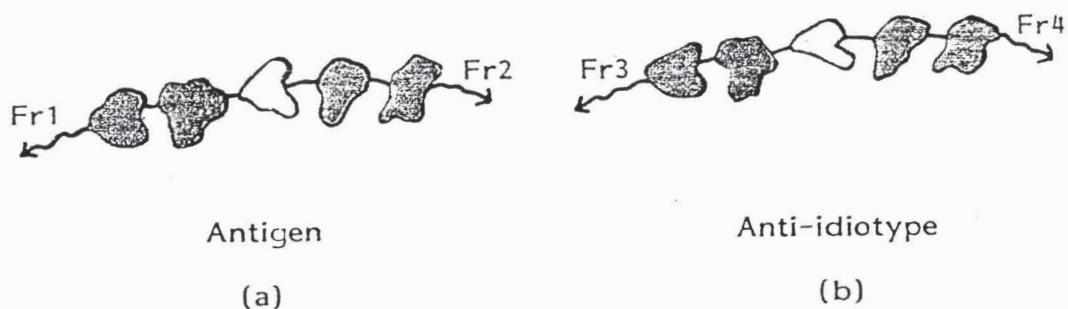
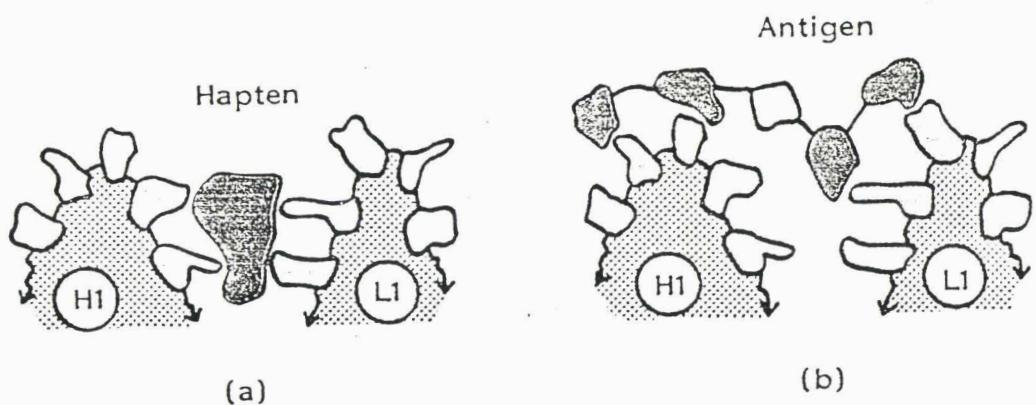


FIGURE 10:

- LE SITE DE LIAISON ANTIGENE ANTICORPS-



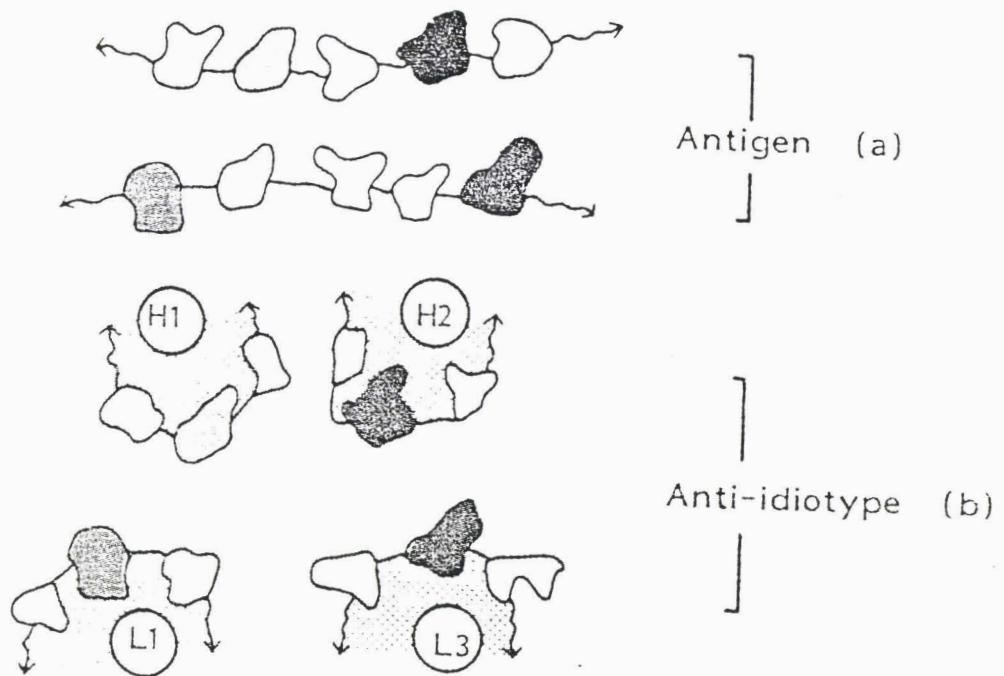
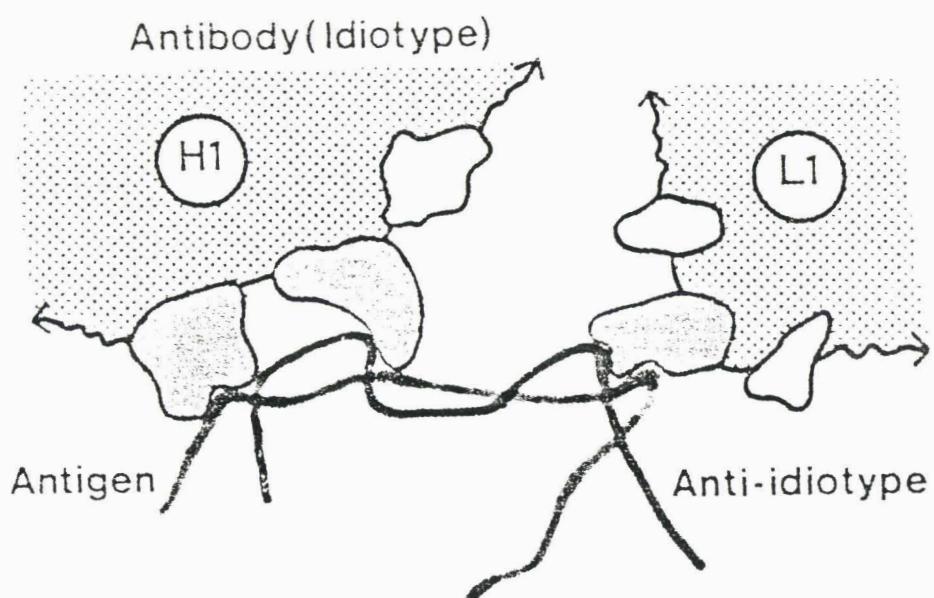
a) "Mimicrie" des résidus de contact.

Les sites de contact entre l'anticorps et l'antigène doivent être nombreux afin d'assurer une bonne cohésion du complexe immun ,d'autant plus nécessaire que les interactions mises en jeu sont de faible énergie. Ces liaisons multiples sont facilitées par la structure en "creux et bosses" du site de fixation de l'anticorps . Les antigènes de petite taille pénètrent profondément dans le site, alors que les antigènes globulaires établissent des contacts beaucoup plus superficiels (Figure 10a et b). Dans ce dernier cas les points de contact peuvent donc intéresser des acides aminés éloignés les uns des autres et même situés sur des chaînes peptidiques différentes.

Si l'on suppose que le contact de l'antigène s'exerce par 4 résidus présents (Figure 11 a) des acides aminés placés de la même manière sur différentes chaînes peptidiques de l'anticorps Ab2 β peuvent donc simuler l'antigène (Figure 11b). Dans ce cas l'image interne est restituée par la disposition des résidus de contact et non par la forme générale des molécules d'anticorps Ab2 et de l'antigène qui peuvent être donc très différentes. Dans ces conditions il n'est pas nécessaire de postuler une identité parfaite de structure ,d'autres acides aminés pouvant assurer des liaisons similaires.On peut parler dans ce cas d'antigène de substitution pour un anticorps anti-Id même s'il ne porte pas l'image interne vraie .

b) Résidus de contact obligatoire.

La notion de réaction croisée entre un anticorps anti-Id et l'antigène peut être étendue aux antigènes non protéiques comme les carbohydrates .Ces réactions avaient été expliquées par ERLANGER (1985) par une identité conformationnelle ,mais ROITT *et al* 1985 proposent une autre hypothèse en relation avec la notion de résidus de contact obligatoire : l'image interne ne serait plus définie par une identité conformationnelle, mais

FIGURE 11 :-"MIMICRIE DES RESIDUS DE CONTACT"-.FIGURE 12 :-RESIDUS DE CONTACT OBLIGATOIRE-

par l'interaction avec des acides aminés dominants (Figure 12). Cette hypothèse pourrait expliquer l'induction par une image interne protéique d'une réponse anti-polysaccharide (BONA et KOHLER 1984) ou la production d'anticorps anti-Id contre de petites molécules ,comme les agonistes de l'acétylcholine (CLEVELAND *et al* 1983) ou vis- à- vis d'agonistes de β adrénnergiques (SCHEIBER *et al* 1980). Dans ces deux cas les anticorps anti-Id ne ressemblent pas à l'agoniste mais comme ces agonistes ils interagissent avec les mêmes résidus de contact obligatoire au niveau des récepteurs (Figure 13 a et b).

3) Les immunisations anti-idiotypiques et leurs applications.

Bien qu'il existe des méthodes immunoprophylactiques à l'encontre des principales infections virales et bactériennes,la production de vaccins plus efficaces et surtout dépouvus d'effets secondaires néfastes demeure aujourd'hui une priorité de tout premier ordre .

En effet certains vaccins utilisant des agents pathogènes atténués peuvent être toxiques, d'autre part la production de certains vaccins est limitée par les difficultés d'obtention de quantité suffisante de matériel antigénique compatible avec son utilisation à large échelle. Pour ces différentes raisons l'élaboration de vaccins idiotypiques pourrait palier à ces inconvénients grâce à la production d'anticorps anti-idiotypiques ou à leurs fractions dérivées ,permettant une production massive de matériel vaccinant dépourvu de tout contaminant toxique inducteur de réactions secondaires.

Nous présenterons ici à l'aide de quelques exemples de la littérature les résultats prometteurs obtenus dans le cas des infections virales, bactériennes et parasitaires (Figure14)

FIGURE 13 :

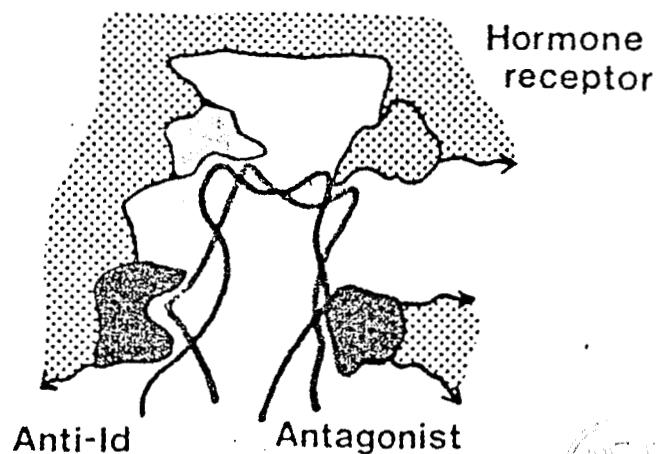
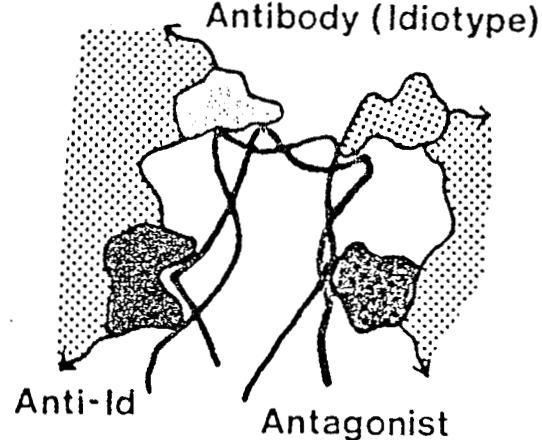
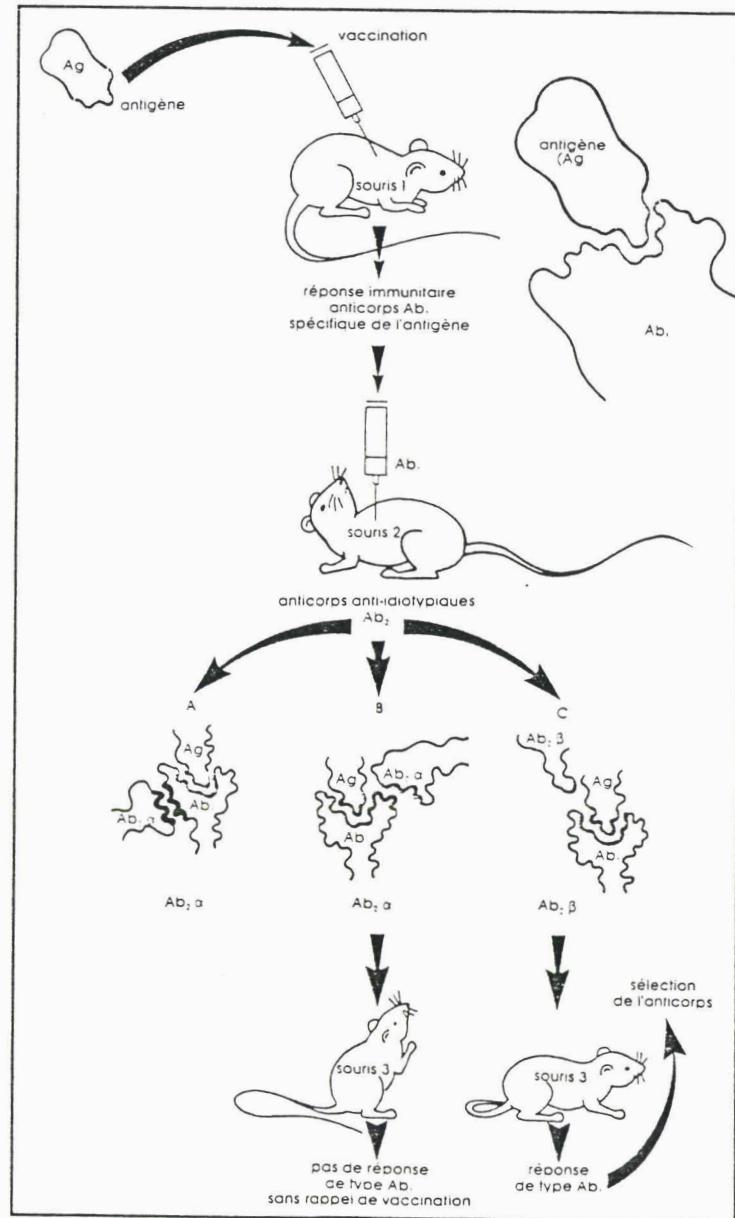


FIGURE 14 :
-PRINCIPE GENERAL DES IMMUNISATIONS ANTI-IDIOTYPIQUES.



BU
LILLE

(Extrait de la Recherche n°188, mai 1987, vol 18, page 160.)

a) Images internes d'épitopes viraux et bactériens.

De nombreux arguments en faveur de la pertinence physiologique des images internes ont été apportés dans les infections bactériennes et notamment dans le système de la phosphorylcholine.

Ces anticorps monoclonaux anti-idiotypiques couplés à l'hémocyanine de patelle KLH peuvent se substituer à l'antigène natif et induire une immunité protectrice vis-à-vis de l'infection par *Streptococcus pneumoniae* chez la souris , alors que l'anti-Id seul ne révèle aucune activité. Dans ces conditions il semble donc que le couplage à la KLH soit indispensable pour la stimulation des cellules T.

Les travaux de STEIN et SODERSTROM (1984) démontrent que l'administration néonatale d'anticorps anti-Id spécifiques sensibilise l'animal vis-à-vis des *Escherichia coli* de type K13 . Ce traitement conduit à une production beaucoup plus intense et précoce d'anticorps anti-*E.coli* par rapport aux animaux non traités. Ces études prennent un intérêt tout particulier car il est généralement admis que la réponse immune spécifique des sucres est tardive et difficile à établir chez le sujet jeune.

D'autres auteurs ont utilisé les anticorps anti-Id pour stimuler la réponse humorale et cellulaire vis-à-vis d'antigènes viraux. KENNEDY *et al* 1983 montrent que la production d'anticorps IgM et IgG spécifiques des antigènes de surface du virus de l'hépatite B est stimulée par un traitement anti-idiotypique préalable de la souris . ERTL *et al* 1984 par préimmunisation anti-idiotypique protègent la souris de l'infection par le virus *Sendaï* (SV).

La stimulation de l'immunité à médiation cellulaire par les anticorps anti-idiotypiques a été observée dans l'infection par le réovirus grâce à l'injection préalable d'un anticorps anti-Id syngénique dirigé contre un anticorps spécifique de l'hémagglutinine virale (SHARPE *et al* 1984).

Enfin UYTDEHAAG et OSTERHAUS (1985) produisent des anticorps neutralisant le polyvirus de type II chez l'animal par l'injection d'un anti-Id monoclonal .

b) Images internes d'épitopes parasitaires.

C'est dans l'infection par *Trypanosoma rhodesiense* que le rôle protecteur des anticorps anti-idiotypiques a été pour la première fois démontré (SACKS *et al* 1982). Dans ce modèle des anticorps polyclonaux anti-Id spécifiques d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes variables du *Trypanosoma rhodesiense* (VAT) ont été préparés chez la souris S/J. L'injection de la fraction IgG₁ purifiée chez la souris Balb/c modifie considérablement le cours d'une infection ultérieure par le trypanosome par rapport au groupe d'animaux témoins. Cette immunité s'exprime soit par une diminution de la parasitémie, ou par une sélection des parasites exprimant le VAT correspondant.

Récemment SACKS *et al.* 1985 ont étendu leurs études à un parasite intracellulaire le *Trypanosoma cruzi*. Ces auteurs ont produit des anticorps anti-Id polyclonaux de lapin contre l'anticorps monoclonal WIC-29-26 spécifique d'un épitope glycanique de l'antigène 72 kDa présent à la surface des stades trypomastigote et épimastigote du parasite (SNARY *et al* 1981). Cette glycoprotéine GP 72 est capable d'induire une immunité partielle chez la souris infectée par le stade métacyclique des trypomastigotes du Trypanosome (SNARY *et al* 1983). L'immunisation de souris Balb/c,de cobayes et de lapins par l'antisérum de lapin anti-WIC 29-26 conduit à la production d'anticorps capables de se fixer à la GP 72 mais qui ne présentent aucune activité protectrice. Ces résultats suggèrent donc que les anticorps anti-Id injectés portent l'image interne d'un épitope sucré du Trypanosome.

c) Anticorps anti-idiotypiques et cancer.

L'immunité anti-tumorale est un mécanisme complexe qui fait intervenir des composantes humorales et cellulaires. Bien que certaines tumeurs expriment des antigènes de surface spécifiques (FOLEY 1953), les essais immunothérapeutiques se sont révélés décevants, et pourraient s'expliquer par un état de suppression des cellules T (NORTH *et al* 1982). Dans ces conditions les anticorps anti-idiotypiques peuvent faire qu'ils se présentent sous une forme moléculaire différente de l'antigène nominal pourraient court-circuiter cette suppression et stimuler l'immunité. Certaines observations semblent indiquer que les anticorps anti-Id agissent au niveau de clones silencieux non stimulables par l'antigène (BONA *et al* 1981, CAZENAVE 1977).

KOPROWSKI *et al* 1984 montrent que seuls les patients atteints d'adénocarcinome gastro-intestinal traités par des anticorps monoclonaux spécifiques de la tumeur, qui développent des anticorps anti-Id, présentent une rémission. Des résultats similaires ont été décrits chez un patient atteint d'un lymphome à cellules B par MILLER *et al* 1983. Le succès de ces traitements dépend de très nombreux facteurs, comme la dose des anticorps injectés, leurs isotypes, l'utilisation de protéines porteuses ou d'adjuvants, de la nature des tumeurs et de leur état de progression.

A l'inverse dans certaines circonstances l'induction d'un état de tolérance ou de suppression pourrait être bénéfique dans le cas des maladies auto-immunes ou dans le cas des transplantations d'organes.

d) Anti-idiotypes, maladies autoimmunes et transplantations.

La tolérance peut être définie comme une absence de réponse vis-à-vis d'un antigène. La tolérance à l'encontre des composants du soi n'est pas due à une absence de cellules auto-agressives mais correspond à une suppression active de ces clones cellulaires (COHEN et WEKERLE 1973, FELDMAN *et al* 1985).

Classiquement deux types de tolérance sont définis, la tolérance à faible dose, la tolérance à forte dose,d'autre part il est possible d'induire une tolérance vis-à-vis d'un haptène par couplage sur des molécules porteuses tolérogènes. Dans ces conditions en fonction de la forme d'injection ou de la dose administrée ,les anticorps anti-Id peuvent être utilisés dans la manipulation et l'orientation de la réponse immunitaire.

La tolérisation par l'image interne a été envisagée dans le cadre de la thérapie des maladies autoimmunes .Dans la *myastenia gravis*, le récepteur pour l'acétylcholine est impliqué, l'injection de l'image interne du récepteur (dans ce cas les cellules immunes du patient portent le paratope) bloque les cellules immunes du patient et arrête la maladie. BROWN *et al* 1979 traitent avec succès la néphrite tubulointersticielle auto-immune induite du cobaye par l'injection d'anti-Id dirigés contre des anticorps spécifiques des membranes basales des tubes corticaux rénaux de lapin.

Dans le domaine des transplantations il est possible par le biais d'anticorps anti-Id de bloquer les interactions entre le système majeur d'histocompatibilité et les cellules immunes B et T, puisque ces cellules portent elles- mêmes ce type de déterminants,ce qui permet de fait d'inhiber les réactions de rejet greffon contre hôte ou hôte contre greffon (Mac KEARN *et al* 1974).

e) Application des anticorps anti-idiotypiques au diagnostic.

L'étroite identité liant l'image interne et l'épitope a aussi été exploitée dans le domaine du diagnostic dans les techniques de dosage d'un épitope dans une préparation antigénique brute.POTOCNJAK *et al* 1982 décrivent le dosage d'un épitope de plasmodium dans les glandes salivaires du moustique par une technique de compétition entre un anti-Id marqué et l'antigène de *Plasmodium berghei* .Ces travaux ouvrent des perspectives prometteuses dans la production d'une nouvelle génération de réactifs biologiques applicables au dosage des antigènes circulants dans les liquides biologiques.

4 De la théorie du réseau à l'application thérapeutique.

De fait il est possible à ce stade de dresser les premières conclusions concernant les immunisations anti-idiotypiques et d'anticiper leurs développements dans un futur proche.

L'utilisation des anticorps anti-idiotypiques comme antigènes de substitution représente une alternative prometteuse dans la production massive de matériel vaccinal pour des antigènes non protéiques dont la synthèse par les voies classiques du clonage moléculaire est aujourd'hui impossible. De plus l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques portant l'image interne d'un antigène oligosaccharidique limiterait considérablement le délai de la réponse immune souvent observé pour les structures sucrées.

Cependant, malgré les progrès réalisés dans les modèles d'immunisation anti-idiotypique de nombreuses questions doivent trouver une réponse avant toute tentative d'application chez l'homme. Ces différents aspects sont tributaires des doses et de la posologie de l'administration des anticorps anti-idiotypiques permettant l'installation d'une immunité efficace et prolongée. Ce problème reste actuellement en suspens, car il est difficile de prévoir les doses optimales d'anticorps anti-idiotypiques à injecter, étroitement dépendantes de leur nature isotypique, de leur degré d'identité avec l'antigène nominal et de l'affinité de ces préparations pour les cellules immunocompétentes de l'homme. De plus les perspectives d'immunisation anti-idiotypique nécessitent la mise au point d'adjuvants naturels dépouvus de toute toxicité.

Enfin l'injection chez l'homme de protéines étrangères peut induire des effets secondaires néfastes, tels que des maladies sériques, une élimination rapide des anticorps anti-idiotypiques ou l'induction de maladies à complexes immuns.

Ces effets nocifs pourront certainement être limités par la construction d'anticorps chimériques produits à partir des domaines variables des anticorps anti-idiotypiques de rat

ou de souris et des domaines constants d'immunoglobulines humaines (MORRISON *et al* 1984), ou par la construction d'hybridomes homologues humains, ou l'isolement après traitement approprié de l'image interne portée par ces molécules, première étape dans la construction d'images internes synthétiques.

CHAPITRE III.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX.

OBJECTIFS ET STRATEGIE

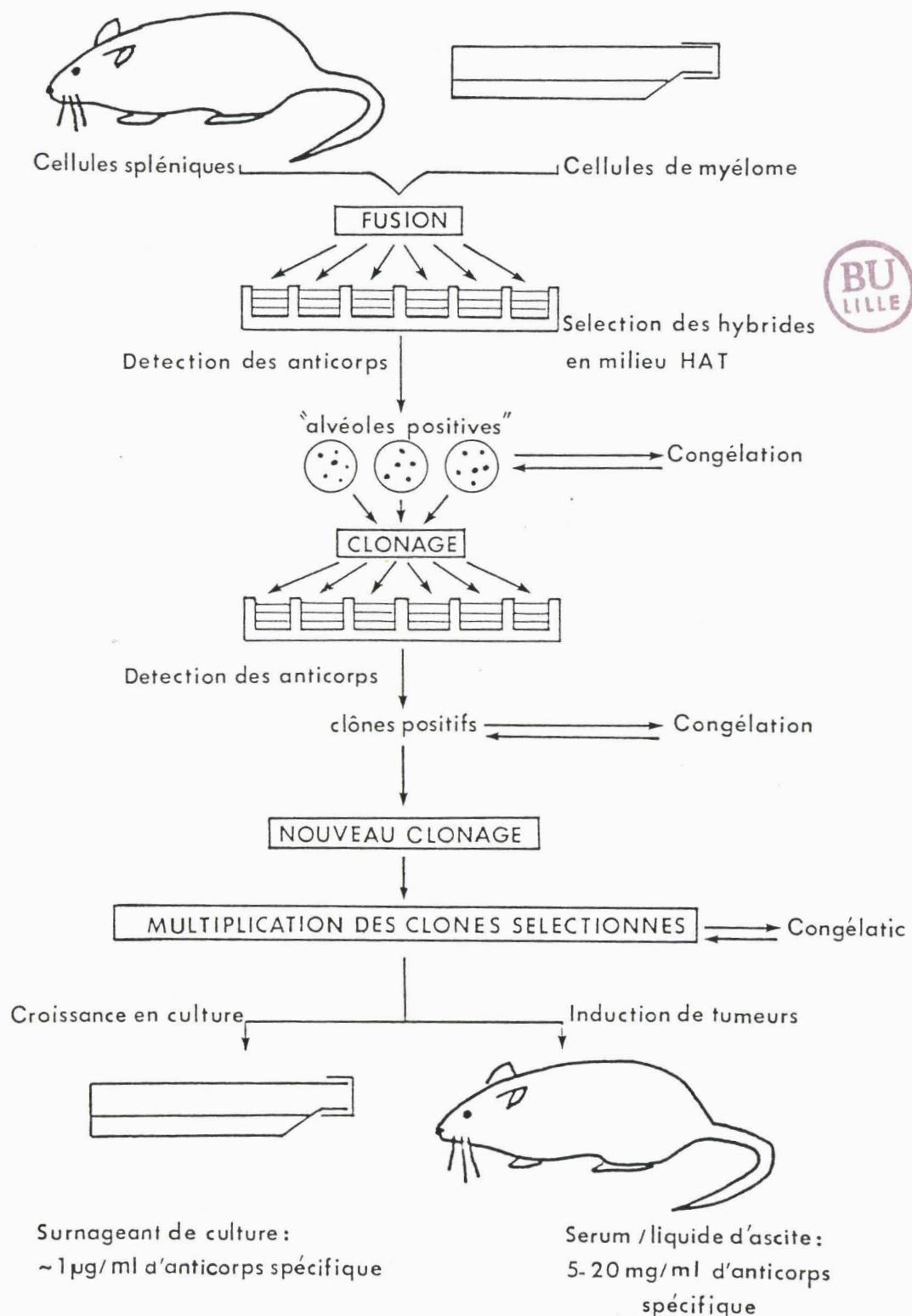
Nos travaux expérimentaux s'inscrivent dans le cadre de l'approche immuno-prophylactique de l'infection par *Schistosoma mansoni*.. Ces études entreprises depuis 1978 procèdent du double intérêt de la caractérisation des antigènes de Schistosome potentiellement protecteurs et de l'analyse fine des mécanismes effecteurs et de régulation de la réponse immune pouvant conduire à une approche rationnelle de l'immunoprophylaxie des schistosomiases. Ces études nous ont conduits à envisager la production d'anticorps monoclonaux de rat spécifiques du *Schistosoma mansoni*.

La construction d'hybrides producteurs d'anticorps monoclonaux de rat se justifie par le fait que le rat développe au cours de l'infection par le Schistosome une réponse immune à de nombreux égards similaire à celle observée chez l'homme. En effet tous les mécanismes effecteurs décrits chez le rat ont pu être à leur tour identifiés dans l'infection humaine et inversement (M.CAPRON *et al* 1986). Ces mécanismes, comme nous l'avons décrit précédemment, font intervenir différentes populations cellulaires comme l'éosinophile, le macrophage et la plaquette, et des anticorps de classes anaphylactiques.

C'est sur ces bases nous avons élaboré une stratégie expérimentale pouvant se résumer en trois points essentiels :

- 1) produire des sondes monocloniales spécifiques du parasite, exprimant des propriétés biologiques identiques à celles observées dans les sérum d'infection.**
- 2) utiliser ces sondes pour caractériser et isoler les antigènes cibles de ces mécanismes effecteurs.**
- 3) obtenir par les méthodes du clonage moléculaire des antigènes recombinants exprimant les propriétés fonctionnelles des antigènes natifs.**

Nos sondes monoclonales ont été produites par la technique d'hybridation cellulaire, à partir de cellules spléniques de rats infectés par *Schistosoma mansoni* et des cellules myéломateuses de souris Balb/c (souche PX3 Ag8) ou de rat LOU souche IR 983F (BAZIN *et al.* 1980b) (Figure 15).

FIGURE 15:-PROTOCOLE DE PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX-

**ARTICLE A : PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DU
SCHISTOSOMA MANSONI.**

Ne disposant pas dans un premier temps de cellules myélomateuses de rat exploitables dans un système d'hybridation cellulaire, la production d'anticorps monoclonaux de rat a été envisagée dans le cadre de fusions hétérologues RAT X SOURIS, utilisant des cellules myélomateuses de souris et des lymphocytes de rats infectés par *Schistosoma mansoni* .

Bien que depuis les travaux originaux de KOLHER et MILSTEIN (1975) de nombreux anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes divers aient été décrits, l'application de cette méthodologie dans un système hétérologue soulevait de multiples interrogations.

--Les fusions hétérologues permettent-elles la construction d'hybrides sécrétant des anticorps monoclonaux de rat spécifiques du Schistosome ?

--Les anticorps obtenus dans ces conditions expriment-ils des activités biologiques ?

--Les hybrides hétérologues ainsi produits sont-ils stables ?

L'étude des propriétés immunologiques et biologiques présentée dans cet article a abouti aux résultats suivants :

- 1)** Les hybrides cellulaires hétérologues obtenus dans ces conditions synthétisent des anticorps monoclonaux de rat spécifiques du *Schistosoma mansoni* décelables dans les surnageants de culture des cellules hybrides par la technique d'immunofluorescence sur coupes de schistosomules.
- 2)** Ces anticorps révèlent une très large diversité isotypique : IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM et IgE.
- 3)** Certains de ces anticorps expriment dans les différents systèmes étudiés des niveaux de cytotoxicité vis-à-vis de la larve parasitaire comparables à ceux couramment observés dans les sérum de rats infectés par *S.mansoni*.
- 4)** L'incidence des populations cellulaires hybrides productrices d'anticorps est relativement élevée, toutefois ces hybridomes hétérologues sont peu stables et n'autorisent pas une production massive de matériel monoclonal.

ARTICLE A

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 289 (29 octobre 1979)

Série D ~ 725

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.

Mongoclonal 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 reaginic activity and antibodies which in a complement dependent or eosinophil dependent system were shown to have a marked cytotoxicity for schistosomula 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 intéressant 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 antisérum 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'immuno-fluorescence.

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-e 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 léthale 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 (%)	
	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 serum 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 léthalité 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 infestés 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 parasites, 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 Mme R. Rousseaux-Prévost et les réactions d'activation des macrophages péritonéaux du docteur M. Joseph. Aide technique de Mme 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.

ARTICLE B : ETUDE IN VITRO ET IN VIVO DES PROPRIETES EFFECTRICES
D'UN ANTICORPS IgG2a MONOCLONAL DE RAT SPECIFIQUE
DU SCHISTOSOMA.MANSONI.

ARTICLE C : IDENTIFICATION D'UN ANTIGENE DE 38 KD DUSCHISTOSOMA
MANSONI PAR UN ANTICORPS IgG2a MONOCLONAL DE RAT.

L'instabilité des hybrides hétérologues nous a conduits en collaboration avec le Pr H. BAZIN (Université de Louvain, Bruxelles) à la mise au point d'un système d'hybridation homologue RAT X RAT. Les anticorps monoclonaux préparés dans ces conditions ont permis d'approfondir notre exploration des mécanismes effecteurs de la schistosomiase et la caractérisation des antigènes cibles.

Dans ces deux articles nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'exploration des fonctions biologiques d'un anticorps monoclonal d'isotype IgG2a IPL Sm1 spécifique du *S.mansoni* .

L'intérêt porté à cet anticorps s'explique par le rôle prépondérant des anticorps d'isotype IgG2a dans l'induction de la fonction cytotoxique de l'éosinophile décrite précédemment par M.CAPRON *et al* (1978a) dans le sérum de rats infectés par le Schistosome. Nous souhaitions donc savoir si l'anticorps monoclonal IPL Sm1 reproduisait les fonctions effectrices des IgG2a polyclonales d'un sérum de rat infecté prélevé après 4 semaines d'infection, pour pouvoir dans un second temps par les techniques d'immunoprécipitation établir une relation directe entre un mécanisme effecteur et l'antigène cible qui le suscite.

Nos travaux démontrent que l'anticorps IPL Sm1 d'isotype IgG2a reproduit parfaitement le mécanisme d'ADCC défini par M.CAPRON *et al* (1978a) comme l'un des mécanismes effecteurs essentiels de l'immunité dans la schistosomiase expérimentale du rat.

- 1) L'anticorps IPL Sm1 est cytotoxique vis-à-vis des schistosomules de *S.mansoni*. en présence d'éosinophiles de rat sain.
- 2) Cette cytotoxicité nécessite pour s'exprimer la présence de mastocytes dans les populations cellulaires effectrices.
- 3) L'anticorps IPL Sm1 se révèle hautement protecteur lorsqu'il est transféré passivement chez l'animal, établissant un niveau de protection (50 à 60%) comparable à ceux définis pour les anticorps polyclonaux ou par une infection initiale (CAPRON *et al* 1980).
- 4) L'antigène cible de l'anticorps IPLSm1 a été identifié. Il s'agit d'une glycoprotéine de poids moléculaire 38 kDa présente à la surface du schistosomule et aussi caractérisée au stade de la cercaire. Cet antigène est totalement relargué de la surface du schistosomule en culture après 24 heures d'incubation, est n'est pas caractérisé au stade pulmonaire du parasite.

L'autre particularité de l'antigène 38 kDa est qu'il apparaît comme l'un des immunogènes majeurs des différents systèmes d'infection expérimentale et humaine (DISSOUS et CAPRON 1982a). Il est en effet responsable de la production d'anticorps spécifiques chez 97% des sujets d'une population bilharzienne étudiée.

ARTICLE B

0022-1767/82/1296-2739\$02.00/0

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Copyright © 1982 by The American Association of Immunologists

Vol. 129, No. 6, December 1982
Printed in U.S.A.IN VITRO AND IN VIVO EFFECTOR FUNCTION OF RAT IgG2a MONOClonal ANTI-S. MANSONI ANTIBODIES¹JEAN-MARIE GRZYCH,² MONIQUE CAPRON, HERVÉ BAZIN,³ AND ANDRÉ CAPRON

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (INSERM U 167, ERA CNRS 422), Institut Pasteur, 15 rue Camille Guérin, 59019 Lille Cedex (France)

Rat IgG2a monoclonal antibodies have been produced after fusion of spleen cells from LOU/C rats infected with *S. mansoni* for 5 wk and IR983F nonsecreting rat myeloma cells. The cell supernatants of one particular IgG2a-producing clone (IPL Sm1) as well as ascitic fluids induced by this clone revealed anti-*S. mansoni* activity detected by immunofluorescence on schistosomula sections. *In vitro* studies of the effector function of such antibodies revealed that the rat IgG2a monoclonal antibodies mediated high levels of rat eosinophil-dependent cytotoxic effect against *S. mansoni* schistosomula, similar to that obtained with 5-week infected rat serum. Passive transfer experiments carried out with IPL Sm1 ascitic fluid showed a significant level of passive protection against a challenge infection. These results indicate a possible use of the monoclonal antibodies in analyzing *in vivo* functions of IgG2a antibodies, as well as in isolating potentially protective target antigens.

The first demonstration of ADCC mechanisms involving eosinophils and antibody came from Butterworth *et al.* (1-3) who demonstrated that normal human eosinophils were able *in vitro* to kill *S. mansoni* schistosomula in the presence of IgG antibodies from *S. mansoni*-infected patients. Two successive steps were necessary for the killing of schistosomula *in vitro*, eosinophil activation, and the subsequent lysis of the parasite by eosinophil degranulation products (4). Although eosinophil-mediated cytotoxicity was initially described in human schistosomiasis, most of the information concerning eosinophil activation and its relationships with immunity has been obtained in experimental models. Capron *et al.* (5) have described rat eosinophil-dependent cytotoxic antibody in serum from *S. mansoni* experimentally infected rats. Using a solid phase absorption procedure, it was shown that rat IgG2a antibodies were involved in this eosinophil-mediated cytotoxic effect during the early period of immunity (5). Analyzing the cell populations involved in this IgG2a mediated-cytotoxicity, mast cells were shown to enhance eosinophil cytotoxic activity significantly (5).

If eosinophil-dependent cytotoxicity has been clearly established *in vitro*, no direct demonstration of the *in vivo* relevance of such a mechanism has been reported until now. However, a series of indirect arguments strongly suggested some relation with immunity to reinfection in the rat model: whereas normal

rat eosinophil-dependent cytotoxicity can be induced by IgG2a antibody present in rat serum at the early period of infection, eosinophils from *S. mansoni*-infected rats can directly kill non-opsonized schistosomula at the precise periods when IgG2a antibodies induce killing by normal eosinophils. Moreover, in this model, anti-*S. mansoni* antibodies can be detected on the surface of infected rat eosinophils (6). The role of IgG2a in immunity was suggested more precisely by serum transfer experiments, the selective IgG2a depletion of immune serum resulting in a partial decrease in the passively transferred immunity (7).

In order to investigate further the major role of IgG2a in the acquired immunity of the rat against *S. mansoni*, we have applied the hybridoma technology described by Köhler and Milstein (8, 9). In a previous paper, we reported preliminary results on the isolation of mouse/rat hybrid cell supernatants containing IgG2a antibodies able to induce rat eosinophil cytotoxicity against *S. mansoni* schistosomula *in vitro* (10). However, the relative instability of such hybrids, together with the limited use of a heterologous system (mouse/rat hybridization) led us to develop a rat/rat system of hybridization and to study the *in vitro* and *in vivo* and biologic activity of these rat monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Myeloma cells. The nonsynthesizing myeloma cell line IR938F (11) is derived from a LOU/C rat immunocytoma. This cell line presents a hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase deficiency, is resistant to 20 µg/ml of 8 azaguanine and dies in Littlefield's medium (12). Continuous cultures are obtained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 15% (v/v) fetal calf serum (FCS) (medium A).

Immune cells and sera. Female LOU/C rats (180 to 200 g) were exposed to 1500 *S. mansoni* cercariae (Puerto Rican strain) by percutaneous infection (13). The spleen was aseptically removed 5 weeks after the primary infection and a cell suspension was prepared by homogenization in DMEM buffered with 25 mM HEPES, pH 7.3 (medium B). Erythrocytes were eliminated by using the Ficoll-Hypaque procedure. LOU/C rats infected for 4 to 5 weeks or uninfected LOU/C rats were the source of infected rat serum, or normal rat serum, respectively.

Fusion technique. For hybridization, myeloma cells (washed twice with medium B) and spleen cells were mixed at a ratio of 1:5 and pelleted together at 400 g for 5 min. Fusion was performed according to the method of Galfré *et al.* (14), modified by the use of polyethylene glycol/dimethyl sulfoxide (PEG/DMSO) (PEG 1500, 30 g, DMSO 6.2 ml, 42 ml of phosphate-buffered saline (PBS)). Hybrid cells were selected in the presence of HAT medium (medium A supplemented with 10⁻⁴ M hypoxanthine, 2 × 10⁻⁷ M aminopterin and 1.6 × 10⁻⁵ M thymidine) in 24 flat-bottomed wells (Nunclo, Denmark). When cell multiplication had started, the HAT medium was replaced by HT medium (HAT medium without aminopterin). Hybrid cell culture supernatants from each well presenting a dense culture were collected and screened for their immunoglobulin content.

* Abbreviations used in this paper: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; medium A, DMEM supplemented with 15% (v/v) FCS; HEPES, N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; medium B, DMEM buffered with 25 mM HEPES, pH 7.3; PEG/DMSO, polyethylene glycol/dimethyl sulfoxide; HAT, DMEM medium supplemented with fetal calf serum, hypoxanthine, aminopterin and thymidine; HT, DMEM medium supplemented with fetal calf serum, hypoxanthine and thymidine; MEM/NRS/TRI, Eagle's minimal essential medium supplemented with normal rat serum (NRS) and synthetic tripeptide (TRI); PBS, phosphate-buffered saline, pH 7.2; FITC, fluorescein isothiocyanate conjugated anti-rat immunoglobulin antisera.

Received for publication June 16, 1982.

Accepted for publication August 18, 1982.

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 grants from the C.N.R.S. ERA 422, INSERM U 167 and WHO-UNDP Special Programme for Tropical Diseases Research.

² Address correspondence to: Jean-Marie Grzych, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France.

³ Unité d'Immunologie Expérimentale, Faculté de Médecine, Université de Louvain, Bruxelles, Belgique.

Cloning procedure. Cells producing anti-*S. mansoni* antibodies were cloned into 96-well microtiter plates (Linbro, USA) by the limiting dilution method with normal BALB/c mouse peritoneal adherent cells as a feeder layer.

Induction of ascitic tumors. After 8 days of culture of positive clones, 1×10^7 cells were injected subcutaneously into LOU/C rats. Three weeks later, solid tumors induced by the injection of hybrid cells were removed and 2×10^7 cells obtained after homogenization of the tumors were injected into the peritoneal cavity of LOU/C rats. Ascitic fluids were collected 2 weeks later by i.p. puncture and stored at -20°C until use.

Indirect fluorescence assay. *S. mansoni* schistosomula were prepared according to the method of Ramalho-Pinto et al. (15) and immediately deep frozen. Sections of $8\text{ }\mu\text{m}$ were made and were overlayed either with samples of supernatants that had been concentrated threefold by lyophilization or ascitic fluids at various dilutions. After 30 min contact and three washings in PBS, FITC-conjugated anti-rat immunoglobulin antisera prepared in rabbits (Miles Yeda Laboratories, Israel) were added for 30 min. The slides were then washed three times in PBS, the last washing containing Evans blue at a final concentration of 1/10 000 as counterstain. Five-week infected rat serum was used as a positive control and normal rat serum, culture supernatant, or ascitic fluid was obtained from the IR983F myeloma as a negative control.

Immunodiffusion analysis. Ouchterlony tests were carried out with 125 μl hybrid cell supernatants and 20 μl specific antisera to rat IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgE immunoglobulins (16). The supernatant of IR983F cells was used as a negative control. Titration of IgG2a in ascitic fluids was carried out by the technique of Mancini et al. (17) by using monospecific antisera to rat IgG2a (16) and rat monoclonal immunoglobulins as standard for IgG2a (16).

Eosinophil-dependent cytotoxicity. The cytotoxicity assay was performed on *S. mansoni* schistosomula prepared according to the method of Clegg and Smithers (18), as previously described by Capron et al. (5). Briefly, effector cells were obtained from LOU/C rats stimulated 48 to 72 hr previously by i.p. injection of 10 ml 0.9% NaCl sterile physiologic saline; peritoneal cavities were washed with 20 ml Eagle's minimum essential medium (MEM) containing penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1% normal rat serum (NRS), 20 ng/ml synthetic tripeptide (glycyl-histidyl-lysine, Calbiochem, San Diego, CA) and 25 IU/ml calcium heparinate (MEM/NRS/TRI). Eosinophil-rich populations were prepared by allowing these peritoneal cells (5 to $7 \times 10^6/\text{ml}$ in MEM/NRS/TRI) to adhere to plastic Petri dishes for 2 hr at 37°C . The nonadherent cells of each Petri dish were recovered, pooled, and washed twice in MEM/NRS/TRI. After staining with Discombe's diluent or toluidine blue, this cell population contained 40 to 90% eosinophils and 4 to 10% mast cells. In some experiments, mast cell-depleted populations were prepared after centrifugation of the eosinophil rich population on 22.5% metrizamide (Nyegaard, Oslo, Norway) according to the method of Lynch et al. (19). This population referred to as the mast cell-depleted population contained 50 to 98% eosinophils and less than 0.1% mast cells. The cytotoxic assay was carried out in sterile plastic microplates with flat-bottomed wells (Nuncorp, Denmark). Fifty schistosomula were added to each well and incubated overnight with 100 μl hybrid cell supernatants that had been concentrated twofold by lyophilization, 100 μl ascitic fluids at different dilutions, or 100 μl normal or infected rat serum at a final dilution of 1/16 to 1/32 (all these factors having been previously heat inactivated for 2 hr at 56°C). After 18 hr incubation at 37°C , effector cells were added in 100 μl of MEM/NRS/TRI at a ratio of 6000 effector cells to 1 schistosomulum. The plates containing effector cells and sensitized targets were incubated in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C . The percentage of cytotoxicity was measured after 24 to 48 hr by microscopic examination.

Passive transfer experiments. Ascitic fluids (2 ml) were injected i.v. into LOU/C rats (10-wk-old, 180 to 200 g) that had been infected with 1000 to 1500 *S. mansoni* cercariae 4 hr previously. Parasite burdens were evaluated 5 days later by lung recovery according to Sher et al. (20) or 3 wk later by liver perfusion (21). The numbers of lung schistosomula or liver worms obtained from rats injected with ascitic fluids induced by IPL Sm 1 clone or by the myeloma cell line IR983F were compared to those obtained from rats injected with 2 ml physiologic saline. The percentage of protection was calculated by the formula (22): $(A - B)/A \times 100$ where A = the number of worms recovered from rats injected with 2 ml physiologic solution, and B = the number of worms recovered from rats injected with 2 ml ascitic fluid (IPL Sm 1 clone or control).

Infection of tumor-bearing rats. LOU/C rats were injected subcutaneously with cells from the positive clone or IR983F myeloma (1×10^7 cells to each rat). After 2 weeks of tumor development, these rats together with normal LOU/C rats were infected with 1500 *S. mansoni* cercariae and the level of protection was measured by the lung recovery technique as described above.

RESULTS

Biologic activity of hybrid cell supernatants. Among the 450 hybrid cell supernatants obtained from 9 successive cell fusion

experiments, 17 demonstrated specific anti-*S. mansoni* antibodies detected by immunofluorescence on schistosomula sections. In most of the cases, an intense fluorescence reaction was observed at the membrane level.

The biologic activity of these 17 supernatants was explored in the rat eosinophil-dependent cytotoxicity assay against schistosomula targets (Table I). One particular supernatant from the B42.11 cell population was able to induce high level of heat-stable cytotoxicity at a similar level to that observed with a 5-wk infected rat serum (5). Immunodiffusion test revealed the presence of IgG2a immunoglobulin in this supernatant. To confirm the cytotoxic activity of this *S. mansoni* specific antibody, three successive cloning experiments were performed. Several clones, producing IgG2a antibody and inducing a significant cytotoxic effect in the presence of rat eosinophils were isolated. One of these clones, named IPL Sm 1, was selected for further investigation and used for the production of ascitic fluids (Table I).

Biologic activity of ascitic fluids induced by the IPL Sm 1 clone. The specificity of the activities of ascitic fluids induced in LOU/C rats by the clone IPL Sm 1 containing 1 to 3 mg/ml IgG2a specific antibody was studied by immunofluorescence on schistosomula sections and in eosinophil-dependent cytotoxicity. Ascitic fluids from the myeloma cells IR983F was used as a control. Results presented in Table II indicate that a very significant level of cytotoxicity could be observed up to a dilution of 1:4000, and this can be clearly related to results obtained by immunofluorescence. No activity could be detected with control ascitic fluid.

TABLE I
Eosinophil-dependent cytotoxicity of hybrid cell supernatants

Antibody Source*	% of Cytotoxicity
B42.11 initial hybrid cell supernatant ^c	79.0 ± 7.1
B42.11 BG ₁ -AH ₂ -AB, (IPL Sm ₁) clone cell supernatant ^c	85.4 ± 6.2
B42.11 BG ₁ -AH ₂ -AB, clone cell supernatant ^c	79.7 ± 5.4
B42.11 BG ₁ -AH ₂ -AC ₁ , clone cell supernatant ^c	58.4 ± 3.8
B42.11-BG ₁ -AH ₂ -AC ₁ , clone cell supernatant ^c	57.8 ± 15.6
B42.11 BG ₁ -AH ₂ -AD ₁ , clone cell supernatant ^c	69.4 ± 0.8
B42.11-BG ₁ -AH ₂ -AE ₁ , clone cell supernatant ^c	68.0 ± 1.9
IR983F cell supernatant ^c	8.1 ± 5.2
5 week-infected rat serum ^d	90.3 ± 0.7
Normal rat serum ^e	6.3 ± 0.7

* All the factors were heat inactivated for 2 hr at 56°C .

^b The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48-hr contact with effector cells (LOU/C rat peritoneal cells enriched in eosinophils, 58% eosinophils, 4% mast cells (mean of two experiments ± SD).

^c One hundred microliters of cell supernatant concentrated threefold by lyophilization.

^d One hundred microliters of rat serum diluted to 1/4 in MEM/TRI/NRS (final dilution: 1/16).

TABLE II
Biologic activity of ascitic fluids produced by the IPL Sm 1 clone

Antibody source*	Immunofluorescence		
	Final dilution	Activity on schistosomula	Cytotoxicity ^a
IPL Sm 1 ascitic fluid	1/8	++++	100.0 ± 0
	1/16	+++	89.6 ± 9.6
	1/32	+++	90.9 ± 8.3
	1/64	+++	91.8 ± 1.3
	1/128	+++	95.6 ± 0.6
	1/256	+++	88.6 ± 4.6
	1/512	+++	88.1 ± 10.5
	1/1,024	+++	85.1 ± 4.6
	1/2,048	+++	81.6 ± 2.6
	1/4,096	++	72.5 ± 7.4
	1/10,000	+	35.2 ± 15.2
IR983F ascitic fluid	1/8	-	4.0 ± 0.7
5-week infected rat serum	1/32	+++	59.3 ± 7.8

* All the factors were heat inactivated for 2 hr at 56°C .

^a The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48-hr contact with effector cells (LOU/C rat peritoneal cells enriched in eosinophils 40% eosinophils, 8% mast cells) (mean of duplicate experiments ± SD).

Mast cell involvement. When the effector cell population was depleted of mast cells (to less than 0.1%) by centrifugation on metrizamide, a dramatic decrease in eosinophil-dependent cytotoxicity induced by monoclonal IgG2a antibodies was observed (Table III).

Passive transfer experiments. The protective role of monoclonal IgG2a antibodies in immunity was investigated by passive transfer experiments. Two different protocols have been used. In the first, ascitic fluids from the IPL Sm 1 clone; control ascitic fluid (IR983F) or physiologic saline were injected i.v. (2 ml/rat) into normal rats exposed 4 hr previously to 1500 *S. mansoni* cercariae. The level of immunity was measured by recovery of lung schistosomula 5 days after infection. Results of four representative experiments are shown on Table IV. In all the experiments, rats receiving the ascitic fluids from the IPL Sm 1 clone, presented a lower number of lung schistosomula when compared to rats receiving control ascitic fluids or saline. The level of protection ranged between 27 and 58% and the results were statistically significant at the $p < 0.05$ level. No significant protection was obtained after injection of control ascitic fluids.

In the second series of experiments, normal rats were injected with IgG2a monoclonal antibodies, control ascitic fluid or saline, 4 hr after infection with 1000 cercariae. The parasite burden was evaluated 3 wk later by liver perfusion (Table V). The level of protection obtained in the case of specific monoclonal IgG2a antibodies ranged between 53 and 62% and the results were highly significant ($p < 0.001$). No protective effect was conferred by the injection of control ascitic fluids either in the case of ascitic fluid induced by IR983F myeloma cells, or with ascitic fluid obtained from clones producing monoclonal IgG2a directed against unrelated antigen (human IgE) (Expt. 3).

Infection of tumor-bearing animals. In preliminary experiments, when rats grafted with IgG2a producing hybridoma cells were directly infected with *S. mansoni*, they presented a lower number of lung schistosomula when compared to control rats. The level of protection (around 40%) was similar to that obtained by the lung recovery technique in the passive transfer experiments.

DISCUSSION

The present results confirm our initial observation concerning the possibility of producing in a mouse/rat system of hybridization, anti-*S. mansoni* monoclonal antibodies expressing a defined biologic activity (10). We have described here the production of a stable rat/rat hybridoma, secreting IgG2a monoclonal antibody directed against schistosomula, and mediating a high level of rat eosinophil-dependent cytotoxicity against *S. mansoni* schistosomula *in vitro*, comparable to that obtained with infected rat serum (5). The studies carried out on

TABLE III
Role of mast cells in rat eosinophil dependent cytotoxic activity induced by IgG2a monoclonal antibody

Antibody Source*	% Cytotoxicity ^b	
	Effector cells	Effector cells depleted of mast cells
IPL Sm 1 ascitic fluid	93.0 ± 1.4	32.5 ± 4.9
IR 983 F ascitic fluid	15.0 ± 9.9	15.5 ± 1.4
4-week infected rat serum	83.0 ± 7.1	20.5 ± 6.4
Normal rat serum	13.0 ± 4.8	2.5 ± 0.7

* Ascitic fluids and sera were heat inactivated for 2 hr at 56°C and diluted to 1/32 (final concentration).

^b The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48-hr contact with effector cells (LOU/C rat peritoneal cells enriched in eosinophils: 89% eosinophils, 3% mast cells) or LOU/C rat peritoneal cells depleted of mast cells (98% eosinophils, less than 0.1% mast cells) (mean of duplicate experiments ± SD).

TABLE IV
Passive immunization of LOU/C rats with IgG2a monoclonal antibody: lung recovery

Expt. No.	Material Injected*	No of Lung Schistosomula ± SD ^a	% Immunity ^c	p Value
1	IPL Sm 1	44.0 ± 9.6	27	<0.02
	IR983F	69.0 ± 2.6	0	
	Saline	60.3 ± 9.8		
2	IPL Sm 1	29.0 ± 9.8	36	N.S. ^d
	IR983F	69.0 ± 11.2	0	
	Saline	44.0 ± 14.8		
3	IPL Sm 1	18.0 ± 8.7	58	<0.05
	IR983F	28.7 ± 2.3	34	N.S.
	Saline	43.0 ± 7.5		
4	IPL Sm 1	74.6 ± 15.0	27	<0.05
	IR983F	100.4 ± 22.7	3	N.S.
	Saline	103.2 ± 24.0		
5	IPL Sm 1	52.5 ± 20.6	42	<0.05
	IR983F	96.0 ± 20.0	0	
	Saline	89.6 ± 21.7		

* Two milliliters of ascitic fluid (either IgG2a producing IPL Sm 1 or IR 983 F control) or 2 ml saline were injected i.v. to each rat (groups of 15 rats for each experiment).

^a The number of worms was estimated by lung recovery 5 days after the challenge infection with 1500 cercariae.

^c The percentage of protection was evaluated by comparing the number of schistosomula in rats injected with ascitic fluids (IgG2a or control) to the number of schistosomula in rats injected with saline.

^d Not significant.

TABLE V
Passive immunization of LOU/C rats with IgG2a monoclonal antibodies: liver perfusion

Expt. No.	Material Injected*	No of worms ^a Re-covered ± SD	% Immunity ^c	p Value
1	IPL Sm 1	31.0 ± 12.2	61	<0.001
	IR983F	68.6 ± 15.9	14	N.S. ^d
	Saline	79.8 ± 7.1		
2	IPL Sm 1	24.4 ± 9.8	62	<0.001
	IR983F	49.8 ± 18.4	23	N.S.
	Saline	64.3 ± 17.4		
3	IPL Sm 1	40.4 ± 15.8	53	<0.001
	IR983F	99.6 ± 16.8	0	N.S.
	C1-19*	76.5 ± 19.2	11	N.S.
	Saline	86.0 ± 23.6		

* Two milliliters of ascitic fluid (either IgG2a producing IPL Sm 1 or IR 983 F control) or 2 ml of saline were injected i.v. to each rat (groups of 15 rats for each experiment).

^a The number of worms was estimated by liver perfusion 21 days after a challenge infection with 1000 cercariae.

^c The percentage of immunity was evaluated by comparing the numbers of worms in rats injected with ascitic fluids (IgG2a or controls) to the number of worms in rats injected with saline.

^d Not significant.

* Ascitic fluid induced by clone producing IgG2a directed against human IgE.

ascitic fluids induced by IgG2a-producing clone (IPL Sm 1) revealed positive results both in immunofluorescence and in eosinophil-dependent cytotoxicity up to high dilutions of the monoclonal material. The investigations concerning the biologic properties of this monoclonal antibody clearly indicated the mast cell dependency of the cytotoxic mechanism involved in the killing of young *S. mansoni* schistosomula by rat eosinophils as previously described by Capron et al. (5).

The demonstration of similar biologic *in vitro* activities exhibited by our IgG2a monoclonal antibody and antibodies present in infected rat serum emphasizes the interest in using such monoclonal material as a tool for the investigation of the *in vivo* biologic role of IgG2a antibodies in acquired immunity to *S. mansoni*. The highly significant level of protection against *S. mansoni* infection observed in the passive transfer experiments is the first direct demonstration of the essential *in vivo* role played by this antibody subclass. The protection obtained

against *S. mansoni* infection in rats grafted with IgG2a secreting hybrid cells, when compared to rats injected with nonsecreting myeloma cells, confirmed the direct *in vivo* role of IgG2a antibodies in rat immunity. Passive transfer experiments of infected rat serum depleted of IgG2a immunoglobulins have already suggested the implication of IgG2a in resistance to *S. mansoni* infection (7). The level of protection observed in rats treated with IgG2a monoclonal antibody is comparable to that obtained with untreated infected rat serum. It should be noticed that the number of worms recovered from control LOU/C rats was rather low (<10%), but comparable, however, in the same conditions of age and weight of rats (10 wk-old, 200 g), with previously published results (23, 24). As it has already been demonstrated, important variations concerning both innate immunity and immunity to reinfection exist between different strains of rats (25). Further investigations are therefore necessary to evaluate in the LOU/C rats, the level of immunity induced either by a first infection or by passive transfer of LOU/C infected rat serum, and also to compare the protective activity of IgG2a monoclonal antibodies in other strains of rats. In our experimental conditions of passive transfer experiments, the parasite burden evaluated by the liver perfusion technique clearly indicated a higher level of protection, compared to the results obtained with the lung recovery technique. Two explanations are possible, either a technical problem resulting from the lack of reproducibility inherent to the lung recovery technique, or, more likely, the hypothesis of a postlung immunity, as has been shown in the case of the mouse (26) and suggested in rats (M. Capron, unpublished results). The monoclonal antibodies could induce damage to schistosomula *in vivo* during the first 5 days of infection, but killing might only become apparent after the lung stage, suggesting therefore a difference in the effector mechanisms operating *in vitro* and *in vivo*. These observations are in contrast with the recent findings of Taylor and Butterworth who failed to demonstrate a cytotoxic activity with mouse anti-*S. mansoni* monoclonal antibodies either with human eosinophils or with complement (C) (27). Taylor and Butterworth explained this lack of a cytotoxic effect by the limited number of schistosomula surface antigens recognized by monoclonal antibodies, limiting therefore the destruction of the parasitic target by effector mechanisms. Similar hypothesis have been put forward by Howard *et al.* (28) to explain the lack of lytic activity of anti-rat MHC monoclonal antibodies. A further possible explanation of the failure to detect cytotoxic activity due to monoclonal antibodies consisted in the selection of monoclonal antibodies that are not directed against the antigenic determinants inducing *in vivo* the production of cytotoxic antibodies. In the case described here, the IPL Sm 1 IgG2a antibody seems to have biologic properties similar to the polyclonal IgG2a present in infected rat serum and is therefore able to kill *S. mansoni* schistosomula in the presence of rat eosinophils and mast cells. Similar observations on the role of anti-*S. mansoni* monoclonal antibodies were recently reported by Smith *et al.* (29), who demonstrated a relationship between C-dependent cytotoxicity mediated by a mouse IgM monoclonal antibody and the level of *in vivo* protection against *S. mansoni* infection in mice. Nevertheless, this IgM-dependent mechanism has not been reported during the course of mouse infection and therefore the biologic relevance of this monoclonal antibody-dependent mechanism remains to be elucidated.

Recently, the use of monoclonal antibody synthesized by the IPL Sm1 has allowed the characterization and isolation from *S. mansoni* schistosomula membrane of a 38,000 m.w. antigen. This particular schistosomula surface antigen was shown to

react with polyclonal antibodies present, not only in infected rats, but also in various infected hosts, including humans, monkeys, and mice (30). This antigen defined by the IgG2a monoclonal antibody seemed therefore to represent the target of an effector mechanism operating both *in vitro* and *in vivo* and might be considered as a potentially protective antigen (31).

In conclusion, the demonstration that a monoclonal antibody directed against surface antigen of *Schistosoma mansoni* was able to mediate *in vitro* eosinophil-dependent cytotoxicity and to induce a significant protection against *S. mansoni* infection provides a strong argument to the *in vivo* role of the eosinophil-dependent effector mechanism in rat immunity.

Acknowledgments. The authors wish to thank Ms. A. M. Schacht, Ms. M. C. Cottrez, Mr. S. Torres, Mr. J. P. Papin and Mr. P. Fressancourt for their excellent technical assistance. The secretarial assistance of C. Colson was appreciated.

REFERENCES

1. Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, C. Houba, and P. M. Rees. 1975. Eosinophils as mediator of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256:727.
2. Butterworth, A. E., J. R. David, D. Franks, A. A. F. Mahmoud, P. H. David, R. F. Sturrock, and V. Houba. 1977. Antibody-dependent mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *S. mansoni*: damage by purified eosinophils. *J. Exp. Med.* 145:136.
3. Butterworth, A. E., H. G. Remold, V. Houba, J. R. David, D. Franks, P. H. David, and R. F. Sturrock. 1977. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118:2230.
4. Butterworth, A. E., M. A. Vadas, D. L. Wassom, A. Dessein, M. Hogan, B. Sherry, G. J. Gleich, and J. R. David. 1979. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.* 150:1456.
5. Capron, M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout, and M. Joseph. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibodies and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8:127.
6. Capron, M., G. Torpier, and A. Capron. 1979. *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.* 123:2220.
7. Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph and J. Pestel. 1980. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:849.
8. Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 26:495.
9. Köhler, G., and C. Milstein. 1976. Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511.
10. Verwaerde, C., J. M. Grzych, H. Bazin, M. Capron, and A. Capron. 1979. Production d'anticorps anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. *C. R. Acad. Sci.* 289:725.
11. 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 hybridsomas. *Ann. Immunol.* 131D:359.
12. Littlefield, W. 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 145:709.
13. Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. Naturally acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Parasitology* 55:695.
14. 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.
15. Ramalho-Pinto, F. J., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. A. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
16. Bazin, H., A. Beckers, and P. Querinjean. 1974. Three classes and four subclasses of rat immunoglobulin. IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 4:44.
17. Mancini, G., A. O. Carbonara, and J. F. Heremans. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235.
18. Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasit.* 2:79.
19. Lynch, S. M., K. F. Austen, and S. I. Wasserman. 1979. Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by non cytolytic secretory stimuli. *J. Immunol.* 121:1394.
20. Sher, A., P. Mackenzie, and S. R. Smithers. 1974. Decreased recovery of invading parasites from lungs as a parameter of acquired immunity to

RAT MONOCLONAL ANTI-S. MANSONI ANTIBODIES

2743

- schistosomiasis in mouse. *J. Infect. Dis.* 130:626.
21. Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55:695.
 22. Phillips, S. M., W. A. Reid, and E. H. Sadun. 1977. The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infection in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. *Cell. Immunol.* 28:75.
 23. Perez, H., J. A. Clegg, and S. R. Smithers. 1974. Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat: measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology* 69:349.
 24. Phillips, S. M., W. A. Reid, J. I. Bruce, K. Hedlund, R. C. Colvin, R. Campbell, C. L. Diggs, and E. H. Sadun. 1975. The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* injections in inbred rats. I. Mechanism during initial exposure. *Cell. Immunol.* 19:99.
 25. Maddison, S. E., L. Norman, S. J. Geiger, and I. G. Kagan. 1970. *S. mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed and antigen sensitized animals. *J. Parasit.* 56:1058.
 26. Smithers, A., and K. Gammage. 1980. Recovery of *Schistosoma mansoni* from the skin, lungs and hepatic portal system of naive mice and mice previously exposed to *S. mansoni*: evidence for two phase of parasite attrition in immune mice. *Parasitology* 80:289.
 27. Taylor, D. W., and A. E. Butterworth. 1982. Monoclonal antibodies against surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 84:65.
 28. Howard, J. C., G. W. Butcher, G. Galfre, and C. Milstein. 1978. Monoclonal, anti-rat MHC (H-1) alloantibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81:54.
 29. Smith, M. A., J. A. Clegg, D. Snary, and A. J. Trejdosiewicz. 1982. Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with IgM monoclonal antibody. *Parasitology* 84:83.
 30. Dissous, C., and A. Capron. 1982. Isolation of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. In *Protides of the Biological Fluids (Proceeding of the 29th Colloquium)*. Edited by H. Peete. Pergamon Press Oxford and New York. P. 179.
 31. Dissous, C., J. M. Grzych, and A. Capron. 1982. *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. *J. Immunol.* In press.

ARTICLE C

0022-1767/82/1295-2232\$02.00/0

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Copyright © 1982 by The American Association of Immunologists

Vol. 129, No. 5, November 1982
Printed in U.S.A.**SCHISTOSOMA MANSONI SURFACE ANTIGEN DEFINED BY A RAT MONOCLONAL IgG2a¹**COLETTE DISSOUS,² JEAN-MARIE GRZYCH, AND ANDRÉ CAPRON

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 15 rue Camille Guérin, 59019—Lille Cedex, France

A schistosomula surface antigen of 38,000 daltons has been isolated by using a rat monoclonal IgG2a that has been shown to confer protection against *S. mansoni* infection by passive transfer in rats. This antigen is one of the previously characterized surface proteins reacting with sera from various infected hosts, including rat, mouse, monkey, and human. Studies on parasites of different developmental stages indicated the presence of this antigen on cercariae and skin-derived or mechanically transformed schistosomula.

A number of hosts develop resistance to reinfection by *Schistosoma mansoni*. The immune response is primarily directed against the young schistosomula of a subsequent challenge (1), and recent studies have been aimed at characterizing surface antigens of schistosomula (2–4) that might be involved in the host-parasite interactions. In previous works, lactoperoxidase-catalyzed radioiodination was used to label schistosomula surface proteins, and surface antigens of 30,000 to 40,000 daltons were isolated from detergent extracts of surface-labeled parasites by immunoprecipitation with infected rat sera (3). The development of hybridoma techniques (5) has recently allowed the selection of an anti-*S. mansoni* monoclonal IgG2a secreted by a hybrid cell line resulting from the fusion of myeloma cells with splenocytes of infected rats.³ Immunofluorescence studies have shown the binding of the monoclonal antibody to the surface of schistosomula, and this paper is concerned with the characterization of the corresponding antigen at the surface of parasites of different developmental stages. We also demonstrate that antibodies specific for this surface antigen are present in sera collected from human and different animal species infected by *S. mansoni*.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. A Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* was used in all experiments. Skin schistosomula were collected 3 hr after application of cercariae to isolated pieces of Swiss mouse abdominal skin (6). Mechanically transformed schistosomula were prepared by shearing off the tails of cercariae by using a vortex mixer (7), and the cercarial bodies were separated from the tails by sedimentation through 54% Percoll. Parasite bodies were extensively washed in Eagle's minimal essential medium (MEM),⁴ then incubated in the same medium at a concentration of 2000 parasites/ml at 37°C in a CO₂ humidified atmosphere. Lung-stage schistosomula were recovered from Fischer rats 5 days after exposure to 5000 cercariae. Lungs were chopped, and released schistosomula were purified

from contaminating host tissues and cells by sedimentation through 45% Percoll (8).

Antibodies. Sera were collected from rats 14 wk after percutaneous exposure to 1000 cercariae. Immune sera were obtained from C57BL/6 mice infected by 50 cercariae for 11 wk and from *Erythrocebus patas* monkeys 16 mo after exposure to a total of 1000 cercariae. Infected human sera were collected from patients with parasitologically confirmed schistosomiasis.

Anti-*S. mansoni* monoclonal IgG2a was secreted by a hybrid cell line (IPL Sm1) resulting from the fusion of IR 983F myeloma cells (9) with spleen lymphocytes of Lou/C rats infected for 5 wk by 1500 cercariae, as described by Grzych et al.³ The anti-*S. mansoni* specificity was detected by immunofluorescence on schistosomula sections, and hybrid cells were further cloned three successive times by the limiting dilution method. One clone, named IPL Sm1, was grown in Lou/C rats and the ascitic fluid was collected. Control ascitic fluid (IR 983 F) was obtained by growing IR 983 F cells in rats.

Isolation of surface antigen. Parasites of different developmental stages were labeled by lactoperoxidase-catalyzed radioiodination (10). Detergent extracts of surface-labeled parasites were incubated with antibodies, and immune complexes were adsorbed on protein A-Sepharose beads as previously described (3). In experiments in which ascitic fluid was used as an antibody source, immune complexes were isolated on protein A-Sepharose beads previously incubated with 10 µl of rabbit anti-rat IgG serum.

SDS-PAGE analysis. Immune complexes eluted from protein A-Sepharose beads were electrophoresed in 13% polyacrylamide gels according to the procedure of Laemmli (11). For autoradiography, dried gels were placed in contact with Kodak X-Omat RP film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) between Cronex intensifying screens (Dupont de Nemours, France) for 2 days at -70°C.

Chemicals. ¹²⁵I was supplied by the Radiochemical Centre (Amersham, U. K.) and lactoperoxidase by Sigma (St. Louis, MO). Rabbit anti-rat IgG serum was a Nordic product (Tilburg, The Netherlands). Protein A-Sepharose and Percoll were purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

RESULTS

Surface antigen defined by IPL Sm1. We have previously reported that infected rat sera reacted with schistosomula surface antigens of 30,000 to 40,000 daltons (3, 4). In these experiments, schistosomula surface proteins were labeled by lactoperoxidase-catalyzed radioiodination, and surface antigens were isolated from detergent extracts of surface-labeled parasites after incubation with infected rat sera. Immune complexes were adsorbed on protein A-Sepharose and analyzed by SDS-PAGE. The same rationale was followed in the experiment presented in Figure 1A in which surface proteins of skin schistosomula were incubated with the rat monoclonal IgG2a (lane 2). The monoclonal antibody recognized a schistosomula surface antigen with an apparent m.w. of 38,000 ± 1000 (mean of 10 experiments) as determined by comparison with the migration of standard proteins. This antigen was effectively precipitated by antibodies produced during rat infection (lane 3), and it was no longer isolated with the use of infected rat sera from a surface protein extract that had been previously incubated with IPL Sm1 ascitic fluid (compare lanes 3 and 4).

Surface antigens of 30,000 to 40,000 daltons have been already shown to react with infected mouse, monkey, and human sera (4). Therefore, it was necessary to confirm that antibodies specific for the antigen defined by IPL Sm1 were present in animal and human sera. Results of experiments in which the surface antigen was previously isolated by precipi-

Received for publication April 2, 1982.

Accepted for publication August 4, 1982.

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 grants from the CNRS (ERA 422), INSERM (U 167), and the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

² Address correspondence to Doctor Dissous.

³ Grzych, J. M., M. Capron, H. Bazin, and A. Capron. Functional properties of rat anti-*S. mansoni* monoclonal antibody. Manuscript submitted for publication.

⁴ Abbreviations used in this paper: MEM, Eagle's minimal essential medium.

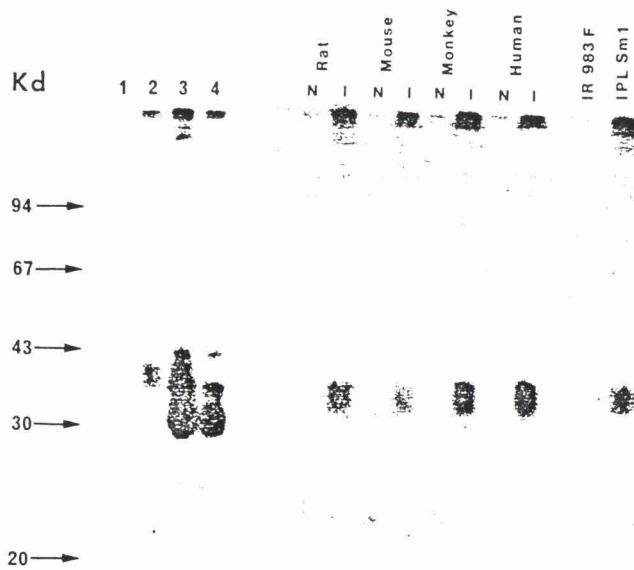


Figure 1. Identification of schistosomula surface antigen reacting with the monoclonal IgG2a. **A**, A detergent extract of 500 surface-labeled skin schistosomula was incubated with 10 μ l of IR 983F ascitic fluid (1) or 10 μ l of IPL Sm1 ascitic fluid (2). The mixture was allowed to react with protein A-Sepharose beads previously coated with rabbit anti-rat IgG, then eluted products were analyzed by SDS-PAGE. The protein A unbound material from 1 and 2 was further incubated with 10 μ l of infected rat serum, and immune complexes were adsorbed on protein A-Sepharose beads, then analyzed respectively in lanes 3 and 4. Kd = kilodaltons. **B**, Immune complexes formed by incubation of parasite detergent extract with IPL Sm1 ascitic fluid were adsorbed on anti-rat IgG protein A-Sepharose, then eluted with 2% SDS at 100°C for 2 min. The eluate was diluted with 6 vol of 2% Triton X-100 (see Reference 3) and incubated with 10 μ l of normal (N) or immune (I) host sera. Immune complexes bound to protein A-Sepharose were analyzed by SDS-PAGE. Control experiments were performed using IR 983 F or IPL Sm1 ascitic fluids. Most of the labeled material recovered at the top of the gel was no longer identified after analysis in reducing conditions, and presumably corresponds to undissociated immune complexes.

tation with IPL Sm1, then incubated with infected host sera, demonstrated that mouse, monkey, and human during infection produced antibodies directed against the 38,000-dalton antigen (Fig. 1B).

Studies on parasites of different developmental stages. Further experiments were undertaken in order to determine whether the antigen, recognized by IPL Sm1, was present on cercariae and mechanically prepared schistosomula. Parasites of different stages were surface labeled, and detergent extracts were incubated with the monoclonal IgG2a. Results, presented in Figure 2A, demonstrated that the 38,000-dalton antigen was a surface component of cercariae and mechanically transformed schistosomula. Although this antigen was still identified on schistosomula incubated *in vitro* for 24 hr in MEM, it was not isolated from a detergent extract of surface-labeled lung-stage schistosomula (Fig. 2B).

In experiments performed with surface-labeled cercariae, the major part of the radioactivity was recovered at the top of the gel. These high-m.w. components (>150,000) were found to be specifically precipitated by IPL Sm1 ascitic fluid and mainly associated with cercariae and newly transformed schistosomula (i.e., Oh schistosomula) but not with skin and lung-stage schistosomula. To follow the fate of surface antigens during the transformation of cercariae into schistosomula, cercariae were surface radioiodinated, then allowed to penetrate mouse skin for 3 hr. Antigens were then isolated from the same number of cercariae and schistosomula. Under these conditions, about 20% of the 38,000-dalton antigen initially present

on the surface of cercariae remained associated with schistosomula, whereas no traces of radioactivity were detectable in the upper region of the gel. Additional data were obtained by *in vitro* incubation of schistosomula, mechanically prepared

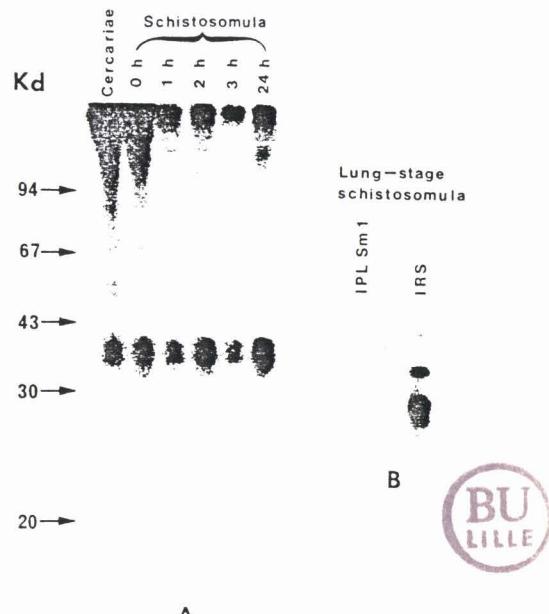


Figure 2. Studies on parasites of different stages. **A**, Cercariae or mechanically transformed schistosomula collected before (0h) or after 1, 2, 3, or 24 hr of *in vitro* incubation were surface labeled. Detergent extracts were incubated with 10 μ l of IPL Sm1 ascitic fluid. Immune complexes were adsorbed on anti-rat IgG protein A-Sepharose, then analyzed by SDS-PAGE. A similar pattern was obtained when analysis was performed under reducing conditions (results not shown). Kd = kilodaltons. **B**, Lung-stage schistosomula, purified as described in Materials and Methods, were surface radioiodinated. Detergent extract of surface proteins was mixed with 10 μ l of IPL Sm1 ascitic fluid or 10 μ l of infected rat sera (IRS). Immune complexes were analyzed by SDS-PAGE.

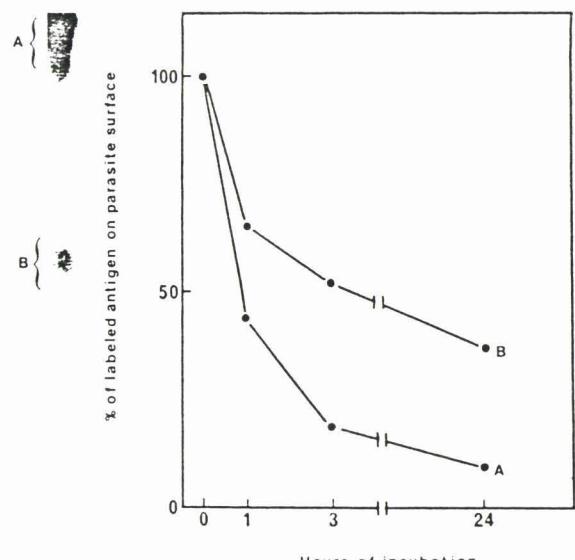


Figure 3. Release of surface antigens during incubation of surface-labeled parasites. Schistosomula were mechanically prepared from surface-labeled cercariae, then incubated in MEM for 1 hr, 3 hr, or 24 hr, at 37°C. Detergent extracts of parasite bodies or incubation media (each equivalent to 500 parasites) were mixed with 10 μ l of IPL Sm1 ascitic fluid. Immune complexes were analyzed by SDS-PAGE. Gels were dried and autoradiographed. Radioactivity of gel slices corresponding to either the large components (A) or the 38,000-dalton antigen (B) was then determined. For each time, the sum of radioactivities isolated from bodies and media was used to calculate the percentage of antigen remaining on the parasite surface.

from surface-labeled cercariae. Results, presented in Figure 3, gave evidence that the 38,000-dalton antigen and the large components were released in the medium during incubation of parasites. Moreover, as it was previously observed for skin schistosomula, large components were released in a more substantial amount (90% after 24 hr of incubation) than the 38,000-dalton antigen (about 60% of release).

DISCUSSION

When skin schistosomula surface antigens were analyzed by SDS-PAGE, the zone corresponding to the 30,000- to 40,000-dalton range was reproducibly darkened on the autoradiogram. In this characteristic pattern, we first distinguished three different components of 40,000, 37,000, and 32,000 daltons (3), but further improvements of separation conditions (i.e., analysis in homogeneous 13% polyacrylamide gel instead of 10 to 15% linear gradient) allowed us to suspect the presence of an additional band, which was confirmed by the results of experiments in which the monoclonal IgG2a was used. A clearer dissection of the pattern was obtained, which demonstrated that at least four components reacted with antibodies produced during rat infection, one of them (38,000 daltons) being specifically recognized by the monoclonal IgG2a.

Experiments have shown that this monoclonal immunoglobulin, secreted by a rat-rat hybridoma, did not bind to protein A. Lack of interaction with protein A has been demonstrated as a characteristic property of rat immunoglobulins of the IgG2a subclass (12). As a consequence, immune complexes formed by incubation of parasite surface proteins with the monoclonal IgG2a had to be isolated by using protein A-Sepharose beads previously coated with rabbit anti-rat IgG. However, some antibodies, produced during rat infection against the 38,000-dalton antigen, interacted directly with protein A. These results suggest a host polyclonal response against the surface antigen.

Experiments performed with larvae of different stages demonstrated the presence of the 38,000-dalton antigen at the surface of cercariae and mechanically transformed schistosomula until at least 24 hr of incubation. However, this antigen was not identified at the surface of lung-stage schistosomula collected from infected rats. In this experiment, the failure to detect the antigen could be attributed to a masking of surface antigens by host molecules, but the results of analysis of surface-labeled molecules reacting with infected rat sera (Fig. 2B) did not support this hypothesis. Indeed, it was noticed that only the 38,000-dalton band was lacking, and the electrophoretic pattern was therefore surprisingly similar to that obtained when a detergent extract of skin schistosomula, previously incubated with the monoclonal IgG2a, was allowed to react with infected rat sera. These results indicated that the 38,000-dalton antigen was a surface component of the young larvae of *S. mansoni*.

Additional components of large m.w. were precipitated by IPL Sm1 ascitic fluid from detergent extracts of labeled parasites, and more particularly from cercariae and newly mechanically transformed schistosomula. The observation that these large molecules were entirely released from the surface of labeled cercariae during or just after the skin penetration process suggests that they are more specific to the cercarial stage. Similar results were obtained using purified preparations of IgG from ascitic fluids, showing a specific binding of the large components to the IPL Sm1 IgG fraction. In a preliminary experiment, high m.w. components were recovered from polyacrylamide gel, then immunoprecipitated by the IPL Sm1 IgG fraction. This argues against the possibility of a nonspecific coprecipitation of these large components with the 38,000-dalton antigen. Thus, these data suggest the presence of an

antigenic community between the two products. The existence of a possible relation between the two antigenic forms remains to be determined.

In this paper, we report that rat, mouse, monkey, and human, which are known to develop resistance to reinfection by *S. mansoni*, after a primary infection, synthesize antibodies directed against the 38,000-dalton antigen. In this context, it is worthwhile to note that antibodies specific for the 30,000- to 40,000-dalton antigens were detected in rats 4 wk after infection, and in mice 7 wk after infection (4), a finding that was in agreement with the demonstration of a later development of immunity in mice than in rats (13, 14).

In vitro studies have shown that schistosomula could be killed by different mechanisms involving specific antibodies and effector cells (1). In the rat model, peritoneal eosinophils were able to mediate, in cooperation with mastocytes, cytotoxicity against schistosomula in the presence of serum IgG2a antibodies (15), and recent results have evidenced the cytotoxic activity of the monoclonal antibody in this system.³ Moreover, passive transfer experiments have demonstrated that the monoclonal IgG2a could significantly protect rats from reinfection.³ All these data suggest that the antigen, defined by the monoclonal antibody, might correspond to a potentially protective antigen, and further investigations will be concerned with a more precise analysis of its biochemical structure and the study of its possible involvement in immunity to schistosomiasis.

Acknowledgment. The authors wish to thank J. Trolet for his excellent technical assistance. The secretarial assistance of C. Colson was appreciated.

REFERENCES

- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1976. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 14:399.
- Taylor, D. W., E. G. Hayunga, and W. E. Vannier. 1981. Surface antigens of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:157.
- Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
- Dissous, C., and A. Capron. 1982. Isolation of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. In *Protides of the Biological Fluids (Proceedings of the 29th Colloquium)*. Edited by H. Peeters. Pergamon Press, Oxford and New York. P. 179.
- Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
- Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2:79.
- Ramalho-Pinto, F. J., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. A. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
- Lazdins, J. K., M. J. Stein, J. R. David, and A. Sher. 1982. *Schistosoma mansoni*: rapid isolation and purification of schistosomula of different developmental stages by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. *Exp. Parasitol.* 53:39.
- Bazin, H., J. M. Grzych, C. Verwaerde, and A. Capron. 1980. A Lou rat nonsecreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybrids. *Ann. Immunol. (Paris)* 131D:359.
- Marchaloni, J. J., R. E. Cone, and V. Santer. 1971. Enzymatic iodination. A probe for accessible surface proteins on normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124:921.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Medgyesi, G. A., G. Füst, 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.
- Perez, H., J. A. Clegg, and S. R. Smithers. 1974. Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat: measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology* 69:349.
- Sher, F. A., P. Mackenzie, and S. R. Smithers. 1974. Decreased recovery of invading parasites from the lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the laboratory mouse. *J. Infect. Dis.* 130:626.
- Capron, M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout, and M. Joseph. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8:127.

ARTICLE D : MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES BLOQUANTES D'UN ANTICORPS MONOCLONAL DE RAT D'ISOTYPE IgG2c DANS LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE.

.ARTICLE E : LA REGULATION DES MECANISMES IMMUNS DANS LA SCHISTOSOMIASE HUMAINE PAR DES ANTICORPS BLOQUANTS D'ISOTYPE IgM.

Si dans le cas de l'anticorps monoclonal IPL Sm1 nos études confirment le rôle prépondérant des anticorps de classe anaphylactique dans l'établissement de l'immunité à la schistosomiase, la production d'un anticorps monoclonal d'isotype IgG2c apporte un éclairage nouveau sur l'existence de mécanismes de régulation.

Cet anticorps monoclonal IPLSm3 s'est révélé, dans une première série d'expériences, dénué de toute activité effectrice *in vitro* et protectrice *in vivo*. L'étude par immunoprecipitation a montré qu'il reconnaît la glycoprotéine 38 kDa définie par l'anticorps IPL Sm1protecteur. Cette observation soulevait l'hypothèse d'une possible activité modulatrice de l'anticorps IPL Sm3 vis-à-vis des propriétés effectrices de l'anticorps IPL Sm1.

Les résultats expérimentaux présentés dans l'article D confirment cette hypothèse, et ont donné lieu aux observations suivantes :

- 1) L'anticorps IPL Sm3 inhibe de manière dose-dépendante les capacités cytotoxiques de l'anticorps monoclonal IPL Sm1 pour des cibles parasitaires préalablement incubées ou conjointement mises en contact avec l'anticorps IPL Sm3.

- 2) Les expériences de cytotoxicité dépendante d'éosinophiles effectuées sur des larves parasitaires ou des cellules effectrices préincubées en présence de fragments F(ab')₂ ou Fc de l'anticorps IPL Sm3, révèlent un double système de blocage, l'un au niveau de l'antigène cible, l'autre au niveau des récepteurs Fc portés par l'éosinophile.
- 3) Cette activité inhibitrice ne s'exerce qu'à l'encontre de la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles induite par des anticorps d'isotype IgG, la préincubation des larves parasitaires par l'anticorps IPLSm3 est sans effet sur la fonction cytotoxique des éosinophiles ou des macrophages dépendante d'anticorps d'isotype IgE.
- 4) Enfin cette activité bloquante s'exprime aussi *in vivo*, le transfert simultané de l'anticorps IPL Sm3 et de l'anticorps IPL Sm1 abolit l'effet protecteur de l'anticorps IPL Sm1.

Bien que cette première série d'expériences ait permis d'appréhender l'existence d'un mécanisme de régulation isotypique, il semblait difficile de postuler la réalité d'un tel phénomène au cours de l'infection par *S.mansoni*. Dans ces conditions il fallait tenir compte de l'effet amplificateur considérable dans la sécrétion d'un isotype particulier inhéritant au système d'hybridation cellulaire qui conduit à sélectionner un seul clone B cellulaire, dont l'expression *in vivo* peut être discrète voire même transitoire dans l'infection naturelle.

La production d'anticorps bloquants a été étudiée dans un premier temps au cours de l'infection expérimentale du rat. Cette approche est basée sur la capacité des IgG2c de rat à se fixer à la protéine A sépharose contrairement aux IgG2a qui ne présentent aucune affinité pour ce support. Les sérums de rat ainsi traités ont été étudiés dans le système de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles.

Ces expériences de déplétion sélective en IgG2c restaurent l'activité cytotoxique des sérums de rats infectés par *S.mansoni* prélevés à des périodes précédemment définies comme dépourvues d'activité cytotoxique et plus particulièrement au 63^{ème} jour de l'infection, période pour laquelle les éosinophiles immuns ne présentent aucune activité protectrice (M.CAPRON *et al* 1984) (Figure 16).

Il existe donc bien au cours de l'infection expérimentale du rat une production d'anticorps à activité bloquante.

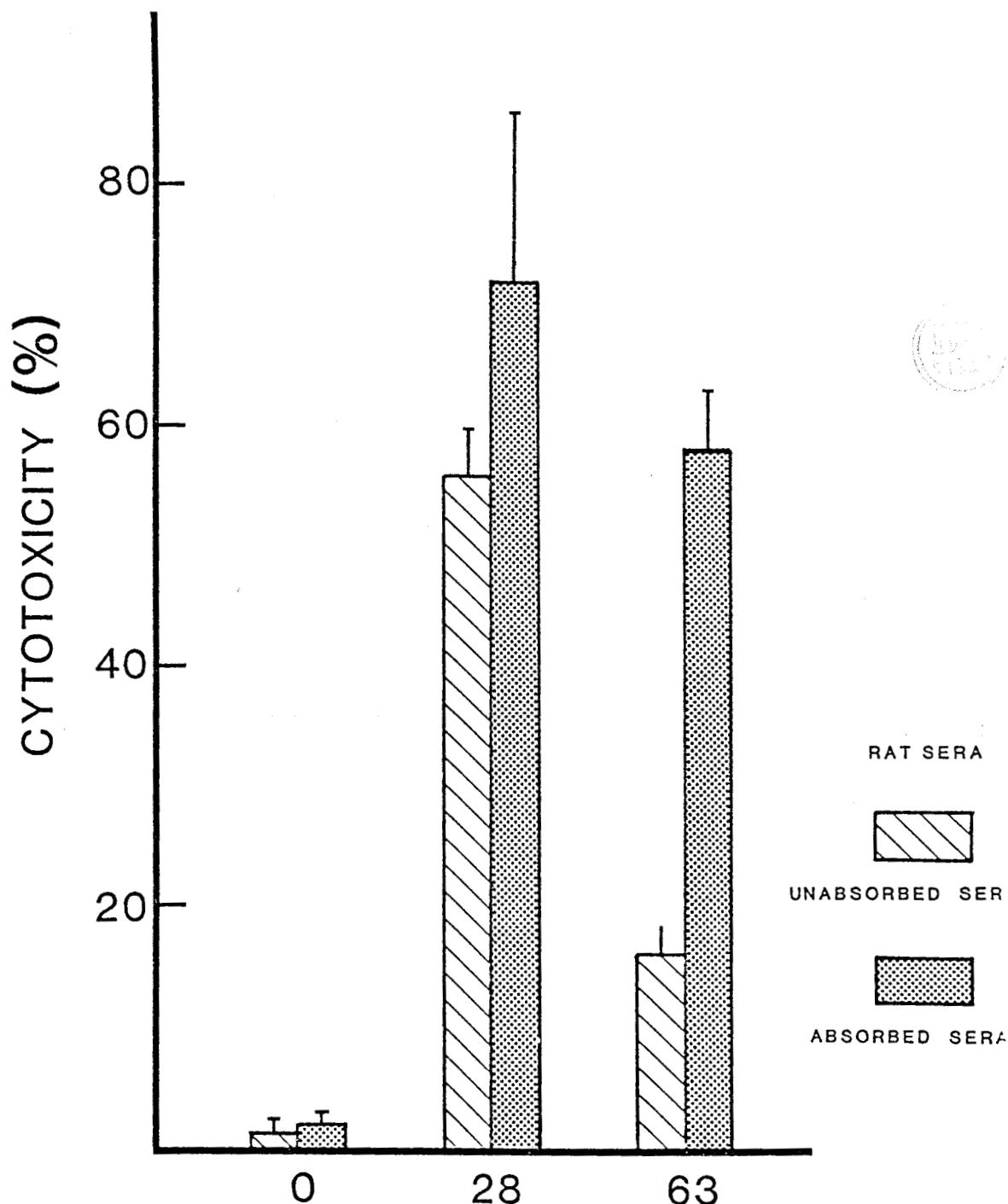
Chez l'homme l'application des techniques d'adsorption sur protéine A sépharose et de chromatographie de type FPLC ont permis l'identification d'anticorps bloquants d'isotype IgM dans les sérums de patients infectés par *S.mansoni* (Article E).

- 1) La déplétion des sérums humains en anticorps d'isotype IgM exalte l'activité cytotoxique dépendante d'éosinophiles de ces sérums vis-à-vis du schistosomule par rapport aux sérums non traités.

- 2) Les fractions IgM isolées de sérums humains infectés inhibent la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles humains induite par les fractions IgG préparées à partir des mêmes sérums.

FIGURE 16:

-IDENTIFICATION D'ANTICORPS BLOQUANTS DANS LES SERUMS
DE RATS INFECTES PAR SCHISTOSOMA MANSONI-



- 3) Les fractions IgG effectrices et IgM inhibitrices présentent toutes deux une spécificité pour l'antigène 38 kDa du schistosomule.
- 4) Les taux des anticorps humains d'isotype IgM spécifiques de l'antigène 38 kDa sont significativement plus élevés dans les sérums des patients susceptibles à l'infection par rapport au groupe des sujets classés comme résistants.

Ces résultats suggèrent donc que l'immunité à la schistosomiase n'est pas seulement liée à la présence d'anticorps à activités effectrices, mais peut aussi dépendre de l'absence d'anticorps bloquants. Ces anticorps bloquants pourraient donc être considérés comme des marqueurs de non-immunité.

ARTICLE D

0022-1767/84/1332-0998\$02.00/0

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Copyright © 1984 by The American Association of Immunologists

Vol. 133, No. 2, August 1984

Printed in U.S.A.

BLOCKING ACTIVITY OF RAT MONOClonAL ANTIBODIES IN EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS¹

JEAN-MARIE GRZYCH,² MONIQUE CAPRON, COLETTE DISSOUS, AND ANDRÉ CAPRON

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (INSERM U 167, ERA CNRS 422), Institut Pasteur, 15 Rue Camille Guérin, 59019 Lille Cedex, France

Rat IgG2c monoclonal antibodies have been produced after fusion of spleen cells from LOU/C rats infected with *Schistosoma mansoni* for 5 wk and IRF983F nonsecreting rat myeloma. The cell supernatant of an IgG2c-producing clone (IPLSm3), as well as ascitic fluids induced by this clone, revealed anti-*S. mansoni* activity detected by immunofluorescence on schistosomula sections. Antigenic analysis performed with IPLSm3 IgG2c antibody allowed to isolate onto the *S. mansoni* schistosomula surface a 38,000 dalton antigen previously characterized with the protective IPLSm1 IgG2a monoclonal antibody. Although IPLSm3 IgG2c did not exhibit any killing activity *in vitro* against schistosomula in the presence of complement, macrophages, or eosinophils, it was shown to strongly inhibit the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IPLSm1 IgG2a antibodies. The blocking activity of IgG2c antibody was further demonstrated *in vitro* by the use of F(ab')₂ fragments and *in vivo* by the inhibition of passively transferred immunity conferred by the IgG2a protective monoclonal antibody.

These results indicate that blocking antibodies could play an important role in the expression of protective immunity during schistosome infection.

The application of hybridoma technology in immunoparasitology represents one of the most important acquisitions of the last four years. Monoclonal antibodies appeared as providential tools for the analysis, characterization, and isolation of parasite antigens, but moreover opened a new way to approach the extremely complex immunologic mechanisms elicited during the course of parasitic infections.

Since 1979, several investigators have reported the production of *Schistosoma mansoni*-specific monoclonal antibodies. These have been used either to identify the parasite antigenic components (1-3) or to investigate antibody participation in the various effector mechanisms against *S. mansoni* schistosomula, in cooperation with complement (C) or with effector cells *in vitro* (4-7). Whereas in these assays, monoclonal antibodies repro-

duced the activities of immune sera or of purified polyclonal antibody preparation (4, 6, 7), the production of other monoclonal antibody isotypes has allowed surprising observations. For instance, mouse or rat IgM monoclonal antibodies were able to kill *S. mansoni* schistosomula *in vitro* in the presence of C, and also to passively transfer a significant level of protection to *S. mansoni* infection (5, 6). However, no specific effector role could be attributed to antibodies belonging to the IgM isotype in the case of polyclonal antibodies. It is of interest to note that many of the monoclonal antibodies produced did not exhibit any activity in the different cytotoxicity systems currently used. To appreciate their potential biologic role, we investigated the possible inhibitory effect of such antibodies on the expression of immunologic mechanisms induced by other monoclonal antibody isotypes.

The studies presented here are specifically focused on the blocking effect of an IgG2c monoclonal antibody on the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by the IPLSm1 IgG2a monoclonal antibody described in a previous report (7). To assess the *in vivo* relevance of our observations, the regulatory role of IgG2c on protective immunity conferred by IgG2a monoclonal antibody was explored by passive transfer experiments.

MATERIALS AND METHODS

Monoclonal antibodies. Rat anti-*S. mansoni* monoclonal antibody-secreting hybridomas were obtained from the fusion of the IR 983 F myeloma cell line (8) with spleen cells collected from female LOU/C rats (180 to 200 g) that were exposed 5 wk earlier to 1500 *S. mansoni* cercariae (Puerto Rican strain) by percutaneous infection (9). Fusion procedure and ascitic fluids preparation were performed according to the methodology described in a previous work (7).

Preparation of schistosomula. Schistosomula of *S. mansoni* prepared according to the method of Ramalho-Pinto *et al.* (10) and referred to as mechanically prepared schistosomula were used throughout the work. For all of the cytotoxicity assays, however, schistosomula were prepared according to the skin penetration technique described by Clegg and Smithers (11), and are referred to as skin-transformed schistosomula (SS).³

Indirect fluorescence assays. Cryostat sections of mechanical schistosomula (8 µm) were made and were overlayed either with samples of supernatants that had been concentrated threefold by lyophilization or with ascitic fluids at various dilutions. After 30 min contact and three washings in PBS, FITC-conjugated anti-rat Ig antisera (Miles Yeda Laboratories, Rehovot, Israel) were added for 30 min. The slides were then washed three times in PBS, the last washing containing Evans Blue at a final concentration of 1/10,000 as counterstain. Five week-infected rat serum (IRS) was used as a positive control, and normal rat serum (NRS), culture supernatant, or ascitic fluid was obtained from the IR 983 F myeloma as negative

Received for publication December 5, 1983.

Accepted for publication March 22, 1984.

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 CNRS (ERA 422), INSERM (U167), and WHO-UNDP Special Programme for Tropical Diseases Research.

² To whom correspondence should be addressed.

³ Abbreviations used in this paper: SS, skin-transformed schistosomula; MEM/NRS/TRI, Eagle's minimal essential medium supplemented with normal rat serum (NRS) and synthetic tripeptide, Gly-His-Lys (TRI); IRS, infected rat serum; HLEG, hydrolysate lactalbumin Earle's glucose medium.

BLOCKING MONOCLONAL ANTIBODIES IN SCHISTOSOMIASIS

controls.

Immunodiffusion analysis. Ouchterlony tests were performed with 125 μ l hybrid cell supernatants and 20 μ l specific antisera to rat IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgE immunoglobulins. The supernatant of IR983F cell was used as a negative control. Titration of IgG2a and IgG2c was performed by the technique of Mancini et al. (12) with antisera to rat IgG2a, rat IgG2c, and rat myeloma Ig used as the standard for IgG2a and IgG2c. Specific antisera to rat Ig and rat myeloma Ig were a gift from Prof. H. Bazin (Louvain University, Brussels), and were prepared according to a previous work (13).

Antibody-purified preparations. The protocol described by Bazin et al. (13) was applied for the purification of IgG2a and IgG2c rat monoclonal antibodies from ascitic fluids or from hybrid cell supernatants. Purified IgG2c antibodies were then treated according to the methods described previously to obtain F(ab')₂ and Fc fragments (14). Briefly, 10 mg of IgG2c monoclonal antibody were incubated for 4 hr at 37°C with twice-crystallized papain (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) or with crystallized pepsin (Sigma Chemical Co.). F(ab')₂ and Fc fragments were purified by gel filtration chromatography on an ACA 44 column. Purified antibodies and antibody fragments were then respectively dialyzed for 24 hr at 4°C against 0.9% NaCl saline physiological solution and minimal essential medium (MEM). All antibody samples were stored at -20°C until use.

Rat IgG2c myeloma protein. Rat myeloma IgG2c without antibody specificity (IR 304) was a gift from Prof. H. Bazin (Louvain University, Brussels), and was prepared according to a previous work (13). IR 304 rat IgG2c Ig were extensively dialyzed against 0.9% physiological saline solution and MEM before use.

Antigenic analysis. Immunoprecipitation experiments were performed as described previously (15). Briefly, *S. mansoni* schistosomula (SS) were radioiodinated by using the lactoperoxidase-technique of Marchaloni et al. (16), and the detergent extract (Nonidet P-40, 0.5%) of surface-labeled parasites was incubated with monoclonal antibodies. Immune complexes were adsorbed onto protein A Sepharose beads, and were then eluted and analyzed by SDS-PAGE in 13% polyacrylamide gels according to the procedure of Laemmli (17). Dried gels were placed in contact with Kodak X Omat Film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) between intensifying screens (Dupont de Nemours, France) for 2 days at -70°C.

Eosinophil-dependent cytotoxicity. The cytotoxicity assay was performed as described previously for polyclonal IgG2a antibodies (18). Briefly, 50- μ l aliquots of schistosomula (SS) were incubated overnight with 100 μ l ascitic fluids at different dilutions or with 100 μ l NRS or IRS at a final dilution of 1/16 to 1/32 (and after heat-activation for 2 hr at 56°C). After 18 hr incubation at 37°C, 100 μ l of the effector cell populations (6000 effector cells to one target) were added to each well of a flat-bottomed microtiter plate. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 hr by microscopic examination. The effector cell population (containing 40 to 90% eosinophils and 4 to 10% mast cells) was the nonadherent peritoneal cells, obtained from LOU/C rats stimulated 48 to 72 hr earlier by i.p. injection of 10 ml sterile 0.9% physiological saline. In the case of the IgE-dependent cytotoxicity assay, the overnight preincubation step with IRS or NRS was omitted, leading to a simultaneous incubation of targets, IRS or NRS, and eosinophil-enriched cells, according to the method of Capron et al. (19).

For cytotoxicity inhibition experiments, two protocols were compared. *S. mansoni* schistosomula were incubated for 2 hr with 100 μ l of IPLSm3 ascitic fluid (1/16 final dilution, corresponding to 50 μ g of IgG2c antibodies), IPLSm3-purified preparation (1000 μ g/ml), IPLSm3 F(ab')₂ or Fc fragments (1000 μ g/ml), or IR 304 myeloma protein (1000 μ g/ml). Schistosomula were then washed twice in MEM/NRS/TRI³ and were then incubated with 100 μ l of IPLSm1 ascitic fluid, NRS, or IRS at a final dilution of 1/16 to 1/32. Inhibitory activity was appreciated by comparing the percentage of dead schistosomula in the presence of the various substances to the percentage of killing after incubation with medium.

The inhibitory effect of IgG2c antibodies was also studied at the effector cell level. Eosinophil-rich populations were preincubated for 2 hr at 37°C with IPLSm3 ascitic fluid (1/16 final dilution), IPLSm3-purified preparation (1000 μ g/ml), IPLSm3 F(ab')₂ or Fc fragments (1000 μ g/ml), or IR 304 myeloma protein (1000 μ g/ml) at a ratio of 3 \times 10⁵ cells to 100 μ l of the different preparations. Pre-sensitized cells were then added to *S. mansoni* schistosomula that were incubated with 100 μ l of IPLSm1 ascitic fluid (1/16 to 1/32 final dilution). The degree of inhibition was measured by comparing to the level of cytotoxicity obtained in the case of cells preincubated for 2 hr in MEM/TRI/NRS. The percentage of inhibition was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{\% \text{ Cytotoxicity with inhibitor}}{\% \text{ Cytotoxicity without inhibitor}} \times 100$$

Macrophage-dependent cytotoxicity. The macrophage-dependent cytotoxicity was explored according to a method described elsewhere (20). Normal rat macrophages were collected after peritoneal washings with MEM and were incubated in the microplates (2.5 \times 10⁵ cells per well). Three hours later, nonadherent cells were removed, and adherent cells were incubated in MEM containing either 10 to 20% NRS or IRS, or monoclonal antibody ascitic fluids (1/16 final dilution). *S. mansoni* schistosomula were then added to the microplate (50 schistosomula per well), and the cytotoxic activity was appreciated after 24 hr of contact by microscopic examination.

C-dependent cytotoxicity. The lethal activity of anti-*S. mansoni* monoclonal antibodies was studied according to the method of Capron et al. (21). Sixty microliters of an *S. mansoni* skin schistosomula suspension containing 50 schistosomula were incubated with 100 μ l of ascitic fluid (diluted at 1/2 to 1/8 in HLEG³) and 40 μ l of fresh guinea pig serum (source of C). After 4 days of incubation, the percentage of cytotoxicity was measured by microscopic examination. In each experiment, NRS and 7 wk-IRS were used, respectively, as negative and positive controls. All sera and ascitic fluids were heat-inactivated for 1 hr at 56°C.

Passive transfer experiments. Ascitic fluids (2 ml of each ascitic fluid per rat) were injected i.v. into LOU/C rats (10-wk-old, 180 to 200 g) that had been infected with 1000 *S. mansoni* cercariae 4 hr earlier. Parasite burdens were evaluated 3 wk later by liver perfusion (22). The numbers of liver worms obtained from rats injected with ascitic fluids were compared to those obtained from rats injected with 2 ml physiological solution. The percentage of protection was calculated by the formula (23): $\frac{(A - B)}{A} \times 100$, where A = the number

of worms recovered from rats injected with 2 ml physiological saline, and B = the number of worms recovered from rats injected with 2 ml ascitic fluid.

Statistical analysis. Student's t-test was used to study the statistical significance of our results.

RESULTS

Characterization and biologic activity of rat monoclonal antibodies. Four hundred and fifty hybrid cell supernatants obtained after nine successive cell fusion experiments were studied by indirect fluorescence on schistosomula sections: 17 of these demonstrated an intense fluorescence reaction at the surface level. The same immunofluorescence pattern was observed for the different monoclonal antibodies. By immunodiffusion analysis of hybrid cell supernatants, several monoclonal antibodies—among them IgG2a and IgG2c—were identified.

The potential biologic activities of these hybrid cell supernatants were explored in different systems of cytotoxicity involving C, rat eosinophils, and rat macrophages. Table I illustrates some results obtained with a reference to the IPLSm1 IgG2a antibody described in a previous report (7). In such conditions, no cytotoxic activity could be induced by the IgG2c antibodies (IPLSm3).

Characterization of target antigens. IPLSm3 ascitic fluid was incubated with a detergent extract of surface-labeled schistosomula; the results, presented in Figure 1, showed that IPLSm3 antibodies precipitated several surface antigens of 30 to 40,000 and 20,000 daltons. In this experiment, the most important observation concerned the specific binding of IPLSm3 antibodies to the 38,000 dalton antigen previously defined by IPLSm1 protective antibodies (3). Inhibition experiments, in which the detergent extract was previously adsorbed by either IPLSm1 or IPLSm3 antibodies, confirmed that both monoclonal antibodies recognize the same 38,000 dalton surface antigen. The significance of the presence of additional bands, precipitated by IPLSm3 antibodies but unadsorbed by IPLSm1 antibodies, has yet to be clarified.

Inhibitory activity of IgG2c monoclonal antibodies. The activity of IgG2c antibodies (IPLSm3) was investi-

1000

BLOCKING MONOCLONAL ANTIBODIES IN SCHISTOSOMIASIS

TABLE I

Biologic activities of anti-S. mansoni monoclonal antibodies

Antibody Source ^a	% Cytotoxicity ± SE		
	with guinea pig C ^b	with normal rat eosinophils ^c	with normal rat macrophages ^d
IPLSm1 ascitic fluid (IgG2a)	11.0 ± 1.9	90.5 ± 10.9	0
IPLSm3 ascitic fluid (IgG2c)	11.0 ± 5.9	11.0 ± 3.9	6.3 ± 1.0
IR983F	6.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0	4.0 ± 1.9
IRS	48.0 ± 20.6	96.0 ± 1.0	90.0 ± 1.0
NRS	5.0 ± 3.9	5.0 ± 5.9	10.5 ± 1.4

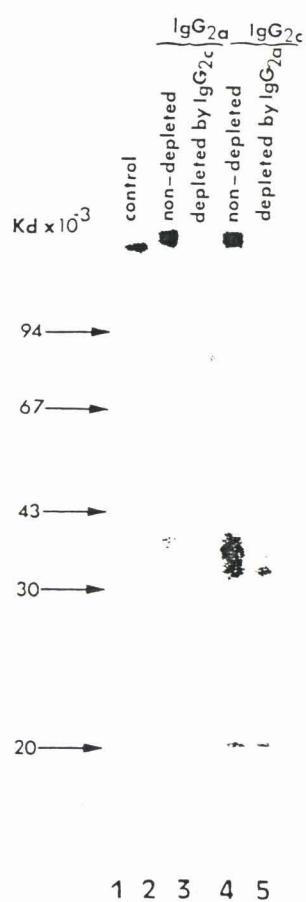
^a Ascitic fluid and sera were heat-inactivated for 30 min at 56°C.^b The percentage of cytotoxicity was evaluated after 4 days contact of 50 schistosomula in 60 µl HLEG with 100 µl of undiluted NRS, 9 wk-IRS or 100 µl ascitic fluids (dilution 1/2), and 40 µl of fresh guinea pig serum (source of C) (mean of two duplicate experiments ± SE).^c The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48 hr contact with effector cells (LOU/C rat peritoneal cells enriched in eosinophils; 79% eosinophils, 5% mast cells). Fifty schistosomula in 50 µl of MEM/NRS/TRI medium were incubated with 100 µl NRS, 4 wk-IRS, or ascitic fluids (dilution 1/4) (mean of two duplicate experiments ± SE).^d The percentage of cytotoxicity was evaluated after 24 hr contact with effector cells (Fischer rat-adherent peritoneal cells). Fifty schistosomula were incubated with 20% NRS, 7 wk-IRS, or ascitic fluids (mean of two duplicate experiments ± SE).

Figure 1. Characterization of surface antigens. Detergent extract of 500 labeled schistosomula was incubated with 10 µl of IPLSm1 or IPLSm3 ascitic fluid. Immune complexes were absorbed on protein A Sepharose and were then analyzed, respectively, in lanes 2 and 4. Protein A-unbound material from lanes 2 and 4 was further incubated with 10 µl of IPLSm3 or IPLSm1 ascitic fluid, and immune complexes were analyzed, respectively, in lanes 5 and 3. IR983F ascitic fluid was used as a control (lane 1). IPLSm1 immune complexes were absorbed on protein A Sepharose, previously incubated with 10 µl of rabbit serum anti-rat IgG (3).

gated in the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IgG2a monoclonal antibody (IPLSm1). *S. mansoni* schistosomula were incubated simultaneously with IPLSm1 and IPLSm3. The resulting cytotoxic effect was compared to the killing activity induced by IgG2a or by IgG2c incubated separately with schistosomula. The results presented in Figure 2 reveal a strong inhibition of the IgG2a-dependent cytotoxicity in the presence of IgG2c antibodies, whereas no effect could be observed in the presence of IgG2c antibodies alone. To rule out a possible nonspecific activity due to the use of ascitic fluid, schistosomula were incubated with an amount of purified IgG2a monoclonal antibodies giving 80 to 100% of cytotoxicity, and with various doses of purified IgG2c monoclonal antibodies.

The results presented in Figure 3 confirm the preliminary observations defined for IPLSm3 ascitic fluid and, moreover, clearly show the dose-dependent inhibitory effect of IPLSm3-IgG2c antibodies. The IgG2a-mediated eosinophil-dependent cytotoxicity was strongly inhibited with as few as 112 µg/ml purified IgG2c monoclonal antibodies. Two hypotheses could therefore be put forward to explain the inhibitory activity of IPLSm3 antibodies on the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated with IPLSm1 antibodies. The IPLSm3 antibodies might act as blocking antibodies at the target level, masking the IPLSm1 site of fixation; alternatively, the IPLSm3 antibodies might inhibit the interaction between IgG2a antibodies and eosinophils through a competition at the eosinophil Fc receptor level.

Mechanism of inhibition by IgG2c monoclonal antibodies. To define more precisely the level of interaction

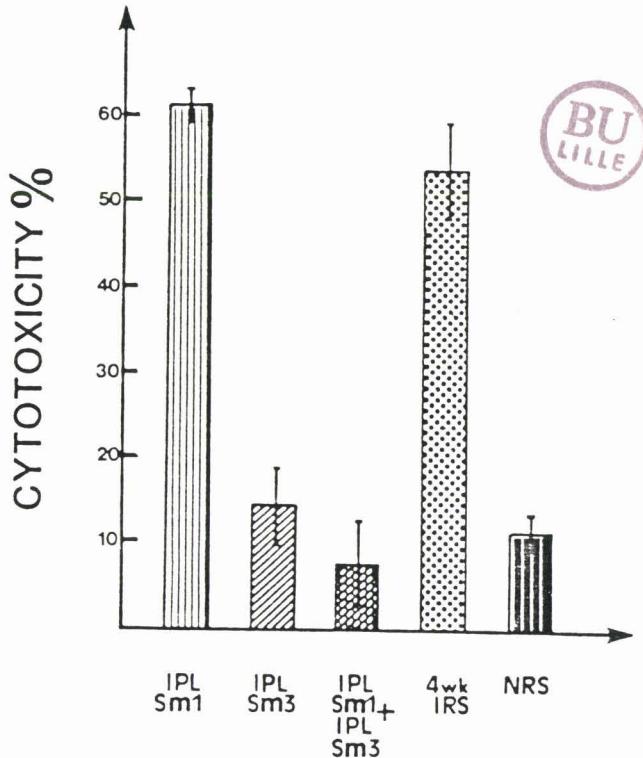


Figure 2. Biologic activity of anti-*S. mansoni* IgG2c monoclonal antibody IPLSm3. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 hr incubation with effector cells (LOU rat peritoneal cells enriched in eosinophils) (mean of two duplicate experiments ± SD). Ascitic fluids and sera (1/32 final dilution) were heat-inactivated for 2 hr at 56°C.

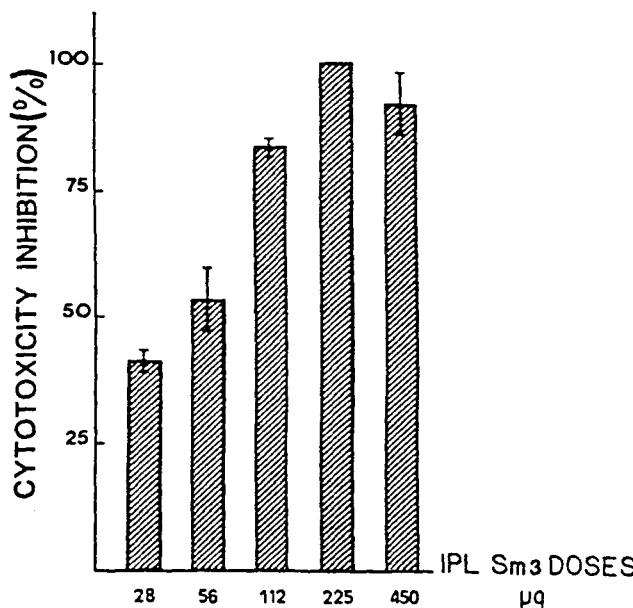


Figure 3. Study of dose-dependent inhibitory activity of IPLSm3 IgG2c antibodies on the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IPLSm1 IgG2a antibodies. The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48 hr contact with effector cells (LOU rat peritoneal cells enriched in eosinophils). Schistosomula were sensitized for 18 hr with 100 μ l of mixtures containing 450 μ g/ml purified IgG2a antibodies and increasing doses of purified IgG2c antibodies (28 to 450 μ g/ml) (mean of two duplicate experiments \pm SD).

of IPLSm3 in this antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism, we compared two protocols of investigation involving either a preincubation of parasite targets or a pre-sensitization of effector cell populations with IPLSm3 antibodies. This approach was completed by the use of non-antibody myeloma IgG2c and F(ab')₂, and Fc fragments purified from IPLSm3 antibodies. The results shown in Figure 4 indicate that the pre-sensitization of schistosomula with IPLSm3 antibodies or with their purified F(ab')₂ fragments, followed by extensive washings, led to an important decrease of the eosinophil-dependent cytotoxicity effect induced by IPLSm1 antibodies ($p < 0.001$). A similar preincubation with non-antibody IgG2c myeloma protein or IPLSm3 antibody Fc portion did not inhibit this cytotoxic effect (Fig. 4A). The IPLSm3-blocking activity could therefore be related to the fact that both IPLSm3 and IPLSm1 antibodies react with the 38,000 dalton surface antigen previously characterized as target antigen for IgG2a antibodies (3). Unfractionated IgG2c or their F(ab')₂ fragments might then inhibit the fixation of IgG2a cytotoxic antibodies to this target antigen.

Alternatively, the preincubation of effector cells with myeloma IgG2c, IPLSm3 antibodies, or Fc fragments prepared from IPLSm3 antibodies led to a strong inhibition of the cytotoxic activity against IPLSm1-opsonized schistosomula ($p < 0.001$). On the other hand, the cytotoxic activity of cells incubated with F(ab')₂ fragments was similar to the controls (Fig. 4B). These results suggest a second way of inhibition able to account for the blocking effect of IgG2c antibodies that involves a competition of IgG2c and IgG2a antibodies at the eosinophil Fc- γ receptor level.

Role of IgG2c antibodies in various cytotoxicity systems. To find out whether the blocking effect of IgG2c

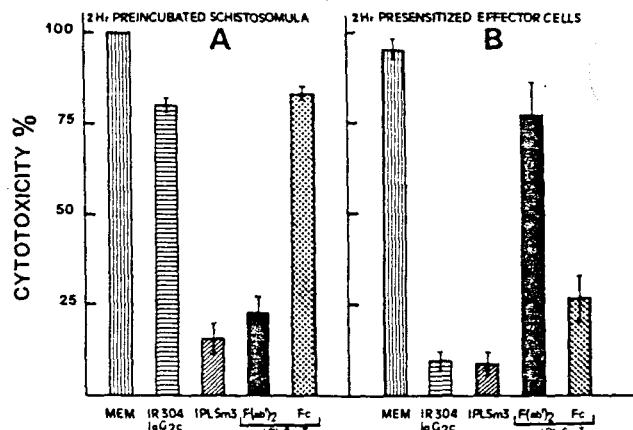


Figure 4. Mechanism of inhibition of eosinophil cytotoxicity by IgG2c antibodies. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 hr contact with effector cell populations (LOU rat peritoneal cells enriched in eosinophils). A. Schistosomula were preincubated for 2 hr with 100 μ l MEM, IgG2c myeloma protein, purified IPLSm3 IgG2c antibody, IPLSm3 F(ab')₂ fragments, or IPLSm3 Fc fragments (100 μ g protein for 50 schistosomula, washed extensively with MEM/NRS/TRI, and then incubated with 100 μ l IPLSm1 IgG2a antibodies (ascitic fluid: 1/16 final dilution). B. Schistosomula were preincubated for 18 hr with 100 μ l of IPLSm1 IgG2a antibodies (ascitic fluid: 1/16 final dilution) and were then incubated with eosinophil-rich populations preincubated for 2 hr with MEM/NRS/TRI, IgG2c myeloma protein, IPLSm3-purified antibodies, IPLSm3 F(ab')₂ fragments, or IPLSm3 Fc fragments (effector cell to protein ratio = 3×10^5 cells/100 μ g protein) (mean of three duplicate experiments \pm SD).

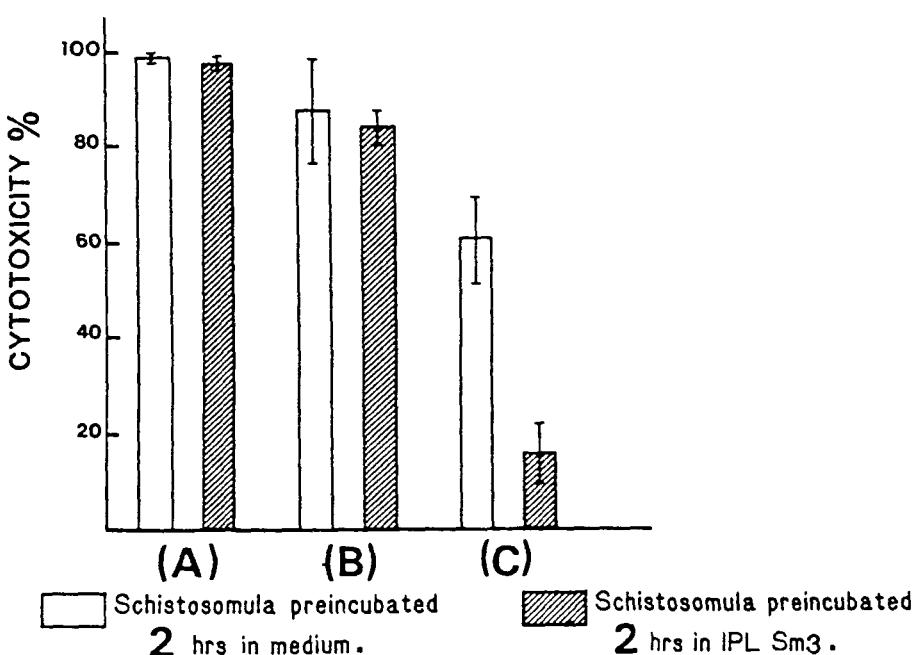
monoclonal antibodies was restricted to the IgG-dependent eosinophil cytotoxicity mechanisms, we compared the inhibitory effect of IgG2c antibodies in the IgE-dependent effector systems previously described in the rat model. The IgG2a or IgE eosinophil-dependent (18, 19) and the IgE macrophage-mediated system (20) were studied in particular. The results shown in Figure 5 indicate that a 2-hr preincubation of parasite targets with anti-S. mansoni monoclonal IgG2c IPLSm3 did not induce any inhibition of cytotoxic activity in the case of IgE eosinophil or IgE macrophage-dependent cytotoxicity, whereas a significant level of inhibition was obtained in the case of eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by heat-inactivated 4 wk-IRS ($p < 0.002$). These results therefore suggest a specific blocking effect of IPLSm3 antibodies on polyclonal cytotoxic IgG antibodies present in the 4 wk-IRS, and present interesting information on the possible biologic relevance of such antibodies in rat experimental schistosomiasis.

In vivo inhibitory role of IgG2c antibodies. The inhibitory effect of IgG2c antibodies on the protection conferred *in vivo* to recipient rats by IgG2a IPLSm1 antibodies was studied by passive transfer experiments (Fig. 6). In these conditions, the injection of IPLSm1 IgG2a ascitic fluid (2 ml) conferred a significant level of protection (48%, $p < 0.005$) in comparison to the control (2 ml of IR983F ascitic fluid). A simultaneous i.v. injection of IPLSm3 IgG2c (2 ml) and IPLSm1 IgG2a (2 ml) ascitic fluids led to a dramatic decrease of the protection when compared to IgG2a antibodies alone ($p < 0.001$).

DISCUSSION

The results presented in this report describe the blocking activity of a given antibody isotype on the expression of immunologic mechanisms induced by other antibody

Figure 5. Role of IgG2c antibodies in various antibody-dependent cellular cytotoxicity systems. A. IgE macrophage-dependent cytotoxicity was measured after 24-hr contact of schistosomula incubated for 2 hr in IPLSm3 ascitic fluid (1/16 final dilution) or medium, and macrophages armed with 20% unheated 7 wk-IRS. B. IgE-dependent eosinophil cytotoxicity was evaluated after 48-hr contact of schistosomula preincubated for 2 hr in IPLSm3 ascitic fluid (1/16 final dilution) or medium, with eosinophil-rich population and 50 μ l of unheated 8 wk-IRS (1/8 final dilution). C. IgG2a-dependent cytotoxicity was measured after 48 hr contact of schistosomula preincubated for 2 hr with IPLSm3 ascitic fluid (1/16 final dilution) or with medium and further incubated with 50 μ l of 4 wk heat-inactivated IRS (1/8 final dilution) and eosinophil-rich population. The inhibition was only significant in C ($p < 0.002$). (Results corresponding to two duplicate experiments \pm SD.)



isotypes. Such studies, made possible by the use of monoclonal antibodies, are particularly relevant to anti-parasite immunity, in which a large variety of effector mechanisms has been described *in vitro*, without a clear cut demonstration of the *in vivo* role of one particular effector system.

Rat monoclonal antibodies of the IgG2c isotype, shown to be specifically directed against schistosomula surface, did not exhibit any anti-parasite killing effect *in vitro*. Interestingly, however, they were able to inhibit, in a dose-dependent manner, the cytotoxic effect mediated by IgG2a and eosinophils, but not the expression of IgE-dependent eosinophil or macrophage cytotoxicity. Two ways of interaction could be proposed to explain this inhibitory activity of IgG2c antibodies: a blocking effect at the level of membrane target antigen, or/and at the effector cell level by competition for the Fc- γ receptor. IgG2c antibodies have been shown to react with the 38,000 dalton surface antigen previously characterized as the target antigen for IgG2a antibodies (3). Total IgG2c antibodies or their F(ab')₂ fragments could inhibit the fixation of IgG2a cytotoxic antibodies, because the two antibodies recognize the same epitope or two very close epitopes. This hypothesis would therefore suggest a higher affinity of IgG2c antibodies for the 38,000 dalton antigen when compared to IgG2a antibodies. It is also possible that the fixation of IgG2c induced a slight modification of 38,000 antigen, masking the IgG2a antibody fixation site. At the eosinophil level, the inhibition induced similarly by IgG2c Ig with or without antibody specificity, or by the Fc portion of it, suggested a competition between IgG2c and IgG2a at the Fc- γ receptor level. Indeed, recent results could show that, by using the technique of inhibition of rosettes, IgG2a and IgG2c Ig could bind to the same Fc- γ receptor, whereas the receptor for IgG1 was different (J. Khalife, M. Capron, J. M. Grzych, H. Bazin, and A. Capron: manuscript in preparation).

The strong inhibitory role of IgG2c antibodies reported

in the present work could therefore result from these two mechanisms, the F(ab')₂ fragment blocking the membrane target antigen and the Fc fragment inhibiting the eosinophil Fc- γ receptor, previously shown to be different from the Fc- ϵ receptor (24).

The experiments performed with IgG2c myeloma protein without antibody specificity confirmed that at the schistosomula level, the blocking effect was well related to the antibody site of IgG2c Ig, because no inhibitory activity could be observed when schistosomula were preincubated with non-antibody IgG2c myeloma protein and were extensively washed. However, a high level of inhibition could also be observed in the case of eosinophils preincubated with non-antibody IgG2c or with the Fc fragment of anti-*S. mansoni* IgG2c, suggesting also a potential role for the Fc portion of the molecule at this level.

At present, it is difficult to integrate these findings in the dynamics of *S. mansoni* infection, because no information concerning the biologic effect of such blocking antibodies has been reported until now in the context of parasite infections. Even though the significance of our observations has yet to be defined, it is, however, interesting to link this inhibitory role of IgG2c antibodies to a previous work of Capron *et al.* (25) concerning infected rat eosinophils and their potentiality to kill non-opsonized schistosomula. These authors showed that immune complexes isolated from infected rats at the period corresponding to a lack of eosinophil cytotoxicity against non-opsonized schistosomula were able to inhibit the cytotoxic activity of normal eosinophils against opsonized targets. Such observations raised the hypothesis of a blocking factor present in IRS, and the present work allowed us to suggest the participation of IgG2c antibodies in these blocking immune complexes. This hypothesis is presently under investigation.

The blocking effect of IgG2c antibodies could also be related to several observations reported in malignant diseases. Blocking antibodies of IgG subclasses have been

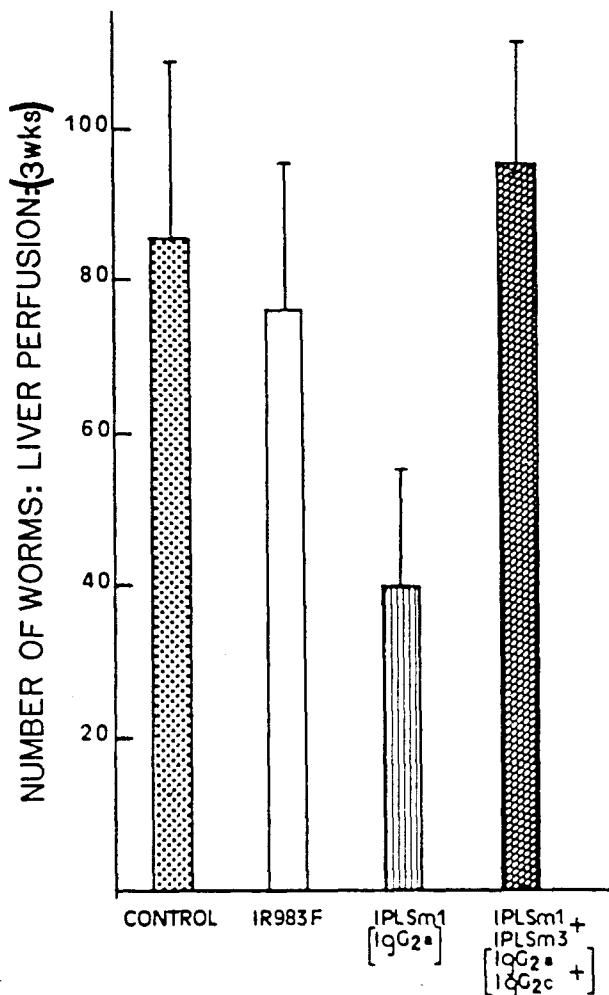


Figure 6. *In vivo* inhibitory role of IgG2c antibodies. Two milliliters of ascitic fluid (either IgG2a-producing IPLSm1, IgG2c-producing IPLSm3, or IR983F control) or 2 ml of saline were injected i.v. into each rat (groups of five rats were used for each test). The number of worms was estimated by liver perfusion 21 days after a challenge infection with 1000 cercariae.

isolated from the sera of patients with neuroblastomas: they were able to strongly inhibit the lymphocyte-dependent cytotoxicity mechanisms *in vitro* (26, 27). In *S. mansoni* infection, IgG2c antibodies could therefore similarly represent for schistosomula a new way to escape the immune response elicited in the infected host. It seems necessary, however, to establish the real relevance of this hypothesis by comparing the inhibitory role of IPLSm3 IgG2c antibodies and various preparations of IgG2c polyclonal antibodies isolated from IRS.

The demonstration of blocking antibodies in schistosomiasis brings new insights to the existence of some regulatory mechanisms already suspected (28) which might affect the expression of protective immunity. The evidence that the same molecule (38,000 dalton) may elicit both a protective and a blocking response might lead to important implications in the production of putatively protective antigens. By revealing the surprising diversity of regulatory mechanisms in parasite infections, this work emphasizes once again the necessity of a careful dissection of immune mechanisms before any attempt of active immunization. The demonstration in

human infection of such blocking antibodies would certainly provide valuable markers for the possible discrimination between immune and non-immune individuals.

Acknowledgments. The authors thank Prof. H. Bazin for the gift of specific antisera and myeloma proteins, and Mr. S. Torres, J. Trolez, and Ms. M. C. Cottrez for their excellent technical assistance. The secretarial assistance of C. Colson and M. F. Massard is appreciated.

REFERENCES

- Taylor, D. W., and A. E. Butterworth. 1982. Monoclonal antibodies against surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 84:65.
- Strand, M., A. McMillan, and Xing-Qing Pan. 1982. *Schistosoma mansoni*: Reactivity with infected human sera and monoclonal antibody characterization of a glycoprotein in different development stages. *Exp. Parasitol.* 54:145.
- Dissous, C., J. M. Grzych, and A. Capron. 1982. Schistosoma mansoni surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. *J. Immunol.* 129:2232.
- Verwaerde, C., J. M. Grzych, H. Bazin, M. Capron, and A. Capron. 1979. Production d'anticorps anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leurs activités biologiques. *CR Acad. Sci.* 289:725.
- Smith, M. A., J. A. Clegg, D. Snary, and A. J. Trejdosiewicz. 1982. Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with IgM monoclonal antibody. *Parasitology* 84:83.
- 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.
- 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.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. Naturally acquired resistance to experimental infection of *S. mansoni* in the Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Parasitology* 55:695.
- Ramalho-Pinto, F. J., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. A. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
- Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2:79.
- Mancini, G., A. O. Carbonara, and J. F. Heremans. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235.
- Bazin, H., A. Beckers, and P. Querinjean. 1974. Three classes and four subclasses of rat immunoglobulin. IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 4:44.
- Rousseaux, J., G. Biserte, and H. Bazin. 1980. The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Mol. Immunol.* 17:469.
- Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
- Marchalonis, J. J., R. E. Cone, and C. Santer. 1971. Enzymatic iodination. A probe for accessible surface proteins on normal neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124:921.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Capron, M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout, and M. Joseph. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibodies and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8:127.
- Capron, H., H. Bazin, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:1764.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, and H. Bazin. 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *S. mansoni* schistosomules. *Nature* 253:474.
- Capron, A., M. Capron, H. Dupas, D. Bout, and A. Petitprez. 1974. Etude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiasis humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immunsérum sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 4:613.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of

1004

BLOCKING MONOCLONAL ANTIBODIES IN SCHISTOSOMIASIS

- adult worms. *Parasitology* 55:695.
- 23. Phillips, S. M., W. A. Reid, and E. H. Sadun. 1977. The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infection in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. *Cell. Immunol.* 28:75.
 - 24. Capron, M., A. Capron, J. P. Dessaint, S. Gunnar, O. Johansson, and L. Prin. 1981. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:2087.
 - 25. Capron, M., G. Torpier, and A. Capron. 1979. *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.* 123:2220.
 - 26. Jose, D. G., and F. Skvaril. 1974. Serum inhibitors of cellular immunity in human neuroblastoma. IgG subclass of blocking activity. *Int. J. Cancer* 13:173.
 - 27. Steele, J. R., J. Amkerst, H. O. Sjögren, J. Vang, and O. Lannerstad. 1975. Absorption of blocking activity from human tumor-bearer sera by *Staphylococcus aureus* Cowan I. *Int. J. Cancer* 15:180.
 - 28. Capron, M., Y. Carlier, H. Nzeyimana, P. Minoprio, F. Santoro, B. Sellin, and A. Capron. 1980. *In vitro* study of immunological events in human and experimental schistosomiasis: relationships between cytotoxic antibodies and circulating *Schistosoma* antigens. *Parasite Immunol.* 2:223.

ARTICLE E

IMMUNITY IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS MANSONI

Regulation of Protective Immune Mechanisms by IgM Blocking

Antibodies

BY JAMAL KHALIFE,* MONIQUE CAPRON,* ANDRÉ CAPRON,* JEAN-MARIE GRZYCH,* ANTHONY E. BUTTERWORTH,‡ DAVID W. DUNNE,‡ AND JOHN H. OUMA§

*From the *Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 167, Centre National de la Recherche Scientifique 624, Institut Pasteur de Lille, France; the ‡Department of Pathology, Cambridge CB2 1QP, United Kingdom; and the §Division of Vector-Borne Diseases, Ministry of Health, Nairobi, Kenya*

Evidence is accumulating that antibody dependent, cell-mediated cytotoxicity (ADCC) plays a critical role in the mechanisms of defense against schistosomes (1, 2). In several experimental models and in the human situation, the participation of phagocytic cell populations, including macrophages, eosinophils, and platelets, has been demonstrated (3–6). Killing in vitro of schistosomula, the main targets of immune attack, is observed when these cells interact with the parasite in the presence of specific antibodies (3, 5–9).

During experimental rat schistosomiasis, or during human infection, large variations in the cytotoxic activity of eosinophils attributable to immune complexes may occur (7, 10), and it has been shown (10) that immune complexes isolated from rat infection serum can either activate or inhibit schistosomulum killing by normal eosinophils. More recently, the production of *Schistosoma mansoni*-specific mAbs has allowed an alternative explanation for variations in the capacity of different sera to support killing (11). A rat IgG2c mAb (IPLSm3), which did not exhibit any killing activity for schistosomula, specifically inhibited the eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by an IgG2a mAb (IPLSm1) (11). The blocking effect of IgG2c was dual, both at the surface target antigen (M_r 38,000) and at the effector cell level, by competition for the Fc γ receptor (12, 13). IgG2c antibodies were also able to inhibit the in vivo protection conferred by IgG2a mAbs.

The demonstration of such mechanisms in the rat raises the question of the possible existence in human schistosomiasis of blocking antibodies modulating the efficiency of immune effector mechanisms (14). To test such a hypothesis, we have studied a group of infected children who are involved in epidemiologic and immunologic studies of schistosome infection (15, 16). Among this group, two subgroups have been distinguished. The first, one of 22 children showing

This work was supported by grants from Tropical Diseases Research Program of the World Health Organization—United Nations Development Program, grants from the European Economic Community, and by the Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624. Address correspondence to Jamal Khalife, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 Rue du Pr. A. Calmette, B.P. 245, 59045 Lille Cédex, France.

high reinfection intensities (>100 eggs per gram of feces), were considered to be susceptible: the second, of 35 children who showed high levels of water contact but low reinfection intensities (<30 eggs per gram of feces), were considered resistant. Comparison of various parameters of the immune response in the two subgroups, including antibody-mediated eosinophil-dependent killing of schistosomula, antischistosomulum IgE antibodies, and eosinophil levels measured as an indirect estimate of eosinophil functional activity, showed no significant differences (16).

In the present work, we demonstrate the existence of blocking antibodies capable of inhibiting eosinophil effector function in human infection with *S. mansoni*, as previously shown for rat experimental schistosomiasis (11). A detailed statistical study by Butterworth et al.¹ suggests that these blocking antibodies may prevent the expression of immunity in young children.

Materials and Methods

Human Sera. Human sera were obtained from *S. mansoni*-infected patients before and after treatment with oral oxamniquine (30 mg/kg). Subjects were living in an endemic area in Kenya (Machakos district), which has already been described in previous papers (15, 16). Normal human sera were prepared from *S. mansoni*-uninfected healthy donors. All sera were stored in frozen aliquots at -70°C. When indicated, the sera were heated for 2 h at 56°C.

Indirect Fluorescence Assay. Surface-binding antibodies were detected by indirect fluorescence on sections of *S. mansoni* schistosomula prepared as previously described (17). The sections were overlaid either with total serum or fractions at various dilutions. After a 30-min incubation and three washings in PBS, FITC-conjugated anti-human immunoglobulin antisera at 1:20 final dilutions were added (α , μ , or γ chain-specific; Cappel Laboratories, Cochranville, PA) for an additional 30 min. The slides were washed three times in PBS and counterstained with Evans blue (1:10,000 final dilution). Normal human sera or medium were used as negative controls. The sections were examined under fluorescence microscopy.

Serum Absorption. 100 μ l of serum diluted (final dilution 1:5) in MEM with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) were mixed in tubes with 100 mg protein A-Sepharose (PAS)² (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) previously swollen and equilibrated with medium. Tubes were loaded on a test tube rotator and agitated overnight at 4°C. The unabsorbed fraction (PAS effluent fraction) was recovered by centrifugation at 600 g for 10 min and tested as such in indirect fluorescence and cytotoxicity assays. The bound IgG fraction was washed extensively and eluted with 0.5 ml 1 M glycine, pH 2.8 (PAS eluate fraction) (18). The aliquots were immediately brought to neutral pH with 10 N NaOH dialyzed against PBS for 3 h and overnight against MEM.

Serum Fractionation (Ig Isotype Separation). A fast protein liquid chromatography (FPLC) (Pharmacia Fine Chemicals) system was used for separation of IgM and IgG from human sera (19). Briefly, after priming the gel filtration column (Superose 6) with PBS (50 mM, pH 7.2), 100 μ l of serum was filtered through a 0.2- μ m filter and loaded onto the column by a V-7 valve. The operating pressure was 1 millipascal, and the flow rate was set at 0.5 ml/min. The fraction collector was programmed to collect 1-ml samples (Fig. 1A). Ig isotype was determined by solid-phase RIA on plates coated with anti-human immunoglobulin antisera specific for γ or for μ chain (Cappel Laboratories) (Fig. 1B).

¹ A. E. Butterworth, R. Bensted-Smith, A. Capron, M. Capron, P. R. Dalton, D. W. Dunne, J. M. Grzych, H. C. Kariuki, J. Khalife, D. Koech, M. Mugambi, J. H. Ouma, T. K. arap Siongok, and R. F. Sturrock. Immunity in human *schistosomiasis mansoni*. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. Manuscript submitted for publication.

² Abbreviations used in this paper: FPLC, fast protein liquid chromatography; PAS, protein A-Sepharose.

1628 IgM BLOCKING ANTIBODIES IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS

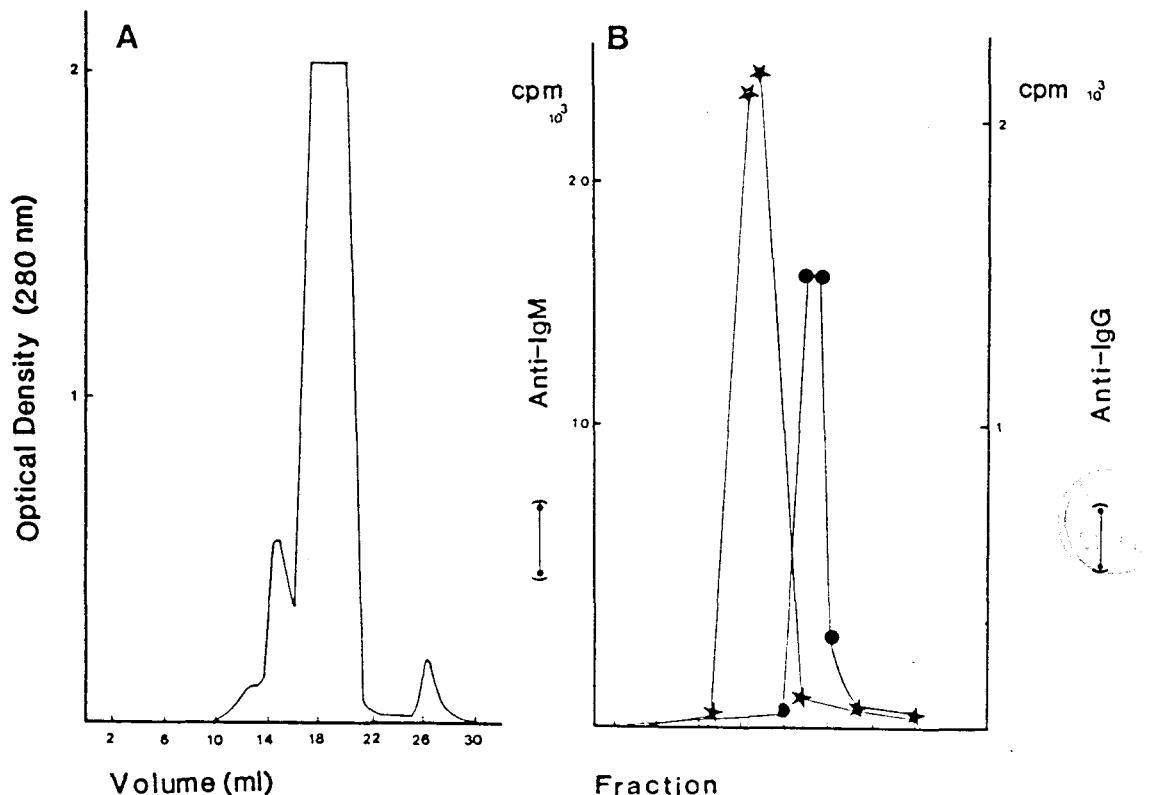


FIGURE 1. IgG and IgM separation from human sera by FPLC. (A) elution profile from the chromatography column. (B) detection of IgM and IgG fractions by RIA. Plates coated with anti-human IgM or anti-human IgG were incubated with 100 μ l of each fraction. After 2 h of contact, wells were washed and then incubated with 125 I-labeled anti-IgG or anti-IgM for 1 h at 37°C and overnight at 4°C.

Cytotoxicity Experiments. Sera were tested for their levels of heat-stable antibodies mediating eosinophil-dependent damage to *S. mansoni* schistosomula according to methods described elsewhere (16). Eosinophils were prepared from eosinophilic individuals by centrifugation on discontinuous metrizamide gradients. Cell fractions collected from the 24–25% metrizamide layers were used in these assays. The experimental procedure for the cytotoxicity assay was similar to that previously described (5). Briefly, 50 μ l of the schistosomula suspension (1,000 schistosomula/ml in MEM/NHS [heat-inactivated normal serum]) were incubated either with 50 μ l of heat-inactivated total human serum samples or fractions at various dilutions. The effector cell suspension containing >90% eosinophils at an E/T ratio of 5,000:1 was then added. In some experiments, schistosomula were preincubated with PAS effluents for 2 h at 37°C. After this incubation period, the schistosomula targets were washed twice with medium before use in the cytotoxicity assay. The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48 h contact by microscopic examination.

Immunoprecipitation. Schistosomulum proteins were radioiodinated using the lactoperoxidase technique (20). Surface antigens were extracted by treatment of labeled parasites with 0.5% NP-40 in Tris-HCl, pH 6.8, containing 100 U/ml aprotinin for 30 min at 0°C (10^5 parasites per 0.5 ml), and immunoprecipitated with antibodies present in immune sera as previously described (21). Briefly, aliquots corresponding to 500 schistosomula were incubated with 10 μ l of serum for 2 h at 4°C and then transferred into tubes containing 10 mg of PAS previously swollen and equilibrated in adsorption buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% Triton X-100, and 100 U/ml aprotinin). PAS was sensitized with anti-human IgM before the addition of antigen-antibody complex to identify the antigen recognized by IgM antibodies. In all experiments,

tubes were agitated overnight at 4°C in a test tube rotator. The Sepharose beads were then washed with 3 ml of 5 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl and 3 ml of 5 mM Tris-HCl, pH 7.4. Fixed complexes were eluted with 40 µl of sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% sucrose, and 0.005% bromophenol blue) at 100°C for 3 min. The eluted labeled antigens were identified by SDS-PAGE, and autoradiography was performed according to the method described elsewhere (21).

Radioimmunoassay. Sera and Ig fractions (IgG, IgM) were tested for their capacity to inhibit the binding to antigen of two rat mAbs against the 38,000 M_r schistosomulum surface antigen (11). Inhibition of binding of radiolabeled IgG2a (IPLSm1) and IgG2c (IPLSm3) mAbs was performed according to the technique previously described (22). Briefly, polyvinyl chloride (PVC) plates precoated with rat IgM (C₃-109) mAb recognizing the 38,000 M_r antigen were incubated with 100 µl of schistosomula NP-40 extract (1 mg/ml). After a 2-h exposure at 37°C, plates were washed twice in PBS/0.1% BSA buffer. For the inhibition test, 100 µl of sera or Ig fractions (1:10 final dilution) were added. After 2 h incubation at 37°C and three washings, plates were incubated with ¹²⁵I-labeled IgG2a or IgG2c for 1 h at 37°C, and overnight at 4°C, and the plates were then washed three times.

The crossinhibition between the Ig fractions purified from human sera by FPLC system was performed as described above. Wells precoated with schistosomulum NP-40 extract were preincubated with unlabeled IgM or IgG fraction for 2 h at 37°C. After three washings, plates were incubated with the homologous human ¹²⁵I-IgG or -IgM fraction (labeled by the chloramine T method; 1 µg/µCi) (23). After 1 h at 37°C and overnight at 4°C, the plates were washed three times. In all experiments, the wells were counted in a gamma counter. Percent inhibition of binding was calculated as [100 × (cpm without inhibitor) – (cpm in the presence of inhibitor)]/(cpm without inhibitor)].

Determination of IgM Antibodies. A double-sandwich ELISA was used to detect IgM antibodies against the 38,000 M_r antigen (24). Microtiter plates coated with anti-human IgM antibodies (Institut Pasteur Production, Marnes La Coquette, France) were washed with saline/0.4% Tween and incubated for 3 h at room temperature with 200 µl of serum diluted in PBS. After three washings, captured human IgM was incubated with 200 µl schistosomulum NP-40 extract (100 µg/ml) overnight at 4°C. The wells were then washed with saline/Tween and incubated for 3 h at 4°C with 200 µl of β galactosidase-conjugated IgG2a mAb. Substrate containing 0.014 M 2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (Merck, Darmstadt, Federal Republic of Germany), 0.003 M MgCl₂, and 0.1 M 2-ME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added to the test wells after a wash step, and the plates were incubated for 1 h at 45°C. The reaction was stopped by adding 500 µl of 1 M Na₂CO₃, and the absorbance was measured at 405 nm using a Titertek Multiskan (Flow Laboratories, McLean, VA). Each test was assessed in duplicate. Results are expressed as mean absorbance values at 405 nm.

Statistical Comparisons. The statistical significance of differences between means were analyzed by using Student's *t* test.

Results

Characterization of Antibodies Binding to Schistosomula. Intense membrane fluorescence with FITC-anti-human IgG (Fig. 2A) or with FITC-anti-human IgM (Fig. 2B) was observed after incubation of schistosomulum sections with total serum from infected patients ($n = 53$; final dilution, 1:50). Occasional and weak fluorescence was seen with FITC-anti-human IgA (final dilution, 1:5). Identical fluorescence patterns persisted in the presence of the corresponding IgG or IgM antibodies fractionated on PAS or FPLC system. No crossreaction was observed between the purified fractions throughout the course of experiments. Control sections incubated with human normal serum or with Ig fractions purified from normal serum showed no reactivity either with FITC-anti-human IgG or with FITC-anti-human IgM.

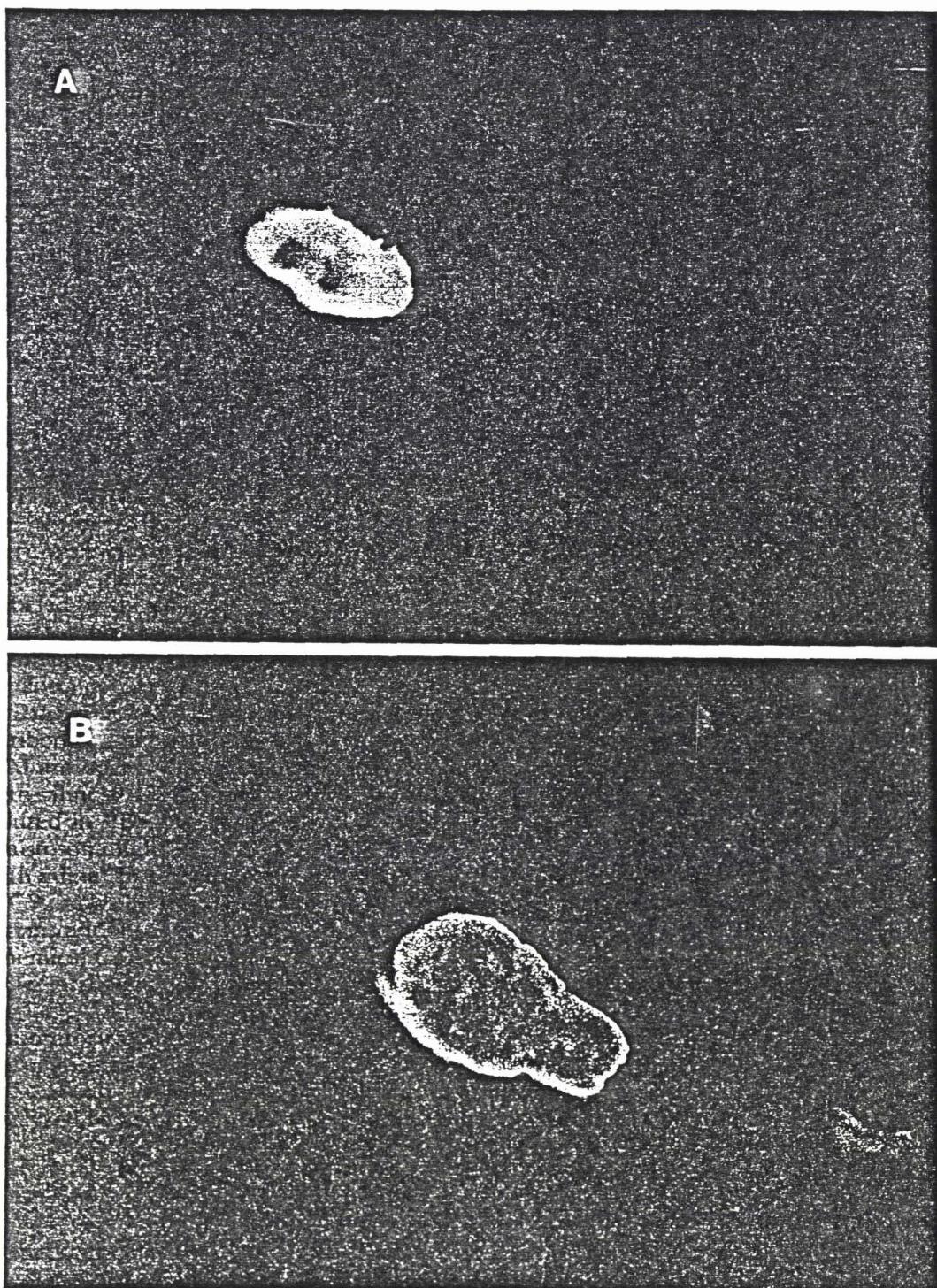


FIGURE 2. Localization of the antigenic sites recognized by total serum and Ig fractions. (A) indirect fluorescence on sections of *S. mansoni* schistosomula incubated with total serum and revealed by FITC-anti-human IgG. (B) same as A using FITC-anti-human IgM.

Antibodies Mediating Eosinophil-dependent Killing of Schistosomulum. To determine the antibody isotype required in the cytotoxicity assay, 20 infected sera and 6 uninfected sera were fractionated either by absorption on PAS or by Ig separation on chromatography column (FPLC system). Each fraction was con-

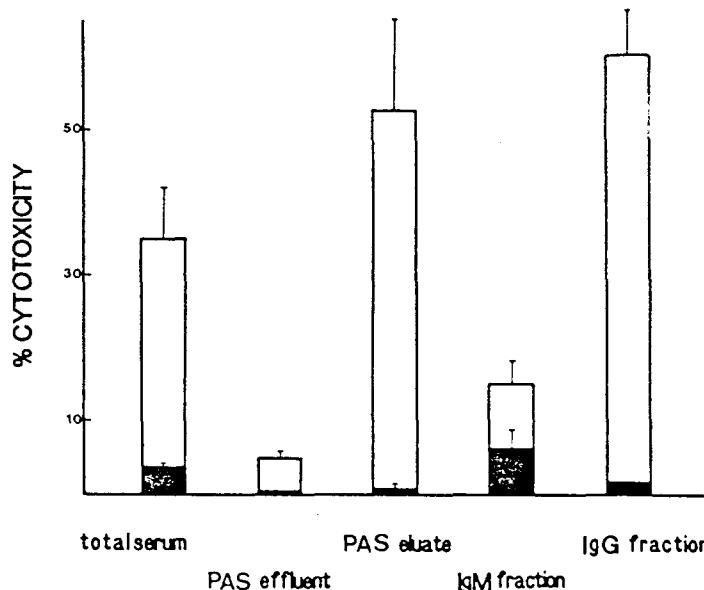


FIGURE 3. Eosinophil-dependent killing of *S. mansoni* schistosomula by various fractions of immune sera. The percentage of cytotoxicity was evaluated after 48 h of contact with eosinophils. Sera or fractions obtained by PAS or FPLC separation (1:20, final dilution) were heat inactivated for 2 h at 56°C. Open bars, immune serum; filled bars, normal serum (mean of six experiments \pm SD).

trolled by indirect fluorescence assay and tested for their capacity to mediate eosinophil-dependent killing of parasite larvae (Fig. 3). Detectable levels of cytotoxicity were observed when *S. mansoni* schistosomula were incubated with eosinophils purified from individuals with moderate eosinophilia in the presence of heat-inactivated total immune sera. When the serum was fractionated, the cytotoxic activity was detected in the IgG-containing fractions (PAS eluate fraction or purified IgG fraction). Moreover, the IgG fractions produced significantly higher levels of cytotoxicity than the total sera, when tested in the same conditions ($p < 0.01$). Apart from some direct toxicity (<5%), no cytotoxic effect was observed either in the presence of PAS effluent fractions or with IgM fraction purified by FPLC. The control Ig fractions from normal serum did not lead to any significant killing activity.

Inhibitory Activity of IgM Antibodies. Since IgM antibodies were able to bind to target surface, it was interesting to study their activity in eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IgG antibodies. *S. mansoni* schistosomula were preincubated with various dilutions of PAS effluents for 2 h at 37°C. After two washings, total immune sera or PAS eluates and eosinophils were added. The percentage of cytotoxicity was compared to the killing activity induced by total immune serum or by PAS eluate fraction after preincubation of schistosomula with medium. As shown in Table I, preincubation of schistosomula with PAS effluents of immune sera markedly inhibited the IgG-dependent cytotoxicity mediated by total immune serum or PAS eluates in a dose-dependent manner ($p < 0.01$). To rule out a possible nonspecific inhibition, schistosomula were preincubated with PAS effluents of normal serum. Results presented in Table I showed no inhibitory effect after the addition of total immune serum. Preincu-

TABLE I
*Inhibitory Role of IgM-containing PAS Effluents on IgG-dependent Cytotoxicity
 by Human Eosinophils*

Preincubation (2 h at 37°C)	Incubation (final dilution)	Percent cytotoxicity
Medium	Total normal serum	2.7 ± 0.0
Medium	Total immune serum (1:20)	36.5 ± 10.0
Medium	PAS effluent* immune serum (1:20)	4.9 ± 0.6
Medium	PAS eluate† immune serum (1:20)	45.5 ± 9.9
PAS effluent immune serum (1:10)	Total immune serum (1:20)	8.2 ± 3.9
PAS effluent immune serum (1:30)	Total immune serum (1:20)	20.4 ± 4.6
PAS effluent immune serum (1:10)	PAS eluate immune serum (1:20)	11.1 ± 1.5
PAS effluent normal serum (1:10)	Total immune serum (1:20)	30 ± 5.2
PAS effluent immune serum (1:10)‡	Total immune serum (1:20)	35.7 ± 6.5

Schistosomula were preincubated for 2 h at 37°C and washed twice with medium. The homologous serum or fractions were then added. Percent cytotoxicity was measured after 48 h contact with eosinophils (mean ± SD of seven experiments).

* PAS effluent represents the unbound fraction to PAS.

† PAS eluate represents the bound fraction to PAS eluted with glycine (1 M).

‡ Eosinophils were preincubated with PAS effluent and then washed with medium.

bation of eosinophils instead of target incubation with PAS effluents of immune serum did not affect the killing activity of total immune serum.

Antibody Response to Schistosomula Surface Antigens. The target specificity of IgG and IgM antibodies was determined. Immunoprecipitation of ¹²⁵I-labeled schistosomulum antigens from infected human serum using protein A-binding antibodies (IgG antibodies) revealed 30,000–40,000 M_r antigens (100% of sera tested; $n = 17$) (Fig. 4). However, additional bands in the 20,000–25,000 M_r range were revealed (66% of sera tested). Occasional faint bands were also detected in the upper region of the gel (>67,000) (41% of sera tested). Surface antigens precipitated by IgM antibodies from infected human serum ranged from 30,000 to 40,000 M_r (100% of sera tested) and also between 20,000 and 25,000 M_r (20% of sera tested). However, the predominant IgM antibody response was against the 32,000 M_r antigen. Adsorption experiments, in which the detergent extract was previously adsorbed by protein A-binding IgG antibodies demonstrated a crossinhibition at the level of the whole antigen between IgG and IgM antibodies (Fig. 4, lane 5).

Epitopes Recognized by IgG and IgM Antibodies. To investigate the respective epitopes recognized by IgG and IgM antibodies, we used an RIA in which the capacity of IgG and IgM fractions to inhibit antigen binding of two rat mAbs (IgG2a and IgG2c) was tested. These mAbs (IPLSm1 and IPLSm3) recognize the 38,000 M_r antigen. This antigen was bound to plates by the use of a different rat mAb (C3-109) that does not interfere with the binding of either IPLSm1 or IPLSm3. Preincubation of wells precoated with schistosomulum antigen in the presence of IgG or IgM fractions of infected serum inhibited both the binding of ¹²⁵I-labeled IgG2a and IgG2c (Table II). In the same conditions, total serum led to an twofold inhibition, when compared with the inhibition induced either by the IgG or by the IgM fractions. The specificity of the epitopes recognized by IgG and IgM antibodies in infected serum was tested by crossinhibition

NORMAL INFECTED

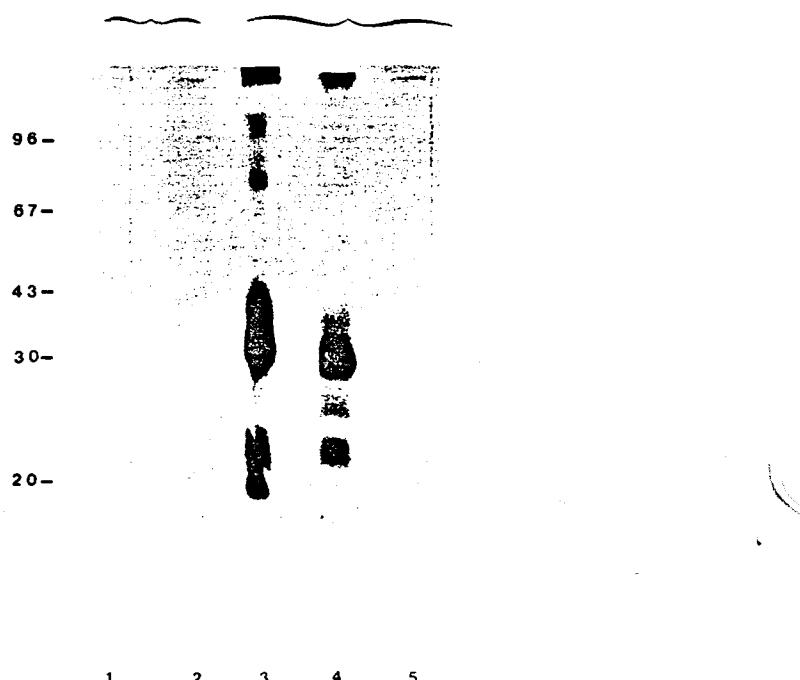


FIGURE 4. Immunoprecipitation of schistosomulum surface antigens by immune sera. Detergent extracts of 500 labeled skin schistosomula were incubated with 10 μ l of total serum or 100 μ l of PAS effluent fraction. Immune complexes of total serum were absorbed on PAS and were analyzed, in lanes 1 and 3. Protein A-unbound material from lane 3 was further incubated with PAS effluent fraction, and immune complexes were analyzed in lane 5. The immune complexes of PAS effluent fraction were absorbed on PAS previously sensitized with 10 μ l (1 mg/ml) of anti-human IgM (lanes 2, 4, and 5).

TABLE II
Inhibition of Binding to Schistosomulum Antigen of Two Rat mAbs
Directed against the 38,000 M_r Antigen

Preincubation	Percent inhibition		n [‡]
	Labeled IgG2a*	Labeled IgG2c*	
IgG fraction [§]	30 \pm 2.0	38 \pm 5.7	17
IgM fraction [§]	23 \pm 1.9	33 \pm 3.7	17
Total serum	55.8 \pm 2.9	54.6 \pm 4.1	17

Plates precoated with antigen were preincubated with IgG, IgM fraction, or total serum from infected patients (1:10 final dilution) for 2 h at 37°C. Percent inhibition was calculated as described in Materials and Methods (mean \pm SD). Inhibition by Ig fraction of normal serum or total normal serum has been subtracted.

* Purified anti-*S. mansoni* IgG2a and IgG2c mAbs were labeled by ¹²⁵I by the chloramine T method.

† Number of sera tested.

§ IgG and IgM fractions were obtained from total serum by fractionation with an FPLC system.

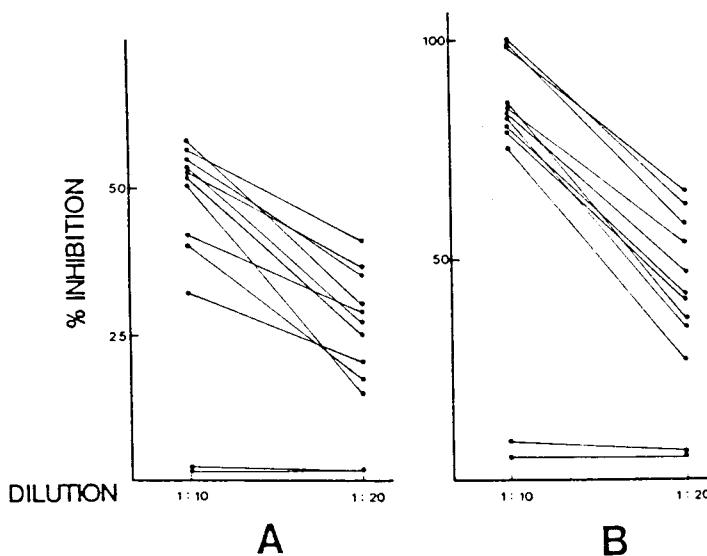


FIGURE 5. Crossinhibition of binding to antigen of IgG and IgM fractions from immune sera. Schistosomulum antigen bound to plates by using a rat mAb (C3-109) were preincubated with IgG fraction (*A*) or with IgM fraction (*B*). After 2 h of contact and three washes, homologous labeled IgM or IgG were added to *A* and *B*, respectively, and incubated for 1 h at 37°C and overnight at 4°C. Results are presented as percent inhibition (see Material and Methods) (mean of duplicate \pm SD). Dots represent the inhibition between the Ig fractions of immune sera; stars represent the inhibition of Ig fractions of infected sera by Ig fractions of normal sera.

experiments. As shown in Fig. 5*A*, the preincubation of antigen-coated plates in the presence of IgG fraction inhibited the binding of homologous ^{125}I -labeled IgM antibodies. In the same conditions, higher levels of inhibition were obtained when unlabeled IgM antibodies were preincubated before labeled IgG (Fig. 5*B*), suggesting higher avidity for the targets.

Role of These IgM Antibodies in Immunity to Reinfection. The biological relevance of such IgM blocking antibodies was assessed by the evaluation of anti-38,000 IgM antibodies in the sera from individuals classified as resistant or susceptible to reinfection using previously defined criteria (16). Such antibodies were measured in an IgM capture assay (see Materials and Methods) in order to avoid competition with the IgG antibodies. Results presented in Table III showed that the mean levels of IgM antibodies in susceptible individuals were significantly higher than those present in resistant subjects in the pretreatment and 12-mo serum samples, but did not differ significantly at 5 wk after treatment. For the susceptible population (defined previously [16] as those individuals having >100 eggs per gram of feces) there was a positive association between the level of IgM antibodies in the pretreatment blood sample and the number of eggs at 12 mo after treatment. In addition, there was a positive association at any given time between IgM antibody levels and the actual egg counts at that time.

Discussion

The numerous studies concerning the effector mechanisms directed against *S. mansoni* schistosomula have shown that eosinophils can act as killer cells in the presence of specific antibodies (1, 2). The factors directly involved in such

TABLE III

Relationship between Presence of IgM Antibodies against the 38,000 Schistosomulum Surface Antigen and Status of Immunity to Reinfection

Blood sample	Before treatment	After treatment	
		5 wk	12 mo
Susceptible			
Optical density eggs per gram	1.5 ± 0.09* (19) 206	0.97 ± 0.12† (21) 7	1.38 ± 0.11§ (21) 133
Resistant			
Optical density eggs per gram	1.19 ± 0.1* (34) 110	0.72 ± 0.1† (24) 0	0.77 ± 0.07§ (32) 8

Sera were selected from susceptible and resistant individuals using previously defined criteria. IgM antibodies were measured by a capture assay (see Materials and Methods). Preliminary studies, in which varying concentrations of the serum (1:100–1:12,800) were used, indicated that a final dilution of 1:6,400 would be the highest dilution to which the normal and immune serum showed a significant difference. Results are presented as mean ± SEM. Number of sera used is shown in parentheses. Egg counts were calculated by examination of duplicate Kato preparations (geometric mean).

* $p < 0.01$ between the two groups.

† $p > 0.05$ between the two groups.

§ $p < 0.001$ between the two groups.

mechanisms include IgG and IgE antibodies (5, 7). However, in previous epidemiological studies (16) of human immunity to schistosome infection, comparison of the levels of IgG and IgE antischistosomulum antibodies between two groups classified as resistant and susceptible to reinfection, respectively, showed no significant difference. The demonstration in experimental models that defined antibody isotypes might block the expression of immunity prompted us to investigate the presence of such blocking antibodies leading to prevention of a given effector mechanism during human schistosomiasis.

Evidence from fluorescence studies on schistosomulum sections indicated the presence of IgG and IgM antibodies specifically directed against the schistosomulum surface in sera from infected patients. As previously reported (7), in vitro studies of the effector function of heat-inactivated immune serum revealed significant levels of eosinophil-dependent cytotoxicity against *S. mansoni* schistosomula. In the same conditions, when serum samples were fractionated and tested for their killing capacity, it was found that the activity was associated with IgG antibodies eluted from protein A, whereas no cytotoxic activity was detected in the PAS effluent preparation of IgM antibodies. Comparable results have been obtained with IgG and IgM antibodies fractionated by FPLC. Moreover, the IgG fraction produced significantly higher levels of cytotoxicity than total immune serum. These results confirm a previous report (7) in which the authors demonstrated the involvement of IgG antibodies. They suggest, in addition, that the depletion of some inhibitory factor not retained on protein A led to an increase in IgG-mediated killing.

The experiments showing that IgM-containing fractions were unable to exhibit any antiparasite killing activity in the presence of eosinophils, together with the demonstration (11) of blocking antibodies in rat experimental schistosomiasis,

1636 IgM BLOCKING ANTIBODIES IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS

led us to investigate the possible inhibitory role of IgM antibodies in eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IgG antibodies. Preincubation of schistosomula with PAS effluents or IgM-containing fractions of immune serum strongly inhibited the cytotoxicity mediated by total immune serum or PAS eluate fractions (IgG antibodies). The absence of inhibition with IgM purified from normal serum confirmed that the blocking effect was related to the antiparasite antibody specificity of IgM. In contrast, these IgM antibodies were unable to inhibit the killing capacity dependent upon specific IgE anti-*S. mansoni* antibodies and eosinophils (data not shown). The interpretation of these observations is that IgM blocking antibodies were crossreactive with the same target antigen as IgG antibodies, and that IgE antibodies were directed against another antigen, as previously described in rat schistosomiasis (25). In this context, previous studies (26) reported in human schistosomiasis showed the presence of blocking antibodies of IgG isotypes able to inhibit the histamine release induced by IgE-sensitized basophils. It was interesting to note that several investigations (27, 28) have demonstrated the presence of such blocking antibodies (IgG and IgA isotypes) in malignant diseases. More recently, in rat experimental schistosomiasis, it was shown (11, 12) that blocking antibodies (IgG2c) inhibited the IgG2a-dependent eosinophil activation and cytotoxicity at the level both of the target antigen and of the eosinophil Fc receptor. The present data showed that the preincubation of eosinophils with blocking IgM antibodies did not inhibit the cytotoxic effect of IgG antibodies, suggesting no crossinhibition between IgG and IgM antibodies at the Fc receptor level.

This consideration prompted us to examine the antigens recognized by IgG and IgM antibodies. The predominant surface antigens precipitated by protein A-binding IgG and by IgM antibodies in infected human sera ranged between 30,000 and 40,000 M_r , with additional major bands at 20,000–25,000 M_r . The antigens precipitated by the IgM antibodies could be removed by prior adsorption with protein A-binding IgG antibodies. In addition, competition between IgM and IgG antibodies to one of the major antigens, of 38,000 M_r , could be directly demonstrated. The 32,000–38,000 M_r complex represents a cluster of related antigens (29) and the preferential binding of IgM to the 32,000 M_r antigen, in comparison with IgG, suggested the recognition of a nonidentical family of epitopes on the 32,000–38,000 M_r complex.

To identify in more detail some of the epitopes recognized by IgG and IgM antibodies, respectively, we used two previously-described rat mAbs, IPLSm1 (a protective IgG2a antibody), and IPLSm3 (a blocking IgG2c antibody). Both of these antibodies recognize carbohydrate epitopes on the 38,000 M_r major surface antigen, and show crossinhibition of binding. In addition, the IPLSm3 mAb that recognizes the 32,000 and 20,000 M_r molecules (11), suggesting either that they recognize structurally-related but not identical epitopes on the 38,000 M_r molecule, or that they compete sterically. The binding of both IPLSm1 and IPLSm3 to the 38,000 M_r molecule could be inhibited by both IgG and IgM fractions of human infected sera.

These findings indicate that the families of IgM and IgG antibodies in human infected sera that have specificity to schistosomulum surface antigens include antibodies with specificity to the major 38,000 M_r antigen. Such antibodies may

compete with each other, either by direct competition for the same or structurally-related epitopes, or by a steric inhibition of binding.

Our results revealed the existence, among the various antibodies specifically directed against schistosomula surface in infected human sera, of two particularly interesting antibodies. The first was of IgG isotype, and was able to induce the killing of *S. mansoni* schistosomula in the presence of human eosinophils; the second was of IgM isotype, and showed no cytotoxic effect, but demonstrated an effective inhibition of eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IgG antibodies. In the context of the *in vivo* relevance of such findings we wanted to know whether the presence of IgM antibodies could be used as a marker of reinfection intensities to *S. mansoni*. We performed a capture assay to measure, in human infected sera, the presence of IgM antibodies specific of the epitope present on the 38,000 M_r antigen, as evaluated by using a second arm with IgG2a mAbs. Results revealed that the mean level of IgM antibodies in individuals classified as susceptible were significantly higher than those present in the resistant individuals; there was a positive association between the level of IgM antibodies in the pretreatment and the number of eggs counted in the susceptible group at 12 mo after treatment, suggesting that such IgM might be related to subsequent reinfection. The positive association between IgM levels and egg counts at any given time suggested, first, that these IgM antibodies may be associated with antiegg responses, and second, that they fluctuate rapidly with time (16). These results suggest that the production of blocking IgM antibodies could be induced by the same epitope expressed on schistosomula and eggs. Further statistical analysis (Butterworth et al.)¹ supported this hypothesis.

In conclusion, although our evidence is derived from *in vitro* studies, these findings indicate that susceptibility to reinfection after treatment of *S. mansoni* infections in man might be explained in part by the presence of schistosomulum-specific IgM blocking antibodies. In addition, they suggest indirectly a major role played by the effector IgG antibodies directed against the M_r 38,000 antigen. The fact that these antibodies are a necessary but not limiting factor in immunity, and the presence of blocking antibodies support the hypothesis that the acquisition of immunity might reflect the loss of a blocking response, rather than the acquisition of an effector response. However, besides IgM antibodies, statistical studies (Butterworth et al.)¹ raise the possibility that another antibody isotype may block the protective response. The availability of this type of information would be of considerable importance in defining the nature of a vaccine capable of inducing the production of both effector and blocking antibodies. However, another approach to explain the prevention of immunity may involve idiotypic regulation, whereby the protective antibodies may be blocked by antibodies directed against the antigen-specific combining sites of effector antibodies (*i.e.*, antiidiotype antibodies). Experiments are now under way to test this hypothesis.

Summary

After the demonstration of blocking antibodies during rat experimental schistosomiasis, the existence of such factors was investigated in human schistosomiasis. The depletion, in sera from *S. mansoni*-infected patients, of a given isotype (IgM) either by protein A-Sepharose (PAS) absorption or by fast protein liquid

1638 IgM BLOCKING ANTIBODIES IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS

chromatography (FPLC) induced a significant increase in IgG-mediated killing of *S. mansoni* schistosomula by human eosinophils. Inhibition experiments showed that IgM-enriched fractions (PAS effluents) were able to inhibit eosinophil-dependent cytotoxicity mediated by IgG fractions (total sera or PAS eluates). Both IgG and IgM antibodies from infected human sera immunoprecipitated antigens of 30,000–40,000 M_r in the labeled detergent extracts of schistosomulum surface. The specificity of IgG and IgM for the 38,000 M_r antigen was suggested by competition experiments using two radiolabeled mAbs (IPLSm1, IPLSm3) directed against this antigen. Moreover, crossinhibition between IgG and IgM antibodies for the M_r 38,000 antigen could be directly demonstrated. The in vivo relevance of such IgM blocking antibodies in the context of human immunity to schistosomiasis was evaluated in two groups of children classified as resistant or susceptible to posttreatment reinfection. IgM antibodies specifically directed against the 38,000 M_r antigen were measured by a capture assay. The mean levels of IgM antibodies were significantly higher in the susceptible than in the resistant group both before and after treatment. These results are consistent with the idea that immunity to schistosomiasis could be attributable not only to the existence of antibodies with defined effector function, but also to the absence of blocking antibodies. The description of the existence in human schistosomiasis of antibody isotypes blocking the effector response against defined surface targets might lead to a new understanding of the mechanisms regulating immunity to reinfection against schistosomes and possibly other parasites.

We thank Prof. A. B. Tonnel, Dr. H. Taelman, Dr. L. Prin for access to eosinophilic patients, and Drs. H. C. Kariuki, D. Koech, M. Mugambi, and T. K. arap Siongok (Kenya). We are grateful to A. Caron, J. P. Papin, S. Torrès and G. Marchandise for their expert technical assistance. The secretarial assistance of C. Colson and M. F. Massard was appreciated.

Received for publication 13 June 1986.

References

1. Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, and G. Torpier. 1982. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. *Immunol. Rev.* 61:41.
2. Butterworth, A. E., D. W. Taylor, M. C. Veith, M. A. Vadas, A. Dessein, R. F. Sturrock, and E. Wells. 1982. Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 61:5.
3. Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, and H. Bazin. 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature (Lond.)*. 253:44.
4. Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba, and A. A. F. Mahmoud. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature (Lond.)*. 256:727.
5. Capron, M., H. L. Spiegelberg, L. Prin, H. Bennich, A. E. Butterworth, R. J. Pierce, M. A. Ouaissi, and A. Capron. 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* 132:462.
6. Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomes. *Nature (Lond.)*. 303:810.
7. Butterworth, A. E., G. H. Remold, V. Houba, J. R. David, D. Franks, P. H. David,

- and R. F. Sturrock. 1977. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: Mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 6:2230.
8. Capron, M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout, and M. Jospeh. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8:127.
 9. Capron, M., H. Bazin, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:1764.
 10. Capron, M., G. Torpier, and A. Capron. 1979. In vitro killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.* 123:2220.
 11. Grzych, J. M., M. Capron, C. Dissous, and A. Capron. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133:998.
 12. Khalife, J., M. Capron, J. M. Grzych, H. Bazin, and A. Capron. 1985. Fc receptors on rat eosinophils: Isotype-dependent cell activation. *J. Immunol.* 135: 2780-2784.
 13. Grzych, J. M., M. Capron, H. Bazin, and A. Capron. 1982. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129:2739.
 14. Capron, A., M. Capron, M. Joseph, C. Dissous, and C. Auriault. 1983. Vaccination against schistosomiasis: Dream or reality? In New approaches to vaccine development. Rosemary Bell and G. Torrigiani, editors. Schwabe and Co. AG. Basel, Switzerland. 460-475.
 15. Butterworth, A. E., P. R. Dalton, D. W. Dunne, M. Mugambi, J. H. Ouma, B. A. Richardson, T. K. arap Siongok, and R. F. Sturrock. 1984. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Sturdy design, pretreatment observations and the results of treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78:108.
 16. Butterworth, A. E., M. Capron, J. S. Cordingley, P. R. Dalton, D. W. Dunne, H. C. Kariuki, D. Koech, M. Mugambi, J. H. Ouma, M. A. Prentice, B. A. Richardson, T. K. arap Siongok, R. F. Sturrock, and D. W. 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.
 17. Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Int. J. Parasitol.* 2:79.
 18. Lindmark, R., T. T. Kerstin, and J. Sjöquist. 1983. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J. Immunol. Methods.* 62:1.
 19. Sampson, I. A., A. N. Hodgen, and I. H. Arthur. 1984. The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography. *J. Immunol. Methods.* 69:9.
 20. Marchalonis J. J., R. E. Cone, and V. Santer. 1971. Enzymatic iodination: a probe for accessible surface proteins on normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124:921.
 21. Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
 22. Grzych, J. M., M. Capron, P. H. Lambert, C. Dissous, S. Torres, and A. Capron. 1985. An anti-idiotype vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature (Lond.)*. 316:74.
 23. Hunter, W. M., and F. C. Greenwood. 1962. Preparation of iodine 131-labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond.)*. 194:495.
 24. Cesbron, J. Y., A. Capron, G. Ovlaque, and F. Santoro. 1985. Use of monoclonal

1640 IgM BLOCKING ANTIBODIES IN HUMAN SCHISTOSOMIASIS

- antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). *J. Immunol. Methods.* 83:151.
- 25. Auriault, C., M. Damonneville, C. Verwaerde, R. Pierce, M. Joseph, M. Capron, and A. Capron. 1984. Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro. *Eur. J. Immunol.* 14:132.
 - 26. Hofstetter, M., R. W. Poindexter, E. Ruiz-Tiben, and E. A. Ottesen. 1982. Modulation of the host response in human schistosomiasis. III. Blocking antibodies specifically inhibit immediate hypersensitivity responses to parasite antigens. *Immunology.* 46:777.
 - 27. Steele, J.R., J. Amkerst, H. O. Sjögren, H. Vang, and O. Lannerstad. 1975. Absorption of blocking activity from human tumor-bearer sera by *Staphylococcus aureus* Cowan I. *Int. J. Cancer.* 15:180.
 - 28. Mathew, G. D., L. F. Qualtierre, H. B. Neel, and G. R. Pearson. 1980. IgA antibody, antibody-dependent cellular cytotoxicity and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 27:175.
 - 29. Dissous, C., J. M. Grzych, and A. Capron. 1985. Biochemical studies on the 30-40 kDa *Schistosoma mansoni* surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:277.

**ARTICLE F: APPROCHE IDIOTYPIQUE DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE
DE L'ANTIGENE 38 KDA DU SCHISTOSOMULE.**

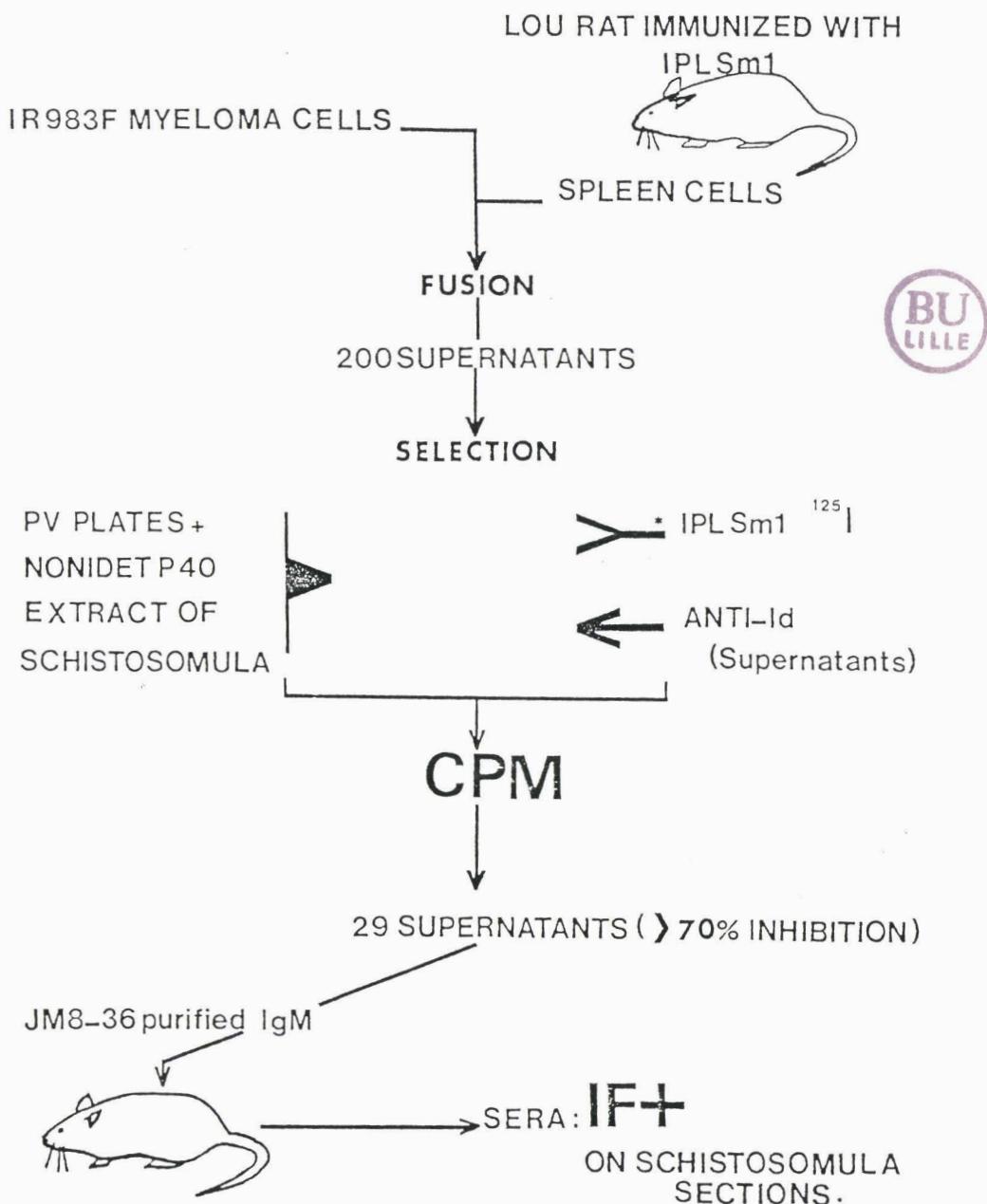
L'antigène 38 kDa pose, par sa nature glycoprotéique, des réserves sur la possibilité de sa traduction *in vitro* dans les modèles couramment utilisés. D'autre part, l'induction par la même molécule d'anticorps effecteurs et bloquants limite considérablement son intérêt dans l'établissement possible d'une immunité.

Ces résultats nous ont conduits à modifier notre approche initiale, qui consistait après la phase de caractérisation des antigènes potentiellement protecteurs à envisager leur traduction grâce aux techniques du clonage moléculaire, et donc à choisir l'alternative anti-idiotypique qui nous permettait de construire à partir d'un épitope glycanique son image interne protéique.

La production des anticorps anti-idiotypiques contre l'anticorps monoclonal IPL Sm1 a été envisagée dans un système d'hybridation homologue RAT X RAT (Figure 17).

Parmi les 29 anticorps monoclonaux sélectionnés sur la base de leur capacité à inhiber la fixation de l'anticorps IPL Sm1 à son antigène cible, un anticorps monoclonal d'isotype IgM a fait l'objet d'investigations plus approfondies qui sont à l'origine des observations suivantes :

- 1) L'injection de l'anticorps JM8-36 (Ab2) chez le rat induit la production d'anticorps Ab3 inhibant la fixation de l'anticorps IPL Sm1 (Ab1) à son antigène cible GP 38 kDa.
- 2) Ces anticorps Ab3 sont spécifiques du Schistosome et induisent une intense fluorescence à la surface du schistosomule.

FIGURE 17:-PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-IDIOTYPIQUES-

- 3) Les sérums des animaux immunisés par l'anticorps JM8-36 sont cytotoxiques pour le schistosomule en présence d'éosinophiles de rat sain, reproduisant ainsi les propriétés déjà décrites pour les sérums d'infection ou l'anticorps IPL Sm1 et transfèrent passivement un niveau de protection comparable à celui obtenu dans le cas de l'anticorps IPL Sm1.
- 4) Les animaux immunisés par l'anticorps JM8-36 se trouvent significativement protégés (50 à 75%) vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve.

Les propriétés exprimées par l'anticorps monoclonal JM8-36 et plus particulièrement celles liées à l'induction chez un animal naïf de certains paramètres de l'infection par *S.mansoni*, laissent supposer que cet anticorps porte l'image interne de l'épitope défini par l'anticorps IPL Sm1 sur l'antigène 38 kDa.

ARTICLE F

Reprinted from Nature, Vol. 316, No. 6023, pp. 74-76, 4 July 1985
 © Macmillan Journals Ltd., 1985

An anti-idiotype vaccine against experimental schistosomiasis

J. M. Grzych, M. Capron, P. H. Lambert*,
 C. Dissous, S. Torres & A. Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte
 INSERM U 167-CNRS 624, Institut Pasteur, BP 245,
 59019 Lille Cedex, France

* Centre OMS de Recherche et de Formation en Immunologie,
 Département de Pathologie CMV, 1211 Genève 4, Switzerland

Schistosomiasis is a parasitic infection of man which is widespread in tropical countries, and which so far has resisted attempts at control. We have been approaching the problem from an immunological angle. We have previously reported¹ the production of a rat monoclonal IgG2a antibody against *Schistosoma mansoni* which exhibits marked cytotoxicity for schistosomula in the presence of eosinophils and a high degree of protection by passive transfer in naive rats. This antibody, IPLSm1, was shown to bind specifically to a schistosomulum membrane target antigen defined as a glycoprotein of relative molecular mass 38,000 (38K)², which is strongly immunogenic in schistosome infection of various animal species including man³. Although theoretically the 38K protein represents an excellent candidate for a potential vaccine against schistosomiasis, the glycanic nature of the epitope recognized by

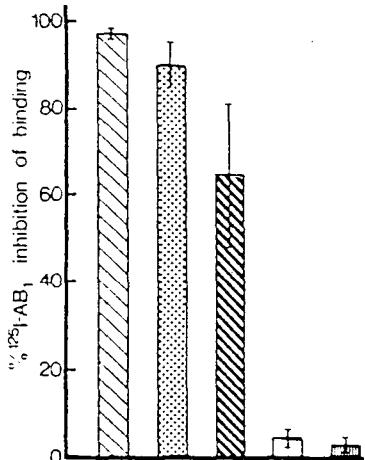


Fig. 1 Inhibition of radiolabelled AB₁ antibody (IPLSm1 IgG2a antibody) to the 38K antigen. Experiments were performed on PVC microtitre plates precoated with C₃-109 IgM antibody (an *S. mansoni* rat monoclonal antibody which recognizes the 38K molecule but does not interfere with IPLSm1 binding). Each well of the PVC plates was coated with 100 μl of a 10 μg ml⁻¹ solution of C₃-109 IgM diluted with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), a procedure which gives better fixation of the 38K antigen. After 2 h, the plates were washed twice in PBS buffer and saturated for 30 min with 200 μl of a 2% bovine serum albumin (BSA) solution in PBS. The plates were then washed twice in PBS-0.1% BSA. A Nonidet P-40 extract of schistosomula was added (100 μl antigen solution containing 100 μg of protein). After 2 h exposure at 37 °C, plates were washed twice in PBS-0.1% BSA buffer. For the test, 50 μl of ¹²⁵I-labelled IPLSm1 IgG2a was incubated with 50 μl of sera at a dilution of 1/25 in PBS-0.1% BSA buffer for 1 h at 37 °C and for 16 h at 4 °C and the plates were then washed three times in PBS-0.1% BSA buffer. The wells were counted in a γ-counter. The percentage of IPLSm1 inhibition binding was calculated using the following formula: $a - b/a \times 100 = \% \text{ of inhibition}$, where $a = \text{c.p.m. obtained when } ^{125}\text{I-AB}_1 \text{ was incubated with } 50 \mu\text{l of PBS-0.1\% BSA buffer}$, and $b = \text{c.p.m. obtained when } ^{125}\text{I-AB}_1 \text{ was incubated with } 50 \mu\text{l serum from a rat bearing a subcutaneous IPLSm1 hybridoma (JM8-36)}$, $50 \mu\text{l serum from a rat immunized with AB}_2$ (JM8-36), $50 \mu\text{l serum from a rat immunized with normal IgM (white)}$, $50 \mu\text{l serum from a 4-week-infected rat (hatched)}$ or $50 \mu\text{l of normal rat serum (solid black)}$ (mean of five duplicate experiments ± s.d.).

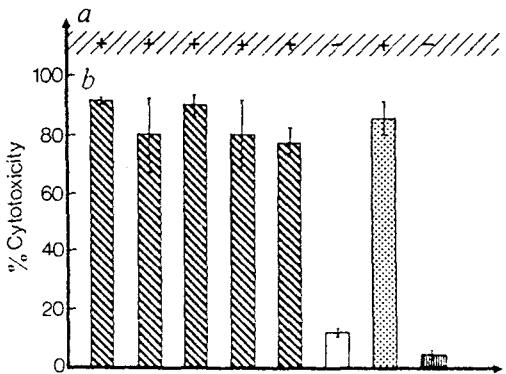


Fig. 2 Humoral response to AB₂ immunization. *a*, Immunofluorescence tests; *b*, eosinophil-dependent cytotoxicity. Indirect immunofluorescence tests were performed¹ on deep-frozen sections of schistosomula (8 μm). *S. mansoni* schistosomula were prepared by penetration of cercariae through abdominal mouse skin. Sera (tested at a dilution of 1/20 in 10 mM PBS) were collected from LOU/M rats immunized by JM8-36 (AB₂) antibody (hatched) purified from ascitic fluid as described previously¹². A 1-mg aliquot of the purified preparation in physiological saline was injected subcutaneously at 2-week intervals. Control sera were obtained from rats injected in the same conditions with the IgM fraction of normal rat serum (white). Eosinophil-dependent cytotoxicity was measured after 48 h contact of skin schistosomula, preincubated overnight with the sera at a final dilution of 1/16, with a rat eosinophil-rich population (40–60% eosinophils). The percentage cytotoxicity was compared at equivalent dilutions with control sera, normal rat serum (white) or serum from rats infected for 4 weeks with *S. mansoni* (hatched). All results correspond to a mean of two duplicate experiments ± s.d.

IPLSm1 limits its production by DNA recombinant technology. It was, moreover, shown that, together with protective antibodies, the 38K molecule was able to induce the production of blocking IgG2c antibodies that inhibit the functional properties of IPLSm1 both *in vitro* and *in vivo*⁴. Therefore, following Jerne's network theory⁵, we considered an alternative approach, the possibility of immunization using anti-idiotype antibodies. In the present study, rat monoclonal anti-idiotype antibodies were produced against IPLSm1 (AB₁). Anti-idiotype antibodies (AB₂) were selected by their capacity to inhibit the binding of radioiodinated AB₁ to its 38K target antigen. Sera from naive LOU rats immunized with a purified AB₂ preparation contained specific anti-schistosome antibodies (AB₃) which bound to 38K. AB₃ antibodies were strongly cytotoxic for schistosomula in the presence of rat eosinophils and conferred highly significant protection by passive transfer. Most importantly, rats immunized with AB₂ demonstrated marked protection (50–80%) to a challenge infection.

Monoclonal antibodies to IPLSm1 were obtained in a homologous hybridization system. Male LOU rats were injected subcutaneously with 1 mg of purified IPLSm1 plus 1 mg of glutaraldehyde-aggregated human IgG in the presence of complete Freund's adjuvant. Two weeks later, the rats received a second injection of the same preparation. The immunization was completed by two subcutaneous injections of 1 mg of IPLSm1 and 1 mg of aggregated human IgG in incomplete Freund's adjuvant at 2-week intervals. The Ouchterlony test was used to select rats showing the highest responses and spleen cells from these animals were fused with cells from the IR983F rat myeloma cell line⁶ as described previously¹. The hybrid cell supernatants were screened for their ability to inhibit the binding of ¹²⁵I-labelled IPLSm1 to the 38K target antigen coated on a polyvinyl chloride (PVC) plate. From 200 hybrid cell supernatants obtained from two successive cell fusion experiments, we selected 29 supernatants inducing significant levels of inhibition (>70%).

Analysis of the immunological components of these hybrid

cell supernatants by the Ouchterlony test revealed that in most cases (23/29) they contained antibodies of the IgM class. The inhibitory activity of hybrid cell supernatants on IPLSm1 binding to 38K strongly suggested that the antibodies produced were able to fix to an epitope of IPLSm1 which was close to or part of its antigen-combining site, indicating that AB₂ were paratope-induced antibodies bearing an internal image of the original epitope.

We next investigated the potential use of such antibodies to induce active immunization in naive LOU rats. Two questions in particular were studied: Is it possible to use AB₂ antibodies to induce the production of AB₃ antibodies which will reproduce the effector mechanism described previously *in vitro* both in experimental schistosomiasis⁷ and with AB₁ antibody, involving eosinophil-mediated cytotoxicity¹? Does this immunization lead to a significant protection of naive rats against a challenge infection?

To answer the first question, we followed the kinetics of the antibody response in naive LOU rats immunized with AB₂ antibodies. Successive injections of purified IgM anti-idiotype antibody (JM8-36) for 4 weeks elicited anti-schistosome antibodies (AB₃) which were detected by indirect immunofluorescence on cryopreserved *S. mansoni* schistosomula sections. In all cases, the fluorescence reaction was observed at the surface level. These observations, suggesting a close correlation between the structure of the anti-idiotype antibody and an epitope present on the surface of *S. mansoni* schistosomula, were confirmed by competition of AB₁ by AB₃ on radiolabelled membrane preparations of schistosomula. AB₃ preparations strongly inhibited the binding of AB₁ to the 38K molecule, indicating a close specificity for the same epitope (Fig. 1).

We explored the biological activity of these AB₃ antibodies induced by anti-idiotype immunization by determining their possible participation in eosinophil-dependent cytotoxicity reactions against *S. mansoni* schistosomula. A significant level of cytotoxicity (70–90%) was observed, close to that mediated by a 4-week *S. mansoni*-infected rat serum (Fig. 2) or by the AB₁ monoclonal antibody itself¹.

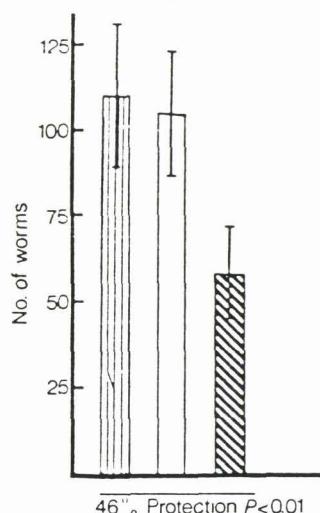


Fig. 3 Passive transfer of AB₃ antibodies. Serum (1 ml) collected from JM8-36 immunized rats (▨) or from rats immunized with normal IgM (□) was injected intravenously into LOU rats infected 4 h previously with 800 *S. mansoni* cercariae. Parasitic burdens were evaluated 3 weeks later by liver perfusion¹⁶. The number of worms obtained from these groups was compared with the parasite burden of rats injected with 1 ml of physiological saline (▨). Percentage protection was calculated by the formula $(a - b)/a \times 100$, where a = the number of worms recovered from the saline-injected control group and b = the number of worms recovered from rat injected with 1 ml of AB₃ serum.

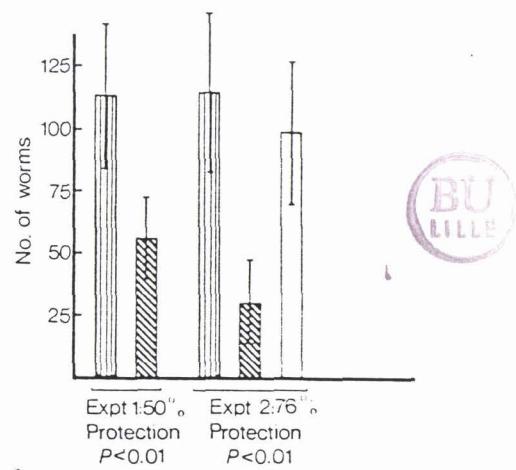


Fig. 4 Protective effect of JM8-36 immunization. LOU rats immunized as described in Fig. 2 legend, giving positive immunofluorescence reactions and significant eosinophil-dependent cytotoxicity, were infected with 800 *S. mansoni* cercariae. Parasite burdens were measured 3 weeks later by liver perfusion¹⁶. The number of worms obtained from rats immunized with JM8-36 AB₂ antibodies (▨) was compared with those obtained from control groups, that is LOU rats injected with physiological saline (□) or with IgM purified from normal rat serum (▨). The percentage of protection was calculated by the formula $(a - b)/a \times 100$, where a = the number of worms obtained from the saline-injected control group and b = the number of worms recovered from AB₂-immunized rats.

The relevance of these *in vitro* findings was fully supported by the demonstration that passive transfer of AB₃ antibodies to naive rats resulted in a significant protection of these animals to a challenge infection by *S. mansoni* cercariae (Fig. 3).

Finally, we studied the direct protective effect of an anti-idiotype immunization. In two series of experiments involving 30 naive LOU rats, immunization with AB₂ resulted in 50–76% protection to a challenge infection (Fig. 4).

The work presented here clearly demonstrates that immunization with an anti-idiotype monoclonal antibody can reproduce several parameters of the acquired immunity observed in experimental rat schistosomiasis. First, immunization with AB₂ resulted in the production of specific anti-*S. mansoni* antibodies in animals which had never been exposed to the parasite antigen. The antibodies produced exhibited the same specificity for the 38K molecule as the original AB₁ monoclonal antibody used to produce the anti-idiotype antibody, suggesting that the AB₂ produced may represent an internal image of the original epitope. However, most importantly, such experiments raise the possibility of inducing a strong immunity against schistosomes, as shown by both active immunization and passive transfer experiments.

Thus, immunization with anti-idiotype antibodies represents an alternative approach to immunization against pathogens. Although recent studies have produced encouraging results^{8–12} concerning the potential substitution of conventional vaccines by anti-idiotype antibodies, this strategy is only in its early stages¹³. In the context of schistosomiasis, idiotype vaccines could be of particular use when relevant protective epitopes cannot easily be produced by the modern tools of molecular biology. Although the rat is a non-permissive host, there is now clear evidence¹⁴ that all the specific effector mechanisms of immunity described in this model also occur in human infection. The possibility of using such immunization procedures in humans remains unexplored and cannot be directly extrapolated from experimental infections. However, work in progress in our laboratory, indicating the existence of cross-reacting idiotypes in human schistosome infection, is encouraging.

We thank Claudi Colson for her help in the preparation of the manuscript. This work was supported by INSERM U167-

CNRS 624 and the WHO-UNDP Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.

Received 18 February; accepted 24 April 1985.

1. Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. & Capron, A. *J. Immun.* **129**, 2739-2743 (1982).
2. Dissous, C., Grzych, J. M. & Capron, A. *J. Immun.* **129**, 2232-2234 (1982).
3. Dissous, C., Prata, A. & Capron, A. *J. Infect. Dis.* **149**, 227-233 (1984).
4. Grzych, J. M., Capron, M., Dissous, C. & Capron, A. *J. Immun.* **133**, 998-1004 (1984).
5. Jerne, N. K. *Ann. Inst. Pasteur, Paris* **125C**, 373-389 (1974).
6. Bazin, H., Grzych, J. M., Verwaerde, C. & Capron, A. *Ann. Immun. Inst. Pasteur, Paris* **131D**, 359 (1980).
7. Capron, M. et al. *Eur. J. Immun.* **8**, 127-133 (1978).
8. Sacks, D. L., Esser, M. & Sher, A. *J. exp. Med.* **155**, 1108-1119 (1982).
9. McNamara, M. K., Ward, R. E. & Kohler, H. *Science* **226**, 1325-1326 (1984).
10. Stein, K. E. & Söderström, T. *J. exp. Med.* **160**, 1001-1011 (1984).
11. Kennedy, R. C., Melnick, J. L. & Dreesman, G. R. *Science* **233**, 930-931 (1984).
12. Reagan, K. J., Wunner, W. H., Wiktor, T. J. & Koprowski, H. *J. Virol.* **48**, 660-666 (1983).
13. Sacks, D. L. in *New Approaches to Vaccine Development* (eds Bell, R. & Torrigiani, G.) 121-131 (Schwabe, Basel, 1984).
14. Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. & Joseph, M. in *Progress in Immunology* Vol. 5 (eds Yamamura, Y. & Tada, T.) 1305-1316 (Academic, Tokyo, 1984).
15. Bazin, H., Beckers, A. & Ouermeian, P. *Eur. J. Immun.* **4**, 44-48 (1974).
16. Smithers, S. R. & Terry, R. J. *Parasitology* **55**, 695-700 (1965).

**ARTICLE G : MISE EN EVIDENCE D'UNE SPECIFICITE EPITOPIQUE CROISEE
ENTRE L'ANTIGENE 38 KDA DU SCHISTOSOME ET LA KLH.**

Dans le cadre de l'optimisation des immunisations anti-idiotypiques, nous avons envisagé le couplage de l'anticorps JM8-36 à une protéine porteuse couramment utilisée, l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata*, plus connue sous l'abréviation KLH.

Ces travaux sont à l'origine d'une observation inattendue révélant que l'injection de KLH chez le rat induit la production d'anticorps spécifiques du *S.mansoni*.

Les investigations détaillées dans cet article apportent une base moléculaire à notre observation originale, et révèlent une étroite identité structurale entre l'épitope de l'antigène 38 kDa reconnu par l'anticorps IPL Sm1 et certaines copules oligosaccharidiques de la KLH. Différents arguments expérimentaux prouvent cette relation :

1°) L'immunisation par la KLH induit chez le rat la production d'anticorps spécifiques du schistosomule décelables par la technique d'immunofluorescence.

2°) Les anticorps anti-KLH immunoprecipitent dans les extraits membranaires du schistosomule l'antigène 38 kDa du Schistosome et inhibent la fixation de l'anticorps IPL Sm1 à son antigène cible.

3°) L'anticorps IPL Sm1, comme les sérum d'infection expérimentale, reconnaît différentes structures de la molécule de KLH de poids moléculaires compris entre 150 et 200 kDa.

4°) L'anticorps anti-idiotypique JM8-36 inhibe d'autre part significativement la réaction de fixation de l'anticorps IPL Sm1 à la KLH.

5°) La déglycosylation de la molécule de KLH abolit son activité inhibitrice sur la liaison de l'anticorps IPL Sm1 à son antigène cible (38 kDa), ainsi que son pouvoir inducteur d'anticorps spécifiques du Schistosome.

6°) L'identité structurale se double d'une identité fonctionnelle puisque l'immunisation de rats par la KLH induit la production d'anticorps hautement cytotoxiques pour les schistosomules en présence d'éosinophiles et protecteurs vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve lorsqu'ils sont transférés passivement.

7°) Enfin l'immunisation par la KLH installe chez le rat un niveau élevé de protection (50 à 76%) à l'encontre d'une infection ultérieure par *S.mansoni*.

L'identité structurale et fonctionnelle existant entre les copules glycaniques de la KLH et de l'antigène 38 kDa du *S.mansoni*, conjointement à la démonstration chez l'homme d'anticorps capables d'inhiber la liaison de l'anticorps IPL Sm1 à la KLH, ouvrent une nouvelle approche dans la séroépidémiologie des schistosomiases. Cette relation permet d'autre part l'accès à la purification d'un épitope parasitaire inaccessible du fait de sa faible représentation pondérale.

ARTICLE G

SCHISTOSOMA MANSONI SHARES A PROTECTIVE CARBOHYDRATE EPITOPE WITH KEYHOLE LIMPET HEMOCYANIN

By JEAN-MARIE GRZYCH, COLETTE DISSOUS, MONIQUE CAPRON,
STÉPHANE TORRES, PAUL-HENRI LAMBERT,* AND ANDRÉ CAPRON

*From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 167, Centre National de la Recherche Scientifique 624, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; and the *Organisation Modiale de la Santé, Centre de Recherche et de Formation en Immunologie, Département de Pathologie, CMV 1211, Genève 4, Switzerland*

The production of mAbs of various isotypes to *Schistosoma mansoni* has greatly contributed to the appreciation of the function of antibodies in the immunity against schistosomiasis, and has allowed the characterization of several potential protective antigens. Using this approach, we clearly established in previous studies (1, 2) the close relationship existing between a 38,000 M_r *S. mansoni* schistosomulum surface antigen and the expression of eosinophil-mediated killing of schistosomula. The 38,000 M_r antigen was initially characterized by the IPLSm1 rat IgG2a mAb that exhibits a marked eosinophil-dependent cytotoxicity and passively transfers a high degree of protection towards a cercarial challenge (1, 2). This particular surface antigen was also shown to react with polyclonal antibodies present in various infected hosts including mice, rats, monkeys, and humans (3). Additional studies revealed that 97% of a group of 120 Brazilian patients with *S. mansoni* infection produced circulating antibodies against this antigen, suggesting that the 38,000 M_r molecule corresponds to a potent immunogen in man. More interestingly, the antibody response was demonstrated to appear in young children, to be maximal in older patients, and showed a parallelism with the prevalence and the intensity of the infection. This indicated that the antibody response against the 38,000 M_r antigen could be considered an important marker of *S. mansoni* infection (4).

Although the 38,000 M_r antigen initially appeared as a good candidate for the molecular cloning and subsequent studies, the glycanic nature of the epitope recognized by the IPLSm1 mAb limited its in vitro production by recombinant DNA methodology. Secondly, the 38,000 M_r antigen was shown (5) to bind the IPLSm3 mAb of IgG2c isotype capable of blocking both in vivo and in vitro effector function(s) of the IPLSm1 IgG2a mAb. We recently demonstrated (6) the existence of similar blocking antibodies specific to the 38,000 M_r molecule

This work was supported by INSERM U 167-CNRS 624 and by grant 0-7585 from Edna McConnell Clark Foundation. Address correspondence to Jean-Marie Grzych, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Pr A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cédex, France.

866 CROSSREACTIVE SCHISTOSOME ANTIGENIC DETERMINANTS

in human infection and correlated the level of such blocking antibodies with the presence or absence of immunity to reinfection.

The protective role of the 38,000 M_r molecule and particularly the effect of its IPLSm1-defined epitope was also supported by an antiidiotype antibody probe. An antiidiotype antibody Ab2 produced against the IPLSm1 antibody (Ab1) elicits by immunization polyclonal Ab3 antibodies exhibiting specificity for the 38,000 M_r antigen. Ab3 antibodies induce a significant level of eosinophil-dependent cytotoxicity and passively transfer immunity. Most importantly, immunization with Ab2 led to a high degree of resistance to a cercarial challenge (7).

Recently, experiments performed on rats immunized with Ab2 mAb conjugated to KLH (currently used as a carrier in immunization with synthetic peptides) led us to make some unexpected observations. We could show that rats injected with KLH, used as control in the KLH/Ab2 immunization, produced anti-*S. mansoni* antibodies specific for the 38,000 M_r schistosomula surface antigen. This observation was also supported by the demonstration that the carbohydrate epitope of the 38,000 M_r antigen that is present at the early life cycle stages of *S. mansoni* (miracidia) is also expressed by the intermediate host *Biomphalaria glabrata* as well as by other freshwater snails (8).

In the present work, we provide new evidence for the existence of a shared epitope between KLH and the 38,000 M_r antigen, and that KLH immunization elicits in rats the production of anti-*S. mansoni* antibodies with similar effector functions to those induced during the course of infection. We have exploited these latest results to investigate further the biological and immunological properties of this particular epitope.

Materials and Methods

Parasites. The Puerto Rican strain of *S. mansoni* was used in all our experiments. The parasite cycle was maintained in our laboratory with the use of *B. glabrata* snails as invertebrate intermediate hosts and Golden hamsters, *Mesocricetus auratus*, as vertebrate definitive hosts. Schistosomula of *S. mansoni* prepared according to the method of Ramalho-Pinto et al. (9) and referred to as mechanically prepared schistosomula were used throughout the work. For all the cytotoxicity assays, however, schistosomula were prepared according to the skin penetration technique described by Clegg and Smithers (10) and referred to as skin-transformed schistosomula.

Monoclonal Antibodies. IPLSm1 mAb is a purified anti-*S. mansoni* antibody of IgG2a isotype (1). It was produced after fusion of spleen cells from rats infected with *S. mansoni* for 5 wk and the nonsecretory IR983 F myeloma cell line (11). It was purified by DEAE ion-exchange chromatography according to the method of Bazin et al. (12). For inhibition experiments, purified IPLSm1 antibodies were radiolabeled with ^{125}I by the chloramine T method (13).

JM8-36 antibody is a rat antiidiotype mAb of IgM isotype specific for the IPLSm1 antibody (7). Purified fractions of JM8-36 were obtained by gel filtration chromatography according to Bazin et al. (12).

Antigens and immunization procedure. Purified lyophilized KLH (mol wt, 3×10^6 to 7.5×10^6) was purchased from France Biochem. (Meudon, France). For inhibition experiments, KLH was radiolabeled with ^{125}I by the chloramine T method (13). Degly-

cosylation of KLH (DKLH)¹ was performed according to the procedure of Edge et al. (14). Briefly, 5 mg of KLH was dissolved in 1 ml of anisole/trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) (1 vol/2 vol) mixture and kept for 3 h at 0°C. The deglycosylated KLH was freed of reagents and low molecular weight sugars by extraction with diethyl ether in the presence of aqueous pyridine followed by dialysis against pyridine acetate buffer, pH 5.5. LOU/M rats (10 wk old, 180–200 g) were immunized twice at a 2 wk interval by intraperitoneal injection of 1 ml of physiological saline solution containing 100 µg KLH or 100 µg DKLH. Rats were bled every week from the start of the immunization. Sera were recovered and stored at -20°C.

Indirect Immunofluorescence Assay. Anti-*S. mansoni* antibodies were detected by indirect immunofluorescence on sections of *S. mansoni* schistosomula prepared as previously described (9). Sections of 8 µm were overlayed with 50 µl of immunized rat sera at a dilution of 1:10 in 10 mM PBS buffer. After 30 min contact and three washings in PBS, FITC-conjugated anti-rat Ig antisera prepared in rabbits (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) were added for 30 min. The slides were then washed three times in PBS, the last wash containing Evans Blue (1:10,000 final dilution) as a counterstain. 4 wk infected rat sera and normal rat sera (NRS) were used respectively as positive and negative controls. The sections were examined under fluorescence microscopy.

Immunoprecipitation and Western Blotting Analysis. Schistosomula surface antigens were radioiodinated using the lactoperoxidase technique of Marchalonis (15) and immunoprecipitated after incubation of the labeled parasite detergent extract (NP-40, 0.05%) with rat antibodies. Immune complexes were adsorbed on protein A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and analyzed by SDS-PAGE exactly as previously described (16).

KLH was analyzed in 10% polyacrylamide-SDS gels in the presence of 5% 2-ME (17), then transferred onto nitrocellulose. Western blotting was performed according to the method of Burnette (18) using 5 µl of rat sera or 10 µg of IPLSm1 mAb. Fixed antibodies were revealed by autoradiography after incubation with 5 × 10⁵ cpm of ¹²⁵I-labeled rabbit anti-rat IgG (8 × 10⁶ cpm/µg sp act).

Inhibition of IPLSm1/KLH Binding. Inhibition experiments were carried out on polyvinylchloride (PVC) microtiter plates (Falcon Labware, Oxnard, CA) coated with IPLSm1 antibody. Each well of the PVC plates was coated with 100 µl of a 10 µg/ml solution of purified IPLSm1 antibody diluted with 10 mM PBS. After 2 h of incubation at 20°C, the plates were washed twice in PBS and saturated for 30 min with 200 µl of a 2% BSA (Albumin, Fraction IV; Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Federal Republic of Germany) solution in PBS. The plates were then washed twice in PBS/0.1% BSA (200 µl per well). For the test, 50 µl of ¹²⁵I-labeled KLH in PBS/0.1% BSA (100,000 cpm/well) were incubated with 50 µl of inhibiting factor diluted in the same buffer for 1 h at 37°C and 18 h at 4°C. The plates were washed three times in PBS/0.1% BSA and each well was counted in a gamma counter. The percentage of inhibition of binding was calculated using the following formula: 100 × (a - b)/a, where a is cpm obtained without inhibitor and b is cpm obtained in the presence of inhibitor. In additional studies, PVC plates were coated under the conditions described above with 100 µl of a 10 µg/ml solution of purified KLH in 10 mM PBS. 50 µl of ¹²⁵I IPLSm1 antibody in PBS/0.1% BSA (100,000 cpm/well) were incubated with 50 µl of inhibiting factor diluted in the same buffer. The experimental conditions of the assay and the evaluation of binding inhibition were identical to those described above.

Inhibition of IPLSm1/38,000 Antigen Binding. Inhibition of binding of radiolabeled IPLSm1 antibody to 38,000 M_r antigen was performed according to the technique previously described (7). Briefly, PVC plates precoated with rat IgM C3-109 mAb recognizing the 38,000 M_r antigen, were incubated with 100 µl of a NP-40 extract of schistosomula (100 µg protein/ml); this procedure allows a better fixation of the 38,000

¹ Abbreviations used in this paper: DKIRS, DKLH-immunized rat sera; DKLH, deglycosylated KLH; IRS, infected rat sera; KIR, KLH immunized rat; KIRS, KLH-immunized rat sera; NRS, normal rat sera; PVC, polyvinylchloride; TFMS, trifluoromethanesulfonic acid; TRI, synthetic tripeptide (glycyl-histidyl-lysine).

M_r antigen. After 2 h of exposure at 37°C, plates were washed twice in PBS/0.1% BSA. For the inhibition test, 50 µl of ¹²⁵I-labeled IPLSm1 in PBS/0.1% BSA were incubated with 50 µl of inhibiting factor. After 2 h at 37°C and 18 h at 4°C, plates were washed three times with PBS/0.1% BSA (100 µl/ml) and the wells were counted in a gamma counter. The percentage of inhibition was calculated according to the formula previously defined.

Inhibition of Radiolabeled IPLSm1 Binding to KLH by Sera from Infected Patients. Inhibition experiments were performed on PVC microtiter plates precoated with KLH. Sera were obtained from untreated patients in an endemic area in Kenya and selected on the basis of egg counts. They were kindly donated by Dr. A. E. Butterworth, (Cambridge University, United Kingdom). Normal human sera were obtained from subjects without any parasitic infection. For the test, 50 µl of ¹²⁵I-labeled IPLSm1 were incubated 1 h at 37°C and 16 h at 4°C with 50 µl of diluted infected or normal sera (dilution 1:50 in PBS/0.1% BSA). Plates were then washed three times in PBS/0.1% BSA and wells were counted in a gamma counter. The percentage of inhibition was measured according to the formula defined above.

Eosinophil-dependent Cytotoxicity. The cytotoxicity assays were performed on *S. mansoni* skin schistosomula, as previously described by Capron et al. (19). Briefly, effector cells were obtained from LOU rats stimulated 48 h previously by intraperitoneal injection of 10 ml 0.9% NaCl sterile physiological saline solution; peritoneal cavities were washed with 20 ml Eagle's MEM containing penicillin (100 U/ml), streptomycin (50 U/ml), 1% NRS, 20 ng/ml synthetic tripeptide (glycyl-histidyl-lysine [TRI], Calbiochem-Behring Corp., San Diego, CA) and 25 IU/ml calcium heparinate (MEM/NRS/TRI). Eosinophil-rich populations were prepared by allowing these peritoneal cells (5–7 × 10⁶/ml in MEM/NRS/TRI) to adhere for 2 h at 37°C in 25-cm² tissue culture flask (Corning Glass Works, Corning, NY). The nonadherent cells of each tissue culture flask were recovered, pooled, and washed twice in MEM/NRS/TRI. After staining with Discombe's diluent or toluidine blue, this cell population was shown to contain 40–90% eosinophils and 4–10% mast cells. The cytotoxic assay was carried out in sterile plastic microplates with flat-bottomed wells (Nunclon, Roskilde, Denmark). 50 schistosomula were added to each well and incubated overnight with 50 µl of KLH-immunized rat sera (KIRS), DKLH-immunized rat sera (DKIRS), or 50 µl NRS or infected rat serum (IRS) at a final dilution of 1:16 (sera were previously heat-inactivated for 2 h at 56°C). After 18 h incubation at 37°C, effector cells were added in a 100 µl of MEM/NRS/TRI at a ratio of 6,000 effector cells for one schistosomulum. The plates containing effector cells and sensitized targets were incubated in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. The percentage of cytotoxicity was measured after 24–48 h by microscopic examination.

Passive Transfer Experiments. 2 ml of sera from rats immunized with KLH (KIRS) were injected intravenously into male LOU rats (10 wk old, 180–200 g) that had been infected with 800 *S. mansoni* cercariae 4 h previously. Parasite burdens were evaluated 3 wk later by the liver-perfusion technique according to Smithers and Terry (20). The number of worms obtained from rats injected with KIRS were compared with those obtained from control groups (rats injected with 2 ml of physiological saline solution or 2 ml of NRS). The percentage of protection was calculated by the formula (21): 100 × (a – b)/a, where a is the number of worms recovered from rats injected with 2 ml of physiological saline solution and b is the number of worms recovered from rats injected with KIRS.

Active Immunization. For active immunization experiments, male LOU M rats (10 wk old, 180–200 g) were immunized twice at 2 wk intervals by intraperitoneal injection of 1 ml of physiological saline solution containing 100 µg of KLH. 3 wk after the second injection, rats were infected with 800 *S. mansoni* cercariae. The worm recovery and the evaluation of the percentage of protection were performed as described above, 3 wk after the cercarial challenge. In these experiments, rats injected with 1 ml of physiological saline solution were used as negative controls.

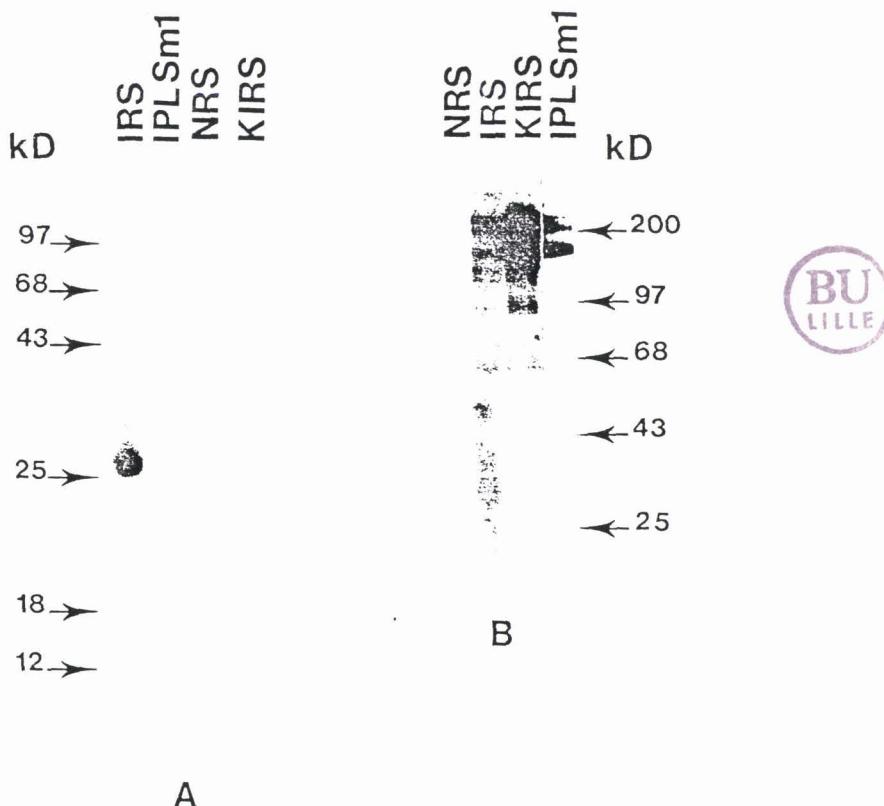


FIGURE 1. Epitopic identity between *S. mansoni* 38,000 M_r antigen and KLH. (A) ^{125}I -labeled schistosomula surface antigens were immunoprecipitated by 10 μl of NRS, IRS, KIRS, or 10 μg of purified IPLSm1 mAb. (B) KLH-purified preparation was analyzed in a 10% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and then transferred to nitrocellulose. Immunodetection was performed with 5 μl of NRS, 5 μl IRS, 5 μl of KIRS, or 10 μg of purified IPLSm1 antibody. $M_r \times 10^{-3}$ are shown.

Results

Antigenic Community between KLH and the 38,000 M_r Antigen. The existence of a common antigenic structure shared by KLH and *S. mansoni* was investigated by immunoprecipitation and Western blotting methodologies. Immunoprecipitation of radiolabeled schistosomulum antigen (Fig. 1A) showed that sera from rats immunized with KLH recognize a 38,000 M_r antigen present on the schistosomulum surface and previously demonstrated as the target antigen of the IPLSm1-protective mAb (2). Additionally, the analysis of a purified fraction of KLH by SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 1B) revealed by Western blotting that IPLSm1 mAb and infected rat sera recognize in KLH two molecules of $\sim 150-200 \times 10^3$ mol wt.

Inhibition of IPLSm1 Binding to KLH. Binding of ^{125}I -labeled IPLSm1 to KLH coated on PVC plates was shown to be strongly inhibited in a dose-dependent manner by various concentrations of unlabeled IPLSm1. Similar levels of inhibition could be obtained in the presence of *S. mansoni*-infected rat sera (Fig. 2).

Epitopic Community. The structural identity between KLH and the 38,000 M_r antigen epitope defined by the IPLSm1 mAb was further studied in inhibition experiments performed in the presence of the JM8-36 antiidiotype antibody specific for IPLSm1 antibody. Results in Fig. 3A show that JM8-36 antibody

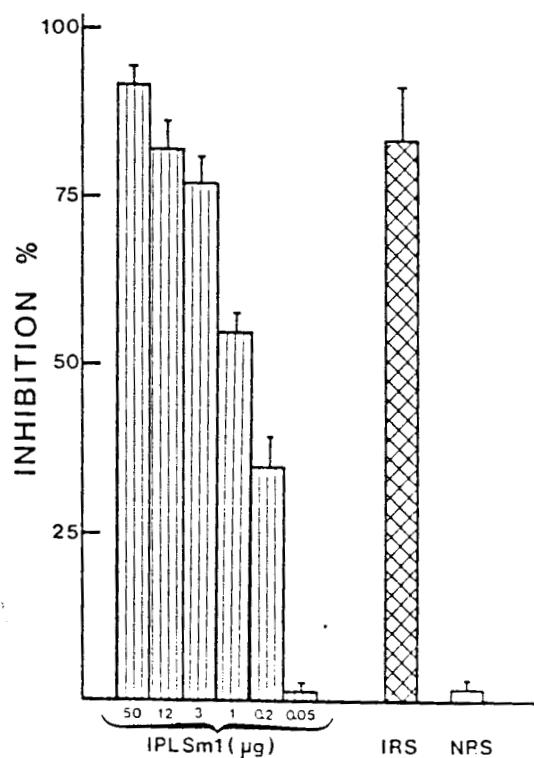


FIGURE 2. Dose-dependent inhibition of ^{125}I -labeled IPLSm1 /KLH binding. $50 \mu\text{l}$ of ^{125}I -labeled IPLSm1 antibody were incubated with $50 \mu\text{l}$ of various concentrations of unlabeled IPLSm1 , $50 \mu\text{l}$ of 4 wk IRS, or $50 \mu\text{l}$ of NRS.

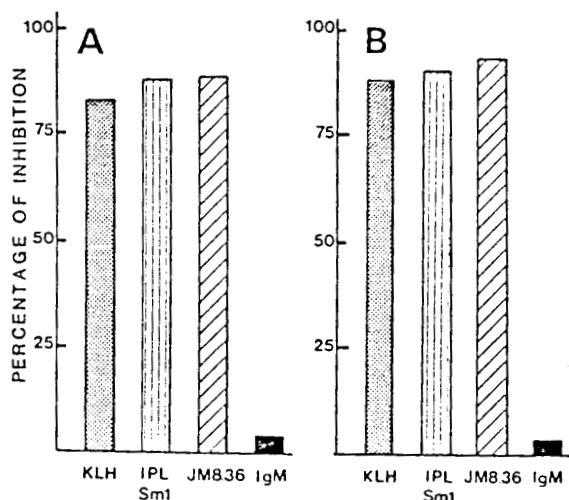


FIGURE 3. Inhibition of ^{125}I -labeled IPLSm1 /KLH binding by JM8-36 antiidiotype antibody. (A) $50 \mu\text{l}$ of ^{125}I -labeled KLH were incubated with $50 \mu\text{l}$ of a solution containing either $50 \mu\text{g}$ of KLH, IPLSm1 antibody, JM8-36 antiidiotype antibody or unrelated IgM, on plates coated with purified IPLSm1 antibody. (B) $50 \mu\text{l}$ of ^{125}I -labeled IPLSm1 were incubated with $50 \mu\text{l}$ of the same solutions on plates coated with native KLH.

inhibits the binding of ^{125}I -labeled KLH to IPLSm1 antibody coated on PVC plates at a level comparable to that obtained either with unlabeled KLH or with purified IPLSm1 antibody. Moreover, JM8-36 antiidiotype antibody can also inhibit ^{125}I -labeled IPLSm1 binding to KLH coated on PVC plates at a level

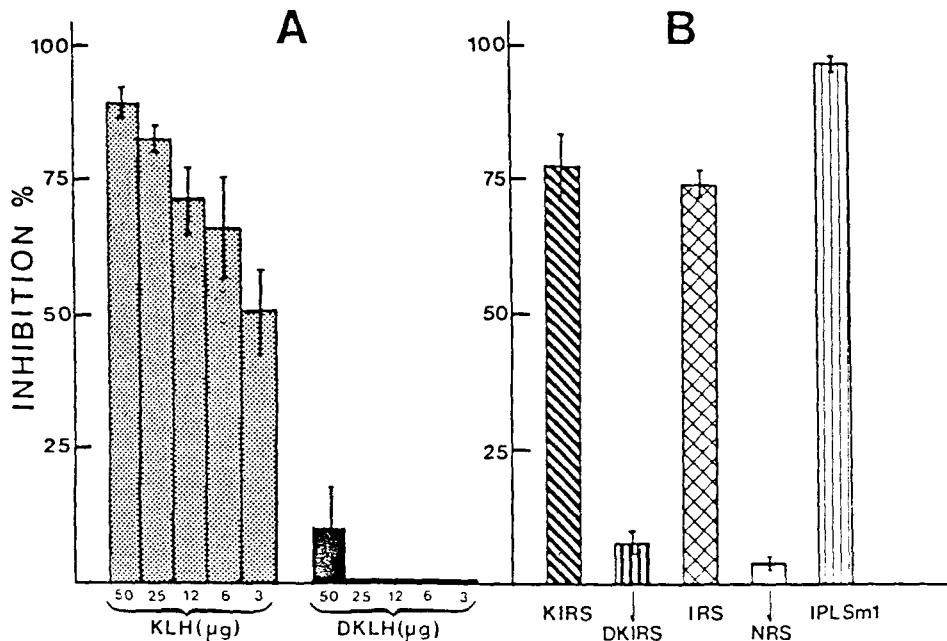


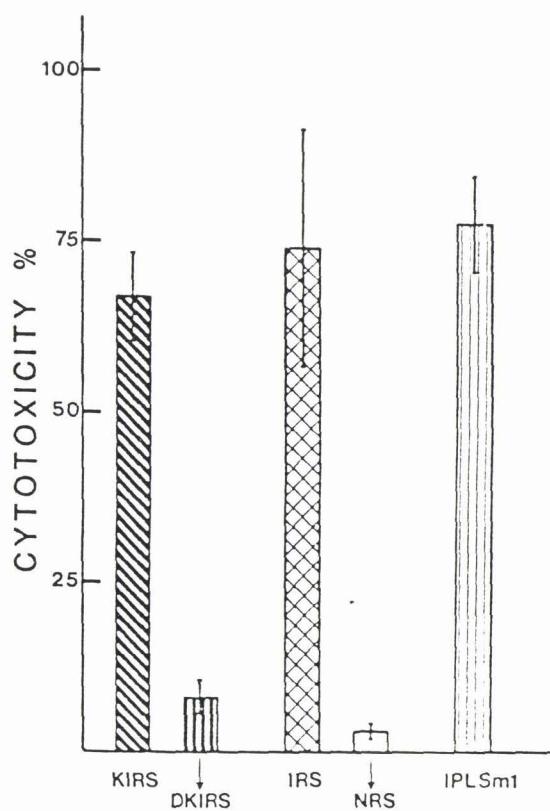
FIGURE 4. Inhibition of ^{125}I -IPLSm1 binding to the $38,000 M_r$ antigen. (A) $50 \mu\text{l}$ of various concentrations of native KLH or DKLH were incubated with $50 \mu\text{l}$ of ^{125}I -labeled IPLSm1 mAb (100,000 cpm/well). (B) $50 \mu\text{l}$ of 1:50 diluted sera collected from KIRS, DKLH immunized rats, 4 wk IRS, NRS, or IPLSm1 ascitic fluid were incubated with $50 \mu\text{l}$ of ^{125}I -labeled IPLSm1 antibody (10^5 cpm/well).

comparable to that seen with unlabeled IPLSm1 or KLH. These results therefore suggest a close structural identity between the antigenic determinant of KLH, the internal image of the antigen expressed on JM8-36 antiidiotype antibody, and the $38,000 M_r$ antigen epitope defined by the IPLSm1 mAb.

Involvement of Carbohydrate Moieties. The previous demonstration that IPLSm1 mAb binds to the $38,000 M_r$ antigen via a glycanic epitope (2) led us to compare the immunological properties of native and deglycosylated KLH. Native KLH preparations used at various concentrations inhibit the binding of ^{125}I -labeled IPLSm1 to its $38,000 M_r$ target antigen. This activity is completely abolished when KLH is deglycosylated by TFMS treatment (Fig. 4A). Additionally, a marked inhibition of binding of ^{125}I -labeled IPLSm1 could be induced with KIRS or IRS, but not with the sera from rats immunized with DKLH or NRS (Fig. 4B).

Eosinophil-dependent Cytotoxicity. The relationship between the existence of antibody-mediated eosinophil-dependent cytotoxicity for schistosomula and the $38,000 M_r$ antigen prompted us to investigate the presence of cytotoxic antibodies in the sera collected from rats immunized with KLH. The cytotoxic activity of anti-KLH rat sera was investigated in the presence of normal rat eosinophils. In these particular conditions, anti-KLH rat sera were shown to exhibit a marked killing activity towards *S. mansoni* skin schistosomula ranging between 46 and 94% and comparable to that usually obtained using 4 wk-IRS (19) or the protective mAb IPLSm1. No cytotoxicity was observed with sera collected from rats immunized with DKLH (Fig. 5).

Passively Transferred Immunity. The potential protective role of anti-KLH rat sera was investigated by passive transfer experiments in naive LOU rats. The



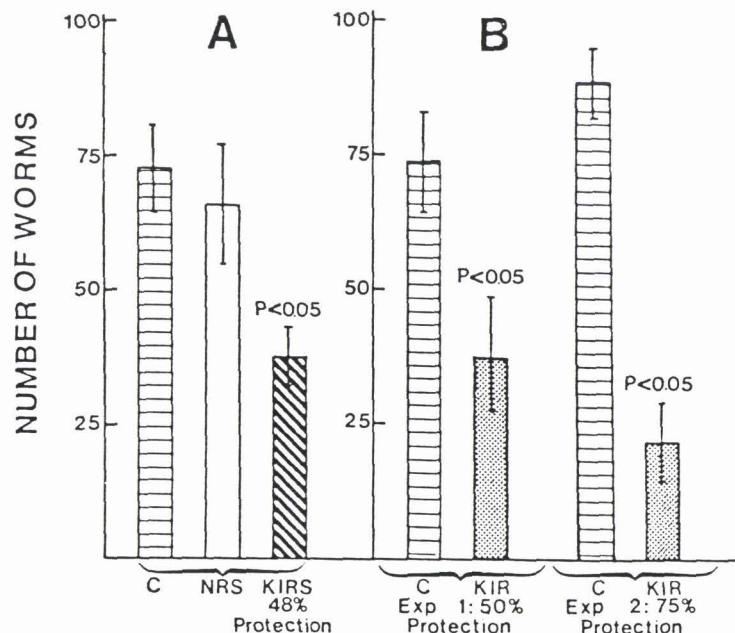
BU
LILLE

FIGURE 5. Eosinophil-dependent cytotoxicity for *S. mansoni* schistosomula. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 h of incubation with effector cells (LOU rat peritoneal cells enriched in eosinophils); schistosomula were preincubated either with KIRS, DKIRS, 4 wk IRS, NRS, or IPLSm1 mAb (mean of 10 duplicate experiments \pm SD).

parasite burden was evaluated by liver perfusion 3 wk after a challenge infection with 800 *S. mansoni* cercariae. Results presented in Fig. 6A indicated that antibodies produced in KLH-immunized rats passively transferred immunity to a degree (48%) very close to that previously observed for the IPLSm1 mAb. In these experiments, rats receiving KIRS presented a lower number of worms when compared with rats treated with NRS or physiological saline solution (Fig. 6A).

Active Immunization. The protective effect of immunization with KLH was studied in naive LOU rats immunized twice at 2 wk intervals with 100 μ g of KLH and infected 3 wk after the second injection by 800 *S. mansoni* cercariae. The effectiveness of the procedure was evaluated 3 wk after the challenge infection by liver perfusion. Two series of experiments involving a total of 24 rats demonstrated that rats previously immunized with KLH presented a significant decrease in the parasite burden when compared with appropriate controls (rats treated with physiological saline solution). The level of protection obtained in these experiments ranged between 50 and 70% (Fig. 6B).

*Studies on Sera from Humans Infected with *S. mansoni*.* Previous studies (4) have demonstrated that the 38,000 M_r antigen glycoprotein is a major immunogen in human infection and induced the production of specific antibodies in 97% of *S. mansoni*-infected patients. The potential use of KLH for the detection of anti-*S. mansoni* antibodies in human sera was explored using a competitive RIA with



BU
LILLE

FIGURE 6. In vivo protective role of anti-KLH antibodies. (A) 1.5 ml of KIRS, 1.5 ml of NRS, or 1.5 ml of physiological saline solution were injected intravenously into each rat (groups of six animals in each test) that had been infected 4 h previously with 800 *S. mansoni* cercariae. (B) KIR or rats injected with physiological saline solution (C) were infected with 800 *S. mansoni* cercariae. In A and B, the number of worms was estimated by liver perfusion 21 d after the challenge infection.

TABLE I
Inhibition of ¹²⁵I IPLSm1 Binding to KLH by Human Serum

Human sera source	Percent inhibition ±SD
<i>S. mansoni</i> -infected human sera (<i>n</i> = 20)	68 ± 13.3
Normal human sera (<i>n</i> = 20)	0.5 ± 1.1

50 µl of ¹²⁵I-labeled IPLSm1 (10^5 cpm/well) were incubated on plates coated with KLH for 1 h at 37°C, and for 16 h at 4°C with 50 µl of 1:50 diluted infected or normal sera.

PVC plates coated with KLH. Results summarized in Table I and concerning a limited series of human infection sera show that the latter significantly inhibit the binding of radiolabeled IPLSm1 antibody to KLH (68 ± 13.3%). No significant levels of inhibition were observed with the various control sera (0.5 ± 1.1%).

Discussion

The experimental data reported here clearly demonstrate that the immunization of naive LOU rat with purified hemocyanin of *Megathura crenulata* (KLH) elicits the production of specific anti-*S. mansoni* antibodies exhibiting both in vitro and in vivo effector functions towards *S. mansoni* schistosomula, indicating therefore the presence of a functional crossreactive epitope between KLH and the 38,000 M_r antigen.

These observations found a molecular basis in the demonstration that sera

874 CROSSREACTIVE SCHISTOSOME ANTIGENIC DETERMINANTS

collected from KLH-immunized rats contain antibodies able to immunoprecipitate from a schistosomula extract the 38,000 M_r surface antigen previously reported as the target antigen of the protective IPLSm1 mAb and of antibodies from human or experimental infection sera. The antigenic similarity was confirmed by Western blotting analysis of KLH in which two molecules of about 150,000 and 200,000 M_r were recognized both by IPLSm1 mAb antibody or *S. mansoni*-infected rat sera.

The existence of a shared epitope between KLH and the 38,000 M_r antigen was fully supported by the results obtained in inhibition experiments performed using the JM8-36 antiidiotype antibody. The latter induced both a marked inhibition of binding of ^{125}I -labeled KLH to IPLSm1 antibody or of ^{125}I -labeled IPLSm1 to KLH, suggesting therefore a close structural identity between the epitope of KLH, of the 38,000 M_r antigen and the internal image of the 38,000 M_r epitope presented by the JM8-36 antiidiotype antibody.

The glycanic nature of the portion of the KLH molecule recognized by the IPLSm1 antibody was established by further inhibition experiments. Deglycosylation of the native KLH by TFMS treatment abolished the inhibitory effect of KLH on the binding of labeled IPLSm1 to its target antigen. On the other hand, sera collected from rats immunized with DKLH were completely devoid of inhibitory activity on IPLSm1/38,000 M_r antigen binding when compared with the sera obtained from rats immunized with native KLH, or rats infected with *S. mansoni*. These results confirmed the close structural and chemical identity between KLH and the 38,000 M_r antigen previously demonstrated to bind the IPLSm1 mAb through a glycanic epitope.

The functional properties of the carbohydrate epitope present on native KLH molecules were studied in the light of the relationship previously reported between killing of schistosomula mediated by normal rat eosinophils and the 38,000 M_r schistosomula surface antigen (1). A marked level of eosinophil-dependent cytotoxicity was observed in the presence of sera collected from KLH-immunized rats, comparable to that obtained with IRS or IPLSm1 mAb; no cytotoxicity was observed with the sera from rats immunized with DKLH. These results indicated that, together with a structural identity between KLH and 38,000 M_r carbohydrate moieties, the KLH epitope recognized by IPLSm1 antibodies expressed similar immunological functions and elicited by immunization the production of cytotoxic antibodies. The effector functions of anti-KLH antibodies were also confirmed *in vivo* by passive transfer experiments. Sera collected from rats immunized with KLH were found to be protective, when passively transferred to rats, to a degree similar to that induced by the IPLSm1 antibody. More importantly, the prior immunization of naive LOU rats with purified KLH gave a high level of protection towards a subsequent *S. mansoni* challenge. The parasite burden estimated by liver perfusion methodology was significantly reduced when compared with appropriate controls.

These latest data increase the interest for the well-defined characterization and isolation of this glycanic epitope shared both by KLH molecules and the 38,000 M_r schistosomula surface antigen, and potentially available for an immunoprophylactic approach towards schistosomiasis. From these encouraging results, observations in various experimental infection models and particularly

in primates to evaluate the immune response against this glycanic epitope should follow.

In man, preliminary investigation performed using a competitive RIA allows the characterization of specific antibodies that can inhibit the binding of IPLSm1 antibody to KLH in the sera of *S. mansoni*-infected patients. Although the existence of natural antibodies to KLH in some individuals has been reported (22), no significant level of inhibition was observed with the various control sera used. The fact that almost all subjects infected by *S. mansoni* produce antibodies against the glycanic epitope of the 38,000 M_r antigen also present in KLH opens an entirely new pathway towards the development of a simple, easily standardized and cheap reagent for the seroepidemiology of human schistosomiasis. We are at present applying this methodology to a large series of well-documented sera.

This paper brings new evidence that the carbohydrate moieties of *Megathura crenulata* hemocyanin (KLH) express the epitope previously characterized on a major immunogen 38,000 M_r antigen of the parasite *S. mansoni* and clearly demonstrate its capacity to elicit by immunization the production of functional antibodies both in vitro and in vivo. Such observations appear to have several major consequences.

The close structural and functional identity between KLH carbohydrate moieties and the glycanic epitope of the 38,000 M_r antigen provides new opportunities to analyze further in man and animal models the isotypes induced towards a potentially protective epitope. KLH could represent in this context a valuable tool for the identification of the human antibody isotype(s) directly involved in the eosinophil-mediated killing of schistosomula.

The characterization on the KLH molecule of a functional epitope recognized by the protective IPLSm1 mAb offers new opportunities to purify a large amount of the oligosaccharide for the study of its chemical structure. Our current work using mass spectroscopy analysis of the purified KLH oligosaccharides renders access to a well-defined structure feasible in the near future, a first step in the production of synthetic oligosaccharides. Such material could certainly provide essential information concerning the potential relations existing between the chemical nature of a functional epitope and the preferential induction of specific antibody isotype(s). This latest point appears to be essential since we previously demonstrated in schistosomiasis the production of blocking mAbs towards the 38,000 M_r glycoprotein antigen. Two ways of investigation could be proposed at this stage, either a slight modification of the initial chemical structure of KLH carbohydrate moieties involved in the production of functional antibodies or the production of neoglycoproteins obtained by a chemical condensation of KLH oligosaccharides with various carrier proteins. These experiments could certainly lead to the appreciation of the real role played by the carrier proteic structure in the orientation of the immune response towards a specific epitope. In this context, we plan to apply such an approach to the P28 antigen of *S. mansoni* recently described (23) as promoting a protective immune response in rats and mice against *S. mansoni* infections.

Moreover, our findings have to be considered in the general framework of the antigenic community existing between parasites and their hosts. This concept established in our laboratory some 20 yr ago indicates that some antigenic

determinants were present both on *S. mansoni* and its snail intermediate host *B. glabrata* (24) and elicited the production of antibodies appearing early during experimental or human infection (25). These results, confirmed in several laboratories (26–30), were recently updated by the demonstration that the glycanic epitope of the 38,000 M_r glycoprotein that is a major immunogen of *S. mansoni* schistosomula is in fact expressed by the intermediate host *B. glabrata* and several freshwater and marine molluscs (8). Such observations raised the problem of the conservation of this oligosaccharide structure throughout evolution and the expression in a human parasite of a major antigenic epitope whose origin was found in a marine mollusc *Megathura crenulata* that has been in existence for several million years.

Finally, it will certainly be of interest to immunologists, who have used KLH for the last 20 yr as a carrier for the immunization of humans or animals, to know that it can lead to the production of anti-*S. mansoni* antibodies.

Summary

The glycanic epitope of the 38,000 M_r , *Schistosoma mansoni* schistosomula major immunogen defined by the IPLSm1 protective mAb was identified in the hemocyanin of the marine mollusc *Megathura crenulata*, better known as KLH. This antigenic community was exploited to investigate further the biological properties of this epitope. KLH was shown to strongly inhibit the binding of IPLSm1 mAb to its 38,000 M_r target antigen. Immunization of naive LOU rats with KLH elicited the production of anti-*S. mansoni* antibodies capable of immunoprecipitating the 38,000 M_r schistosomulum antigen. Antibodies to KLH mediated a marked eosinophil-dependent cytotoxicity and passively transferred immunity towards *S. mansoni* infection. Finally, rats immunized with KLH were significantly protected against a challenge with *S. mansoni* cercariae.

The deglycosylation of KLH completely abolishes its immunological and functional KLH properties, indicating the participation of an oligosaccharidic epitope of the native KLH that is also recognized by the sera of *S. mansoni*-infected patients.

These observations provide new opportunities of access to the well-defined structure of a glycanic epitope potentially available for the immunoprophylaxis and seroepidemiology of schistosomiasis, and a new approach to the isotypic response towards a well-chemically defined epitope.

The authors thank Dr. A. E. Butterworth for access to sera from *S. mansoni*-infected patients and Dr. R. J. Pierce for helpful advice. The expert assistance of A. Caron and J. Trolet was greatly appreciated, as well as the help of C. Colson and M. F. Massard in the preparation of the manuscript.

Received for publication 24 November 1986.

References

1. Grzych, J. M., M. Capron, H. Bazin, and A. Capron. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129:2739.

2. Dissous, C., J. M. Grzych, and A. Capron. 1982. *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat protective monoclonal IgG2a. *J. Immunol.* 129:2232.
3. Dissous, C., and A. Capron. 1983. *Schistosoma mansoni*: antigenic community between schistosomula surface and adult worm incubation products as a support for the concomitant immunity. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 162:355.
4. Dissous, C., A. Prata, and A. Capron. 1984. Human antibody response to *Schistosoma mansoni* surface antigens defined by protective monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 149:227.
5. Grzych, J. M., M. Capron, C. Dissous, and A. Capron. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133:998.
6. Khalife, J., M. Capron, A. Capron, J. M. Grzych, A. E. Butterworth, D. W. Dunne, and J. H. Ouma. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164:1626.
7. Grzych, J. M., M. Capron, P. H. Lambert, C. Dissous, S. Torres, and A. Capron. 1985. An anti-idiotype vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature (Lond.)*. 316:74.
8. Dissous, C., J. M. Grzych, and A. Capron. 1986. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature (Lond.)*. 332:443.
9. Ramalho-Pinto, F. J., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
10. Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2:79.
11. 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.* 131:359.
12. Bazin, H., A. Beckers, and P. Querinjean. 1974. Three classes and four subclasses of rat immunoglobulin, IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 4:44.
13. Hunter, W. M., and F. C. Greenwood. 1962. Preparation of iodine 131. Labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond.)*. 194:495.
14. Edge, A. S. B., C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert, and P. Weber. 1981. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethane-sulfonic acid. *Anal. Biochem.* 118:131.
15. Marchalonis, J. J., R. E. Cone, and V. Santer. 1971. Enzymatic iodination: a probe for accessible surface proteins on normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124:921.
16. Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*. 27:680.
18. Burnette, W. M. 1981. Western blotting electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195.
19. Capron, M., A. Capron, G. Torpier, H. Bazin, D. Bout, and M. Joseph. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8:127.

878 CROSSREACTIVE SCHISTOSOME ANTIGENIC DETERMINANTS

20. Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology*. 55:695.
21. Phillips, S. M., W. A. Reid, and E. H. Sadun. 1977. The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infection in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. *Cell. Immunol.* 28:750.
22. Moroz, L. A., V. Krygier, and A. O. Kotoulas. 1973. Normal human IgG with antibody activity for keyhole limpet hemocyanin. *Immunology*. 25:441.
23. Balloul, J. M., R. J. Pierce, J. M. Grzych, and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kDa antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17:105.
24. Capron, A., J. Biguet, F. Rose, and A. Vernes. 1965. Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspect immunologique des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte de *S. mansoni*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 109:798.
25. Capron, A., J. Biguet, A. Vernes, and D. Afchain. 1968. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Pathol. Biol.* 16:121.
26. Capron, A., J. Biguet, P. Tran Van Ky, and Y. Moschetto. 1969. Immunological studies in various types of schistosomiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 160:863.
27. Yoshino, T. P., and T. C. Cheny. 1978. Snail host line antigens associated with surface membranes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *J. Parasitol.* 64:752.
28. Yoshino, T. P., and C. J. Bayne. 1983. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol. (Oxf.)*. 5:317.
29. Rivera-Marrero, C. A., and G. V. Hillyer. 1985. Isolation and partial characterization of shared antigens of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* and their evaluation by ELISA and the EITB. *J. Parasitol.* 71:547.
30. Rasmussen, K. R., G. V. Hillyer, and W. M. Kemp. 1985. Isolation and partial characterization of an antigen shared between *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* and *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 71:692.

**ARTICLE H: CARACTERISATION D'UNE SPECIFICITE ANTIGENIQUE ENTRE
LA MOLECULE 38 KDA DU SCHISTOSOME ET DIFFERENTS
MOLLUSQUES D'EAU DOUCE.**

Si à ce stade il semblait difficile de comprendre la relation d'identité épitopique définie entre le schistosome et l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata*, les investigations réalisées parallèlement au niveau des relations antigéniques existants entre le *S.mansoni* et son hôte invertébré *Biomphalaria glabrata*, nous permettent d'apporter quelques éléments de réponse à cette observation relevant plus de la sérendipité que d'une progression logique dans l'analyse expérimentale.

L'application des techniques d'immunoprécipitation et d'inhibition de la fixation de l'anticorps IPLSm1 à son antigène cible, est à l'origine de la démonstration de la répartition ubiquitaire du motif oligosaccharidique spécifique de l'anticorps IPL Sm1 au niveau de toute une série de mollusques d'eau douce.

Les travaux présentés dans cet article peuvent se résumer de la façon suivante :

1°) L'épitope glycanique cible de l'anticorps IPL Sm1 a été caractérisé sur une molécule de 90 kDa du *Biomphalaria glabrata*.

2°) *Bulinus truncatus* et *Lymnaea stagnalis* hôtes respectifs de *Schistosoma haematobium* et de *Trichobilharzia ocella* (schistosome aviaire), expriment cet épitope.

3°) L'identité épitopique n'est pas restreinte aux hôtes du genre schistosome puisque *Lymnaea limosa*, qui n'est pas un hôte du schistosome possède cette structure, inversement ce motif antigénique n'a pu être identifié chez l'escargot terrestre *Helix pomatia*.

Bien que nos travaux s'inscrivent dans le concept général de la mimicrie moléculaire existant entre les trématodes et leurs hôtes invertébrés décrit par CAPRON et al (1965), ils soulèvent néanmoins de nombreuses questions concernant la signification biologique de l'expression dans un parasite humain d'une structure glycanique ancestrale également caractérisée dans l'hémocyanine d'un mollusque marin.

ARTICLE H

Reprinted from Nature, Vol. 323, No. 6087, pp. 443-445, 2 October 1986
 © Macmillan Journals Ltd., 1986

Schistosoma mansoni shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails

C. Dissous, J. M. Grzych & A. Capron

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

The expression of similar antigenic determinants by trematode parasites and their intermediate (invertebrate)¹⁻⁵ or definitive (vertebrate)⁶ hosts has been previously reported. Studies of experimental⁷⁻⁹ and human¹⁰ infection by the parasite *Schistosoma mansoni* have revealed the strong immunogenicity of a surface antigen with a relative molecular mass (M_r) 38,000 (38K). Here we provide evidence that the important protective epitope of the 38K molecule is expressed by the uninfected intermediate host of *S. mansoni*, *Biomphalaria glabrata* and is synthesized both by the mollusc and by the parasite throughout its life cycle, thus confirming our original hypothesis¹¹. Deglycosylation experiments indicate that the protective epitope is an oligosaccharide and in *B. glabrata*, is associated with a 90K component. Analysis of soluble extracts from different freshwater mollusc species shows that the same protective epitope is found in schistosome as well as in non-schistosome hosts. Moreover, it was also found on the haemocyanin of the keyhole limpet (*Megathura crenulata*), a carrier protein widely used in immunological studies.

Immunoprecipitation of antigens isolated from surface-radio-iodinated miracidia using antibodies produced by rats during *S. mansoni* infection, reveals binding to surface components of M_r ranging from 30K to 200K (Fig. 1a). All these antigens contained the epitope defined by the protective monoclonal antibody (IPLSml)⁸ characterized previously on the 38K schistosomula surface molecule (Fig. 1b). These results show that the protective determinant is present in the different parasite stages on various molecules. Indeed, it has already been demonstrated that the IPLSml antibody recognizes high M_r (≥ 150 K) components on the surface of cercariae⁷ and a 115K antigen in the metabolic products from adult worms¹².

Antigenic similarity between trematodes and their respective intermediate hosts has been described¹⁻⁵. We therefore studied the possibility of identity between characterized immunogenic *S. mansoni* antigens and *B. glabrata* components. Antibodies directed against soluble mollusc extract were raised in rabbits and used to immunoprecipitate surface-labelled antigens of miracidia and schistosomula. In both parasite stages, rabbit antibodies bound to surface molecules and the electrophoretic patterns of isolated antigens were similar to that obtained with the IPLSml antibody. The rabbit immunoglobulins bound strongly to the protective epitope of parasite target antigens as they were able to inhibit (up to 80%) the binding of IPLSml to the 38K schistosomula antigen in a solid-phase competitive assay⁹. It is important to note that antigenic identity between *B. glabrata* and *S. mansoni* was only associated with the 38K antigen among the surface schistosomula components recognized by infected rat antisera.

The observation that the IPLSml antibody bound to a number of molecular structures in the different developmental stages of the parasite suggested that the protective epitope could be found on carbohydrate chain(s) linked to different protein or proteolipidic structures. This was supported by work showing that rabbit antibodies produced against deglycosylated mollusc extract did not recognize surface-labelled parasite antigens. These antibodies were also unable to compete with the IPLSml antibody for binding to the 38K molecule (<5% inhibition was observed in solid-phase radioimmunoassay).

The identification of cross-reactive *B. glabrata* components was investigated by SDS-polyacrylamide electrophoresis (PAGE) of soluble mollusc extract followed by Western blotting

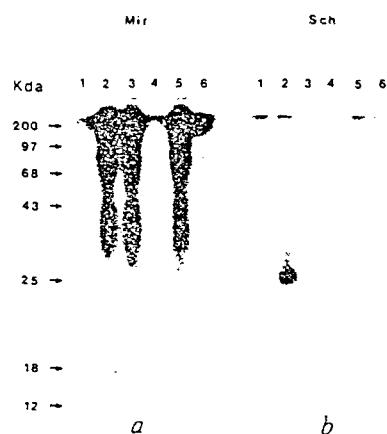


Fig. 1 Antigenic identity between *S. mansoni* target antigens and *B. glabrata*. A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was used. Miracidia were prepared from eggs collected from livers of infected golden hamsters¹⁰. Schistosomula were obtained by passage of cercariae through isolated pieces of Swiss mouse skin¹¹. Parasites were labelled by lactoperoxidase-catalysed radioiodination¹³ and antigens were isolated and analysed by SDS-PAGE as previously described¹⁰. *B. glabrata* (albino strain) bodies were ground in liquid nitrogen until a fine powder was obtained. The powder was dissolved in distilled water (8 mg g⁻¹) and sonicated at 4°C for 4 × 15 s at 25 W. The soluble mollusc extract was obtained following a 1 h centrifugation at 100,000 g at 4°C. New Zealand rabbits were immunized by injection of 1 ml (5 mg protein) mollusc extract or 1 ml extract that was previously deglycosylated by the trifluoromethanesulphonic acid method of Edge *et al.*²⁰. Immunization was performed according to the technique of Vaitukaitis *et al.*²¹ in the presence of complete Freund's adjuvant. Surface antigens of miracidia (a) or schistosomula (b) were immunoprecipitated by normal Fischer rat serum (1), serum from Fischer rats infected by *S. mansoni* for 100 days (2), IPLSml monoclonal antibody (3), normal rabbit serum (4), anti-*B. glabrata* rabbit serum (5) or anti-deglycosylated *B. glabrata* rabbit serum (6).

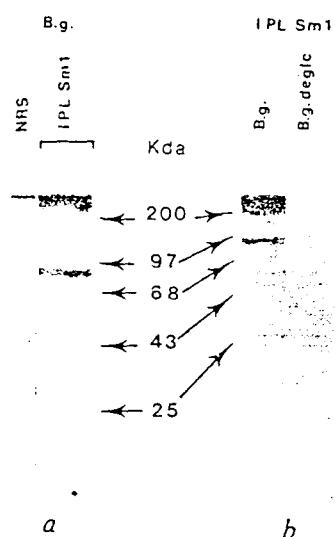


Fig. 2 Identification of cross-reactive *B. glabrata* components. a, *B. glabrata* extract (30 µg protein) was analysed by SDS-PAGE under reducing conditions²², then transferred onto nitrocellulose. Western blotting was performed according to the technique of Burnette²³ using 10 µl normal rat serum (NRS) or 10 µg IPLSml monoclonal antibody (two different preparations were used). Fixed antibodies were revealed after incubation with ¹²⁵I-labelled rabbit anti-rat IgG. b, SDS-PAGE analysis of deglycosylated²⁰ *B. glabrata* extract followed by Western blotting using IPLSml monoclonal antibody.



using the IPLSml antibody. The antibody bound preferentially to a 90K *B. glabrata* component (Fig. 2). Several additional fainter bands with a variable intensity in different experiments are also seen, suggesting that the cross-reactive epitope could be found to a lesser extent on other molecular structures. The 90K band was no longer labelled when deglycosylated *B. glabrata* extract was analysed, confirming the glycanic nature of the epitope defined by IPLSml.

These data indicate that *S. mansoni* and its intermediate host share a common glycanic determinant previously demonstrated to be active in immunity to schistosomes^{8,9}. The presence of this epitope in metabolic products from adult worms has been described and the present results have shown that it is also distributed on various surface components of miracidia, that is, on the infective larvae before they have penetrated into the molluscan host. These two observations argue against the possibility that the 38K protective epitope on cercariae and newly-transformed schistosomula could result from the acquisition of molluscan components by specific or non-specific adsorption and show that the synthesis of this carbohydrate moiety can occur both in the mollusc and in the parasite throughout its life cycle. Such results raise questions about the role of antigenic identity in host-parasite relationships and how it could arise. It has been supposed that the existence of cross-reactive antigens results from an adaptation of the parasite to its host and thereby prevents immune recognition. Indeed, in non-permissive mollusc hosts, immune killing of parasites by phagocytic cells has been described¹³ and is comparable to the antibody-dependent cellular cytotoxicity observed in vertebrate hosts¹⁴.

Previous studies using sera from patients infected by different trematodes indicate that the 38K schistosomula antigen could be specific for the *Schistosoma* genus¹⁰; we tested this by analysis of mollusc extracts from schistosome or non-schistosome host species. *B. glabrata* extracts strongly inhibited (up to 95% in

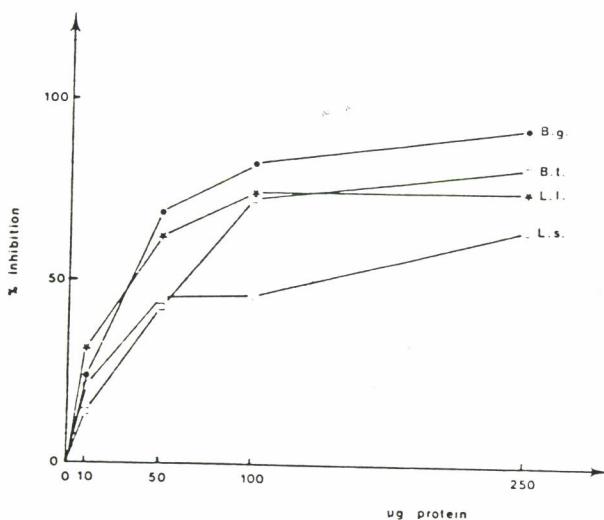


Fig. 3 Inhibition of IPLSml antibody binding to the 38K *S. mansoni* antigen by different fresh water mollusc extracts. Detergent extract from 250 ^{125}I -labelled schistosomula was incubated with 5 μg IPLSml antibody in the absence or in the presence of increasing concentrations (10, 50, 100 or 250 μg protein) of *B. glabrata* (B.g.), *Bulinus truncatus* (B.t.), *Lymnaea stagnalis* (L.s.) or *Lymnaea limosa* (L.l.) mollusc extracts. *B. truncatus* were obtained from the Pasteur Institute of Alger and *L. stagnalis* from the Paul Ehrlich Institute (Frankfurt, Germany). *L. limosa* were collected from local streams in the north of France. Immune complexes were analysed by SDS-PAGE¹⁹ and the amount of 38K antigen immunoprecipitated was determined by counting polyacrylamide gel slices containing the molecule. The percentages of inhibition were calculated as follows: $a - b/a$ where a and b represent, respectively, the amount of radioactivity isolated in the absence or in the presence of mollusc extract.

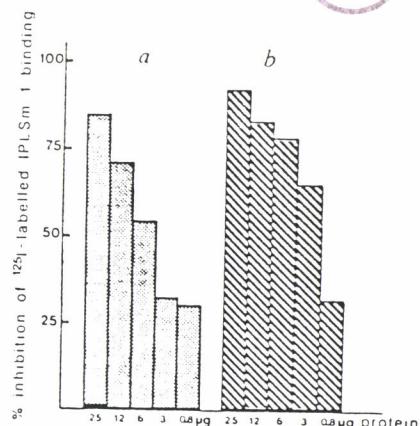


Fig. 4 Inhibition by KLH of radiolabelled IPLSml binding to *S. mansoni* antigen. Experiments were carried out on polyvinylchloride (PVC) microtitre plates coated with parasite antigen according to the method previously described⁶. Fifty microlitres of ^{125}I -labelled IPLSml antibody were simultaneously added to each well with in *a*, 50 μl various concentrations of purified keyhole limpet haemocyanin (KLH) (France Biochem, Meudon) \square , or KLH deglycosylated by the method of Edge et al.¹⁹ \blacksquare , and in *b*, 50 μl of native \square , or deglycosylated \blacksquare . *B. glabrata* extract at different protein concentrations.

the presence of 250 μg total protein) the immunoprecipitation of the labelled 38K antigen by IPLSml antibody (Fig. 3). *Bulinus truncatus* and *Lymnaea stagnalis*, which are the respective intermediate hosts for *Schistosoma haematobium* and *Trichobilharzia ocellata* (an avian schistosome), were also able to compete with the *S. mansoni* antigen, showing respectively, an 80 and 65% decrease of the isolated labelled 38K molecule for the same maximal dose of protein added. Moreover, a similar level of inhibition (75%) was observed with the non-schistosome host *Lymnaea limosa*. Extract from the land snail *Helix pomatia* did not compete with the 38K antigen (results not shown) and such data suggested that the protective epitope could be found in many freshwater snail species without restriction to schistosome hosts.

Further experiments showed that haemocyanin from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*) also possesses the carbohydrate protective epitope. Figure 4 illustrates the competition of purified keyhole limpet haemocyanin for the binding of the IPLSml antibody to parasite antigens and demonstrates the role of carbohydrate moieties in the inhibition. Thus, these results show the expression in a human parasite of a major antigenic epitope whose origins are found in the marine mollusc *M. crenulata* (that has been in existence for several hundred million years) as well as in freshwater snails. The conservation of this oligosaccharide structure throughout evolution raises questions of phylogeny and adaptation. It has been recently reported in various biological systems that membrane oligosaccharides are important in osmotic adaptation¹⁵ and it is tempting to speculate that important changes of osmolarity to which schistosomes are exposed during the rapid adaptation of free larval forms to invertebrate or vertebrate hosts might rely on this highly preserved structure. Work is presently in progress to explore the possible use of the oligosaccharide molecule in immunization against schistosomes.

We thank J. Trolet and S. Torres for their technical assistance, C. Colson and M. F. Massard for the preparation of the manuscript, H. Neibell and H. D. Brede for giving us *Lymnaea stagnalis* snails and B. Hamraoui for giving us *Bulinus truncatus* snails. Supported by INSERM U 167-CNRS 624 and the WHO-UNDP Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

Received 30 April; accepted 31 July 1986.

1. Capron, A., Biguet, J., Rose, F. & Vernes, A. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **109**, 798-810 (1965).
2. Yoshino, T. P. & Cheng, T. C. *J. Parasit.* **64**, 754-756 (1978).
3. Yoshino, T. P. & Bayne, C. J. *Parasite Immun.* **5**, 317-328 (1983).
4. Rivera-Marrero, C. A. & Hillyer, G. V. *J. Parasit.* **71**, 547-555 (1985).
5. Rasmussen, K. R., Hillyer, G. V. & Kemp, W. M. *J. Parasit.* **71**, 792-798 (1985).
6. Damian, R. T. *Am. Nat.* **98**, 129-149 (1964).
7. Dissous, C., Grzych, J. M. & Capron, A. *J. Immun.* **129**, 2232-2234 (1982).
8. Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. & Capron, A. *J. Immun.* **129**, 2739-2743 (1982).
9. Grzych, J. M. *et al.* *Nature* **315**, 74-76 (1985).
10. Dissous, C., Prata, A. & Capron, A. *J. Infect. Dis.* **149**, 227-233 (1984).
11. Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. & Afchain, D. *Path. Biol.* **16**, 121-138 (1968).
12. Dissous, C. & Capron, A. *FEBS Lett.* **162**, 355-359 (1983).
13. Bayne, C. J., Buckley, P. M. & Dewan, P. C. *J. Parasit.* **66**, 413-419 (1980).
14. Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M. & Torpier, G. *Immun. Rev.* **61**, 41-66 (1982).
15. Miller, K. J., Kennedy, E. P. & Reinhold, V. N. *Science* **231**, 48-51 (1986).
16. Yoshino, T. P., Cheng, T. C. & Renwrantz, L. R. *J. Parasit.* **63**, 818-824 (1977).
17. Clegg, J. A. & Smithers, S. R. *Int. J. Parasit.* **2**, 79-98 (1972).
18. Marchalonis, J. J., Cone, R. E. & Santer, V. *Biochem. J.* **124**, 921-927 (1971).
19. Dissous, C., Dissous, C. & Capron, A. *Mol. Biochem. Parasit.* **3**, 215-225 (1981).
20. Edge, A. S. B., Faltrynek, C. R., Hof, L., Reichen, L. E. & Weber, P. *Analyt. Biochem.* **118**, 131-137 (1981).
21. Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E. & Ross, G. T. *J. Clin. Endocrin.* **33**, 988-991 (1971).
22. Laemmli, U. K. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
23. Burnette, W. N. *Analyt. Biochem.* **112**, 195-205 (1981).

CHAPITRE IV.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'application de la technique d'hybridation cellulaire dans le domaine de la schistosomiase expérimentale du rat, puis l'exploration fonctionnelle des sondes produites sont à l'origine de quatre observations majeures :

- La caractérisation d'un des immunogènes majeurs de *Schistosoma mansoni*.
- L'identification de mécanismes régulateurs de la réponse immune par le biais d'anticorps bloquants.
- La construction d'anticorps anti-idiotypiques portant l'image interne d'un épitope oligosaccharidique de *Schistosoma mansoni*.
- L'identification d'une communauté antigénique entre le *Schistosoma mansoni* et la molécule d'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata*.

Si certains de nos résultats apportent une réponse aux questions posées dans nos hypothèses de travail, d'autres appellent de nombreux commentaires quant à leur signification biologique et leurs conséquences pratiques.

Par soucis de clarté nous discuterons respectivement chacun des différents thèmes tout en gardant à l'esprit leurs étroites interactions.

A) ROLE ET SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DE L'ANTIGENE 38kDa

1°) L'antigène 38 kDa dans le contexte des antigènes potentiellement protecteurs.

Les investigations moléculaires développées dans notre étude nous ont conduits grâce à l'anticorps monoclonal IPL Sm1, à établir une relation directe entre l'expression d'un mécanisme effecteur *in vitro*, d'une protection *in vivo* et l'antigène de 38 kDa du schistosomule de *S.mansoni*.

L'intérêt particulier de cette molécule réside dans le fait qu'elle appartient au groupe des antigènes de 30 à 40 kDa reconnu par les sérum de nombreux systèmes d'infection expérimentale et humaine (DISSOUS *et al* 1981, DISSOUS et CAPRON 1982a, SIMPSON *et al* 1983).

L'antigène 38 kDa induit d'autre part dans 97% des cas étudiés dans une population de 120 sujets bilharziens la production d'anticorps spécifiques. Dans ce groupe de patients l'intensité de la réponse anti-38 kDa croît avec l'âge des sujets avant d'atteindre un plateau à l'âge adulte pour décroître ensuite, suivant ainsi un étroit parallélisme avec la courbe de prévalence et d'infection classiquement admise par les épidémiologistes. Dans ces conditions la réponse anti-38 kDa peut donc être considérée comme un marqueur de l'immunité anti-parasitaire.

Depuis 1982 de nombreux auteurs ont proposé différentes molécules parasitaires comme candidats pour l'élaboration d'un matériel vaccinal spécifique du Schistosome. Ces antigènes d'un poids moléculaire s'échelonnant de 27 à 153 kDa ont été retenus sur la base des techniques d'immunisation directe, ou sur l'argument indirect de la protection conférée passivement par l'injection d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces antigènes (Tableau 3).

TABLEAU 3:

-LES ANTIGENES POTENTIELLEMENT PROTECTEURS DE
SCHISTOSOMA MANSONI-

Antigènes	Immunisation	Transfert passif	% de protection				Références
			souris	hamster	rat	singe	
<u>Carbohydrates</u>							
	IPLSm1 MAB(AB1)	-	-	53-62	-	-	Grzych et al 1982
JM8-36MAB (AB2)		-	-	50-76	-	-	Grzych et al 1985
	Ac anti-JM8-36 (AB3)	-	-	46	-	-	Grzych et al 1985
KLH		-	-	50-75	-	-	Grzych et al 1987
	Ac anti-KLH	-	-	48	-	-	Grzych et al 1987
<u>Protéines clonées</u>							
P28		43	-	65	-	-	Balloul et al 1987b
	Ac anti-P28	-	-	60	-	-	Balloul et al 1987b
	¢ anti-P28	-	-	85	-	-	Auriault et al 1987
P28 clonée		-	50	65	35-8	Balloul et al 1987a,c	
28 kDa		38	-	-	-	-	Harn et al 1987
	anti-28 kDa MAB	50	-	-	-	-	Harn et al 1985
SWAP (97 kDa)		60-67	-	-	-	-	Sher et al 1986
Sj26		30	-	-	-	-	Smith et al 1986
<u>Allergènes</u>							
22-26 kDa		-	-	60	-	-	Damonneville et al 1986
	anti-26 kDa MAB	-	-	40-60	-	-	Verwaerde et al 1987

Les molécules étudiées dans ces différents modèles d'infection expérimentale ont permis d'établir des taux variables d'immunité vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve.

Deux antigènes méritent pourtant une attention particulière. Un antigène protéique de PM 28 kDa (P28) isolé des produits du métabolisme du Schistosome adulte et aussi présent dans le schistosomule, qui par immunisation sous sa forme native ou recombinante induit des niveaux de protection très significatifs dans différents modèles d'infection (rats, souris, hamsters et primates) (BALLOUL *et al* 1985 ,1987 a et b).

Cet antigène suscite lui aussi la production d'anticorps effecteurs d'isotype IgG2a et IgE chez le rat, ce qui confirme une fois de plus la relation existant dans certains modèles entre l'expression des mécanismes de cytotoxicité *in vitro* et l'immunité à la schistosomiase.

Le deuxième antigène de poids moléculaire 97 kDa doit être mentionné car il installe dans le système murin une immunité significative par le biais d'une intense réponse à médiation humorale (SHER *et al* 1986, JAMES *et al* 1986).

Dans le contexte général des antigènes protecteurs, l'antigène 38 kDa tient une place particulière de par la nature glycanique de son épitope actif mais surtout de par sa dualité d'induction d'anticorps antagonistes.

2°) Signification biologique de l'épitope spécifique de l'anticorps IPL Sm1

La caractérisation de l'antigène 38 kDa et plus précisément celle de son épitope défini par l'anticorps monoclonal IPL Sm1 déborde largement du cadre de nos investigations initiales et soulève aujourd'hui de multiples questions quant à sa signification biologique et à sa répartition ubiquitaire au niveau de certaines structures du parasite mais aussi dans des modèles très éloignés philogéniquement.

Cet épitope, dont la nature glycanique a été suggérée puis définitivement établie (DISSOUS et al 1982a et b DISSOUS et al 1986), a été caractérisé sur différentes structures du parasite *S.mansoni*, chez le ver adulte dans les produits métaboliques du parasite sur une molécule de 115 kDa (DISSOUS et CAPRON 1983), et dans le miracidium sur toute une série d'antigènes allant de 30 à 200 kDa.

Ces études apportent un support moléculaire à la notion d'immunité concomitante et pourraient être reliées au fait que l'antigène 38 kDa induit à la fois la production d'anticorps effecteurs et d'anticorps bloquants ce qui permettrait au parasite d'échapper à la réponse immunitaire qu'il suscite.

PHILLIPS et al (1977) avaient déjà démontré chez le rat que l'immunité à la réinfection associait des phases de forte et de faible susceptibilité à la réinfection, qui ne sont pas sans rappeler les études de M.Capron et al (1984) démontrant des niveaux très variables de protection lors du transfert chez le rat d'éosinophiles immuns prélevés à différentes périodes de l'infection.

On peut supposer ici que l'expression d'un même épitope présent sur des molécules des différents stades du parasite puisse être en partie responsable de la modulation de l'expression isotypique de la réponse immunitaire et donc de l'induction d'anticorps d'isotypes différents voire même antagonistes.

Outre son expression sur des antigènes de stades parasitaires, l'épitope spécifique de l'antigène 38 kDa a aussi été identifié chez l'hôte intermédiaire de *S.mansoni* le mollusque *Biomphalaria glabrata*. Les anticorps anti-*B.glabrata* préparés chez le lapin précipitent les mêmes molécules aux niveaux des différents stades parasitaires que celles définies par l'anticorps IPL Sm1 et inhibent la fixation de l'anticorps monoclonal à son antigène cible (80 %). Ces réactions ne sont pas observées pour les sérum de lapins immunisés par des extraits du mollusque préalablement déglycosylés, confirmant de fait la nature sucrée de l'épitope considéré. Inversement l'anticorps IPL Sm1 reconnaît des structures du *B.glabrata* d'un poids moléculaire 90 kDa.

Ces observations prouvent de toute évidence que l'épitope spécifique de l'anticorps IPL Sm1 est aussi exprimé par l'hôte intermédiaire non infecté et confirment l'existence d'une identité moléculaire entre le trématode et son hôte, démontrée il y a quelques vingt années dans notre laboratoire par CAPRON *et al* (1965).

Cette identité moléculaire n'est pourtant pas restreinte au système *S.mansoni*-*Biomphalaria glabrata* puisque *Bulinus truncatus* et *Lymnaea stagnalis* hôtes respectifs de *Schistosoma haematobium* et de *Trichobilharzia ocella*, ainsi que *Lymnaea limosa* qui n'est pas un hôte du Schistosome, expriment cet épitope. Par contre cette structure glycanique n'a pas été caractérisée sur l'escargot terrestre *Helix pomotia*.

Dans ce contexte, l'identification de cet épitope dans l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata* pose de toute évidence le problème fascinant de la conservation au cours de l'évolution d'une structure oligosaccharidique, dont les origines remontent à plusieurs centaines de millions d'années. Il faut cependant noter que des structures oligosacchariques ont récemment été décrites par MILLER *et al* (1986) pour leur rôle essentiel dans l'adaptation osmotique et l'osmolarité des microorganismes. Il est donc tentant d'expliquer la conservation de l'épitope glycanique spécifique de l'anticorps IPL Sm1 dans le cadre de l'adaptation du Schistosome aux brusques modifications de l'osmolarité de son environnement pendant les phases d'adaptation rapide qu'il doit effectuer du stade larvaire libre dans l'eau douce à son état captif dans les tissus de son hôte définitif.

B) LES ANTICORPS BLOQUANTS DANS LA SCHISTOSOMIASE

L'exploration des propriétés biologiques et fonctionnelles de l'anticorps monoclonal IPL Sm3 d'isotype IgG2c est à l'origine de toute une série d'investigations qui nous ont conduits à la mise en évidence de mécanismes de régulation isotypique et à la caractérisation d'anticorps bloquants dans les schistosomiases.

Sur les bases de l'absence totale d'activité effectrice de l'anticorps IPL Sm3 et de sa spécificité pour l'antigène 38kDa précédemment définie par l'anticorps monoclonal protecteur IPL Sm1, nous avons élaboré puis vérifié *in vivo* et *in vitro* l'hypothèse du rôle modulateur de l'anticorps IPL Sm3 sur l'expression des propriétés effectrices de l'anticorps IPL Sm1.

Dans une première série d'études réalisée dans le système de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles, nous démontrons clairement le rôle inhibiteur de l'anticorps IPL Sm3 sur les propriétés cytotoxiques de l'anticorps IPL Sm1. Cette inhibition s'exprime d'une manière dose-dépendante lors de l'addition de l'anticorps dans le système ainsi défini de quantités croissantes de l'anticorps IPL Sm3, mais peut aussi être induite par la préincubation des schistosomules par l'anticorps IPL Sm3.

Des études complémentaires révèlent que l'activité inhibitrice de l'anticorps IPL Sm3 n'est pas restreinte au modèle monoclonal mais qu'elle s'exerce aussi à l'encontre des anticorps polyclonaux effecteurs présents dans le sérum de rats infectés par *S.mansoni* suggérant que ce blocage touche un facteur essentiel de l'expression du mécanisme de cytotoxicité et apporte un premier argument en faveur du rôle fonctionnel de tels anticorps dans l'infection naturelle. Par contre, aucune activité modulatrice n'a été observée dans le cas des modèles d'ADCC impliquant des anticorps d'isotype IgE, que ce soit en présence de macrophages ou d'éosinophiles, indiquant ainsi une restriction isotypique stricte vis-à-vis des anticorps de classe IgG.

L'activité inhibitrice de l'anticorps IPL Sm3 posait tout naturellement la définition du mécanisme moléculaire sous-tendant le blocage. Si, de par la spécificité connue des 2 anticorps monoclonaux pour le même antigène, l'hypothèse d'une compétition au niveau de la cible parasitaire pouvait être évoquée, il ne fallait pas négliger la relation établissant l'existence de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines G à la surface des éosinophiles (M.CAPRON 1978b).

Nos travaux expérimentaux ont permis la définition d'un double système de blocage. Le premier se situe au niveau de la cible parasitaire comme le démontre l'inhibition obtenue par les fragments $F(ab')_2$ de l'anticorps IPL Sm3. Cette observation suppose néanmoins une plus forte affinité de l'anticorps IPL Sm3 pour l'antigène 38 kDa par rapport à l'anticorps IPL Sm1, dont la réalité a pu être vérifiée au cours d'expériences d'inhibition croisée des deux anticorps à leur antigène cible adsorbé sur un support solide. Il faut cependant évoquer que cette inhibition pourrait aussi résulter d'une modification des structures antigéniques du parasite induite par la fixation de l'anticorps IPL Sm3 qui interdirait la fixation ultérieure de l'anticorps IPL Sm1.

Indépendamment de la compétition des deux anticorps pour le même antigène, nous avons pu caractériser un second niveau d'interaction faisant intervenir les $Fc\gamma R_c$ des éosinophiles, comme le révèle l'activité inhibitrice des fragments Fc de l'anticorps IPL Sm3 ou les IgG2c myélomateuses lors des expériences de cytotoxicité réalisées en présence de cellules effectrices préalablement incubées dans ces préparations.

Dans ce contexte les travaux de KHALIFE *et al* (1985a et b) confirment nos résultats et apportent différents arguments en faveur de la pertinence biologique des anticorps antagonistes dans l'infection par *S.mansoni*.

Ces auteurs ont visualisé l'interaction des anticorps IgG2a et IgG2c au niveau du $Fc\gamma R_c$ de l'éosinophile grâce à la technique de formation de rosettes observée entre les éosinophiles et des globules rouges de mouton sensibilisés soit par des IgG2a ou des IgG2c. Dans ces conditions l'addition de l'un ou l'autre des isotypes inhibe indifféremment la formation de rosettes dans les deux systèmes.

Cette compétition peut aussi se traduire selon les mêmes auteurs par une inhibition de l'activation cellulaire mesurable en fonction du relargrage d'une enzyme : la peroxydase de l'éosinophile (EPO). L'activation de l'éosinophile peut être induite par un double signal réalisé par une préincubation des cellules effectrices en présence d'anticorps IgG2a suivie d'une activation déclenchée par l'adjonction de l'anti-sérum correspondant (anti-IgG2a).

Dans ce modèle la préincubation des éosinophiles par l'IgG2c inhibe le relarguage d'EPO. Ce dernier résultat et la démonstration de l'activité toxique de l'EPO vis-à-vis du schistosomule pourraient rendre compte, du moins partiellement, du rôle bloquant de l'IgG2c ou de sa partie Fc dans la fonction effectrice de l'éosinophile.

Enfin cet argument tient aussi compte des observations réalisées *ex vivo* concernant l'occupation des Fc γ Rc par les anticorps cytophiles qui a pu être vérifiée au cours d'une étude cinétique dans l'infection expérimentale du rat sur des éosinophiles résidents de la cavité péritonéale. Au niveau des éosinophiles péritonéaux la présence d'anticorps cytophiles d'isotype IgG2a a pu être visualisée jusqu'à la 4^{ème} semaine de l'infection par le Schistosome puis une décroissance est observée, doublée d'une apparition d'anticorps cytophiles d'isotype IgG2c qui pourrait donc expliquer la faible activité effectrice de ces cellules pour des larves parasitaires non opsonisées et leur faible pouvoir protecteur (M.CAPRON *et al* 1979-1984).

L'ensemble de ces observations suggère que les anticorps cytophiles d'isotype IgG2a pourraient être déplacés de leurs Fc γ Rc par les anticorps d'isotype IgG2c, hypothèse vérifiée *in vitro* et *in vivo* dans le cas des éosinophiles prélevés chez le rat infecté par *S.mansoni* à différentes périodes de l'infection, et permet d'autre part d'expliquer la restriction isotypique de l'activité bloquante de l'anticorps IPL Sm3 vis-à-vis des anticorps effecteurs d'isotypes IgG puisqu'au niveau des éosinophiles aucune interaction n'a pu être démontrée entre les Fc γ Rc et les Fc Σ Rc (M.CAPRON *et al* 1981b).

Bien que le concept des anticorps bloquants s'intègre parfaitement dans le contexte de l'éosinotoxicité, l'argument majeur du rôle fonctionnel des anticorps bloquants dans la schistosomiase a été apporté par les expériences de déplétion sélective en anticorps de classe IgG2c.

Ces études démontrent que l'adsorption des sérum d'infection expérimentale du rat sur la protéine A sépharose exalte leur fonction cytotoxique, même à des périodes précédemment définies comme dénuées de toute activité et tout particulièrement au 63^{ème}

jour de l'infection où les éosinophiles de rats infectés n'expriment aucune activité cytotoxique pour des larves parasitaires non opsonisées (M.CAPRON *et al* 1979). Ainsi est-il possible d'établir par cette étude cinétique un étroit parallélisme entre la présence d'anticorps bloquants et anticorps cytophiles d'isotype IgG2c à une phase de décroissance de l'immunité.

Mais la notion des mécanismes de régulation isotypique prend toute sa réelle dimension dans le cadre de l'infection humaine, où l'identification d'anticorps bloquants d'isotype IgM permet de reconsiderer l'absence de corrélation entre l'expression de certains paramètres de l'infection à *S.mansoni* et le réel statut immunitaire de l'hôte.

Si l'on excepte l'aspect particulier de la compétition des anticorps effecteurs et bloquants au niveau des récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines des éosinophiles, les anticorps d'isotype IgM bloquants humains reproduisent les effets précédemment évoqués dans le cas des anticorps d'isotype IgG2c du rat.

En effet ces anticorps IgM n'expriment aucune activité cytotoxique en présence d'éosinophiles humains vis-à-vis du schistosomule mais inhibent l'activité effectrice des anticorps d'isotype IgG présents dans les sérum de patients infectés.

L'approche antigénique permet à nouveau d'établir une relation directe entre le mécanisme d'inhibition et l'affinité respective des fractions IgG et IgM isolées des sérum d'infection pour un groupe d'antigènes de poids moléculaire compris entre 30 et 40 kDa dont fait partie la glycoprotéine 38 kDa et qui suscite dans 95% des cas la production d'anticorps spécifiques.

Une relation plus étroite a pu être définie pour ces 2 fractions isotypiques par rapport à l'épitope reconnu par l'anticorps IPL Sm 1 sur l'antigène 38 kDa et démontre que les anticorps IgM et IgG comme le sérum total inhibent la fixation des anticorps IPL Sm1 et IPL Sm3 à leur antigène cible, suggérant de fait que chez l'homme cette molécule peut aussi exprimer sa dualité fonctionnelle par l'induction d'anticorps IgM bloquants et IgG effecteurs.

Cette dernière observation est confortée par la démonstration des taux significativement plus élevés d'anticorps d'isotype IgM spécifiques de l'antigène 38 kDa dans les sérums d'un groupe d'individus classés comme susceptibles par rapport aux taux sériques définis dans les sérums d'un groupe de sujets classés selon les mêmes paramètres comme résistants vis-à-vis d'une infection post-thérapeutique.

Bien que ces investigations soient le résultat d'observations réalisées *in vitro*, elles indiquent néanmoins que la susceptibilité à la réinfection chez l'homme pourrait s'expliquer par la présence d'anticorps bloquants. D'autre part, elles supposent de manière indirecte le rôle effecteur des anticorps de classe IgG dirigés contre l'antigène 38 kDa. Le fait que ces anticorps soient un facteur nécessaire mais non limitant des facteurs de l'immunité, et l'identification des anticorps bloquants suggèrent que l'acquisition de l'immunité refléterait la perte d'une réponse bloquante, plutôt que l'acquisition d'une réponse effectrice. Cette donnée essentielle revêt une importance considérable en ce qui concerne la définition des structures moléculaires susceptibles d'être utilisées dans le domaine de l'immunoprophylaxie et pose en filigranes l'existence des relations potentielles liant la nature glycanique d'un antigène parasitaire et l'induction d'anticorps bloquants.

Enfin, en dehors des implications vaccinales, l'existence des anticorps bloquants révèle un mécanisme élégant permettant au parasite d'échapper à la réponse immune effectrice qu'il suscite et témoigne de l'extraordinaire adaptation de ce parasite à son hôte vertébré.

C) APPROCHE IDIOTYPIQUE DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE DE L'ANTIGENE 38 KDA.

Bien que sa nature glycoprotéique et que sa capacité à induire des anticorps effecteurs et des anticorps bloquants limitent considérablement l'exploitation de l'antigène 38 kDa dans l'immunoprophylaxie des schistosomiases, il nous a été néanmoins possible

de démontrer indirectement par l'alternative des anticorps anti-idiotypiques le rôle protecteur de son épitope reconnu par l'anticorps IPL Sm1.

Toute une série d'arguments expérimentaux plaide en faveur de la nature anti-idiotypique bêta (Ab2 B) de l'anticorps monoclonal JM8-36, et donc du fait qu'il porte l'image interne d'un épitope de l'antigène 38 kDa.

L'inhibition exercée sur la liaison de l'anticorps IPL Sm1 à son antigène cible indique que l'anticorps JM8-36 se lie à une structure idotypique de l'anticorps IPL Sm1 proche ou faisant partie du site paratopique.

Les relations structurales et conformationnelles liant l'épitope glycanique de l'antigène GP 38 et l'anticorps JM8-36 ont pu être appréhendées au cours des expériences d'immunisation d'animaux naïfs par des préparations purifiées de l'anticorps JM8-36. Celles-ci induisent la production d'anticorps Ab3 polyclonaux inhibant la fixation de l'anticorps IPL Sm1 à son antigène cible, révélant ainsi une étroite spécificité pour la même molécule, observation confirmée par les techniques d'immunofluorescence sur coupes de schistosomules où ces 2 anticorps réalisent le marquage des structures de surface du parasite.

Outre la capacité de l'anticorps à susciter chez un animal n'ayant jamais été mis en contact avec des structures parasitaires des anticorps spécifiques du Schistosome, l'identité structurale entre l'anticorps JM8-36 et la molécule 38 kDa du *S.mansonii* se double d'une identité fonctionnelle en ce qui concerne certains paramètres de l'immunité anti-parasitaire.

Cette relation est particulièrement bien illustrée par les propriétés cytotoxiques des anticorps Ab3 en présence d'éosinophiles comparables à celles définies pour les anticorps Ab1 (IPL Sm1) ou les sérums d'infection, mais aussi au niveau des isotypes impliqués dans cette réponse. Nous avons en effet pu, lors de récentes expériences de cytotoxicité, démontrer que la cytotoxicité induite par ces anticorps Ab3 est abolie lorsque les cellules effectrices sont préincubées en présence d'IgG2a myélomateuses, suggérant que l'immunisation par l'anticorps JM8-36 provoque l'apparition d'anticorps Ab3 cytotoxiques d'isotype IgG2a.

Bien que nous n'ayons pas établi l'ensemble du profil isotypique de la réponse Ab3 et notamment la présence d'anticorps bloquants, cette observation est pour le moins encourageante dans l'optique de l'application immunoprophylactique où l'on souhaite susciter la production d'anticorps effecteurs. Ces résultats ajoutés aux niveaux très significatifs de protection enregistrés chez le rat vis-à-vis d'une infection cercarienne d'épreuve apportent un faisceau d'arguments convergents en faveur des réelles potentialités protectrices des préparations anti-idiotypiques dans l'immunoprophylaxie des schistosomiases.

Il semble bien sûr à ce stade difficile de spéculer de l'efficacité de telles structures idiotypiques dans l'infection humaine, mais l'on peut toutefois mentionner des expériences préliminaires qui nous ont conduits à la mise en évidence d'idiotypes croisés entre le rat et l'homme. Ainsi avons nous pu démontrer que les anticorps humains présents dans le sérum de patients infectés peuvent se fixer à l'anticorps JM8-36 ou inhiber la liaison de l'anticorps JM8-36 à l'anticorps IPL Sm1.

Ces résultats, bien que préliminaires, et la similitude des mécanismes effecteurs décrits chez le rat et chez l'homme suggèrent pourtant que l'on peut favorablement envisager ces anticorps anti-idiotypiques comme des antigènes de substitutions applicables à la vaccination humaine.

De plus, l'identité structurale existant entre l'anticorps anti-idiotypique JM8-36 et l'épitope sucré de l'antigène 38 kDa apparaît comme un outil de choix dans l'approche de la réponse isotypique à un épitope donné au cours des infections expérimentales et humaines par le *S.mansoni*.. Elle permet de plus d'entreprendre l'étude des relations potentielles existant entre la nature chimique d'un épitope et l'orientation de l'expression isotypique en fonction de la nature glycanique ou protéique d'un même motif épitopique.

Finalement il est possible d'envisager par des techniques appropriées de caractériser la structure peptidique représentant l'image interne de l'épitope spécifique de l'anticorps IPL Sm, première étape vers la production d'épitopes protéiques de synthèse.

D) COMMUNAUTE EPITOPIQUE ENTRE LE SCHISTOSOME ET LA KLH

Alors qu'à de nombreux égards la caractérisation chimique de l'épitope de l'antigène 38 kDa spécifique de l'anticorps IPL Sm1 se trouvait limitée par sa nature oligosaccharidique et sa faible représentation pondérale au niveau des structures antigéniques parasitaires, la découverte d'une communauté entre l'antigène 38 kDa et l'hémocyanine du mollusque marin *Megathura crenulata* KLH ouvrait de nouvelles perspectives d'approche.

Depuis l'observation originale de l'induction au cours de l'immunisation par la KLH d'anticorps spécifiques du Schistosome, de nombreux résultats expérimentaux sont venus témoigner de l'identité structurale et fonctionnelle des déterminants exprimés conjointement par la KLH et l'antigène 38 kDa.

Les premières bases moléculaires de cette identité sont fournies par les études d'immunoprecipitation et de "Western blotting" indiquant que les sérums de rats immunisés par KLH immunoprecipitent l'antigène 38 kDa du schistosomule et qu'en inversement les sérums de rats infectés par *S.mansoni* ou l'anticorps IPL Sm1 présentent une affinité pour différentes structures de la KLH dont les poids moléculaires s'échelonnent de 150 à 200 kDa.

Nous avons par la suite pu restreindre cette communauté antigénique au niveau épitopique par une approche fine des sites de fixation des anticorps anti-KLH grâce aux techniques d'inhibition de la liaison de l'anticorps IPL Sm1 radiomarqué à son antigène cible. Dans ces conditions les anticorps anti-KLH induisent des taux d'inhibition tout-à-fait comparables à ceux décrits pour les sérums d'infection par Schistosome, l'anticorps IPL Sm1 froid ou la molécule de KLH.

L'identité structurale a d'autre part pu être argumentée sur les capacités de l'anticorps anti-idiotypique JM8-36 à inhiber la fixation de la KLH radiomarquée à l'anticorps IPL SM1 couplé à une phase solide, comme l'induit la KLH froide ce qui

suppose aussi une identité entre les déterminants de la KLH, l'épitope spécifique de l'anticorps IPL Sm1 et l'image interne de cet épitope portée par l'anticorps JM8-36.

Les premières études consacrées à la caractérisation biochimique de l'épitope spécifique de l'anticorps IPL Sm1 de l'antigène 38 kDa avaient permis de démontrer, grâce aux techniques de déglycosylation, la nature glycanique de l'épitope considéré.

Des expériences similaires pratiquées sur la molécule de KLH abolissent totalement ses propriétés inhibitrices sur l'interaction de l'anticorps IPL Sm1 et son pouvoir d'induction d'anticorps spécifiques du Schistosome, prouvant ainsi de façon indéniable la participation des structures olisaccharidiques comme support de la communauté antigénique.

La participation réelle des structures sucrées a été très récemment apportée au cours d'expériences d'inhibition et démontre que la fraction oligosaccharidique isolée de la KLH reproduit l'effet global de la KLH native dans ses capacités inhibitrices de la liaison IPL Sm1- antigène cible.

Nous avons pu, parallèlement à ces études moléculaires, vérifier la relation qui unie l'expression du mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles à l'antigène 38 kDa, par la démonstration du rôle hautement cytotoxique des sérum de rats immunisés par la KLH, qui révèlent une extraordinaire capacité cytotoxique dans ce modèle. Les propriétés effectrices de ces anticorps ont aussi pu être corrélées à l'expression *in vivo* par immunisation passive ou directe d'un degré significatif de protection vis-à-vis de l'infection par *S.mansoni* traduisant ainsi les propriétés immunoprophylactiques potentielles de la KLH.

L'ensemble de nos travaux démontre donc que les copules glucidiques de la KLH expriment un épitope glycanique précédemment caractérisé sur l'antigène 38kDa du *S.mansoni* par l'anticorps IPL Sm1, et qui possède les mêmes caractéristiques structurales, chimiques et fonctionnelles.

De ces observations originales il est possible de tirer quatre conséquences majeures :

1°) Au plan biologique, elles illustrent l'existence et l'expression chez un parasite humain d'un immunogène majeur dont l'origine est retrouvée chez un mollusque marin évoluant depuis plusieurs centaines de millions d'années. La conservation de cette structure au cours de l'évolution et la signification de son expression dans un parasite humain, posent de toute évidence des problèmes fascinants de phlogénie et d'adaptation.

2°) Le fait que la quasi-totalité des sujets infectés par *S.mansoni* produit des anticorps vis-à-vis de l'épitope sucré de l'antigène 38 kDa également exprimé dans la molécule de KLH, fait de la KLH un réactif diagnostique simple, aisément standardisable et de faible coût de revient pour la séroépidémiologie des bilharzioses humaines.

Des études préliminaires nous ont d'ailleurs permis de démontrer les capacités inhibitrices des sérums de patients infectés par *S.mansoni* dans la liaison de l'anticorps IPL Sm1 radiomarqué sur la KLH.

3°) Outre le pouvoir protecteur porté par cet épitope, conférant à la KLH et plus particulièrement à sa copule glucidique une potentialité exceptionnelle dans la stratégie vaccinale contre la schistosomiase, l'étroite identité structurale et fonctionnelle existant entre les glycanes de la KLH et l'antigène 38 kDa ouvre de nouvelles voies dans l'étude de la réponse immune dans les schistosomiases.

La KLH apparaît comme un matériel de choix dans le cadre de l'identification des isotypes des anticorps induits vis-à-vis d'un épitope potentiellement protecteur, et tout particulièrement dans l'étude des isotypes d'IgG impliqués dans le mécanisme de cytotoxicité dépendant d'éosinophiles chez l'homme.

4°) La présence sur la molécule de KLH d'un épitope fonctionnel reconnu par l'anticorps IPL Sm1 offre de nouvelles possibilités pour la préparation de quantités suffisantes d'oligosaccharides compatibles avec l'analyse chimique de ce motif antigénique. Des résultats encourageants ont déjà été apportés dans ce domaine et ont permis de proposer une structure oligosaccharidique tétra-antennée pour l'épitope commun à la KLH

et à l'antigène 38 kDa du Schistosome. Ces travaux représentent une première étape dans les voies de synthèse organique de cet épitope.

Un tel matériel synthétique pourrait apporter de précieuses informations sur les relations existant entre la structure chimique et conformationnelle d'un épitope et l'induction préférentielle d'isotypes particuliers.

Cette approche s'avère aujourd'hui essentielle depuis la démonstration dans la schistosomiase de l'induction par un même antigène d'une réponse humorale protectrice et bloquante. Deux voies peuvent être proposées pour cette étude, l'une utilisant des analogues structuraux synthétiques de l'épitope glycanique, l'autre par la construction de néoglycoprotéines issues de la condensation chimique des sucres de la KLH et de différentes molécules porteuses permettant ainsi d'appréhender l'effet potentiel d'orientation isotypique de la réponse humorale vis-à-vis d'un épitope chimiquement défini.

CONCLUSION.

La construction d'hybrides cellulaires producteurs d'anticorps monoclonaux de rat spécifiques du *Schistosoma mansoni* a largement contribué à la dissection fine de l'immunité anti-parasitaire ainsi qu'à la caractérisation des antigènes cibles de la réponse immune potentiellement applicables à l'immunoprophylaxie de ces infections.

Si dans le cas des anticorps anaphylactiques les sondes monoclonales ont surtout confirmé le rôle prépondérant de ces isotypes comme support de l'immunité, l'étude d'autre isotypes et plus particulièrement celle des anticorps d'isotype IgG2c a apporté un éclairage tout à fait nouveau sur l'existence de mécanismes de régulation susceptibles d'avoir de profondes conséquences pratiques dans l'élaboration de préparations vaccinales efficaces.

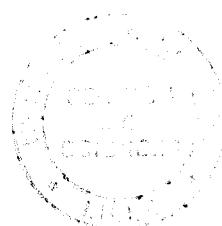
Ces travaux sont aussi à l'origine de l'identification chez l'homme d'anticorps à activité bloquante qui permet de reconsidérer l'absence de corrélation entre l'expression de

certains paramètres de l'infection par schistosome et le réel statut immunitaire de l'hôte étroitement dépendant du contexte immunopathologique.

L'ensemble des données recueillies dans ce domaine nous conduit donc à une juste appréciation des difficultés qu'il reste à vaincre pour effectuer le passage de la caractérisation d'une molécule potentiellement protectrice à son application chez l'homme et souligne à nouveau l'importance d'une bonne compréhension des mécanismes immunitaires, permettant ainsi un ciblage judicieux des antigènes potentiellement protecteurs.

Ces études qui s'inscrivaient résolument dans le domaine de l'immunoprophylaxie ont très vite débordé le cadre de nos investigations originales et nous ont permis d'approcher les bases moléculaires qui régissent les interactions hôte-parasite et qui conditionnent la différenciation du schistosome.

Dans ce contexte l'approche monoclonale, par la démonstration de la répartition ubiquitaire de certains épitopes au niveau des différents stades évolutifs du parasite, et l'identification du phénomène de régulation isotypique, révèle un mécanisme élégant élaboré par le parasite qui lui permet d'échapper à la réponse immune qu'il induit, témoignant ainsi de l'extraordinaire degré d'adaptation du schistosome vis-à-vis de son hôte définitif vertébré.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ABE T., J.T. FORBES et D.G. COLLEY. 1983. Natural killer cell activity during murine Schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* 69 : 1001-5

ANWAR A.R.E., S.R. SMITHERS et A.B. KAY. 1979. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leukocytes *in vitro* : requirement for complement preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.* 122 : 628-37

ATTALAH A.M., F.A. LEWIS, A. URRITIA-SHAW , T. FOLKS et T.J. YEATMAN 1980. Natural killer cells (NK) and antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy* 13 : 351-54

AURIAULT C., M.JOSEPH , J.P. DESSAINT et A. CAPRON . 1980. Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosoma* larvae proteases. *Immunol. Lett.* 2 : 135-39

AURIAULT C., J. PESTEL , M.JOSEPH, J.P. DESSAINT et A. CAPRON . 1981. Interaction between macrophages and *Schistosoma mansoni* schistosomula : role of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62 : 15-27

AURIAULT C., M.A. OUASSI , G. TORPIER , H. EISSEN et A. CAPRON 1981a. Proteic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 3 : 33-44

AURIAULT C., M.JOSEPH , A. TARTAR et A. CAPRON . **1983.** Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of IgG. FEBS Lett. 153 : 11-15

AURIAULT C., M.JOSEPH , A. TARTAR, D.BOUT , A.B. TONNEL et A. CAPRON, **1985.** Regulatory role of tripeptide (TKP) from the constant domain of immunoglobulin G *Int. J. Immunopharmacol.* 7 .(1) :73.

BACH M.K., K.J. BLOCH et K.F. AUSTEN . **1971a.** IgE and IgA antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. I. Optimum conditions for *in vitro* preparation of target cells with antibody and challenge with antigens. *J. Exp. Med.* 127 : 767

BACH M.K., K.J. BLOCH et K.F. AUSTEN . **1971b.** IgE and IgA antibody-mediated release of histamine from rat peritoneal cells. II. Interaction of IgE and IgG2a at the target cell. *J. Exp. Med.* 133 : 772

BALLOUL, J.M., R. PIERCE, J.M. GRZYCH et A. CAPRON.**1985.** *In vitro* synthesis of a 28 kDa antigen present in the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 17:105.

BALLOUL, J.M., P. SONDERMEYER, D. DREYER, M. CAPRON, J.M. GRZYCH, R. PIERCE, D. CARVALLO, J.P. LECOCQ et A.CAPRON.**1987a.** Molecular cloning of a protective antigen against schistosoniasis. *Nature.*326:149.

BALLOUL, J.M., J.M. GRZYCH, R; PIERCE et A. CAPRON. **1987b.** A purified 28 kDa protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138:3448.

BAZIN H., A. BECKERS et P. QUERINJEAN . **1974.** Three classes and four sub-classes of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.* 4 : 44

BAZIN H., A.CAPRON, M.CAPRON, M. JOSEPH, J.P. DESSAINT, et R.PAUWELS **1980a.** Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies to Schistosomes (*S. mansoni*) in the rat. *J.Immunol..* 124 : 2373

BAZIN H., J.M. GRZYCH, C. VERWAERDE et A. CAPRON. **1980b.** A LOU rat non secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. *Ann. Immunol.* 131D : 359

BLOCH K.J. **1968.** Anaphylactic antibodies of mammals including man. *Progr. Allergy* 10 : 84

BONA C.A., E. HERBERT-KATZ et W. PAUL . **1981.** Idiotype-anti-idiotype regulation I Immunization with a levan binding myeloma-protein leads to the appearance of auto (anti-idiotype) antibodies and the activation of silent clones. *J.Exp.Med.* 153 : 951

BONA C.A., S. FINLEY, S. WATERS et H.G. KUNKEL. **1982.** Anti-idiotype immunoglobulin antibodies. Properties of asequential anti-idiotypic antibodies to heterologous anti G globulins. Detection of Fc fragments (homobodies) and with idiotopes (epibodies). *J.Exp.Med.* 156:986.

BONA C.A. et H. KOHLER .**1984.**Anti-idiotypic antibodies and internal images in monoclonal and anti-idiotype antibodies: Probes for receptor structure and functions.(J.C. Venter, C.M. Faser & J.Lindstrom, eds.).Alan Liss Inc., New York.

BONA C.A., C.Y. KANG, H. KOHLER et M. MONESTIER.**1986.**Epibody: the image of the network created by a single antibody. *Immunol Rew.* 90: 115.

BORROS D.L. et K.S. WAREN. **1970.** Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a solution factor isolated from *S.mansoni* eggs. *J.Exp.Med.* 132 : 488

BOUT D., H. DUPAS, Y. CARLIER , D. AFCHAIN et A. CAPRON. **1977.** High resistance induced by young live bacillus Calmette Guerin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ann. Immunol.* 128C : 811-16

BOUT D., M.JOSEPH , J.R. DAVID et A. CAPRON. **1981.** *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *J. Immunol.* . 127 : 1-5

BROWN C.A., K. CAREY ET R.B. COLVIN. **1979.**Inhibition of autoimmune tubulointerstitial nephritis in guinea pigs by heterologous antisera containing anti-idiotypic antibodies. *J.Immunol.*123:2102.

BUTTERWORTH A.E., R.F. STURROCK , V. HOUBA et P.H. REES .**1974.** Antibody dependant cell-mediated damage to schistosomula *in vitro*. . *Nature* 252 : 503

BUTTERWORTH A.E., R.F. STURROCK , V. HOUBA , A.A.F. MAHMOUD , A. SHER et P.H. REES . **1975.** Eosinophils as mediators of antibody-dependant damage to schistosomula. *Nature* 256 : 727

BUTTERWORTH A.E., J.R. DAVID, B, D. FRANKS , A.A.F. MAHMOUD, P.H. DAVID , R.F. STURROCK et V. HOUBA . **1977a.** Antibody-dependant eosinophil dependant damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* : damage by purified eosinophils. *J. Exp. Med.* 145 : 136

BUTTERWORTH A.E., H.G. REMOLD , V. HOUBA , J.R. DAVID , D. FRANKS P.H. DAVID et R.F. STURROCK . **1977b.** Antibody-dependant eosinophil mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *S.mansoni* : mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118:2230

BUTTERWORTH A.E., H.A. VADAS et A. SHER. **1979a.** Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage *J. Immunol.* 122 : 1314

BUTTERWORTH A.E., D.L. WASSOM, G.J. GLEICH, D.A. LOEGERINet J.R DAVID. **1979b.** Damage to schistosomula of *S. mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 122 : 221

BUTTERWORTH A.E., D.W, TAYLOR et M.C VEITH .**1982.**Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis.*Immunol. Rev.* 61: 5-39.

BUTTERWORTH A.E., P.R. DALTON, D.W. DUNNE, M. MUGAMBI, J.H. OUMA, B.A. RICHARDSON, R.F. ARAP SIONGOK et R.F. STURROCK. **1984.** Immunity after treatment of human schistosomiasis *mansonii*. I. Study design, pretreatment observations and the results of the treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 78 : 108 - 23 .

CAMUS D., J.P. DESSAINT, E. FISCHER et A. CAPRON. **1979.** Nonspecific suppressor cell activity and specific cellular unresponsiveness in rat schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 9 : 341-44

CAMUS D., A. MOSSEIR, C. MAZINGUE et A. CAPRON. **1981.** Immunoregulation by *Schistosoma mansoni*. *Immunopharmacology* 3 : 193-204

CAPRON A., J. BIGUET , F. ROSE et A. VERNES. **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 : 198

CAPRON A., A. VERNES, J. BIGUET , F. ROSE , A. CLAY et L. ADENIS. **1966.** Les précipitines sériques dans les bilharzioses humaines et expérimentales à *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 41 : 123

CAPRON A., A. VERNES, J. BIGUET et P. TRAN VAN KY. **1967.** Apport de l'immunoélectrophorèse à l'étude immunologique des bilharzioses. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 47 : 127

CAPRON A., J. BIGUET , A. VERNES et D. AFCHAIN. **1968.** Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol..* 16 : 121

CAPRON A., J. BIGUET, P. TRAN VAN KY et Y. MOSCHETTO. **1969.** Immunological studies in various types of schistosomiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci..* 160 : 863

CAPRON A., M. CAPRON-DUPONT, D. CAMUS et A. VERNES. **1972a.** Les phénomènes d'hypersensibilité dans les bilharzioses humaines. II. Etude *in vitro* de l'activité léthale des sérums de malades pour les schistosomules de *Schistosoma mansoni*. Rapport avec les tests d'hypersensibilité. *Société Française d'Immunologie*, Paris, 8-9 décembre (résumé)

CAPRON A., P. WATTRE, M. CAPRON et M.N. LEFEBVRE . **1972b.** Le diagnostic biologique moderne des parasitoses humaines. *Rev. Prat..* 22 : 3661

CAPRON A., M. CAPRON, D. CAMUS et A. VERNES. **1973.** Les phénomènes d'hypersensibilité au cours des schistosomiases humaines à *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma haematobium*. II. Etude *in vitro* de l'activité létale de sérums de malades pour les schistosomules de *Schistosoma mansoni* . Rapport avec les tests d'hypersensibilité. *Path. Biol.* 21 : 1079

CAPRON A., M. CAPRON, H. DUPAS et A. PETITPREZ . **1974.** Etude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité léthale d'immuns sérums sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni* . *Int. J. Parasitol.* 4 : 613

CAPRON A., H. BAZIN, J.P. DESSAINT et M. CAPRON. 1975a. Macrophage adherence mediated by specific IgE antibodies. *ORCS*. 3 : 52

CAPRON A., J.P. DESSAINT, M. CAPRON et H. BAZIN. 1975b. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*. 253 : 474

CAPRON A., M. CAPRON, D.BOUT, R. ROUSSEAU et H. BAZIN. 1975c. IgE in immunity to Schistosomes in the rat. *Eur. Immunol. Meeting, Amsterdam*, Sept. 16-19.

CAPRON A., J.P. DESSAINT, M. CAPRON, M.JOSEPH, et J. PESTEL. 1980. Role of anaphylactic antibodies in immunity to Schistosomes. *Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg.* 29 : 849

CAPRON-DUPONT, M. 1974. Les mécanismes de cytotoxicité dans la bilharziose humaine et expérimentale. Rapport avec l'immunité. *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Lille*.

CAPRON M., D. CAMUS, Y. CARLIER et J.F.M. FIGUEIREDO , A. CAPRON. 1977. Immunological studies in human schistosomiasis. II. Antibodies cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg* : 26 : 248

CAPRON M., A. CAPRON, G. TORPIER, H. BAZIN, D.BOUT et M.JOSEPH. 1978a. Eosinophil-dependant cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8 : 1270

CAPRON M., J. ROUSSEAU, C. MAZINGUE, H. BAZIN et A. CAPRON. 1978b. Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependant eosinophil cytotoxicity to *S. mansoni* schistosomula. *J. Immunol.* 121 : 2518

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

CAPRON M., H. BAZIN, M.JOSEPH et A. CAPRON. 1981a. Evidence for IgE-dependant cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126 : 1764

CAPRON M., A. CAPRON, J.P. DESSAINT, G. TORPIER, S.G.O. JOHANSSON et L. PRIN. 1981b. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophil. *J. Immunol.* 126 : 2087

CAPRON M., J.A. NOGUEIRA-QUEIROZ, J.P. PAPIN et CAPRON. A. 1984. Interactions between eosinophils and antibodies : in vivo protective role against rat schistosomiasis. *Cell. immunol.* 83 : 60

CAPRON, M. et A. CAPRON. 1986 Rat, mice and men-models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitology Today.* 2 : 69-75

CARDOSO, W. 1953. A esquistossomiase mansônica no negro. *Medicina, Cirurgia, Farmacia, Rio de Janeiro,* 202 : 89

CAZENAVE, P.A. 1977. Idiotypic anti-idiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 74 : 5122

CIOLI J.A. et G. DENNERT. 1976. The course of *Schistosoma mansoni* infection in thymectomized rats. *J. Immunol.* 117 : 590

CLEGG, J.A.,S.R. SMITHERS et R.J. TERRY **1971.** Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasit.* 1 : 43

CLEGG J.A. et S.R. SMITHERS . **1972.** The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 12 : 79

CLEVELAND W.L.,N.H. WASSERMAN,R. SARANGARAJAM, A.S.PENN, A.S. et B.F. ERLANGER.**1983.**Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by normally functioning auto-idiotypic mechanism. *Nature.* 305 : 56

COHEN I.R. et H. WEKERLE.**1973.**Regulation of auto-sensitization:The immune activation and specific inhibition of self-recognizing thymus-derived lymphocytes *J.Exp.Med.* 137: 224.

COZENZA, H. et H. KOLHER . **1972.** Specific inhibition of plaque formation to phosphorylcholine by antibody against antibody. *Science.*176:1027.

DAMIAN R.T. **1964.** Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Nat..* 98 : 129

DAMIAN R.T. **1967.** Common antigens between adult *S. mansoni* and laboratory mouse. *J. Parasitol.* 53 : 60

DAMONNEVILLE M., C. AURIAULT, T. THOREL, C. VERWAERDE, R.J. PIERCE, G. STRECKER et A. CAPRON. **1986.** Induction of a protectiveimmune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum released products : immunochemical properties of the target antigens.*International archives of Allergy and applied Immunology.*3:215.

DAVID J.R., M.A. VADAS, A.E. BUTTERWORTH, A.P.de BRITO, E.M. CARVALHO , R.A. DAVID, J.C. BINA et Z.A ANDRADE. **1980.** Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *New. Engl. J. Med.* 303 : 1147

DEAN D.A., R. WISTAR et K.D. MURRELL. **1974.** Combined *in vitro* effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23 : 420

DEAN D.A., R. WISTAR et P. CHEN. **1975.** Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni* . I. *In vitro* effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24 : 74

DESSAINT J.P., D. CAMUS, E. FISHER et A. CAPRON. **1977.** Inhibition lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 7 : 624-29

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

DESSAINT J.P., B.H. WAKSMAN, H. METZGER et A. CAPRON. **1980.** Cytolytic binding of IgE to the macrophage. III. Involvement of cyclic GMP and calcium in macrophage activation by dimeric or aggregated rat myeloma IgE. *Cell. Immunol.* 51 : 280

DISSOUS C., C. DISSOUS et A. CAPRON. **1981.** Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol.Biochem. Parasitol.* 3 : 215

DISSOUS C. et A. CAPRON. 1982a. Isolation of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. In PEETERS H (ed), *Protides of biological fluids*, pp 179-182. Oxford and New York: Pergamon Press.

DISSOUS C, J.M. GRZYCH et A. CAPRON. 1982b. *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *J. Immunol.* 129:2232.

DISSOUS C et A. CAPRON. 1983. *Schistosoma mansoni*: antigenic community between schistosomula surface and adult worm incubation products as a support for concomitant immunity. *FEBS Letters*. 162:355.

DISSOUS C., J.M. GRZYCH et A. CAPRON. 1986. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*. 323:445.

DOMINGO E.O., R.B.T. COWAN et K.S. WARREN. 1967. The inhibition of granuloma formation around *S. mansoni* eggs. I. Immunosuppressive drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 284

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

DOUGHTY, B.L. et S.M. PHILLIPS. 1981. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. Definition of the model. *J. Immunol.* 128 : 30

EICHMANN K. et K. RAJEWSKY. 1975 Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur. J. Immunol.* 5:661.

ERLANGER B.F. **1985.** Anti idiotypic antibodies : What do they recognize ? *Immunol. Today.* 6 : 10

ERTL M.C., J.E. HOMANS, S. TOURNAS et R.W. FINBERG. **1984.** Sendai virus-specific responses by anti-idiotypic antibodies directed against a T helper clone. *J. Exp. Med.* 160 : 1195

FAERON D.T. **1980.** Identification of the membrane glycoprotein that is the C_{3b} receptor of human erythrocytes, polymorphonuclear leucocyte, B lymphocyte and monocyte. *J. Exp. Med.* 152 : 20-30.

FELDMAN M., E.D. ZANDERS et J.R. LAMB. **1985.** Tolerance in T-cell clones. *Immunol today* . 6: 58.

FOLEY, F.J. **1953.** Resultats cités dans *Intern. Rev. Immun.* 1986. PP.27-39.

GITTER B.D. et R.J. DAMIAN. **1982.** Murine alloantigens acquisition by schistosomula of *Schistosoma mansoni* : further evidence for the presence of K, D and I region gene products on the tegumental surface. *Parasite Immunol.* 4 : 383-93

GRZYCH J.M., M. CAPRON, H. BAZIN et A. CAPRON. **1982.** In vitro and in vivo effector function of a rat IgG2a monoclonal anti-*S.mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129:2739.

GRZYCH J.M., M. CAPRON, C. DISSOUS et A. CAPRON. **1984.** Blocking activity of a rat monoclonal antibodies in rat experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133.998.

GRZYCH J.M., M. CAPRON, P.H. LAMBERT, C. DISSOUS, S.TORRES et A.CAPRON .**1985.**An anti-idiotype vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature*.316:74.

GRZYCH J.M.,C. DISSOUS, M. CAPRON,S. TORRES,P.H. LAMBERT et A.CAPRON **1987.** Schistosoma mansoni shares with keyhole limpet hemocyanin a protective carbohydrate epitope. *J.Exp.Med.*165:878.

HALPER J. et H. METZGER.**1976.** The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. VI. Inhibition by IgGa immune complexes. *Immunochemistry* 13 : 907

HARN D.A., M. MITSUYAMA, E.D. HUGUENEL, L.OLIGINO et R.J. DAVID **1985.** Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. parasitol.* 16:345.

HARN D.A., L. OLIGINO, A. KO et L.D. STEN.**1987.**Candidate epitope for vaccination against schistosomiasis mansoni.*J.Cell.Biochem..supp.*11A:151.

HART, D.A., A.L. WANG, L.L. PAWLAK et A. NISONOFF.**1972.**Suppression of idiotypic specificities in adult mice by administration of antiidiotypic antibody.*J.Exp.Med.*135:1293.

HSÜ S.Y.L., G.L. LUST et H.F. HSÜ. **1971.** The fate of challenge Schistosome cercariae in monkey immunized by cercariae exposed to high doses of X irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136 : 727-31

IIDA K. et V. NUSSENZWEIG . 1981. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J. Exp. Med.* 153 : 1138-50

JAMES S.L., A. SHER, J.K. LAZDINS, M.S. MELTZER. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. II. Killing of newly transformed schistosomula *in vitro* by macrophages activated as a consequence of *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* 128 : 1535-40

JAMES S.L., E.J. PEARCE, D. LANAR et A. SHER. 1986. A defined vaccine against schistosomiasis based on cell-mediated immunity. *J. Cell. Biochem. supp.* 11A:169.

JERNE N.K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur* . 125c : 373

JOSEPH M., J.P. DESSAINT et A. CAPRON. 1977. Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. *Cell. Immunol.* 34 : 247

JOSEPH M., A. CAPRON, A.E. BUTTERWORTH, R.F. STURROCK et V. HOUBA. 1978. *In vitro* cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes induced by IgE immune complexes. *Clin. Exp. Immunol.* . 33 : 48

JOSEPH M., A.B. TONNEL, A. CAPRON et G. VOISIN. 1980. Enzyme release and superoxyde anion production by alveolar macrophages stimulated by immunoglobulin E. *Clin. Exp. Immunol.* . 40 : 416

JOSEPH M., C. AURIAULT, A. CAPRON, H. VORNG et P. VIENS .1983.A role of platelets in IgG-dependent killing of schistosomes. *Nature*. 303 : 810-11

KAGAN I.G. 1958. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis
Rice Inst. Pamph. 45 : 151

KASSIS A.I., M. AIKAWA et A.A.F. MAHMOUD. 1979. Mouse antibody dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *S. mansoni*. *J. Immunol.* 122 : 398

KENNEDY R.C., K. ADLER-STROTHZ, R.D. HENKEL, V. SANCHEZ, J.L. MELMICK et G.R. DREESMAN. 1983. Immune response to hepatitis B surface antigen : enhancement by prior injection of antibodies to the idiotype. *Science*. 121 : 853.

KHALIFE J., M. CAPRON, J.M. GRZYCH, H. BAZIN et A. CAPRON. 1985a. Extracellular release of rat eosinophil-peroxydase (EPO). I. Role of anaphylactic immunoglobulins. *J. Immunol.* 134:1968.

KHALIFE, J., M. CAPRON, J.M. GRZYCH, H. BAZIN et A. CAPRON. 1985b. Fc receptors on rat eosinophils: isotypic regulation of cell activation. *J. Immunol.* 135:2780.

KÖHLER G., C. MILSTEIN. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 26 : 495

KOPROWSKI H., D. HARLYM, M. LUBECK, E. De FREITAS et H. SEARS. 1984. Human anti-idiotype antibodies in cancer patients is the modulation of immune response beneficial for the patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:216.

KUBELKA C., A. RUPPEL, U. KEEs, P.H. KRAMMER et G. GEN. 1982. Induction of macrophage killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokines from T cell clones. XIV Tagung der Gesellschaft für Immunologie 26-29.9.82, Münster. *Immunobiology* . 162 : 382

KUNKEL H.G., M. MANNIK et R.C. WILLIAMS. 1963. Individual antigenic specificities of isolated antibodies. *Science (Washington)* 140 : 1218.

LANGLET C., C. MAZINGUE, J.P. DESSAINT et A. CAPRON. 1984. Inhibition of primary and secondary IgE-response by a Schistosome-derived inhibitory factor. *Int. Arch. Allergy* 73 : 225-30

MACKENSIE C.D., F.J. RAMALHO-PINTO , D.J. Mc LAREN et S.R. SMITHERS . 1977. Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *S. mansoni* in vitro . *Clin. Exp. Immunol.* 30 : 97

MADDISON S.E., L. NORMAN, S.J. GEIGER et I.G. KAGAN. 1970. *S. mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected-reexposed, and antigen sensitized animals. *J. Parasit.* 56 : 1058

MAHMOUD A.A.F., K.S. WARREN et P.A. PETERS. 1975. A role for the eosinophil in acquired resistance to *S. mansoni* infection as determined by anti-eosinophil serum. *J. Exp. Med.* 142 : 805

MAHMOUD A.A.F., P.A.S. PETERS, R.H. CIVIL et J.S. REMINGTON. 1979. *In vitro* killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by BCG and *C-parvum*- activated macrophages. *J Immunol.* 122 : 1655-62



MAZINGUE C., J.P. DESSAINT, A.M. SCHMITT-VERHULST , J.C. CERTTINI et A. CAPRON. **1983.** Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by Schistosome-derived inhibitory factor (SDIF) is independant of the production of interleukin 2. *Int. Arch. Allergy* .72 : 22-29

Mc KEAN J.R. et A.R.E. ANWAR. **1981.** *Schistosoma mansoni* : complement and antibody damage mediated by human eosinophils and neutrophils, in killing schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 51 : 307-17

Mc KEARN T. J., Y. HAMADA, F.P. STUART, et F.W. FITCH. **1974.** Anti-receptor antibody and resistance to graft-versus-host disease. *Nature*.151:648.

Mc LAREN D.J., L.D. MACKENSIE et F.J. RAMALHO-PINTO. **1977.** Ultrastructural observation on the *in vitro* interaction between eosinophils and some parasitic Helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). *Clin. Exp. Immunol..* 30 : 105

Mc LAREN D.J. et F.J. RAMALHO-PINTO **1979.** Eosinophil-mediated killing of schistosomula of *S. mansoni* *in vitro* : synergistic effect of antibody and complement. *J. Immunol..* 123 : 1431

MILLER, R.A., D.G. MALONEY, R. WARNKE et R. LEVY . **1983.** Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *New. Engl. J. Med.* 306 : 517.

MILLER K.J., E.P. KENNEDY et V.N. REINHOLD. **1986.** Osmotic adaptation by gram-negative bacteria.Possible role for periplamic oligosaccharides. *Science*.231 :48.

MORRISON S.L., L.A. WINS et V.T. OI. **1984.** Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells in monoclonal antibodies. *Biol. Clin. Appl. (Florence), Abstract pL2*

MORSE H.C. III, K. J. BLOCH et K.F. AUSTEN. **1968.** Biologic properties of rat antibodies. II. Time-course of appearance of antibodies involved in antigen-induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A^{rat}). Association of this activity with IgG2a. *J. Immunol.* 101 : 65

MORSE H.C. III, K.F. AUSTEN et K.J. BLOCH. **1969.** Biologic properties of rat antibodies. II. Histamine release mediated by two classes of antibodies. *J. Immunol.* 102 : 327

NAIMARK D.H., J. OLIVER-GONZALEZ, E.F. CHAFFEE et R.I. ANDERSON **1957.** Studies on schistosomiasis *mansi* in Primates. I. Initial occurrence of serologic antibodies correlated with egg recovery. *J. Parasit.* 43 suppl. 26

NORTH, R.J., E.S. DYE, C.D. MILLS, et CHANDLER, J.L. **1982.** Résultats cités dans Intern. Rev. immun., 1986. vol. 1, pp. 27-39.

OLDS G.R., J.J. ELLNER, A. EL KHOLET A.A.F. MAHMOUD. **1981** Monocyte-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* : alterations in human schistosomiasis *mansi* and tuberculosis. *J. Immunol.* 127 : 1538-42

OLSSON I., P. VENGE, J.K. SPITZNAGEL et R.J. LEHER. **1977.** Arginine-rich cationic proteins of human eosinophil granules. Comparison of the constituents of eosinophilic and neutrophilic leukocytes. *Lab. Invest.* 36 : 493

OUAISSI M.A., F. SANTORO et A. CAPRON. 1980. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system. Receptors for C_{3b} on cercariae and schistosomula. *Immunol. Lett.* 1 : 197-210

OUAISSI A., C. AURIAULT, F. SANTORO et A. CAPRON. 1981. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system : role of IgG peptides in the activation of the classical pathway by schistosomula. *J. Immunol.* 127 : 1555-59

OUDIN J., M. MICHEL. 1963. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines du sérum de lapin apparemment liée à la fonction et à la spécificité d'anticorps. *C.R. Sciences Acad. Agr. Fr.* 257 : 805

OUDIN J. 1966. Th genetic control of immunoglobulin synthesis. *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.* 166 : 805

PECK C.A., M.D. CARPENTER et A.A.F. MAHMOUD. 1983. Species-related resistance to *Schistosoma mansoni*. Role of mononuclear phagocytes in schistosomula killing *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 71 : 66-72

PEREZ H. 1974. Investigation on the mechanism of protective immunity to *S. mansoni* in the rat. Ph. D. Thesis, Brunel University, Oxbridge, Middlesex, England.

PEREZ H., J.A. CLEGG et S.R. SMITHERS . 1974. Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat : measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology* 69 : 349

PEREZ H. **1975.** Thèse de doctorat, Londres. Résultats cités dans "A report of conference on newer immunologic approaches of schistosomiasis", Waksman R.H. et Cook J.A. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 24 : 1037

PHILLIPS S.M., W.A. REID, J.I. BRUCE, K. HELDUND, R.C. COLVIN, R. CAMPBELL C.L. DIGGS et E.H. SADUN. **1975.** The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure. *Cell. Immunity*. 19 : 99

PHILIPPS S.M., W.H. REID, et E.H. SADUN. **1977.** The cellular and humoral response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. II Mechanisms during reexposure. *Cell. Immunol.* 28 : 75.

PHILLIPS, S.S.M. et D.G. COLLEY. **1978.** Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis : resistance, immunopathology and eosinophil involvement. *Progr. Allergy.* 24 : 49-182

POTOCNJAK P., F. ZAVALA, R. NUSSENZWEIG, et V. NUSSENZWEIG. **1982.** Inhibition of idiotype-anti-adiotype interaction for detection of a parasite antigen : a new immunoassay. *Science*. 215 : 1637-39

RAMALHO-PINTO F.J., D.J. McLAREN et S.R. SMITHERS. **1978.** Complement-mediated killing of schistosomula of *S. mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. Exp. Med.* 147 : 147

RAMALHO-PINTO F.J., R. DE ROSSI et S.R. SMITHERS. **1979.** Murine schistosomiasis *mansi* : anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and eosinophil-mediated killing of schistosomula *in vitro*. *Parasite Immunol.* 1 : 295

ROLAND J. et P.A. CAZENAVE. **1981.** Rabbits immunized against b6 allotype express similar anti-b6 idiotype. *Eur.J.Immunol.*.. 11: 469.

ROITT I.M., Y.M. THANAVALA, D.K. MALE et F.C. HAY . **1985.**Anti-idiotypes as surrogate antigens: structural considerations. *Immunology Today.* 6: 2657.

ROUSSEAUX-PREVOST R., H. BAZIN et A. CAPRON. **1977.** I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunology* , 33 : 501

ROUSSEAUX-PREVOST R., M. CAPRON, H. BAZIN et A. CAPRON. **1978.** 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

SACKS, D.L., K.M. ESSER et A. SHER. **1982.** Immunization of mice against African trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J Exp.Med.* 155 : 1108.

SACKS, D.L., L.V. KIRCHHOFF, S. HIENY et A.SHER. **1985.**Molecular mimicry of a carbohydrate epitope of a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotype antibodies. *J. Immunol.*.135:4155.

SADUN E.H. et T.W. GORE. **1970.** *S. mansoni* and *S. haematobium* : homocytotropic reaginic-like-antibodies in infections of man and experimental animals. *Exp. Parasit.* 28 : 435

SAMUELSON.J.C.,A.SHER,etJ.P.CAULFIELD. **1980.**Newly transformed schistosomes spontaneously lose surface antigens and C₃ receptor sites during culture. *J. Immunol.* 124 : 2055-57

SANTORO F., P.J. LACHMANN, A. CAPRON et M. CAPRON. 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 : 1551-57

SANTORO F., M.A. OUAISI, J. PESTEL et A.CAPRON .1980. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system binding of C_{1q} to schistosomula. *J. Immunol.* 124 : 2886-91

SCHEIBER A.B., P.O. COURAND, C. ANDRE, B. VRAY et A.D. STROSBERG. 1980. Anti-alprenolol anti-idiotypic antibodies bind to β-adrenergic receptors and modulate catecholamine sensitive adenylylate cyclase. *Proc. Natl. Sci Acad. USA.* 77 : 7384-89

SEGE K. et P.A. PETERSON.1978. Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA..* 75 : 2443

SHARPE A.G., G. GAULTON, K. Mc DADE, B. FIELD et M. GREENE. 1984. Syngeneic monoclonal antiidiotype can induce cellular immunity to reovirus. *J.Exp.Med.* 160:1195.

SHER A., J.R. KUSEL, H. PEREZ et J.A. CLEGG. 1974a. Partial isolation of membrane antigen which induces the formation of antibodies lethal to *Schistosoma* cultured *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol..* 18 : 357

SHER A., P. MACKENZIE et S.R. SMITHERS . 1974b. Decreased recovery of invading parasites from lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in mouse. *J. Infect. Dis.* 130 : 626.

SHER A., S.R. SMITHERS et P. MACKENZIE. 1975. Passive transfer of acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in laboratory mice. *Parasitology* .70 : 347

SHER A., S.R.SMITHERS , P. MACKENZIE et K. BROOMFIELD.1977. *Schistosoma mansoni* : immunoglobulins involved in passive immunization of laboratory mice. *Exp. Parasit..* 41 : 160

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

SHER A., E. PEARCE, S. HIENY et S.L.JAMES.1986.Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. IV.Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity. *J.Immunol.* 136: 3878.

SIMPSON A.J.G S.L. JAMES et A; SHER.1983.Identification of surface antigen of schistosomula of *Schistosoma mansoni* recognized by antibodies from mice immunized by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae.*Infection and immunity* 41: 591.

SMITH B.D., K.M. DAVERN,P.G. BOARD, W.U. TIU, E.G. GARCIA et G.F. MITCHELL.1986.Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathion S-transferase.*Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*83:8703.

SMITHERS S.R. 1967. Acquired resistance to *S. mansoni* in the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Ann. Soc. belge Med. Trop.* 47 : 87

SMITHERS S.R. et R.J. TERRY. 1965a. Naturally acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in th Rhesus monkeys (*Macacamulatta*). *Parasitology* 55 : 701

SMITHERS S.R. et R.J. TERRY. 1965b. Acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the albino rat. *Parasitology* .55 : 711

SMITHERS S.R et R.J. TERRY. 1965c. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* .55 : 695

SMITHERS S.R. et R.J. TERRY. 1969a. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 7 : 41

SMITHERS S.R. et R.J. TERRY. 1969b. Immunity in schistosomiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 160 : 826

SMITHERS S.R. et R.J. TERRY. 1976. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 14 : 399

SNARY K., M.A. FERGUSON, M.T. SCOTT, et A.K. ALLEN. 1981. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi* use of monoclonal antibodies to identify and isolate epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasit.* 3 : 343

SNARY D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 : 126

STEIN, K. et T. SODERSTROM. 1984. Neonatal administration of idiotype or anti-idiotype primes for protection against *E. coli* K13 infection in mice. *J. Exp. Med.* 160 : 1001

TORPIER G., A. CAPRON et M.A. OUAISI. 1979. Receptor for IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. *Nature* .278 : 447-49

TRENKNER, E. et R. RIBLET. 1975. Induction of anti-phosphorylcholine antibody formation by anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 142 : 1123

UYTDEHAAG F. et A. OSTERHAUS .1985. Induction of neutralizing antibody in mice against poly-virus type II with monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Immunol.* 134 : 1225

VADAS M.A., A.E. BUTTERWORTH, S. BURAKOFF et A. SHER. 1979. Majorhistocompatibility complex product restricts the adherence of cytolytic T lymphocytes to minor histocompatibility antigens or to trinitrophenyl determinant on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 1982-85

VERWAERDE C, M. JOSEPH, M.CAPRON, R.J. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, F. VELGE, C. AURIAULT et A. CAPRON. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138 / 4441.

VON LICHTENBERG F.et L.S. RITCHIE. 1961. Cellular resistance against schistosomula of *S. mansoni* in *Macaca mulatta* monkeys following prolonged infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10 : 859

VON LICHTENBERG F., E.H. SADUN, et J.I. BRUCE .**1962.** Tissue responses and mechanisms of resistance in schistosomiasis mansoni in abnormal hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11 : 347

VON LICHTENBERG F. et E.H. SADUN . **1963.** Parasite migration and host reaction in mice exposed to irradiated cercariae of *S. mansoni*. *Exp. Parasitol.* 13 : 256

VON LICHTENBERG F., A. SHER, M. GIBBONS et B.L. DOUGHTY. **1976.** Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *S. mansoni*. *Am. J. Pathology* 84 : 479-500

WARREN S., E.O.DOMINGO et R.B.T. COWAN.**1967.** Granuloma formation around Schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Path.* 51 : 735

TABLE DES MATIERES.

TALE DES MATIERES

<u>SOMMAIRE.....</u>	20
<u>RESUME.....</u>	21
<u>INTRODUCTION GENERALE.....</u>	22
<u>I- L'IMMUNITE DANS LA SCHISTOSOMIASE:.....</u>	24
<u>A) L'IMMUNITE NATURELLE ET L'IMMUNITE ACQUISE.....</u>	27
<u>1) Spécificité d'espèce et intraspécifique.....</u>	27
<u>2) L'immunité acquise.....</u>	28
<u>a) La réponse cellulaire.....</u>	28
<u>b) La réponse humorale.....</u>	29
<u>c) L'immunité concomitante.....</u>	30
<u>B) APPROCHE IN VITRO ET IN VIVO DE L'IMMUNITE, LES MECANISMES EFFECTEURS.....</u>	31

1) Mécanisme de séotoxicité: anticorps létal.....	33
2) La cytotoxicité dépendante de cellules.....	34
a) <u>La cytotoxicité dépendante du neutrophile.....</u>	36
b) <u>la cytotoxicité dépendante du macrophage.....</u>	37
<u>*La cytotoxicité liée aux anticorps IgG.....</u>	37
<u>*Lacytotoxicité liée aux anticorps IgE.....</u>	37
c) <u>La cytotoxicité dépendante d'éosinophiles.....</u>	39
d) <u>la cytotoxicité des plaquettes.....</u>	43
3) Mécanismes effecteurs et anticorps anaphylactiques.....	44
a) <u>Les anticorps IgE.....</u>	44
b) <u>Les anticorps IgG2a.....</u>	45
4) Signification biologique des mécanismes effecteurs.....	46
5) Régulation des mécanismes effecteurs.....	47
a) <u>Les molécules dérivées du parasite.....</u>	48

b) Les peptides inhibiteurs du macrophage.....	49
c) La régulation par anticorps.....	50
d) La modulation par les complexes immuns.....	50
6) Les mécanismes effecteurs non spécifiques.....	51
 <u><i>II-IDIOTYPES, ANTI-IDIOTYPES ET IMMUNISATIONS IDIOTYPIQUES</i></u>53	
A- LA VARIABILITE DES IMMUNOGLOBULINES.....	54
1) Les variations isotypiques.....	54
2) Les varations allotypiques.....	57
3) Les variations idiotypiques.....	57
B- STRUCTURE ET LOCALISATION DES IDIOTOPES.....	58
1) Structure.....	58
2) Localisation des déterminants idiotypiques.....	58
C- DECOUVERTE DE L'IDIOTYPIE.....	59
1) Expérience d'Oudin et Michel.....	59

2) Production d'anticorps ou de sérums anti-idiotypiques.....	62
3) Evolution des idiotypes au cours de la réponse immune.....	62
D- LA THEORIE DU RESEAU IDIOTYPIQUE:	
LA REGULATION IDIOTYPIQUE.....	63
1) La théorie de Jerne.....	64
2) Arguments expérimentaux.....	68
a) Rôle immunorégulateur des interactions idiotypiques.....	68
* <i>La suppression de la réponse anticorps.....</i>	69
* <i>Exaltation de la réponse immune.....</i>	70
b) Auto-anticorps anti-idiotypiques, les anticorps à fonction d'image interne.....	71
3) Conclusion.....	72
E- LES IMMUNISATIONS IDIOTYPIQUES.....	73
1) Les différents anticorps anti-idiotypiques.....	73
a) Les anticorps anti-idiotypiques alpha.....	73

<u>b) Les anticorps anti-idiotypiques beta.....</u>	73
<u>c) Les anticorps anti-idiotypiques gamma.....</u>	73
<u>d) Les anticorps anti-idiotypiques epsilon.....</u>	75
<u>2) De la notion d'image interne vraie, au concept d'antigènes de substitution.....</u>	75
<u>a)" Mimicrie" des résidus de contact.....</u>	77
<u>b)Résidus de contact obligatoire.....</u>	77
<u>3) Les immunisations anti-idiotypiques et leurs applications.....</u>	79
<u>a) Images internes d'épitopes viraux et bactériens.....</u>	82
<u>b) Images internes d'épitopes parasitaires.....</u>	83
<u>c) Anticorps anti-idiotypiques et cancer.....</u>	84
<u>d) Anti-idiotypes, maladies autoimmunes et transplantation.....</u>	84
<u>e) Applications des anticorps anti-idiotypiques au diagnostic.....</u>	85
<u>4) De la théorie du réseau à l'application thérapeutique.....</u>	86
<u>III - TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....</u>	88

<u>OBJECTIFS ET STRATEGIE</u>	89
<u>ARTICLE A; PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE SCHISTOSOMA MANSONI</u>	92
<u>ARTICLE B: ETUDES IN VITRO ET IN VIVO DES PROPRIETES EFFECTRICES D'UN ANTICORPS MONOCLONAL IgG2a DE DE RAT SPECIFIQUE DE S.MANSONI</u>	97
<u>ARTICLE C: IDENTIFICATION D'UN ANTIGENE 38 KDA DU SCHISTOSOME PAR UN ANTICORPS IgG2a MONOCLONAL DE RAT</u>	97
<u>ARTICLE D: MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES BLOQUANTES D'UN ANTICORPS MONOCLONAL DE RAT D'ISOTYPE IgG2c DANS LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE</u>	108
<u>ARTICLE E: LA REGULATION DES MECANISMES IMMUNS DANS LA SCHISTOSOMIASE HUMAINE PAR DES ANTICORPS BLOQUANTS D'ISOTYPE IgM</u>	108
<u>ARTICLE F: APPROCHE IDIOTYPIQUE DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE DE L'ANTIGENE 38 KDA DU SCHISTOSOMULE</u>	135
<u>ARTICLE G: MISE EN EVIDENCE D'UNE SPECIFICITE EPITOPIQUE CROISEE ENTRE L'ANTIGENE 38 KDA DU SCHISTOSOME ET LA KLH</u>	141

<u>ARTICLE H:CARACTERISATION D'UNE SPECIFICITE ANTIGENIQUE ENTRE LA MOLECULE 38 KDA DU SCHISTOSOME ET DIFFERENTS MOLLUSQUES D'EAU DOUCE.....</u>	157
<u>IV- DISCUSSION CONCLUSION.....</u>	162
<u>A) ROLE ET SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DE L'ANTIGENE 38 KDA.....</u>	164
<u> 1) L'antigène 38kDa dans le contexte des antigènes protecteurs.....</u>	164
<u> 2) Signification biologique de l'épitope spécifique de l'anticorps monoclonal IPL Sm1.....</u>	166
<u>B) LES ANTICORPS BLOQUANTS DANS LA SCHISTOSOMIASE.....</u>	168
<u>C) APPROCHE IDIOTYPIQUE DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE DE L'ANTIGENE38 KDA.....</u>	173
<u>D)COMMUNAUTE EPITOPIQUE ENTRE SCHISTOSOME ET LA KLH.....</u>	176
<u>V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	181
<u>VI TABLE DES MATIERES.....</u>	209