

50376
1989
129

50376
1989
129

N° d'ordre 342

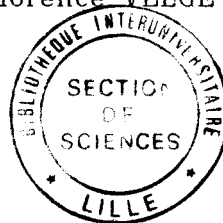
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FLANDRES-ARTOIS

THESE DE DOCTORAT

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de docteur en Biochimie

par

Florence VELGE-ROUSSEL



ETUDE DU RESEAU IDIOTYPIQUE DANS LA REPONSE IgE AU COURS DE LA
SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE DU RAT A *SCHISTOSOMA MANSONI*

présentée le 26 MAI 1989 devant la commission d'examen

Président M. J. Montreuil

Rapporteurs M. P. H. Lambert

M. C. Auriault

Examineurs M. A. Capron

Mme. G. Spik

MONSIEUR LE PROFESSEUR CAPRON,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et honorée de votre confiance.

Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Docteur Claude Auriault,

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

A monsieur le professeur Jean Montreuil,

Qui m'a fait l'honneur de présider la soutenance de cette
thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier particulièrement
Monsieur le Professeur Paul-Henri LAMBERT
Madame le Professeur Geneviève SPICK
Qui ont accepté de juger cette thèse
Qu'ils soient assurés de ma gratitude

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée dans ce travail et en particulier

Anne DELANOYE

Catherine VENDEVILLE

Christine MAZINGUE

Claudie VERWAERDE

Claudine COLSON

Françoise COTTREZ

Isabelle WOLOWCZUK

Jean-Marie GRZYCH

Marc BOUQUEREL

Martine DAMONNEVILLE

Pierre BILLAUT

Ray PIERCE

Véronique DUQUESNE

Véronique PANCRE

ABBREVIATIONS

Ab1, 2, 3 : Anticorps de 1^{ere}, 2^{eme}, 3^{eme} génération
ACF, AIF :Adjuvant Complet, Incomplet de Freund
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
Bq : Becquerel (1 Curie= 37 GBq)
BSA : "Bovine Serum Albumin"
c.p.m. : coups par minute
Con A : concanavalin A
CTL : "Cytotoxic T Lymphocyte"
DNP- : Dinitrophenyl-
FcεR I : Récepteur de classe I pour l'IgE
FcεR II : Récepteur de classe II pour l'IgE
HBSS : "Hank's Balanced Salt Solution"
IFNα : Interféron alpha
IFNγ : Interféron gamma
IkU/l : Internationale kilo Unité par litre
IL-2, -3, -4 : Interleukine 2, 3, 4.
kDa : kilo Dalton
OVA : Ovalbumine
P.M : Poids moléculaire
PBS : "Phosphate Buffered Saline"
RAST : "Radio Allergosorbent Test"
SEA : antigènes solubles d'oeufs (Soluble Egg Antigen)
SRP : Produits libérés par le schistosomule
SRP-A : antigènes libérés par le schistosomule
SVF : Sérum de Veau Foetal
Thy. : Thymidine
TNF : Tumor necrosis Factor ou lymphotoxine

RESUME

Les anticorps anaphylactiques, en particulier les anticorps IgE, ont un rôle primordial dans les mécanismes immunitaires développés au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni*. L'étude de la réponse IgE développée dans le modèle expérimental du rat dirigée contre les produits de relargage de la larve du parasite, appelés SRP, ont montré que les anticorps IgE anti-SRP induisent l'activité cytotoxique de cellules effectrices, macrophages, éosinophiles et plaquettes, vis-à-vis du schistosomule, stade larvaire du parasite.

Parmi les antigènes présents dans le SRP, nous nous sommes intéressés à la molécule de 26 kDa, cible antigénique des anticorps IgE des sérums anti-SRP et des sérums d'infection. Les cellules T spécifiques de la molécule de 26 kDa augmentent de façon significative la production d'IgE *in vitro* et participent à l'immunité protectrice. Un anticorps monoclonal, obtenu à partir d'animaux immunisés par de l'antigène de ver adulte, d'isotype IgE, reproduit les effets des anticorps IgE des sérums anti-SRP, induit l'activité cytotoxique en présence de cellules effectrices et confère une immunité protectrice à des rats. De plus cet anticorps reconnaît dans le SRP la molécule de 26 kDa.

Le rôle protecteur de l'épitope défini sur l'antigène de 26 kDa par l'anticorps monoclonal IgE a été démontré par la production d'anticorps anti-idiotypes. L'analyse des sérums anti-idiotypes sont produits par immunisation avec l'anticorps monoclonal Ab1 révèle l'apparition des anticorps anti-idiotypes (Ab2), des anticorps anti anti-idiotypes (Ab3) ces derniers reconnaissant le même antigène que l'anticorps IgE Ab1. L'étude

des isotypes des Ab3 montre la présence d'Ab3 d'isotype IgG et de façon plus intéressante d'Ab3 d'isotype IgE. Ces anticorps IgE reconnaissent l'antigène de 26 kDa et induisent également l'activité cytotoxique des plaquettes et des éosinophiles vis-à-vis du parasite. Les anticorps Ab3 IgG et IgE confèrent une immunité protectrice par transfert passif (environ 50%). Ces travaux montrent l'importance du réseau idiotypique dans la mise en place d'une immunité protectrice.

INTRODUCTION

La schistosomiase est une des maladies parasitaires affectant l'homme les plus répandues dans le monde. Cette maladie est actuellement endémique dans 74 pays et l'on estime à plus de 200 millions les individus infestés dans les régions agricoles, et à 600 millions le nombre d'individus exposés du fait même des conditions précaires de vie dans ces pays dits en voie de développement.

La lutte contre les parasitoses prend un aspect d'autant plus dramatique que ces maladies ont un caractère handicapant dans un grand nombre de pays. Et ironie, les méthodes d'irrigation et les essais d'éradication chimique aboutissent le plus souvent à une dissémination des parasites et à la sélection d'espèces chimio-résistantes.

Il semble donc que la compréhension de la réponse immunitaire qui apparaît au cours de la maladie soit primordiale pour envisager une lutte efficace. De plus l'appréhension de ces mécanismes fondamentaux a enrichi nos connaissances en mettant en évidence de nouveaux mécanismes de régulation du système immunitaire.

La pathologie peut revêtir de nombreux aspects suivant les différentes espèces de parasites infectants. La schistosomiase à *Schistosoma mansoni* ou schistosomiase hépato-splénique est plus particulièrement répandue dans 53 pays allant des pourtours du Nil (Egypte, Soudan), Niger, Oman jusqu'au Brésil, au Surinam et au Vénézuéla.

Les études réalisées jusqu'à présent concernent les différentes composantes de la réponse immune qui comprennent les mécanismes effecteurs, la caractérisation de leurs antigènes cibles et la modulation de l'immunité. D'autre part une part importante de la réponse immune dans la

schistosomiase est une réponse de type anaphylactique en particulier IgE. Les mécanismes y présidant semblent d'autant plus primordiaux que ce type de réponse est rencontré dans un grand nombre d'autres pathologies (allergies, syndrome hyperéosinophilique), la régulation de la réponse de type IgE reste donc une question d'actualité. A ce titre, cette maladie a suscité un intérêt croissant ces dix dernières années dans la mesure où elle peut bénéficier d'une approche expérimentale des mécanismes d'immunorégulation de la réponse IgE.

GENERALITES

LA SCHISTOSOMIASE

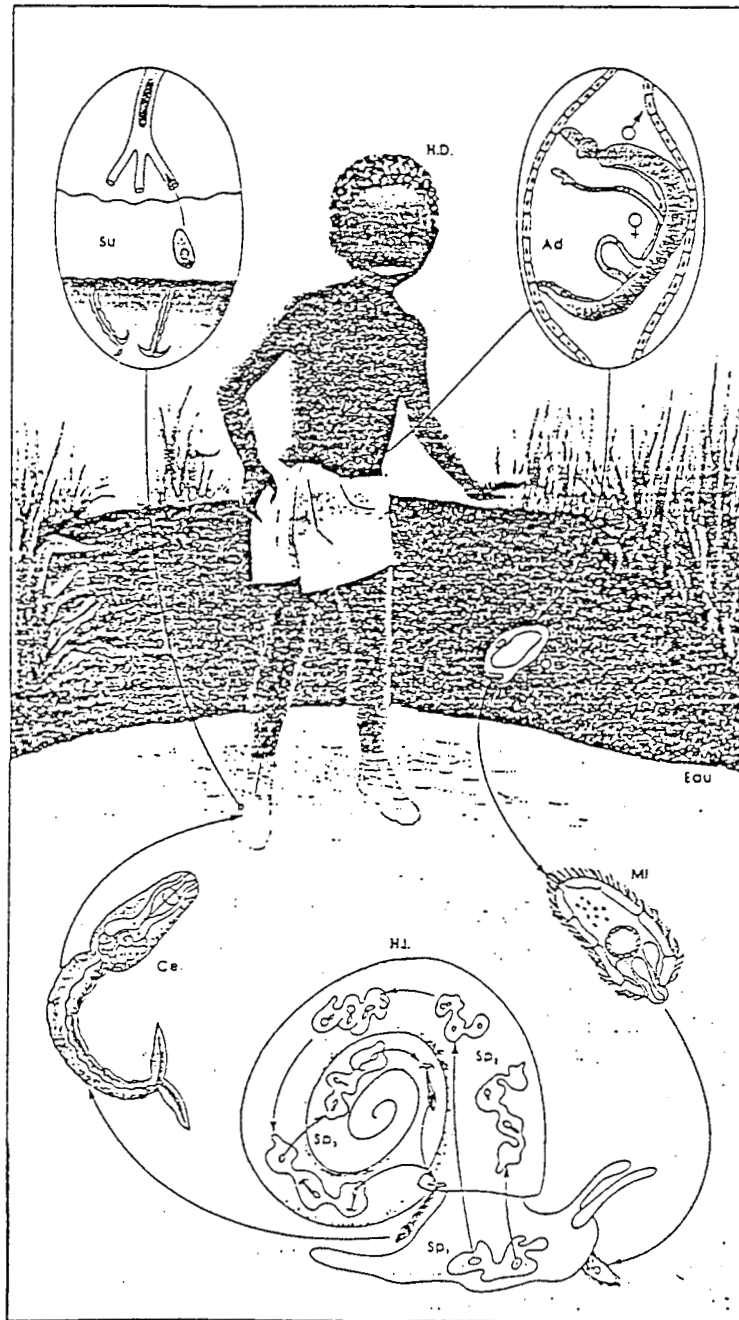
1. LE CYCLE

L'infection par *Schistosoma mansoni* ou schistosomiase hépatosplénique se caractérise par la présence de vers adultes bisexués dans le système veineux et porte de l'homme et de différents animaux de laboratoire. Les parasites y séjournent de nombreux mois, voire même plusieurs années. Cette situation résulte d'un cycle complexe de migration et de maturation du parasite. Les femelles pondent des oeufs qui traversent la paroi intestinale et sont éliminés dans les selles. Les oeufs au contact de l'eau douce libère un *miracidium* qui va infecter son hôte intermédiaire la planorbe *Biomphalaria glabrata*. Le parasite doit trouver son hôte dans les 8 à 12 heures pour survivre. Chez le mollusque, le miracidium se différencie en **sporocytes** primaires, secondaires, même tertiaires (Jourdan *et al.* 1980) qui produisent des **cercaires**, formes infestantes pour l'homme, hôte définitif. Elles pénètrent dans la peau et après la perte de l'appendice caudale les **schistosomules** atteignent les vaisseaux sanguins dans les 48 heures. Le jeune parasite devient un ver adulte mâle ou femelle. Les vers femelles demeurent liés dans le canal gynécophore des vers mâles toute leur existence. La femelle pond 100 à 300 oeufs par jour, dont la moitié seulement est libérée dans les selles, l'autre moitié qui se dépose dans les tissus est à l'origine des manifestations pathologiques de l'infection (**granulome**).

Bien que de études cliniques et épidémiologiques aient permis de bien connaître cette maladie, l'approche expérimentale requiert la mise en place de modèles animaux qui miment les différents états pathologiques décrits

FIGURE 1:

-LE CYCLE PARASITAIRE DE SCHISTOSOMA MANSONI-



pour l'homme. Ces modèles expérimentaux différant par leur degré de susceptibilité à la schistosomiase ont été développés dans le laboratoire.

Le degré de résistance à l'infection est très variable selon les espèces considérées, il va de l'élimination de la charge parasitaire à un état pathologique grave précédant la mort en passant par toutes les autres étapes intermédiaires de la maladie. Suivant ces observations, est proposée une classification qui regroupe trois catégories; les animaux totalement résistants, les animaux qui peuvent être infestés mais ne permettent pas un développement normal du parasite et enfin les animaux permissifs.

Le hamster et la souris sont considérés comme les hôtes les plus sensibles, chez eux les parasites développent un cycle normal s'accouplent et pondent des oeufs. L'homme, par ailleurs se comporte comme un hôte susceptible et développe une infection qui peut demeurer stable plusieurs années.

Parmi tous les hôtes possibles, le rat tient une place à part. En effet, c'est un hôte semi-permissif puisque les parasites peuvent l'infester et accomplir une migration hépatique. Mais à partir de la 3^{ème} semaine commence une phase de rejet de la charge parasitaire aboutissant à une diminution, et même une disparition des parasites (Smithers *et al.* 1965). De plus les rats présentent une résistance à la réinfection par le parasite.

2. LA REPOSE IMMUNE AU COURS DE LA SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE

Comme au cours de nombreuses infections causées par différents agents (virus, bactéries), l'hôte va développer différents mécanismes de défense immunitaire auxquels participent, soit des cellules sensibilisées (immunité cellulaire), soit des anticorps spécifiques de l'agent infectieux (immunité humorale).

2.1. L'immunité concomitante

L'immunité concomitante est née de l'observation de la résistance de singes Rhésus à la réinfection sans pour autant qu'il y ait élimination des vers adultes (Smithers *et al.* 1965). Les vers matures semblent être à l'origine de cette réponse dirigée contre les jeunes larves. Ces observations peuvent expliquer en partie la persistance de la charge parasitaire pendant plusieurs années chez l'homme ainsi que le maintien de son niveau constant.

2.2. La réponse cellulaire et granulomateuse

Au cours de l'infection, l'immunité cellulaire est surtout liée à des réactions d'hypersensibilité retardée. Au niveau du derme on peut observer, suite à la pénétration cercarienne, un afflux de leucocytes polynucléaires et de macrophages. Au stade du poumon, les schistosomules sont à l'origine d'une intense réaction inflammatoire (Von Lichtenberg *et al.* 1961). La formation d'un granulome périovulaire dans le foie apparait comme une des réactions cellulaires les plus typiques de la schistosomiase. De plus cette réaction granulomateuse est un des aspects les sévères de la pathologie en perturbant le débit sanguin portal hépatique.

Chez la souris Doughty B. *et al.*, (1982) établirent un modèle expérimental de formation du granulome, montrant notamment l'importance des lymphocytes dans le recrutement de différentes populations cellulaires.

2.3. La réponse humorale

Une caractéristique de l'infection par *Schistosoma mansoni*, ainsi que dans d'autres helminthiases est l'intense réponse humorale de type anaphylactique qu'elle provoque (Sadun et Gore, 1970). Pourtant ces anticorps n'apparaissent que lentement vers la 3^{ème} semaine pour être au taux maximum vers la 12^{ème} semaine chez le rat (Maddison *et al.* 1970). La réponse humorale est une composante essentielle de l'immunité protectrice comme le démontre les expériences de transfert de sérums immuns à des rats sains conférant une protection significative contre une infection ultérieure par *S. mansoni*. De plus en épuisant sélectivement ces sérums en anticorps de classe IgE ou IgG2a, Capron *et al.* (1980), ont montré l'importance de ces deux isotypes dans l'élaboration d'une immunité chez le rat. Ces anticorps nécessitent, pour induire une immunité protectrice la participation de cellules effectrices. Seul un faible pourcentage de ces anticorps correspond à des anticorps spécifiques de différents stades d'évolution du parasite (adulte, oeuf, schistosomule) (Rousseaux *et al.* 1980). On observe donc au cours de la schistosomiase une forte production d'IgE spécifiques du parasite ainsi qu'une potentialisation d'une réponse IgE non spécifique. Ce dernier sujet sera traité en détail dans le chapitre IgE (6.1).

3. LES MECANISMES EFFECTEURS

Nous ne décrivons pas ici tous les mécanismes effecteurs mais tenterons de rapporter les connaissances actuelles sur un certain nombre qui nous semblent importants.

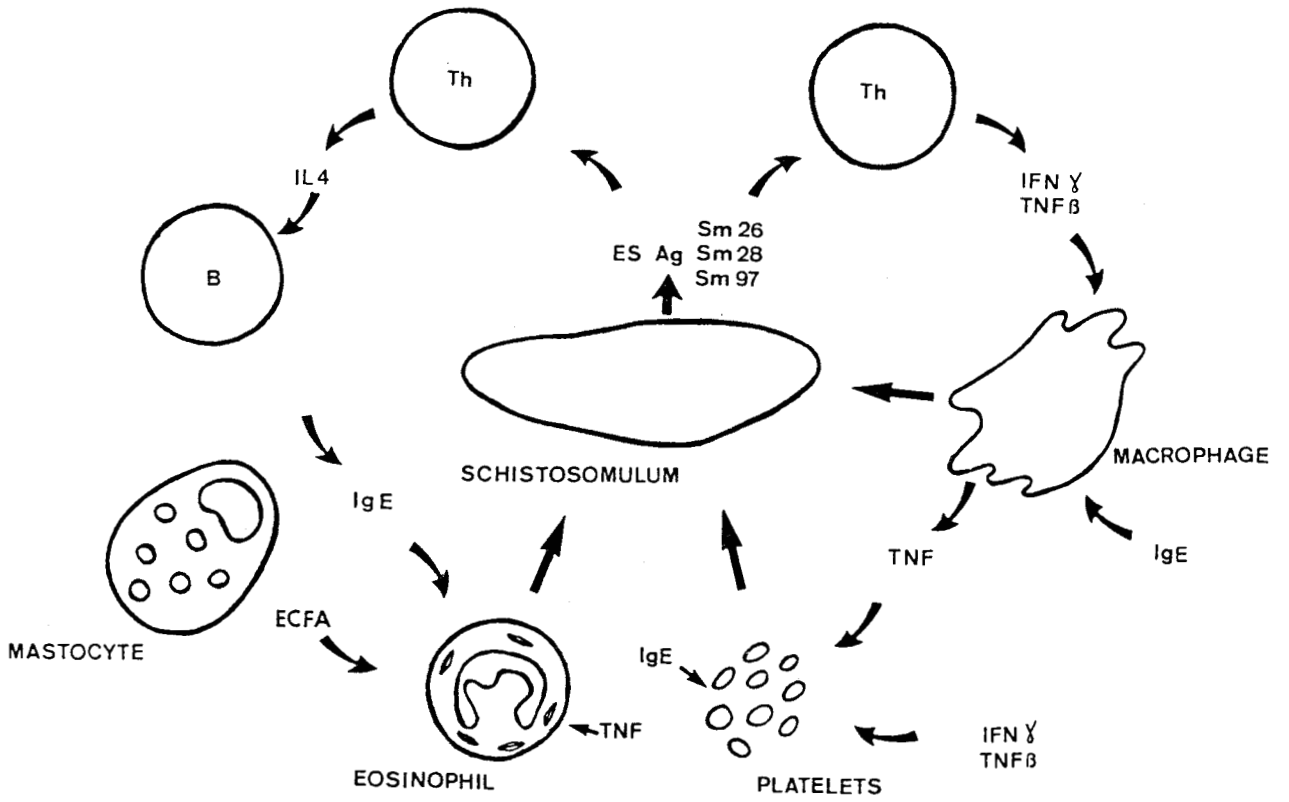


Figure 2 : Les mécanismes effecteurs cellulaires contre la larve du schistosome (Dr R. J. Pierce).

3.1. Cytotoxicité par anticorps léthaux

Il a été mis en évidence que des sérums de singes infectés par *S. mansoni* supplémenté en complément étaient capables de détruire *in vitro* des schistosomules. Les anticorps impliqués dans ce mécanisme sont des immunoglobulines G dont la toxicité ne s'exprime qu'en présence de complément hétérologue (Clegg *et al.* 1972). Ces anticorps sont spécifiques de stade et d'espèce. Cependant la pertinence biologique de ce phénomène reste incertaine, car il faut une source importante de complément hétérologue pour observer une cytotoxicité suffisante (Capron *et al.* 1977). De plus le transfert passif de fractions IgG ayant une activité léthale *in vitro* s'avère inefficace *in vivo* (Sher *et al.* 1975).

3.2. Cytotoxicité cellulaire

De nombreux aspects de la réponse immunitaire sont thymo-dépendants. Des animaux thymectomisés présentent une faible résistance à la réinfection par *S. mansoni* ainsi qu'une diminution des réactions d'hypersensibilité retardée, de l'hyperéosinophilie, et de la production d'anticorps notamment d'isotypes IgE (Capron *et al.* 1983). Contrairement aux infections virales ou bactériennes, la réponse cellulaire T ne semble pas impliquée dans des mécanismes de cytotoxicité type CTL. Pourtant le schistosomule peut acquérir à sa surface des antigènes majeurs d'histocompatibilité, et donc être la cible des mécanismes de cytotoxicité (Sher *et al.* 1978). Mais il va sans dire que la réponse cellulaire T reste néanmoins indispensable pour l'établissement d'une immunité efficace contre le schistosome.

D'autre part ont été décrits des mécanismes de cytotoxicité originaux impliquant d'une part des sérums et d'autre part des cellules de type inflammatoire telles que les macrophages, les éosinophiles, les plaquettes.

3.3.1. Cytotoxicité des macrophages anticorps-dépendante

Des sérums de rat immuns mis en présence de macrophages sont capables de tuer la larve du schistosome, le schistosomule *in vitro*. Les travaux de Capron *et al.* en 1977 ont montré la nature IgE des anticorps impliqués, ce qui suggèrerait l'existence d'un récepteur Fcε à la surface du macrophage (Fcε RII) de faible affinité différent de celui des mastocytes (FcεRI) de forte affinité. D'autre part la spécificité antigénique de l'anticorps est nécessaire. En effet la mise en contact des macrophages avec des sérums réaginique dirigés contre d'autres antigènes parasitaires ne provoque pas la mort du schistosomule. La cytotoxicité se fait par fixation des IgE sur le macrophage puis dans un deuxième temps, par contact de la cellule armée avec la cible. Cette cytotoxicité est également reproduite avec des sérums de patients bilharziens et des monocytes humains ou des macrophages péritonéaux de babouins (Joseph *et al.* 1978).

3.3.2. Cytotoxicité des éosinophiles anticorps-dépendante

Butterworth *et al.* observent en 1975 que les éosinophiles humains mis en présence des immunoglobulines des patients bilharziens pouvaient tuer le schistosomule. De nombreuses informations furent apportées par les travaux de Capron *et al.*, (1978), développés dans le modèle expérimental du rat. Ils ont permis de démontrer les composantes de ce mécanisme.

-La double fonction effectrice de l'éosinophile dépendante de deux classes d'anticorps anaphylactiques du rat, IgE et IgG2a.

-La coopération des mastocytes comme cellules accessoires. Ces cellules libèrent un médiateur chimio-attractif pour l'éosinophile "l'éosinophil factor of anaphylaxis" (ECFA)

-La cytotoxicité des éosinophiles semble résulter donc de deux signaux engendrés l'un par la fixation des anticorps sur le récepteur Fc de la cellule et l'autre induit par les produits de dégranulation du mastocyte par des IgG2a et les IgE.

L'obtention d'un anticorps Ig2a monoclonal IPLSM1 cytotoxique en présence d'éosinophiles a permis de vérifier l'efficacité de ce mécanisme effecteur autant *in vitro* qu'*in vivo* (Grzych *et al.* 1982). L'analyse des éosinophiles sur gradient de métrizamide permet de définir différentes catégories de cellules, normodenses, hypodenses, hyperdenses (Prin *et al.* 1983). Il semble que ce sont les éosinophiles hypodenses qui participent aux mécanismes effecteurs *in vitro*. La cytotoxicité de l'éosinophile dépendante d'anticorps ferait intervenir la libération de médiateurs tels que l'éosinophil peroxidase (EPO) (Capron *et al.* 1988).

3.3.3. Cytotoxicité des plaquettes dépendante d'anticorps

La participation de plaquettes sanguines dans les mécanismes de cytotoxicité vis-à-vis du schistosomule a été clairement démontrée grâce aux travaux de Joseph *et al.* 1983. Des plaquettes de rats infectés par *S. mansoni* tuent le schistosomule après quelques heures d'incubation. Cette activité cytotoxique est corrélée avec l'état d'immunité à la réinfection et est à son maximum aux environs de 7 semaines. De plus des plaquettes peuvent être rendues cytotoxiques si elles sont préalablement incubées avec des sérums d'individus ou de rats parasités, ce qui suggère l'existence d'un facteur sérique toxique pour la larve. La dépendance des IgE de ce mécanisme a été mis en évidence par des expériences d'inhibition avec des

IgE myélomateuses et de l'immunoabsorption anti-IgE des sérums. La démonstration de l'existence d'un récepteur pour l'IgE sur la plaquette est récente (Joseph *et al.* 1986). Ce récepteur pourrait être le même que celui des macrophages et des éosinophiles (FcεRII), mais ceci reste à confirmer.

3.2. Mécanismes dépendants de lymphokines

Les lymphocytes T contrôlent les mécanismes effecteurs développés au cours de la réponse immune à une infection parasitaire soit indirectement en agissant sur la production des anticorps, soit directement par le biais des lymphokines. Certaines lymphokines exercent une activité régulatrice au cours de l'immunité. En effet, elles peuvent avoir un effet non seulement sur l'expression de certains récepteurs à la surface des cellules, mais aussi agir directement sur les cellules qui libèrent des médiateurs cytotoxiques dans les mécanismes effecteurs.

L'IFN γ lymphokine sécrétée par les lymphocytes T activés par un antigène ou un mitogène, induit l'activité cytotoxique de certaines cellules inflammatoires. Pour le macrophage l'induction d'une cytotoxicité *S. mansoni* a été montrée par Kubella *et al.*, (1986), avec des surnageants de cellules spléniques. D'autre part des plaquettes activées par l'IFN γ (Pancré *et al.* 1987) deviennent cytotoxiques vis-à-vis de la larve de *S. mansoni*. De plus l'induction par l'IFN γ à l'augmentation du nombre de récepteurs pour l'IgE sur la plaquette en présence d'IFN γ (Pancré *et al.* 1988). Jusqu'à maintenant l'IFN γ n'a pas été montré comme ayant une action sur l'éosinophile.

Une autre lymphokine, le Tumor Necrosis Factor β (TNF β), ou lymphotoxine confère aux plaquettes saines une activité cytotoxique *in vitro* de façon dose dépendante, le TNF α a la même activité mais dans une moindre mesure (Damonville *et al.* 1988). Le TNF α a également une action directe sur

l'activité cytotoxique de l'éosinophile vis-à-vis des schistosomules (Sylvertein *et al.* 1987).

Enfin des lymphokines telles que HILDA, l'IL4 humaine, l'IL5 murine augmentent de façon dose dépendante la cytotoxicité de l'éosinophile. L'IL3 et le GM-CSF recombinantes humaines sont capables de transformer des éosinophiles normodenses en hypodenses, état le plus actif pour la cytotoxicité *in vitro* (Capron *et al.* 1988).

3.4. Pertinence *in vivo* des mécanismes effecteurs

La connaissance des mécanismes d'immunité est en grande partie apportée par des études réalisées *in vitro*. Il est donc nécessaire de se poser la question de leur pertinence *in vivo* au cours de la mise en place de l'immunité anti-parasitaire.

Il faut d'abord noter qu'il existe une relation chronologique étroite entre l'apparition des anticorps de type anaphylactique et l'immunité à la réinfection observée chez le rat ainsi que l'expression dynamique des mécanismes effecteurs *in vitro* (Capron *et al.* 1980). De plus des expériences de transferts de sérums d'infection épuisés sélectivement en anticorps d'isotype IgG2a ou IgE ont conduit à un effondrement important de l'immunité induite par ces transferts (Capron *et al.* 1980). Des arguments plus forts nous sont donnés par l'utilisation dans des expériences de transferts d'anticorps monoclonaux d'isotype IgG2a et IgE (Grzych *et al.* 1982, Verwaerde *et al.* 1987). Ces deux anticorps monoclonaux induisent une protection vis-à-vis d'une infection d'épreuve. Ces résultats montrent l'importance de ces deux classes d'anticorps mais ne permettent pas de désigner les populations cellulaires entrant en jeu. Des expériences de transfert de différentes populations de cellules immunes à des animaux avant leur infestation ont permis démontrer l'acquisition d'une immunité. En

particulier avec des populations enrichies en éosinophiles prélevées à des périodes correspondant à la présence d'anticorps IgG2a (6 à 12 semaines) ou d'IgE (5 à 8 semaines) à leur surface (Capron *et al.* 1984). Des résultats similaires sont obtenus avec d'autres populations cellulaires telles que les plaquettes dans la période où l'immunité à la réinfection est optimale (Joseph *et al.* 1983).

La critique que l'on peut faire est que l'on utilise des systèmes restreints donnant une image simplifiée d'une réalité plus complexe. L'immunité vis-à-vis du schistosome constitue un ensemble de faits et ayant une dynamique propre. Il faut envisager l'existence de processus modulateurs entre les mécanismes effecteurs aussi bien synergiques qu'antagonistes.

3.5. Antigènes cibles de l'immunité

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons aux antigènes induisant une réponse autre qu'IgE ceux-ci seront décrits dans le chapitre "Régulation de la réponse IgE"

L'étude des antigènes et l'analyse de la réponse qu'ils induisent permettent de déterminer leur importance dans l'immunité ainsi que leur potentialité vaccinnante.

De nombreux travaux ont montré la complexité de leur composition en protéines et en glycoprotéines isolées du parasite soit au stade larvaire (schistosomule), soit de stade adulte. Différentes méthodes biochimiques ont permis de caractériser des antigènes de surface du schistosomule. Des sérums d'animaux infectés par *S. mansoni* de façon chronique ainsi que des sérums humains reconnaissent des molécules de la surface du schistosomule de 30-40 kDa ainsi que 15-25 kDa (Dissous *et al.* 1984).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux induisant une protection a permis de définir un certain nombre de cibles antigéniques. C'est le cas de l'anticorps monoclonal IgG2a IPLSM1 qui reconnaît une glycoprotéine Gp 38 au stade larvaire et une molécule de 115 kDa au stade adulte.

La paramyosine Sm 97 décrite et séquencée par Sher (Sher *et al.* 1988) est un des rares antigènes pouvant induire dans le modèle souris une immunité protectrice. D'autre part, cette molécule a été identifiée également dans notre laboratoire à l'aide de sérums de rats infestés par *S. mansoni* (Pierce, communication personnelle).

Un antigène de 28 kDa a été caractérisé dans l'antigène d'adulte pour ses propriétés protectrices dans différents modèles. Il existe sous plusieurs formes et deux molécules ont été clonées P28-1 et P28-2. Les travaux faits sur P28-1 montrent que dans les différents modèles la molécule recombinante est capable d'induire le même niveau de protection. L'antigène P28-1 est une enzyme de la famille des glutathion-transférases. Ces enzymes sont impliquées dans les mécanismes de détoxification des organismes et peuvent donc jouer un rôle protecteur du parasite dans les attaques de l'hôte en neutralisant les radicaux peroxides.

Des travaux d'immunisations avec une seule dose de protéine recombinante P28-1 en présence d'adjuvant tel que le BCG chez le rat et la souris montrent que l'on obtient un niveau de protection tout à fait comparable à celui obtenu avec l'antigène natif. Les résultats de ce protocole laissent envisager une vaccination sur le terrain dans le cadre des campagnes contre la tuberculose. Et l'on peut dans différents modèles animaux, dont les primates, mettre en évidence un rôle protecteur de la molécule recombinante (Balloul *et al.* 1987).

D'autre part des cellules T spécifiques de la molécule P28-1 transférées passivement confèrent une immunité protectrice vis-à-vis d'une infection d'épreuve (50 à 80%). De plus Auriault *et al.*, (1987) montrent que le transfert de ces cellules T a un effet "helper" sur la réponse IgE anti-P28-1. Des études poursuivies actuellement visent à déterminer à l'aide de peptides de la molécule P28-1 les épitopes T majeurs.

REGULATION DE LA REPOSE IgE

1. GENERALITES

La réponse IgE subit les mêmes événements cellulaires et moléculaires fondamentaux que les autres réponses anticorps. Mais le contraste entre le nombre de plasmocytes B ϵ (précurseurs des cellules B sécrétant les IgE) et la quantité d'IgE produite indique cependant que la sécrétion de cet isotype est soumise à un contrôle strict. L'expression de l'IgE est régulée par l'IgE elle même, de façon antigène-spécifique, par des anticorps antiidiotypes ainsi que par certaines lymphokines telles que l'IFN τ et l'IL4.

2. REGULATION SPECIFIQUE D'IgE

Le rôle des cellules T dans la génération des différentes classes d'immunoglobulines autres que IgM a été analysé par de nombreuses études sur des souris thymectomisées. D'autre part il a été suggéré que les populations T à l'origine de la réponse IgE et IgA soient différentes de celles des autres classes (Khishimoto *et al.* 1982). La mise en évidence de facteurs d'origine cellulaire régulant la production d'IgE a permis de grands progrès dans l'éclaircissement de ce mécanisme.

Comme les autres immunoglobulines, les IgE sont produites sous deux formes, soluble et membranaire. La forme soluble dépourvue de la région hydrophobe transmembranaire est libérée dans le milieu tandis que la forme membranaire est insérée dans la membrane des cellules B.

Les molécules qui se lient à la région Fc des IgE sont aussi de deux formes solubles et membranaires. Les formes membranaires se classent selon leurs affinités pour l'IgE en récepteur de forte (Fc ϵ RI) ou de faible affinité

(FcεRII). On connaît la forme membranaire FcεRI du mastocyte, du basophile et la forme FcεRII du macrophage (Capron *et al.* 1975), de l'éosinophile (Capron *et al.* 1981), de la plaquette (Joseph *et al.* 1986), du lymphocyte B ainsi que du lymphocyte T activé (Huff *et al.* 1984). Les formes solubles de ces molécules ont été décrites par Ishizaka et Katz (1985). Il s'agit des **IgE binding factor, (IgE BF)**.

2.1. Facteurs décrits par Ishizaka

Les travaux de l'équipe d'Ishizaka (Ishizaka *et al.* 1985) utilisent un modèle d'infection du rat par le nématode *Nippostrongylus brasiliensis* où l'on observe une augmentation sélective de la réponse IgE. Ils mettent en évidence deux facteurs solubles IgE-BF produits par les lymphocytes de rats infestés : l'IgE PF, IgE Potentiating Factor et l'IgE SF, IgE Suppressing Factor. Ces lymphokines peuvent être produites par des lymphocytes T normaux activés *in vitro* et agissent de façon antagoniste. Elles sont sous le contrôle d'autres lymphokines, le GEF Glycosylation-Enhancing Factor pour l'IgE PF et le GIF Glycosylation-Inhibiting Factor pour l'IgE SP. Ce modèle s'est avéré valable dans d'autres domaines expérimentaux et est résumé sur la figure 3 .

2.2. Nature et régulation des IgE-BF

Ces deux facteurs ont la même structure protéique mais différent dans leurs résidus glycosylés. Ils sont traduits à partir du même ARNm que les Fcε R (Ikuta *et al.* 1987)

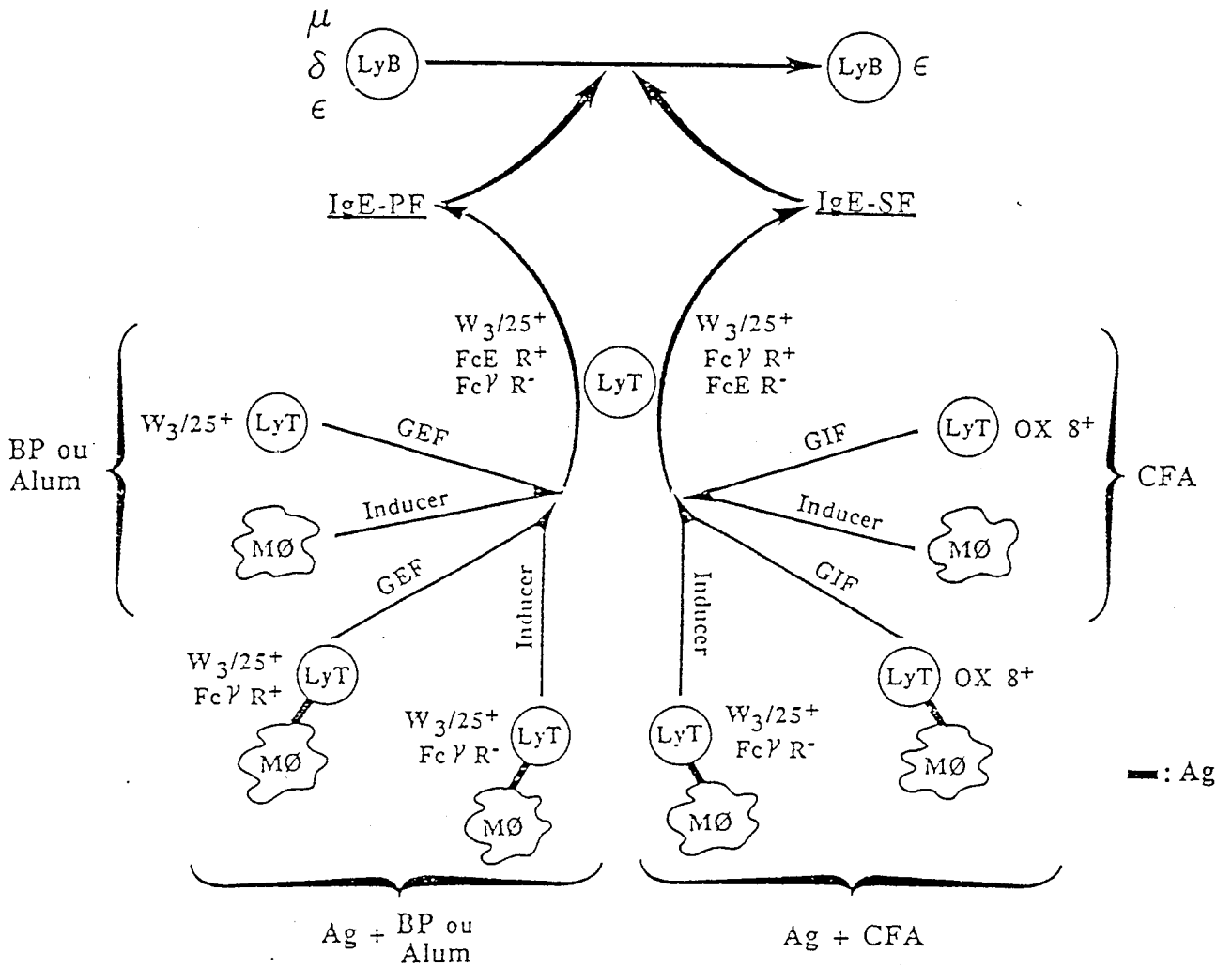


Figure 3 : Régulation de la synthèse d'IgE selon ISHIZAKA *et al.* : Mécanismes de production des "IgE-binding factors" après traitement par adjuvants ou après stimulation antigénique.

"IgE-potentiating factor"

C'est une glycoprotéine de 13 à 15 kDa possédant des résidus α -mannose. Cette protéine est à la fois N- et O- glycosylée. La fixation de l'IgE PF sur l'IgE se fait par la partie protéique. Cette molécule est libérée par les lymphocytes exprimant le phénotype (W3/25⁺) chez le rat, ayant un récepteur pour l'IgE (Suemura *et al.* 1980).

"IgE-suppressive factor"

Il s'agit également d'une glycoprotéine de 13 à 15 kDa mais ne possédant que des résidus O-oligosaccharidiques. Cette molécule est produite par les lymphocytes T W3/25 portant un récepteur pour les IgG (Fc γ R⁺) et son action est antagoniste de l'IgE PF.

Leurs productions sont sous la dépendance de deux antagonistes le GEF et le GIF. Ces facteurs augmentent ou diminuent la glycosylation des IgE BF. Le GEF est obtenu sous l'action du vaccin *B. pertussis* sur des lymphocytes T "helper" (W3/25⁺Fc γ R⁺). C'est une protéine de 25 kDa ayant une activité kallikreine et lectine-like. Elle agirait via la voie des phospholipases A2 (Iwata *et al.* 1984), voie activatrice de certaines glycosyltransférases qui augmentant la N-glycosylation des IgE-BF leur confèrent une activité potentiatrice. Le GIF est produit par les lymphocytes T OX8⁺ (suppresseur, cytotoxique) Fc γ R⁺ sous l'action du CFA. C'est un fragment de lipomoduline phosphorylée qui par inactivation des phospholipases inhibe la fixation des N-oligosaccharides aux IgE-BF (Uede *et al.* 1983).

2.3. Modèle décrit par Katz

Parallèlement l'équipe de Katz dans le modèle murin établirent un modèle de régulation faisant intervenir une cascade de facteurs sécrétés et régulant l'expression du récepteur pour l'IgE (Katz *et al.* 1984).

Les lymphocytes B $Fc\epsilon R^+$ sont au centre du modèle et par une cascade d'événements. On aboutit finalement au contrôle de l'expression des récepteurs $Fc\epsilon R$ sur les lymphocytes B et à la production des IgE.

A côté de l'induction directe de $Fc\epsilon R$ sur les cellules T et B par l'IgE agrégée, l'IgE monomérique provoque la production par les lymphocytes B d'un facteur soluble l'IgE-Induced Régulant EIR_B qui est capable d'induire la production pour les cellules T $Ly2^+$ ("helper" chez la souris) d'un EIR_T . Celui-ci stimule l'expression de $Fc\epsilon R$ sur les lymphocytes T. Le facteur EIR_B augmente l'expression des récepteurs pour l'IgE sur les cellules B et induit la production par les cellules $LyT1^+$ (suppressives chez la souris) du Suppressor Factor of Allergy (SFA) capable d'inhiber la réponse IgE (Marcelletti *et al.* 1984). Les cellules T $Ly2^+$ stimulées par l' EIR_T produisent les EEM (Enhancing Effector Molecule) et les cellules T et B ($Ly1^+$) les SEM (Suppressing Effector Molecule) sous l'influence du SFA. Le SFA et les SEM seraient des IgE-BF qui diminueraient l'expression de $Fc\epsilon R$ sur les cellules B. Enfin on peut dire que les deux molécules effectrices finales qui lient l'IgE pourraient être identiques aux IgE-BF décrits par Ishisaka. D'autre part, ce modèle souligne que l'expression des $Fc\epsilon R$ sur la cellule n'est pas constitutive mais fait l'objet de facteurs multiples de régulation.

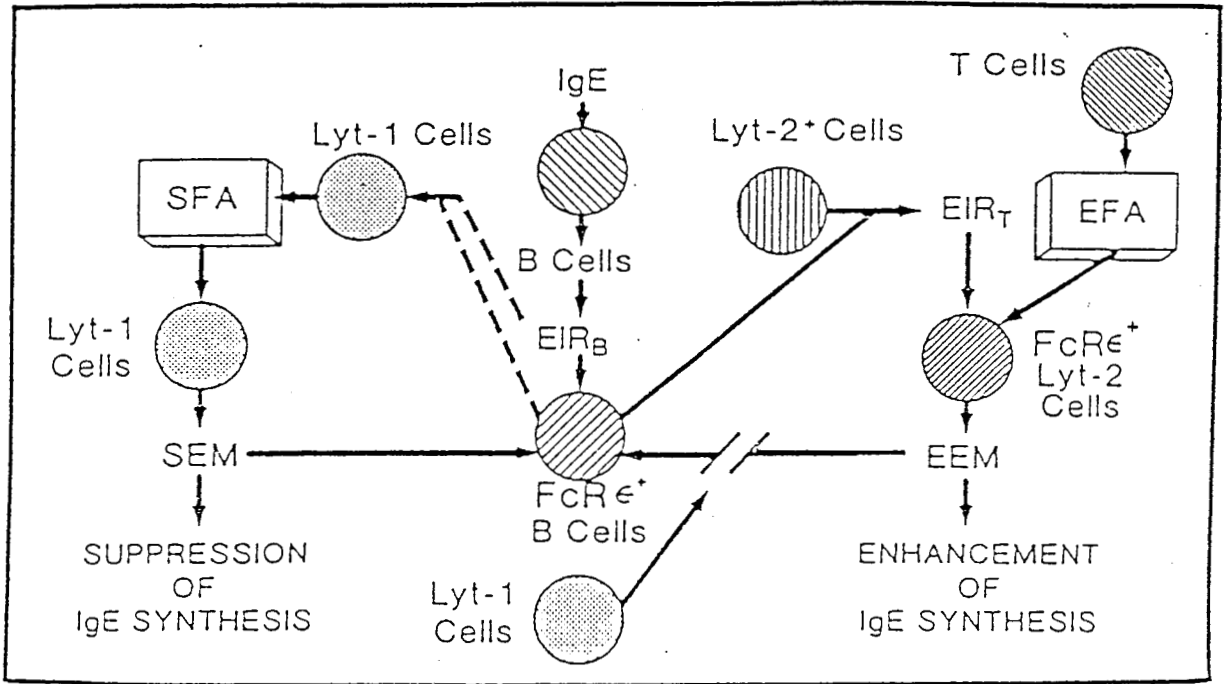


Figure 4 : Régulation de la synthèse d'IgE selon KATZ *et al.* (d'après KATZ, D. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 77, p.22, 1985)

3. REGULATION ANTIGENE-SPECIFIQUE

L'étude de la régulation de la réponse IgE peut être envisagée via la tolérisation des populations B ou via la manipulation des cellules T qui régulent la différenciation des plasmocytes en cellules B sécrétant des IgE. Les travaux de Katz *et al.*, (1973) montrent une suppression de la réponse IgE par injection de dinitrophényl-D glutamine-lysine (DNP-dGL) avant l'immunisation par dinitrophényl-ovalbumine (DNP-OVA). Cette suppression est générale à tous les isotypes y compris les IgE et semble due à l'induction de cellules B tolérantes. Kishimoto *et al.*, (1982) étendent l'hypothèse de cellules T antigène-spécifiques suppressives à la régulation de l'IgE et mettent en évidence un facteur suppresseur spécifique de l'IgE produit par les cellules T (IgE TsF). Ils montrent qu'il existe des cellules T spécifiques de l'antigène, "helper" et suppressives de la réponse IgE qui sont différentes de celles régulant la réponse IgG. Enfin Ishisaka définit par de nombreux travaux une présentation générale de la régulation antigène spécifique de l'IgE par l'intermédiaire des cellules T spécifiques obtenues en présence d'hydroxide d'alumine ou de CFA. De plus il semble que sous l'influence de IgE "Binding Factor" secrétés par les cellules T spécifiques d'antigène, seraient induits des facteurs secrétés constitutivement par les cellules T, le GIF et le GEF qui auraient une affinité pour l'antigène et qui réguleraient la réponse anticorps de façon "porteur" dépendante. (Ishisaka *et al.* 1988) (fig.3).

4. REGULATION PAR LES ANTICORPS ANTIIDIOTYPES

D'autre part Liu *et al.*, (1979) dans le système ovalbumine-Dglutamine-Dlysine (OVA-dGL) chez la souris obtient une suppression de la réponse I^a et II^a IgE contre l'OVA par injection de OVA-dGL. Mais le

mécanisme ici est différent, il ne s'agit pas de cellules B tolérantes, ni de l'induction de cellules T suppressives et la suppression est limitée à l'isotype IgE mais plus probablement d'une inhibition due à des anticorps anti-Id.

Dans le modèle benzypenicibyl (BPO), il est possible d'inhiber une réponse IgE établie, par l'injection d'anticorps anti-Id homologues chez le cobaye sans pour autant affecter la réponse IgG (Wetterwald *et al.* 1986). La suppression s'exercerait au niveau du stade primaire sur les cellules B ϵ lorsqu'elles sont encore accessibles à une régulation via les cellules T. Ces cellules T régulatrices seraient induites par des cellules anti-Id-Id couplées comme cela a été montré dans d'autres modèles d'hypersensibilité retardée (Sy *et al.* 1980) ou d'immunité cellulaire. Au stade secondaire, les cellules B seraient bloquées par les anticorps anti-Id.

5. REGULATION PAR LES LYMPHOKINES

Les deux principales lymphokines décrites comme intervenant dans la régulation de l'IgE sont l'IL4 et l'IFN τ . En effet, l'IL4 ou BSF-1 est produite par une sous-population de lymphocytes T "helper" Th2 avec une autre lymphokine l'IL3 (Mosmann *et al.* 1986). Les premiers travaux faits *in vitro* sur l'activation de populations B au LPS ont permis de montrer l'effet de l'IL4 sur la sécrétion d'IgG1 et d'IgE (Coffmann *et al.* 1986). Pour des concentrations inférieures à 10^3 U/ml, l'IL4 augmente la sécrétion d'IgG1 tandis qu'aux concentrations supérieures le taux d'IgE est fortement augmenté (Snapper *et al.* 1988). Il est à noter la suppression induite par l'IL4 pour les autres isotypes tels IgG3 et IgG2b (Jones *et al.* 1983) et IgM et IgG2a (Snapper *et al.* 1988). Cette action de l'IL4 sur la production d'IgG1 et d'IgE est différentielle, en effet de fortes concentrations de lymphokine présente dans la culture après 48h inhibe la production d'IgG1

et augmente le taux d'IgE (Snapper *et al.* 1988). Cette potentialisation de la réponse IgE se ferait par l'induction de récepteurs de faible affinité pour l'IgE (marqueur CD23 sur les cellules humaines) sur les cellules B (Bonnefoy *et al.* 1987). L'activité de l'IL4 a été démontrée *in vivo* (Finkelman *et al.* 1988) chez des souris infectées par *Nippostrongylus brasiliensis* à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IL4. Ces auteurs observent ainsi une inhibition de la réponse polyclonale IgE.

L'IFN τ a un effet antagoniste de l'IL4 et semble diminuer la production d'IgE. Il est produit par les lymphocytes T "helper" Th1 (Mosman *et al.* 1986) avec l'IL2 et l'IL3. L'IFN τ recombinant stimule la sécrétion d'IgG2a et inhibe la synthèse d'IgG1 dans le cas de cellules B activées au LPS (Snapper *et al.* 1988). D'autre part il est possible d'inhiber la synthèse d'IgG1 et d'IgE induites par l'IL4 par de l'interféron τ ainsi que par de l'interféron α et la prostaglandine E₂ (Pène *et al.* 1988). Dans ce cas, il est observé une inhibition de l'expression des récepteurs de faible affinité pour l'IgE. Ceci montre les effets antagonistes de l'IFN τ et de l'IL4.

6. LA REponse IgE AU COURS DE LA SCHISTOSOMIASE

6.1. Généralités

Comme nous l'avons déjà souligné, une des principales caractéristiques immunologiques des helminthiases est la production importante d'IgE, observée chez la souris (Mota *et al.* 1969), chez le rat (Jarrett *et al.* 1974) et chez l'homme (Ito *et al.* 1972). Cependant cette augmentation des IgE sériques n'est pas due seulement à des anticorps anti-schistosomes mais surtout à une potentialisation de la réponse IgE préexistante. En effet 5 à 10% seulement des IgE totales dans les sérums bilharziens sont spécifiques d'antigènes de *Schistosoma mansoni* (Dessaint *et*

al. 1975). Le taux moyen d'IgE anti-schistosome au cours de la maladie est de 177 IKU/ml et peut atteindre 1000 IKU/ml. On observe chez certains patients en phase chronique un taux d'IgE plus élevé qu'en phase aiguë (Ottesen *et al.* 1981).

Cet effet stimulant sur les IgE n'est pas à confondre avec un simple effet adjuvant. Si l'infection expérimentale est réalisée avant, en même temps ou juste après l'immunisation, l'effet potentiateur n'a pas lieu et il peut même y avoir inhibition de la réponse IgE en cours (Orr *et al.* 1972).

6.2. Modulation de la réponse IgE par les produits parasitaires

Verwaerde *et al.*, (1986) ont montré que le schistosome dès le stade larvaire libérait des molécules contrôlant la synthèse de certains isotypes en particulier les IgE. En effet l'addition de SRP (Schistosomula Released Products) sur des lymphocytes anti-DNP-OVA, antigène classiquement utilisé pour étudier la réponse IgE *in vitro*, met en évidence une potentialisation des IgE de façon sélective ainsi qu'un effet inhibiteur sur la réponse IgM anti-DNP. Cette activité potentialisatrice a pu être reliée à une activité serine protéase, exprimée exclusivement au stade larvaire. Cette observation est vérifiée *in vivo* puisque l'injection simultanée de DNP-OVA et de SRP en réponse secondaire induit également une augmentation de la réponse IgE sérique spécifique du DNP.

Il semble donc que le SRP exerce une activité régulatrice importante sur la réponse IgE au cours de la phase précoce de l'infection par *S. mansoni*.

6.3. Réponse IgE contre les produits d'excrétion du schistosomule (SRP-A)

Nous avons vu que les anticorps anaphylactiques, en particulier les IgE, ont un rôle clef dans les mécanismes immunitaires au cours de

l'infection. Des travaux précédents ont été consacrés aux antigènes cibles des anticorps IgE et plus précisément aux antigènes excrétés par le schistosomule (Schistosomula Released Products). L'injection de SRP-A à des rats ou à des singes *Erythrocebus patas*, sans adjuvant induit préférentiellement la production d'IgE (Damonville *et al.* 1986). Ces anticorps sont cytotoxiques pour le schistosomule en présence d'éosinophiles, de macrophages et de plaquettes. L'immunisation de rats avec du SRP-A suivit d'une infection d'épreuve, diminue la charge parasitaire de 90%. De plus l'importance de la réponse IgE dans l'immunité protectrice est démontrée par le transfert passif des sérums anti-SRP-A.

Deux antigènes de masse moléculaire 22 kDa et 26 kDa sont identifiés par les anticorps IgE des sérums anti-SRP-A; l'antigène de 26 kDa, reconnu par un sérum d'infection, apparaît comme un antigène potentiellement vaccinant, ce qui n'est pas le cas de l'antigène de 22 kDa (Auriault *et al.* 1984).

Des cellules T spécifiques des antigènes du SRP-A ou de l'antigène de 26 kDa ont été isolés (Damonville *et al.* 1987). Certaines lignées ont été maintenues en culture afin de tester, *in vitro* leur activité amplificatrice de la réponse anticorps IgE, d'autres ont été transférés à des rats. Dans les deux cas, il apparaît que les lymphocytes T augmente de façon significative la production d'IgE et participent à l'immunité protectrice. On voit donc que le SRP malgré la faible quantité de matériel qu'il représente constitue un élément essentiel de l'étude de la réponse immune au cours de la schistosomiase.

Cette étude nécessitait néanmoins des outils spécifiques. Dans ce but la préparation d'un anticorps d'isotype IgE monoclonale B48-14 dirigé contre la molécule de 26 kDa a été réalisée (Verwaerde *et al.* 1987). Obtenir un anticorps IgE monoclonal doué de propriétés effectrices et protectrices analogues à celles des IgE des sérums d'infections s'avèrait une aventure

délicate lorsque l'on connaît le faible pourcentage de cellules B ϵ . Grâce à la technique de Köhler et al., (1975) et à l'aide de cellules de rat immunisé avec la fraction antigénique de ver adulte, un anticorps d'isotype IgE a été obtenu. Cet anticorps IgE monoclonal reproduit les activités effectrices des sérums anti-SRP; elle induit une activité cytotoxique des macrophages, des éosinophiles et des plaquettes à un taux comparable à celui obtenu avec les anticorps IgE des sérums d'infection ou anti-SRP. Par transfert passif cet anticorps confère une immunité protectrice à des rats vis-à-vis d'une infection d'épreuve d'un niveau équivalent à celui obtenu pour un sérum d'infection. Enfin cet anticorps B48-14 reconnaît dans le SRP, l'antigène de 26 kDa. Cette sonde monoclonale est à l'origine de notre travail.

6.4. Conclusions

Plusieurs possibilités nous sont offertes quant aux stratégies présidant au choix et à l'étude de molécules potentiellement vaccinales. Si l'on dispose de la molécule via les techniques de la biologie moléculaire, comme dans le cas de la P28 l'étude peut se faire à l'aide de peptides néosynthétisés et l'on pourra affiner la détermination des épitopes T ou B. Une autre possibilité, lorsqu'on ne dispose pas de la molécule ou que les épitopes concernés sont de nature glycanique comme dans le cas de la Gp38, consiste en la préparation d'anticorps anti-idiotypes. Etant donné que nous ne disposons de la molécule de 26 kDa qu'en faible quantité et que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal B48-14 semblait induire une immunité protectrice, nous avons choisi d'aborder cette étude en préparant des anticorps anti-idiotypes.

LES ANTICORPS ANTIIDIOTYPES

LES ANTICORPS ANTIIDiotYPES

Le fait de considérer que certaines parties des anticorps pouvaient être reconnues comme non soi et donc induire une réponse immunologique était audacieux. Les conséquences immunologiques qui en découlent sont immenses.

Ce chapitre n'a pas la prétention de faire le point de façon exhaustive sur l'apport de la connaissance de l'idiotypie à l'immunologie, mais d'introduire un certain nombre d'éléments marquants dans ce domaine.

1. STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES

Malgré leur diversité, les immunoglobulines sont formées sur le même modèle. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) avec des domaines variables (V) et constants (C), assemblées sous forme monomères ou polymères.

Ces glycoprotéines se caractérisent par un polymorphisme dans lequel il est possible de définir trois niveaux principaux de variabilité.

1.1. les variations isotypiques

L'isotypie définit à l'intérieur de l'espèce la variation des chaînes lourdes et légères dans leurs parties constantes. Pour l'homme, on caractérise différents isotypes codés par les gènes correspondant aux chaînes lourdes τ_1 , τ_2 , τ_3 , τ_4 , μ , ϵ , α , δ et pour les chaînes légères k et l.

1.2. Les variations allotypiques

L'allotypie concerne les différences entre individus ou famille d'une même espèce et met en jeu différents allèles d'un même locus. Ces déterminants allotypiques sont en général localisés dans les domaines constants des chaînes lourdes des immunoglobulines.

1.3. Les variations idiotypiques

Les anticorps portent des déterminants antigéniques au niveau des domaines V. Ces déterminants sont appelés **idiotopes**, et l'ensemble des idiotopes portés par un anticorps constitue l'idiotype de l'anticorps (Id). Ainsi l'idotypie concerne des déterminants localisés dans les parties hypervariables ainsi que dans l'armature des chaînes lourdes et légères.

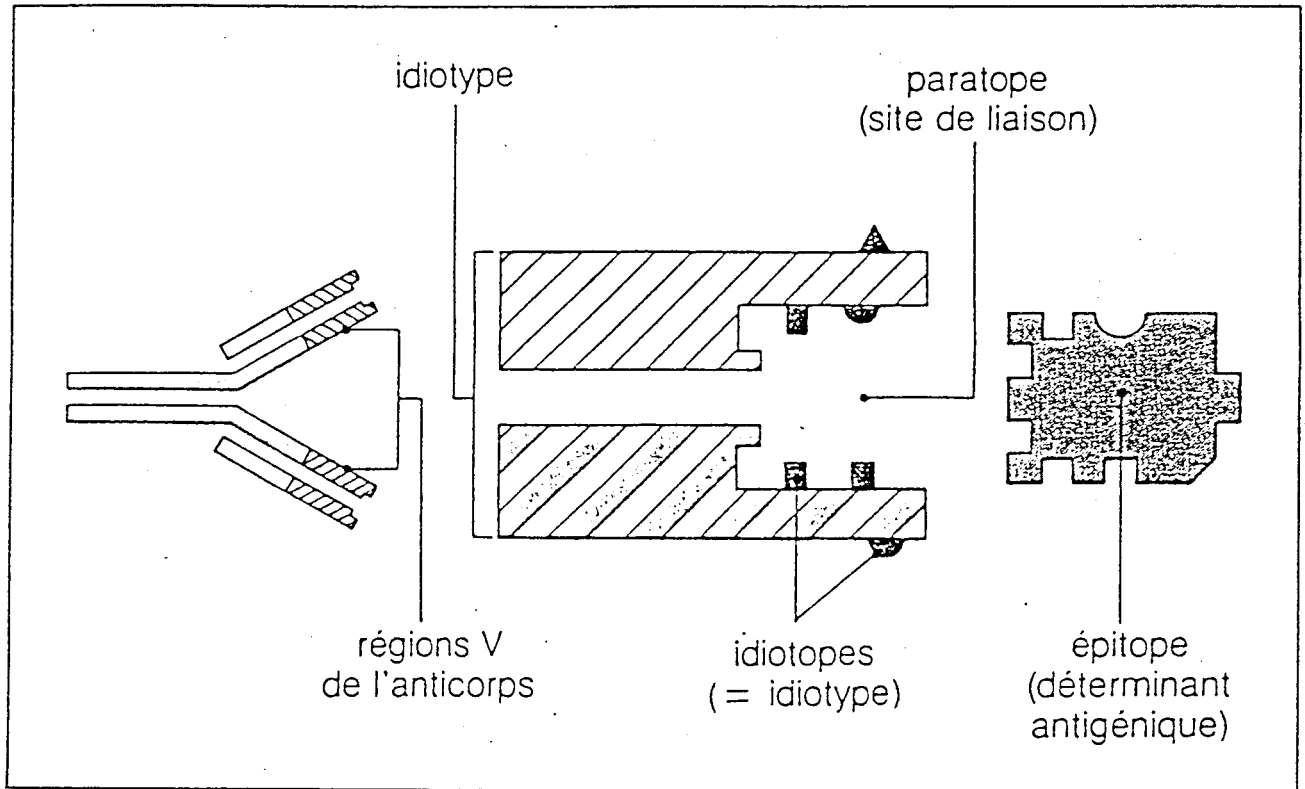


Figure 5 : Représentation schématique de la région variable des immunoglobulines.

2. L'IDIOTYPIE

2.1. Découverte de l'idiotypie

Les découvertes concernant l'idiotypie ont été faites presque simultanément en 1963 par Oudin *et al.* et par Kunkel *et al.*, l'un dans un système hétérologue, l'autre chez l'homme dans un système homologue.

2.1.1. Expérience de Oudin et Michel

Ces expériences réalisées sur des lapins ayant la même constitution allotypique, consistaient en la préparation d'anticorps anti-*Salmonella typhimurium* chez un lapin A. Du sérum était prélevé avant l'immunisation (A₀) puis après (A₁). Les anticorps de cette saignée A₁ étaient mis en contact avec l'antigène et réinjectés chez un lapin B. Une partie des anticorps recueillis à partir du sérum B étaient capable de reconnaître spécifiquement les anticorps du lapin A, mais aucune réaction n'était observée avec le sérum A₀ ni avec celui d'autres lapins anti-salmonella. Ces anticorps sont appelés anticorps antiidiotypiques (anti-Id) puisqu'ils reconnaissent des idiotopes spécifiques dus à la réponse anti-salmonelle du lapin A.

2.2. Différentes catégories d'idiotopes

Comme il a été remarqué dans la définition des idiotopes, ces déterminants antigéniques sont situés sur les parties variables et hypervariables des immunoglobulines. Un certain nombre d'arguments montre qu'ils sont liés au **paratope** (site de liaison à l'antigène) de

l'immunoglobuline bien que cette localisation ne soit pas exclusive.

L'analyse de la réponse anti-Id a permis de définir deux catégories d'idiotopes : des idiotopes retrouvés systématiquement sur les immunoglobulines au cours d'une réponse immune dit idiotopes "publics" ou "récurrents" et des idiotopes différents dits idiotopes privés présents sur les anticorps dirigés contre le même antigène.

3. LE RESEAU IDIOTYPIQUE

3.1. La théorie du réseau idiotypique

3.1.1. Hypothèse de Jerne

Le postulat de Jerne *et al.* 1974 est que le paratope d'un anticorps est capable de reconnaître l'épitope d'un antigène, mais aussi un idiotope d'un autre anticorps, ce qui signifie que les idiotopes des anticorps d'un individu sont équivalents à l'ensemble des déterminants antigéniques extérieurs.

L'antigène est reconnu par un anticorps appelé Ab1. Cet anticorps Ab1 est reconnu par un anticorps Ab2, par l'intermédiaire de ses déterminants idiotypiques. L'Ab2 par ses propres déterminants peut induire une réponse Ab3 qui lui-même induira une réponse Ab4 et ainsi de suite. Selon que les idiotopes sont situés dans ou hors du paratope ou site de liaison, les anticorps Abn seront différents parce que dirigés contre des idiotopes différents de l'Abn-1.

Pour essayer d'expliquer l'homéostasie du système immunitaire, Jerne a modélisé les différentes interactions du réseau de la façon suivante;

On considère les trois protagonistes, l'épitope E, le paratope p, l'idiotope i. L'anticorps Ab1 reconnaît l'épitope E par le paratope p1 et possède

l'idiotope i1. Un anticorps Ab2 reconnaît l'idiotope i1 par le paratope p2 et exprime un idiotope i2 qui lui même sera reconnu par un paratope p3. L'ensemble des idiotopes exerce un effet stimulateur et l'ensemble des paratopes un effet inhibiteur. La régulation du système immunitaire est contrôlé par l'équilibre des deux. L'introduction de l'antigène mobilise l'ensemble p1,i1 et supprime donc l'effet inhibiteur de l'Ab1 sur l'image interne Ab2 et donc sur la production d'Ab1.

Depuis la prime élaboration de cette théorie, différents éléments sont venus s'ajouter. Jerne limitait son axiome aux cellules B et à leurs produits. Il est maintenant clair que les cellules T participent au réseau dans une mesure qui n'est pas encore entièrement définie. D'autre part, l'effet des anticorps anti-idiotypes n'a pas été seulement démontré comme supprimeur mais aussi stimulateur de la réponse immune. Enfin l'induction par l'Ab1 d'anticorps Ab2 de différentes natures étend les rôles et les utilisations potentielles du réseau idiotypique.

3.2. Etude du réseau idiotypique

3.2.1. Rôle immunorégulateur du réseau idiotypique

3.2.1.1. Induction d'une suppression

Une des bases expérimentales du réseau idiotypique est la capacité qu'ont les anticorps anti-Id de supprimer l'activité des clones portant l'idiotope correspondant. Ce phénomène a été décrit dans de nombreux systèmes expérimentaux, et peut être induit par une administration d'anticorps anti-Id chez l'animal adulte, en période néonatale, aussi bien que par une exposition à ces anticorps *in utero*. La suppression idiotypique présente quelques caractéristiques. Elle peut être induite par les anticorps

anti-Id hétérologues ou homologues. Les expériences les plus démonstratives ont été faites chez la souris.

a/Système phosphorylcholine

Des souris Balb/c immunisées avec de la phosphorylcholine (PC) ont une réponse anticorps anti-PC dont 80% des anticorps portent l'idiotope T15. Par une première immunisation avec un anticorps anti-Id, il est possible de supprimer la composante T15 de la réponse anti-PC. On met en évidence chez le nouveau-né une suppression de longue durée, chez l'adulte une suppression temporaire, mais dans les deux cas l'idiotope T15 n'est plus exprimé. Une petite quantité d'anticorps anti-T15 est suffisante chez le nouveau né pour obtenir une suppression de la composante T15 de la réponse anti-PC. La composante T15 de la réponse est compensée par d'autre idiotopes, la réponse globale anti-PC étant moins affectée que chez l'adulte. Chez les souris adultes une injection d'importantes quantités d'anti-T15 est nécessaire pour obtenir de façon transitoire les mêmes effets (Kim *et al.* 1979).

b/Système $\alpha(1-3)$ dextrane

Des phénomènes de suppression sont montrés dans d'autres systèmes antigéniques. Des anticorps anti-Id isogéniques dirigés contre le MOPC104E (anticorps de myelome dirigé contre le dextrane) administrés à des souriceaux induisent la suppression des clones exprimant l'idiotope lorsque les animaux adultes sont immunisés avec le dextrane. Par contre des anti-Id allogéniques obtenus contre MOPC104E suppriment à la fois le clonotype et également d'autres clones anti-dextrane, diminuant par là même la réponse anti-dextrane globale (Bona *et al.* 1981).

3.2.1.2. Activation d'une réponse immune

Dans le cas de l'antigène polysaccharidique du streptocoque, la réponse obtenue chez la souris de souche A présente un idiotope public A5A porté par 50% des anticorps anti-strep. A circulants. Des anticorps de cobaye anti-A5A peuvent moduler la production d'anticorps portant l'idiotope A5A. Mais les différents isotypes des anticorps anti-Id ont des effets antagonistes. L'isotype IgG1 stimule le clone A5A et la production d'anticorps portant l'idiotope A5A représentent une forte proportion de la réponse anti-strep. A. Tandis que l'isotype IgG2 induit une suppression de A5A sans affecter la réponse globale.

D'autre part Kelsoe et al., (1981) montrent que chez des souris C57BL/6 l'injection de fortes quantités d'anti-Id -l'Ab1 est un anti-nitrophenyl, NP- conduit à la suppression de l'expression de l'idiotype spécifique alors que l'injection de faibles quantités accroît de façon significative l'expression de l'idiotope. Ces quantités sont équivalentes aux quantités d'idiotypes trouvées naturellement dans le sérum.

Des anticorps anti-Id capables de moduler ces réponses seraient produits naturellement *in vivo* au cours de la réponse immune. Il existe notamment des vagues d'anticorps portant l'idiotope T15 et des anti-Id suivant l'immunisation de souris avec la PC couplée avec une protéine porteuse.

3.2.2. Réseau idiotypique infini?

Etant donné le nombre presque infini d'idiotopes possibles ainsi que les interrelations du réseau idiotypique, on ne voit pas où sont les limites de la théorie de Jerne si ce n'est le nombre d'immunoglobulines dont dispose un individu. Les études ont montré dans deux cas différents, chez

le lapin (Bona *et al.* 1981) et la souris (Wikler *et al.* 1979), que les anticorps antiidiotypes Ab4 portaient l'activité Ab2 de liaison à l'antigène, ce qui laisserait penser que le réseau n'est pas "open-ended" ouvert. De plus lorsque des idiotopes sont trouvés récurrents à différents niveaux de la cascade idiotypique, ils ont souvent une grande importance dans l'immunorégulation et sont appelés idiotopes régulateurs (Bona *et al.* 1981). L'idée d'un réseau non infini s'appuie donc sur la mise en évidence de ces idiotopes régulateurs (Urbain *et al.* 1981) .

3.2.3. Différents anticorps antiidiotypes

Les anticorps anti-Id (Ab2) sont classés en 4 catégories principales basées sur des propriétés immunochimiques et fonctionnelles, définies par Jerne *et al.* 1982 puis par Bona *et al.* 1984.

-Les anticorps Ab2 α sont des anticorps reconnaissant un idiotope sur le récepteur à l'antigène des cellules B ou T. Ce site peut être un déterminant hors (Oudin *et al.* 1963) ou associé au paratope et dont la fixation peut être inhibée par l'antigène. Ces deux catégories d'anticorps ont le même effet sur les cellules B ou T.

-Les anticorps Ab2 τ sont une sous-catégorie des Ab2 α définis par des considérations expérimentales. Les Ab2 τ reconnaissent un idiotope proche du paratope, suffisamment pour que la réaction Ab1/Ab2 soit inhibée par l'haptène ou l'antigène.

-Les anticorps Ab2 β portent l'image interne de l'antigène. Ces anticorps reconnaissent un idiotope qui mime la structure en trois dimensions de l'épitope. L'intérêt est que les Ab2 β peuvent se comporter comme l'antigène et donc entrer en compétition avec lui. Il constitue donc dans la réponse immune un élément régulateur.

-On définit une dernière catégorie, les Ab2 ϵ ou "epibody" qui

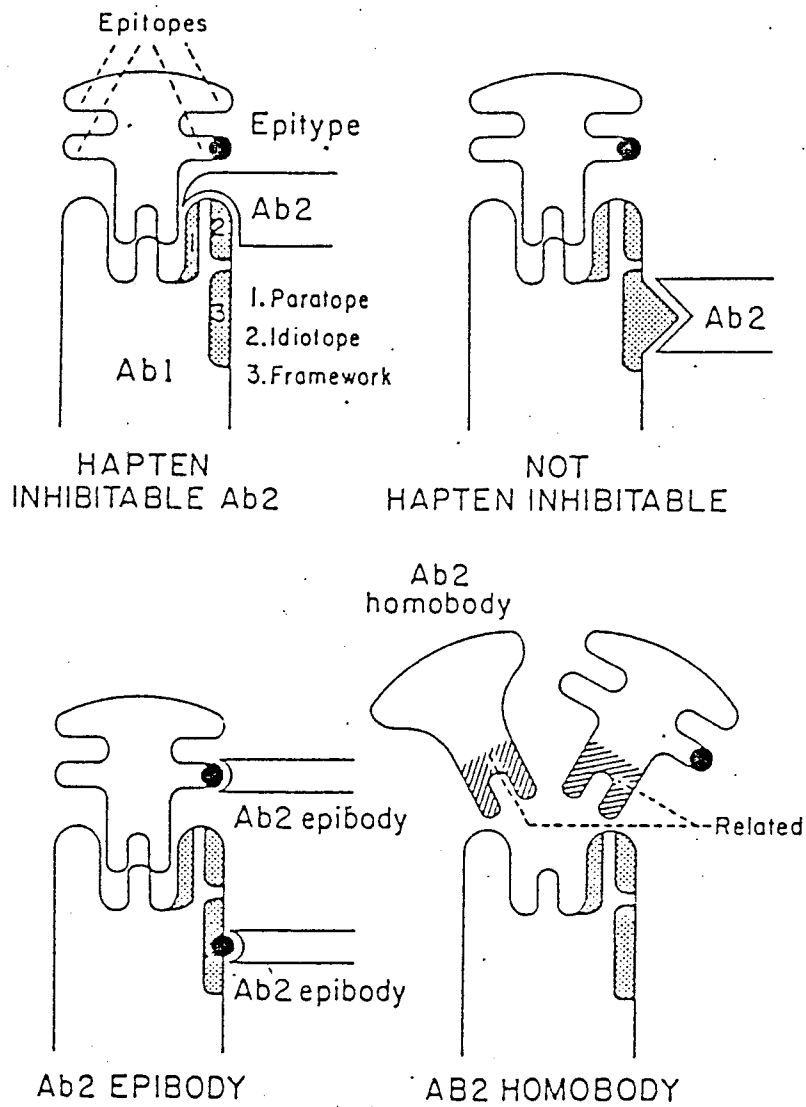


Figure 6 : Représentation des différents anticorps anti-idiotypiques (selon Bona *et al.* 1986)

reconnaissent le même idiotope sur l'antigène et sur l'anticorps dirigé contre cet antigène (Bona *et al.* 1986). Ces Ab2 ϵ représentent des anticorps multispécifiques aussi bien que les interrelations clonales avec un seul paratope.

Ces définitions mettent en évidence la complexité et le nombre possible d'anticorps anti-Id. Mais une notion essentielle est à retenir, l'existence d'anticorps Ab2 β image interne de l'antigène.

3.3. Notion d'image interne

Les anticorps Ab2 β représentent avec les Ab2 ϵ une faible part de la réponse antiidiotypique totale (<10%). Mais les anticorps Ab2 β font l'objet de nombreuses études à cause de leurs possibilités d'utilisation comme antigène de substitution dans différents domaines.

3.3.1. Topologie

A cause des modèles clef/serrure pour la relation épitope/paratope, on envisage mal structurellement les relations entre l'Ab2 β et les récepteurs T ou B ou même l'Ab3. Roitt *et al.*, (1985) définissent plusieurs cas où un modèle de ce type est possible.

Plus les points de contact entre l'anticorps et l'antigène sont nombreux, plus la liaison est forte. Ces liaisons multiples sont facilitées par la structure irrégulière du site de fixation de l'anticorps. Les résidus en contact peuvent se trouver éloignés les uns des autres voire même sur des chaînes peptidiques différentes. Si les points de contact sur un antigène se font par l'intermédiaire de 4 résidus de l'épitope, ces mêmes résidus placés de la même manière sur les chaînes de l'Ab2 suffisent à

mimer l'antigène. Il n'y a pas identité parfaite entre l'Ab2 β et l'antigène, mais une conformité au niveau des sites de contact.

Par contre lorsque l'on a affaire à des antigènes de nature non protéique, on suppose qu'il existe une identité conformationnelle entre la molécule antigène et l'Ab2 β . Roitt propose plutôt une conformité au niveau des sites de contact par l'interaction avec des acides aminés dominants. Ceci expliquerait que l'on puisse obtenir la production d'anticorps antiidiotypes contre les molécules de petites tailles (Cleveland *et al.* 1983, Scheiber *et al.* 1980).

On peut dire en définitive que l'anticorps antiidiotype de par les acides aminés des segments hypervariables V_H, V_L et la conformation de ces chaînes, recrée dans les trois dimensions la conformation ainsi que les points de contact de l'épitope (via les forces de Van der Waals, force ionique, pont hydrogène).

3.3.2. Etudes structurales

Des travaux récents se sont intéressés à la séquence peptidique de certains domaines des chaînes hypervariables d'anticorps anti-Id dans le cas de la réponse à l'hémagglutinine de réovirus et à l'IgG de lapin d'allotype 1a (Bruck *et al.* 1986, Van Cleave *et al.* 1988). Bruck retrouvaient dans la chaîne légère du CDR2 de l'IgM antiidiotype et dans la séquence de l'épitope de l'hémagglutinine (HA) la même séquence peptidique (Tyr, Ser, Gly, Ser). D'autre part, les travaux de Van Cleave montrent à l'opposé que la séquence commune retrouvée ici au niveau de la position 81-90 du FR3 de l'allotype 1a et du V_H CDR2 en position 52-60 de l'anti-Id est en image inverse.

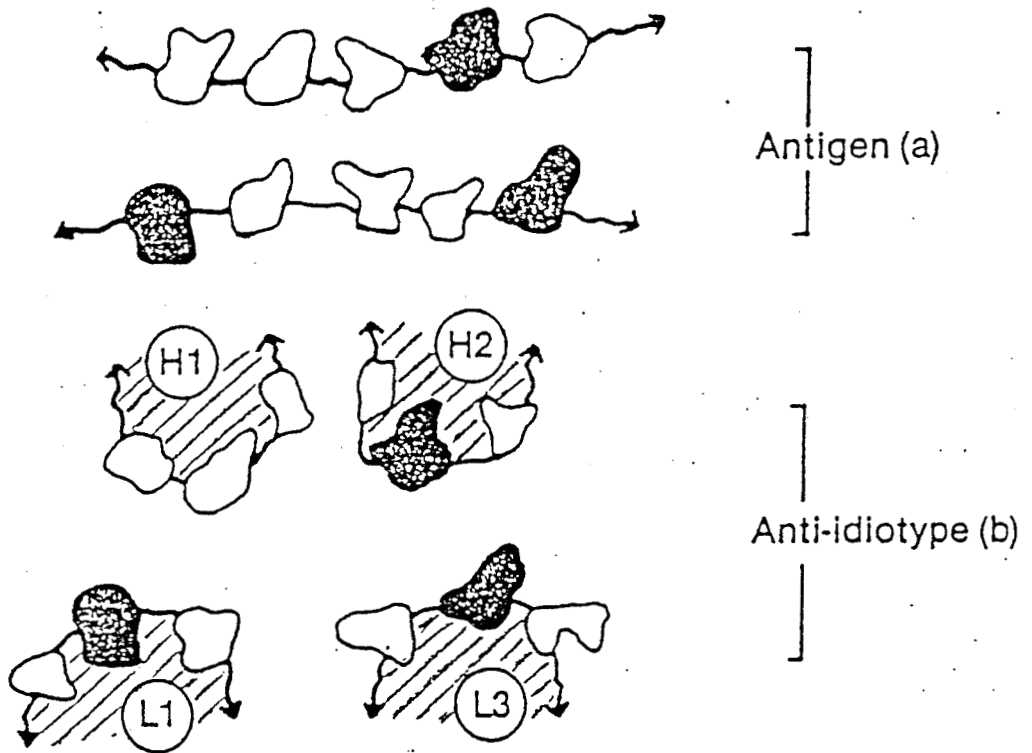


Figure 7 : Mimicrie des résidus de contact (selon Roitt *et al.* 1985)

A l'heure actuelle il est difficile de décider entre une homologie de séquence peptidique ou une homologie de conformation entre l'épitope et l'idiotope de l'Ab2 β .

3.4. Applications des anticorps antiidiotypes

Cette propriété particulière de l'Ab2 β de mimer l'épitope conduit à l'idée que ces anticorps puissent être utilisés à la place de l'antigène pour obtenir une réponse spécifique, comme dans le cas de vaccins. Ce ne sont pas les seules utilisations possibles des antiidiotypes, on retrouve en cancérologie et même en recherche fondamentale l'application de ces nouveaux outils.

3.4.1. Vaccins

Différents travaux ont montré la possibilité d'induire chez les animaux de laboratoire une immunité anti-parasitaire (Sacks *et al.* 1982, Grzych *et al.* 1987), anti-bactérienne (Stein *et al.* 1984), anti-virale (Kennedy *et al.* 1986) à l'aide d'anticorps anti-Id.

Dans le cas des bactéries, les travaux de Stein chez la souris montrent que l'injection néonatale d'anticorps anti-Id particuliers sensibilisent l'animal vis-à-vis de *Escherichia coli* type K13. On observe surtout une forte réponse anticorps spécifique.

D'autres auteurs dans le cas des virus ont montré qu'ils pouvaient induire une immunité spécifique importante avec des anti-Id. Kennedy *et al.*, (1986) démontrent que l'injection d'anti-Id induit une réponse IgG et IgM spécifiques dirigés contre le virus de l'hépatite B. Ils mettent en évidence un idiotope commun présent sur les anticorps d'humains infectés. A l'aide

d'un sérum de lapin anti-Id ils montrent que cet idiotope est présent sur les anticorps de souris immunisées par HbSAg ainsi que chez le cobaye, le lapin, la chèvre et le chimpanzé. De plus la préparation d'un anticorps monoclonal chez la souris dirigé contre cet idiotope à réaction croisée a permis de montrer qu'une immunité protectrice peut être induite chez le chimpanzé seul modèle animal infectable par le virus de l'hépatite B (Thanalava *et al.* 1986, Kennedy *et al.* 1986). On peut multiplier les exemples dans le cas des virus, Ertl *et al.* (1984) pour le virus sendaï, Francotte *et al.* (1984) pour le virus de la mosaïque du tabac.

Dans le cas des parasitoses, la première vaccination réussie à l'aide d'anticorps anti-Id est celle de Sacks *et al.*, (1982) chez des souris infectées par *Trypanosoma rhodensiense* par immunisation par un sérum polyclonal anti-Id de lapin. De même dans le cas de *Schistosoma mansoni* une immunité protectrice est observée chez des rats traités par un anticorps monoclonal anti-Id syngénique (Grzych *et al.* 1987). Des anticorps monoclonaux antiidiotypiques ont été préparés à partir d'un anticorps monoclonal IgG2a Ab1, cytotoxique et protecteur dirigé contre un antigène de 38 kDa du stade schistosomule. Un de ces anticorps IgM (Ab2) a été sélectionné sur sa capacité à inhiber la fixation de l'Ab1 sur l'antigène. Les auteurs montrent que l'injection de cet anticorps Ab2 induit la production d'anticorps Ab3 qui inhibe la fixation de l'Ab1 sur l'antigène et que ces Ab3 reconnaissent la surface du schistosomule. De plus, une activité cytotoxique des anticorps Ab3 est mise en évidence en présence d'éosinophiles, reproduisant ainsi l'activité de l'Ab1. Enfin des animaux sont protégés par immunisation avec l'Ab3 vis-à-vis d'une infection d'épreuve. Ces travaux montrent dans ce modèle la possibilité d'induire une immunité protectrice à l'aide d'anticorps antiidiotypes.

Enfin des anticorps anti-Id préparés chez la souris contre un anticorps monoclonal anti-*Trypanosoma cruzi* sont capables d'induire une réponse

anti-*T. cruzi* chez la souris, le lapin, le cobaye (Sacks *et al.* 1985).

3.4.2. Thérapie du cancer

Les études impliquant des anticorps anti-Id dirigés contre des antigènes tumoraux se focalisaient surtout sur leur utilisation dans les traitements des tumeurs lymphoïdes. Les immunoglobulines de surface des cellules lymphoïdes présentant l'idiotype, les anti-Id appropriés pouvaient éliminer une partie ou toute la tumeur, sans effet néfaste sur les autres tissus. Des transferts passifs d'anticorps anti-Id ont montré qu'ils se fixaient bien sur leur cible (Meecker *et al.* 1985) mais la rémission complète n'a été obtenue que dans un cas sur onze. Dans le même esprit, d'autres travaux ont été faits et il ressort que ce type d'administration se heurte à plusieurs difficultés. L'injection d'anticorps xénogènes induit parfois des réactions d'hypersensibilité. On a affaire à des mutations de la tumeur, les variants n'étant plus reconnus par les anti-Id injectés. Il a été expérimenté d'autre part des chimères formées d'une partie du Fab anti-Id de souris et d'un Fc d'un IgG humaine (George *et al.* 1988).

Une autre voie possible est l'injection d'anticorps anti-Id dans le but d'induire une réponse anti anti-Id protectrice et tumoricide. Les anticorps anti-Id Ab2 β élicitent une réponse Ab3 semblable à l'Ab1 et potentiatureur d'une réponse à l'antigène. L'utilisation d'anti-Id est d'autre part appréciable lorsqu'on ne dispose pas de grandes quantités d'antigène. Herlyn *et al.* (1987) montrent que dans le cas d'un cancer colorectal, une rémission partielle peut être obtenue par immunisation avec des anti-Id de souris (Ab2). Ils observent surtout une forte réponse Ab3 anti-antigène tumoral.

3.4.3. Maladies autoimmunes

La suppression d'une réponse immune peut être souhaitable comme dans le cas des maladies autoimmunes ou des greffes pour induire un état de tolérance.

L'utilisation d'anti-Id a été envisagée dans différentes maladies autoimmunes, De Baets *et al.*, (1987) dans le cadre de la *myastenia gravis* expérimentale du rat obtiennent avec un anti-Id dont l'Ab1 est un anti-AChR, la suppression d'une réponse polyclonale anti-AChR. Meuer *et al.*, (1983) proposent l'injection d'anticorps monoclonaux anti-clonotypes. Ces anticorps anti-Id sont dirigés contre les cellules T autoréactives présentes dans *M. gravis* qui sont à l'origine des manifestations pathologiques. Ils pensent de cette façon inhiber la cytotoxicité à médiation cellulaire.

4. LYMPHOCYTES T ET ANTIIDIOTYPES

Les lymphocytes T reconnaissent l'épitope d'un antigène lorsque celui-ci est présenté par une cellule présentatrice d'antigène en association avec une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II.

La question qui se pose est de savoir quelle est l'importance des cellules T dans le réseau idiotypique, et leurs relations avec les autres composants de la réponse immunitaire. On sait qu'il existe des cellules T portant des idiotypes au niveau du récepteur T pour l'antigène. Cela a été décrit dans le cas des cellules suppressives.

4.1. Circuit supprimeur

Les phénomènes de suppression peuvent être spécifiques de l'antigène ou des déterminants d'immunoglobulines (isotypie, allotypie, idiotypie). Nous ne parlerons ici que du rôle des déterminants idiotypiques.

Dans les phénomènes de suppression dus aux anticorps anti-Id, il existe deux niveaux de régulation, un effet direct des anti-Id sur les cellules B Id+ (cf.3.2.1.) et un effet du réseau de cellules Ts spécifique de l'idiotype.

Eichman décrit un modèle de suppression idiotypique dans la réponse aux polysaccharides de streptocoques A dans lequel interviennent des cellules T suppressives. L'injection d'anticorps anti-idiotypiques peut supprimer la synthèse des anticorps porteurs de spécificité idiotypique correspondante (Eichman *et al.* 1975). Une forte dose d'anticorps anti-Id provoque une suppression immédiate mais transitoire, alors que de faibles doses entraînent une suppression retardée mais chronique. Les cellules T suppressives en cause semblent reconnaître des idiotopes présents sur les cellules B et les cellules T. Cette suppression peut être transférée à des animaux irradiés par des cellules T spléniques I-J+. On remarque aussi une diminution de l'activité des cellules T "helper" spécifiques. Des cellules T suppressives peuvent donc exprimer des idiotypes et agir sur les cellules T "helper" spécifiques de l'idiotype. A l'aide d'anticorps anti-Id de différents isotypes (IgG2, IgE et IgG1), on montre que l'isotype ne change pas le devenir de la réponse mais que les doses faibles ($<0,1\mu\text{g/souris}$) sont inductrices alors que les doses fortes ($>10\mu\text{g/souris}$) sont suppressives (Müller *et al.* 1985).

4.2. Cellules T et anti-idiotypes

Il semble que l'injection d'anticorps anti-Id induise des cellules Th Id+ ainsi que l'établissement d'une mémoire immunitaire tant au niveau T que B sans pour autant que l'on ait un niveau détectable d'anticorps anti-Id (Rajewsky *et al.* 1983).

Ces observations permettent de penser que les lymphocytes T participent au réseau idiotypique au même titre que les anticorps. L'existence de cellules T anti-Id a été mise en évidence dans différents modèles et en particulier les parasitoses. Les travaux de Lima *et al.*, (1987) montrent qu'il existe chez des patients infectés par *S. mansoni*, des cellules T activées par les anticorps anti-antigènes d'oeuf (SEA) et non par l'antigène SEA lui même. Il semble bien que les lymphocytes T de ces patients reconnaissent des idiotopes particuliers à la réponse anti-SEA. Par ailleurs, au cours de l'infection par *Trypanosoma cruzi* on met en évidence chez des patients infectés des cellules T qui sont restimulées par des anticorps anti-épimastigotes. Leur présence serait liée à un état particulier de la maladie (existence d'une cardiopathie) (Gazzinelli *et al.* 1987). Ces cellules T auto-anti-idiotypes sont-elles à l'origine ou une conséquence de la pathologie?

Tout comme pour les anticorps Abl, l'injection de cellules T spécifiques induit une réponse immunitaire cellulaire et humorale. Par injection d'un clone cellulaire T dirigé contre la membrane basale, Lider *et al.*, (1987) induisent des cellules T anti-idiotypes qui, prélevées au niveau des ganglions et transférées à des rats naifs confèrent une protection vis-à-vis de l'encéphalite expérimentale du rat. Ces cellules ont un phénotype CD4+ ou CD8+ et ont un effet "helper" ou suppresseur, selon leur phénotype, sur la réponse anti-clone.

D'autre part l'injection d'un clone "helper" dirigé contre un épitope neutralisant du virus *sendai* permet d'obtenir un sérum anti-clonotype. Ce sérum possède des propriétés neutralisantes vis-à-vis d'une infection virale, il confère également une protection lorsqu'il est injecté et ce, chez les différentes lignées de souris. Il est à l'origine d'une réaction d'hypersensibilité retardée à l'antigène (Ertl *et al.* 1988). De telles observations ont été faites dans le cas d'une bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* par la préparation d'un sérum anti clonotype (Hausman *et al.* 1988).

La structure "protectrice" représentée, soit par une cellule T au niveau de son récepteur à l'antigène, soit par l'anticorps au niveau du paratope, est donc capable d'être à l'origine d'une réponse immune et de conserver son rôle fonctionnel.

On peut mettre en évidence dans différents modèles, que des anticorps anti-Id sont capables de restimuler *in vitro* des lignées cellulaires dirigées contre l'antigène de départ. Cette stimulation est restreinte par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité dans le cas de l'antigène 38 kDa de *Mycobactéria tuberculosis* (Rees *et al.* 1987, Praputpittaya *et al.* 1987). Par ailleurs, cet anticorps monoclonal anti-Id est capable d'induire chez différentes lignées de souris une réaction d'hypersensibilité retardée à l'antigène.

D'autre part, l'injection d'un anticorps monoclonal anti-Id dont l'antigène est le polymère (T,G)-A-L permet d'obtenir une lignée cellulaire T qui est restimulée non seulement par l'anticorps monoclonal ayant servi à l'immunisation mais également par l'antigène (T,G)-A-L. De plus cette lignée est capable d'activer *in vitro* des cellules B issues d'une première immunisation (Mozes *et al.* 1987).

Il semble donc qu'il existe un lien structural entre ce qui est reconnu par un anticorps et le récepteur T à l'antigène. Même si le nombre de travaux sur les lymphocytes T et le réseau idiotypique reste limité par rapport à l'ensemble de la littérature sur l'idiotypie, les résultats exposés ici semblent montrer que la théorie du réseau idiotypique s'applique également à la réponse T. L'obtention de cellules T anticlonotypes ayant une fonction biologique comparable à celle des cellules spécifiques de l'antigène permet de supposer que la notion d'image interne de l'antigène s'applique aussi à des idiotopes du récepteur T pour l'antigène. Néanmoins, la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T nécessite le concours de cellules présentatrices de l'antigène. On peut se demander si la présentation des structures idiotypiques aux lymphocytes T suit la même règle que pour un antigène conventionnel.

L'ensemble de ces travaux montrent qu'il existe un lien entre les cellules T et B sensibilisées et les anticorps anti-Id d'une part, les anticorps, les cellules B et les cellules T anti-Id d'autre part.

5. CONCLUSION

C'est donc dans l'optique d'étude du réseau idiotypique dans le cas d'un épitope protecteur que nous nous sommes placés. L'originalité de notre travail réside dans l'utilisation d'un anticorps IgE monoclonal et protecteur, un isotype peu étudié dans les travaux sur le réseau idiotypique en général. Ces différentes circonstances nous permettaient donc d'étudier d'une part le devenir d'un idiotope protecteur au cours de la cascade idiotypique et d'autre part l'incidence d'un isotype très particulier, l'isotype IgE dont nous avons décrit l'importance dans la schistosomiase.

RESULTATS

RESULTATS

Dans l'étude des épitopes potentiellement protecteurs, l'antigène 26 kDa semble avoir tout à fait sa place. Tous les travaux (Auriault *et al.*, Damonville *et al.*, Verwaerde *et al.*) réalisés sur la réponse IgE tant au cours de l'infection que dans le cadre de la réponse anti-SRP montrent que cet antigène est un allergène majeur dans la schistosomiase expérimentale du rat et qu'il possède des potentialités protectrices. L'étude de la molécule de 26 kDa de *S. mansoni* est relativement peu aisée puisque qu'on ne dispose pas de quantités suffisantes de protéine. Il nous faut donc passer par d'autres approches technologiques tels que le clonage moléculaire ou la préparation d'anticorps anti-idiotypiques. Actuellement tous les travaux tendant à obtenir cette molécule par génie génétique sont restés vains. La production d'un anticorps IgE monoclonal B48-14 dirigé contre l'antigène de 26 kDa, cytotoxique en présence de cellules effectrices et protecteur par transfert passif, nous dotait d'un outil intéressant. Des travaux précédents dans le cadre de la schistosomiase (Grzych *et al.* 1987) ont montré qu'il était possible d'induire une immunité protectrice à l'aide d'anticorps anti-idiotypes d'un autre anticorps monoclonal protecteur IgG2a.

Les questions que nous nous sommes posées étaient de plusieurs ordres:

-Etait-il possible de substituer l'antigène de 26 kDa par des anticorps anti-idiotypes de l'anticorps monoclonal B48-14 afin d'en étudier les potentialités protectrices ?

-Quel était le devenir au travers du réseau idiotypique de l'anticorps monoclonal IgE, en particulier le devenir de son idiotope et indirectement de "l'épitope 26 kDa" ?

-Quelle était la **régulation isotypique de la réponse antiidiotypique** dans le cas d'une IgE et dans un modèle où la réponse IgE semble être un paramètre essentiel de l'induction d'une immunité protectrice?

-Les cellules T antiidiotypes et anti antiidiotypes interviennent-elles directement dans la régulation isotypique?

1. CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE L'ANTIGÈNE DE 26 kDa

Des rats Lou/M sont immunisés par injection sous cutanée 10 µg de l'antigène 26 kDa électroélué en présence d'adjuvant complet de Freund (CFA). Un rappel sans adjuvant est pratiqué un mois après. Les tests RIA et le RAST sont réalisés avec de l'antigène "schistosomule".

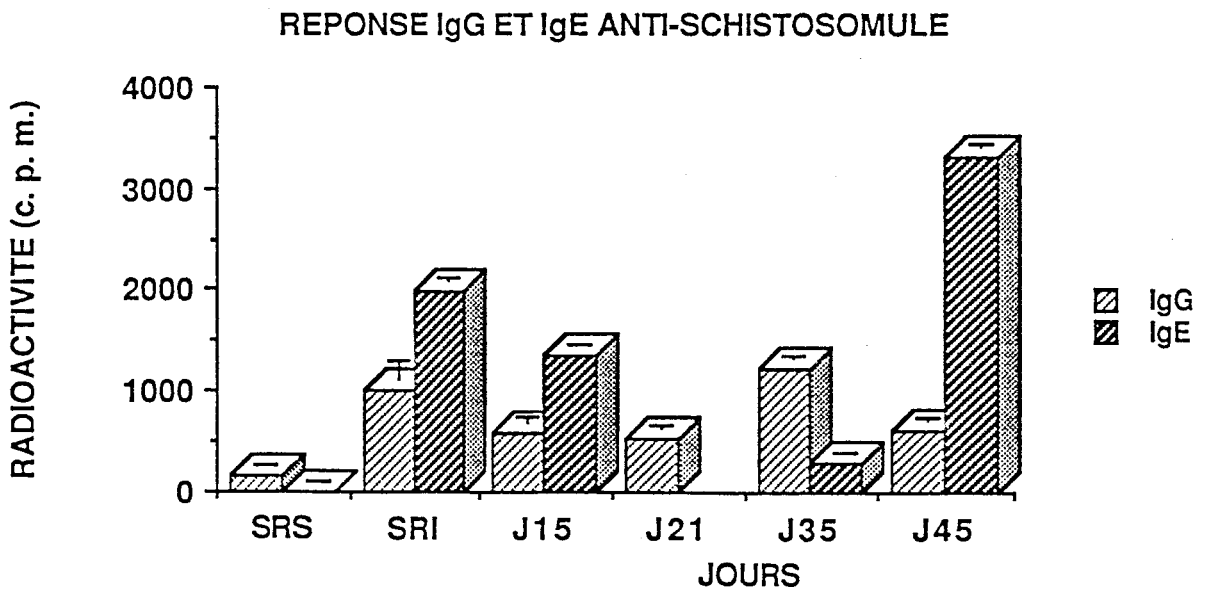


Figure 8 : Cinétique de la réponse IgG et IgE anti-schistosomule. Les rats sont immunisés en s. c. avec de l'antigène 26 kDa électroélué. Le dosage est fait contre de l'antigène schistosomule total en RAST pour les IgE et en RIA pour les IgG en comparaison avec un sérum d'infection (SRI).

On met en évidence une réponse anticorps IgG et IgE anti-schistosomule. Malgré l'utilisation de CFA comme adjuvant, la réponse IgE est importante et atteint son maximum 15 jours après la première injection (j15) et l'injection de rappel (j45). L'intensité de cette réponse IgE est tout à fait comparable à celle d'un sérum d'infection.

2. ANALYSE DE LA SPECIFICITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL B48-14

La spécificité de l'anticorps monoclonal B48-14 d'isotype IgE est analysée par immunoprécipitation du SRP radiomarqué à l'¹²⁵I par la méthode à l'iodogène (Markwell *et al.* 1978). Les complexes antigène-anticorps immunoprécipités sont analysés sur un gel 13% SDS-PAGE puis autoradiographiés après séchage du gel. La Figure 9 montre l'immunoprécipitation du SRP par l'anticorps B48-14 (D) en comparaison avec un anticorps IgE monoclonal non relevant (C) ainsi que par un sérum de rat monospécifique anti-26 (B). L'anticorps monoclonal B48-14 reconnaît par cette méthode deux bandes à 26 kDa et à 56 kDa. Le lien entre ces deux molécules n'est pas connu actuellement, mais il semble qu'elles possèdent une homologie de structure. Seule une analyse des séquences peptidiques de ces deux molécules pourrait nous donner une réponse définitive.

3. ETUDE DE LA REPOSE ANTIIDIOTYPE

La mise en évidence des anticorps antiidiotypes a nécessité la mise au point d'un test en immuno-empreinte. En effet le test classique utilisé pour la mise en évidence des Ab2 par compétition de l'Ab1 vis-à-vis de l'antigène ne pouvait être utilisé parce que l'anticorps IgE B48-14 a une affinité trop faible pour l'antigène. De plus un test RIA de reconnaissance de l'IgE par les Ab2 n'était pas réalisable à cause de la fixation peu importante de la B48-14 sur les plaques de test RIA (<0,5% de fixation) et ce, malgré l'utilisation de glutaraldéhyde. Nous avons donc essayé de fixer les immunoglobulines des sérums Ab2 et de révéler par de l'IgE marquée. Mais après marquage à l'¹²⁵I, l'activité spécifique s'est révélée trop faible.

DETERMINATION DES ANTIGENES RECONNUS PAR L'IGE MONOCLONALE
B48-14 PAR IMMUPRECIPITATION

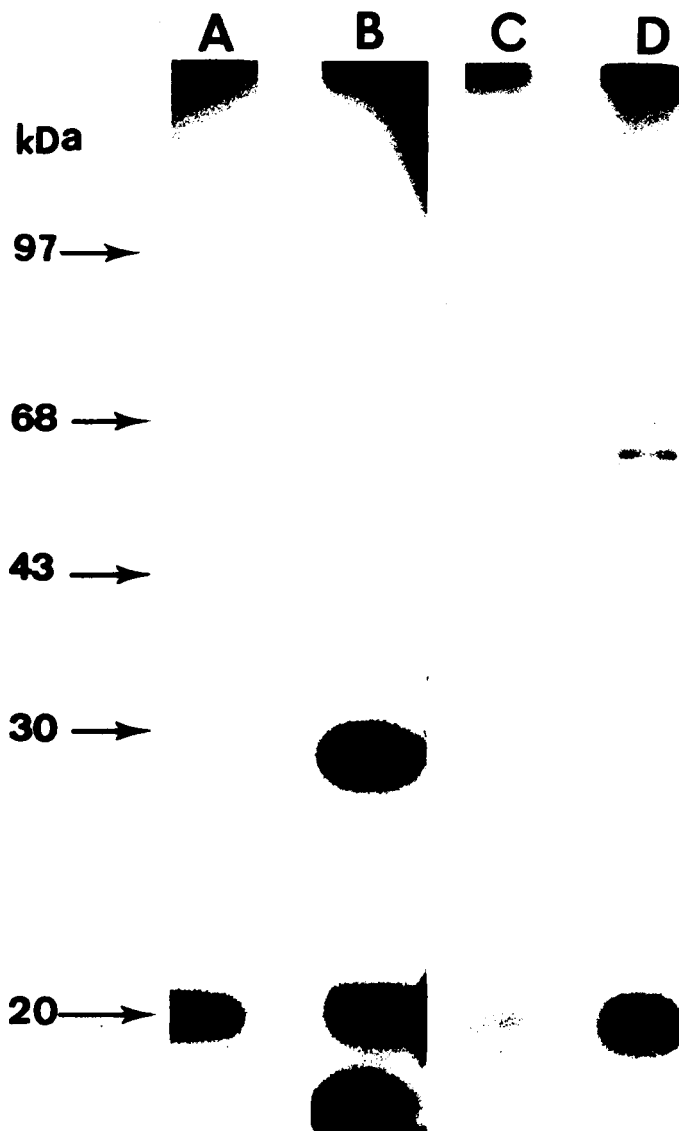


Figure 9 : Immunoprécipitation de SRP-A marqué à l'iode par la méthode à l'iodogène par un sérum de rat sain (A), un sérum de rat anti-26 kDa (B), une IgE non pertinente (C), l'IgE B48-14 (D). Les produits du SRP-A immunoprécipités sont analysés en gel 13% SDS PAGE. Le gel est séché, puis autoradiographié. Des poids moléculaires (LKB) sont utilisés pour suivre la migration.

Enfin le choix s'est porté sur la nitrocellulose support inerte. Il est apparu que la fixation de l'IgE était correcte sur ce support. La nature des liaisons entre les protéines et la nitrocellulose n'est pas encore connue, il semble que ce soit simplement une capacité d'imbibition des protéines sur le papier qui permette leur fixation. Après avoir vérifié que l'anticorps anti-IgG de rat marqué à la peroxydase ne présentait pas de réaction croisée avec l'anticorps IgE B48-14, nous avons déterminé le rapport entre l'IgE et les sérums pour l'obtention d'un test significatif.

3.1 Cinétique de la réponse antiidiotypique

Les protocoles utilisés pour la production d'anticorps antiidiotypes varient beaucoup selon les auteurs. Néanmoins l'injection répétée d'antigène en quantité assez importante avec un agent tolérogène semble être le protocole le plus usité. L'injection d'un anticorps IgE pour produire des anticorps antiidiotypes ayant été rarement étudiée, nous avons testé différentes façons de présenter l'antigène pour produire des anticorps anti-Id.

3.1.1. Premier protocole

Des rats LOU/M de 12 semaines reçoivent par voie sous-cutanée 200 μ g d'antigène B48-14 précipité au sulfate d'ammonium saturé et copolymérisé par la glutaraldéhyde en présence d'IgG humaines comme agent tolérogène. Les sérums sont testés vis-à-vis de l'anticorps B48-14 et de l'antigène schistosomule en immuno-empreinte comme décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

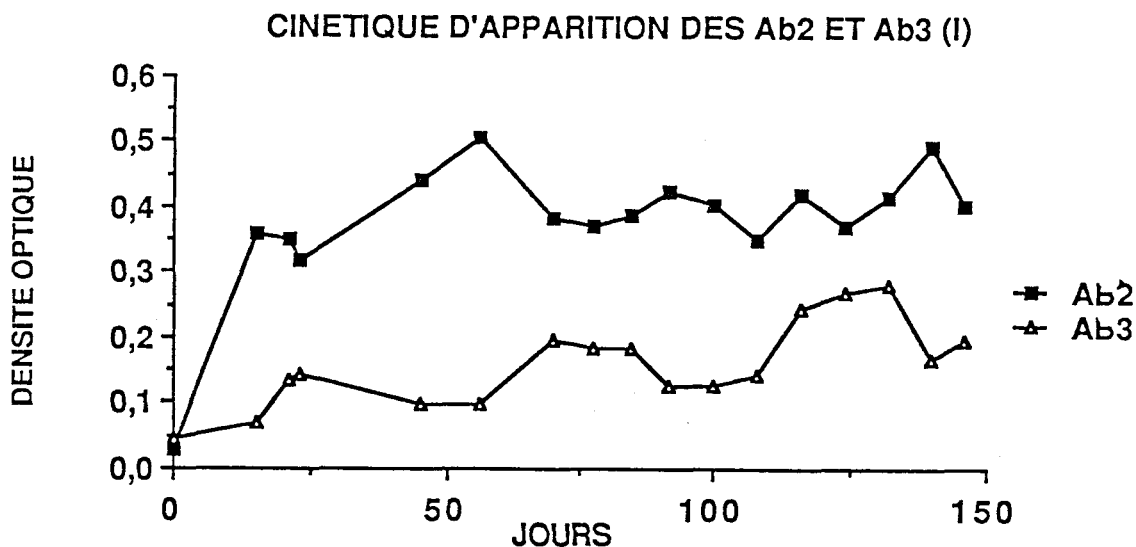


Figure 10 : cinétique d'apparition des Ab2 et Ab3 (premier protocole). Les valeurs présentées sont minorées de la valeur obtenue pour une IgE témoin et représentent la moyenne de cinq rats.

La courbe présentée Fig.10 montre la cinétique d'apparition des anticorps antiidiotypes (Ab2) dirigés contre l'anticorps B48-14 (Ab1). L'immuno-empreinte est réalisée contre 60 ng d'IgE pour la mise en évidence des Ab2 et contre 1 µg d'antigène "schistosomule" pour les Ab3. On révèle par cette technique tous les anticorps antiidiotypes Ab2 c'est à dire les Ab2 α , β , τ , ϵ . C'est pourquoi nous avons mis dans ce test un anticorps monoclonal IgE de rat non relevant afin d'évaluer la part propre de reconnaissance des parties variables de l'anticorps IgE B48-14. Par contre pour les anticorps anti-antiidiotypes Ab3, seule leur capacité à reconnaître l'antigène est mise en évidence dans ce test. La courbe Ab3 ne représente que les Ab3 de type β . Etant donné que la révélation se fait avec deux antigènes différents pour les Ab2 et les Ab3, on ne peut pas comparer l'intensité des valeurs obtenues pour les anticorps Ab2 par rapport à celles des Ab3, mais juste en apprécier les cinétiques relatives.

D'autre part, on retrouve dans ce protocole comme dans la suite du travail la notion de vagues de réponses antiidiotypiques décrite par Kelsoe *et al.*, (1981). En effet à une augmentation du taux d'Ab3 correspond une diminution du taux d'Ab2.

3.1.2. Second protocole:

La même expérience est pratiquée sur un autre lot de cinq rats LOU/M avec une préparation différente d'antigène. Les cellules du clone B48-14 (10^7 /rat) sont agrégées par la glutaraldéhyde en présence d'IgG humaines. L'antigène ainsi obtenu est injecté par voie sous-cutanée avec de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Les sérums sont testés de la même façon que précédemment.

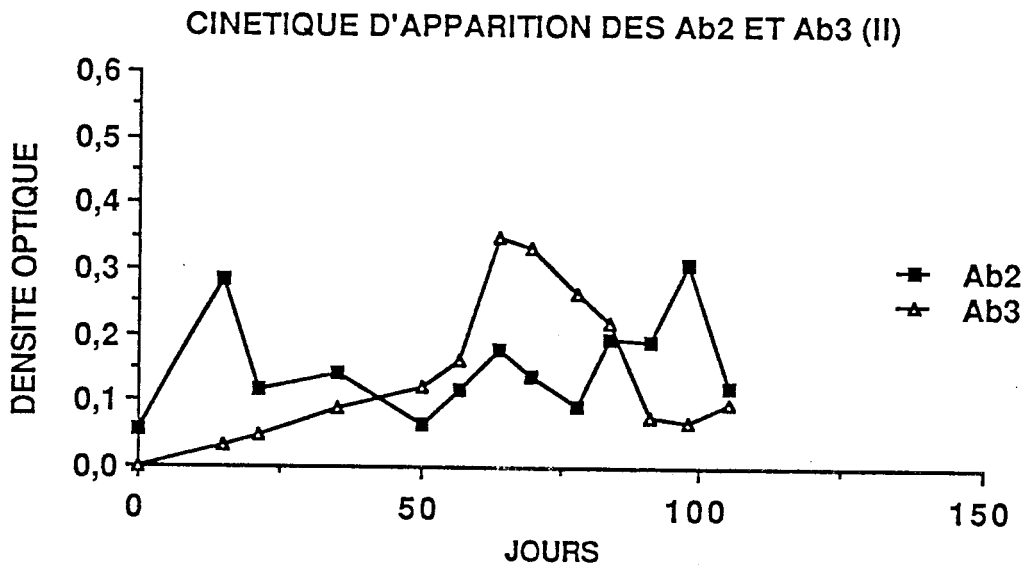


Figure 11 : Cinétique d'apparition des Ab2 et Ab3 (deuxième protocole).

Les courbes obtenues dans ce protocole illustrent également la notion de "vagues" d'anticorps anti-Id et d'anti-anti-Id, tout comme dans le protocole I utilisant l'anticorps B48-14 purifié et polymérisé.

3.1.3. Troisième protocole:

Le troisième protocole consiste en l'injection de l'anticorps IgE B48-14 purifié partiellement par précipitation au sulfate d'ammonium saturé sans agent tolérogène. 200µg d'anticorps IgE sont injectés par rat par voie sous-cutanée avec de l'ACF.

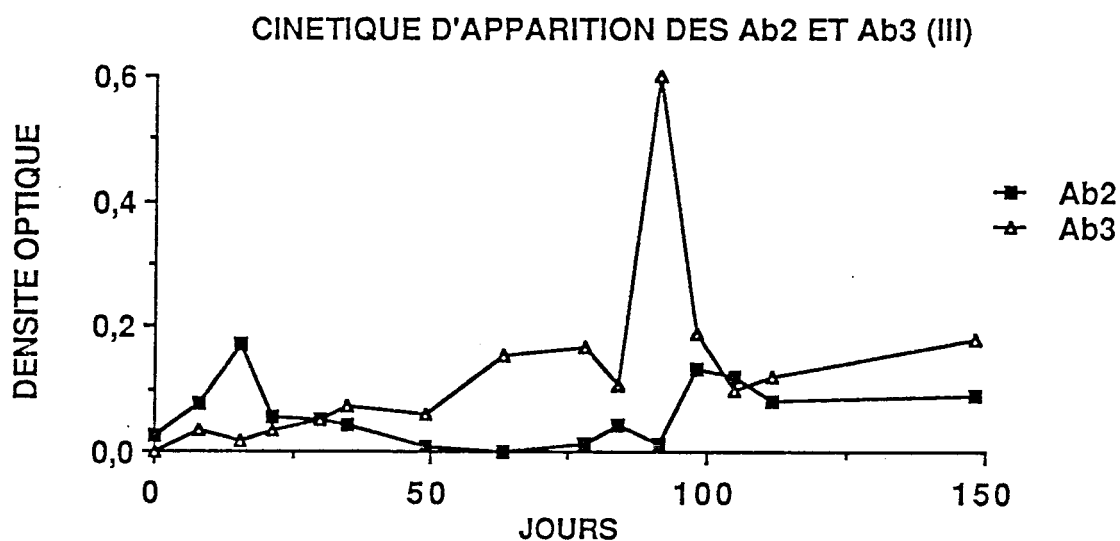


Figure 12 : Cinétique d'apparition des Ab2 et Ab3 (troisième protocole).

La fig. 12 montre que le taux d'anticorps anti-Id (Ab2) obtenu est relativement plus faible que dans les autres protocoles alors que le taux d'Ab3 est comparable à celui obtenu dans le protocole I.

En conclusion, L'analyse des trois courbes montre que même si dans les trois cas des anticorps Ab2 et Ab3 sont obtenus, la présentation de l'antigène joue un rôle important dans l'intensité des réponses. Il est à noter que le taux d'Ab3 obtenu suivant le protocole II est le plus élevé des trois. Ce protocole (II) semble le plus adapté à la production d'anticorps de type Ab3, tandis que le protocole (I) permet d'obtenir un fort taux d'anticorps Ab2.

3.2. Analyse des isotypes de la réponse Ab3

Grâce à la méthode de l'immuno-empreinte et à l'aide d'anticorps anti-isotypes, nous avons mis en évidence des Ab3 d'isotypes IgG et IgE dans les sérums des rats immunisés avec l'anticorps B48-14 et ce quelque soit le protocole.

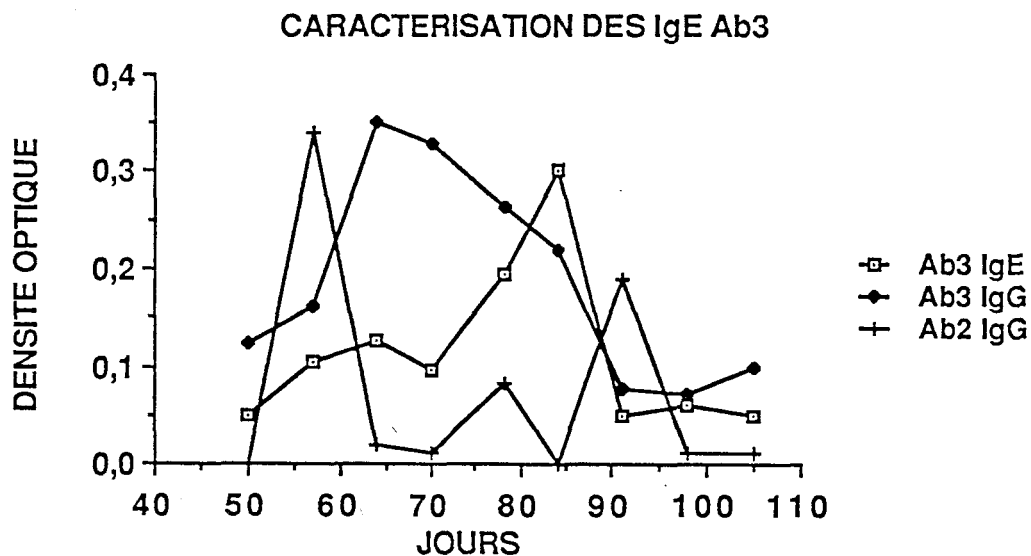


Figure 13 : Cinétique de la réponse Ab2, Ab3 IgG et IgE vis-à-vis de l'antigène schistosomule. L'immuno-empreinte est réalisée avec 1µg d'antigène "schistosomule" et les différents isotypes de la réponse Ab3 sont révélés par des antisérums spécifiques.

Sur la figure 13 est présentée la cinétique de la réponse d'un rat du protocole (II). La réponse Ab3 IgG augmente lorsque la réponse Ab2 IgG diminue. Par contre, la course de la réponse Ab3 IgE semble relativement indépendante de la réponse Ab3 IgG.

Les anticorps IgE détectés ne peuvent pas être les anticorps IgE injectés parce la demie vie de l'IgE dans le sérum est de quelques jours or celles-ci sont détectées jusqu'à 50 jours après la dernière injection. De plus l'anticorps IgE B48-14 a été injecté agrégé dans deux protocoles sur trois et ne peut donc se retrouver sous forme soluble dans le sérum. Quelque soit le protocole utilisé, les anticorps IgE Ab3 apparaissent à peu près 3 semaines après le pic d'IgG Ab3. Il est important de noter que le taux d'IgE Ab3 obtenu est tout à fait comparable à celui des sérums d'infection (0.45 U. DO contre 0.55 U. DO respectivement).

Cependant les anticorps IgE présents en faible quantité et la faible proportion d'antigène 26 kDa dans l'antigène "schistosomule" ne nous permettait pas d'utiliser une méthode telle que l'immuno-blotting pour analyser les antigènes cibles des IgE Ab3. Nous avons donc préparé des antigènes à partir d'homogénat de "schistosomule" séparés sur gel SDS-PAGE. Les bandes prélevées correspondant au poids moléculaire choisi (56, 26 kDa) sont électroéluées et concentrées.

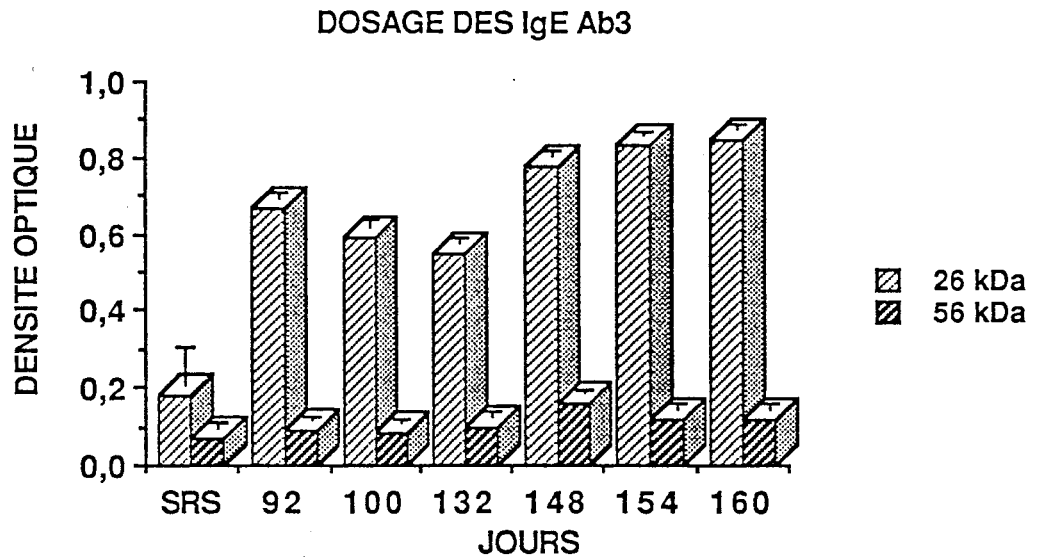


Figure 14 : Dosage des IgE Ab3 en immuno-empreinte sur de l'antigène 26 et 56 kDa. L'homogénat de schistosomule est séparé sur un gel 13% SDS PAGE, les bandes 26 kDa et 56 kDa sont repérées, prélevées et électroéluées. Après concentration, les protéines sont déposées sur la nitrocellulose et le test d'immuno-empreinte est fait classiquement.

Par immuno-empreinte en utilisant ces antigènes, nous avons mis en évidence que les IgE Ab3 reconnaissent préférentiellement la molécule de 26 kDa (fig. 14).

4. ANALYSE BIOCHIMIQUE DES CIBLES ANTIGENIQUES DES AB3

L'anticorps IgE B48-14 reconnaît deux molécules de 26 et 56 kDa en immunoprécipitation du SRP marqué (fig.9). Les sérums Ab3 sont sélectionnés au pic de production des IgG Ab3 dans les trois protocoles et testés en immunoprécipitation vis-à-vis du SRP et en immunoblotting vis-à-vis de l'antigène "schistosomule". Comme le montre la fig.15 les IgG Ab3 immunoprécipitent une molécule de 56 kDa dans le SRP. Par contre, en blotting ces Ab3 reconnaissent une molécule de 26 kDa. Cette différence peut être expliquée par la nature des préparations antigéniques.

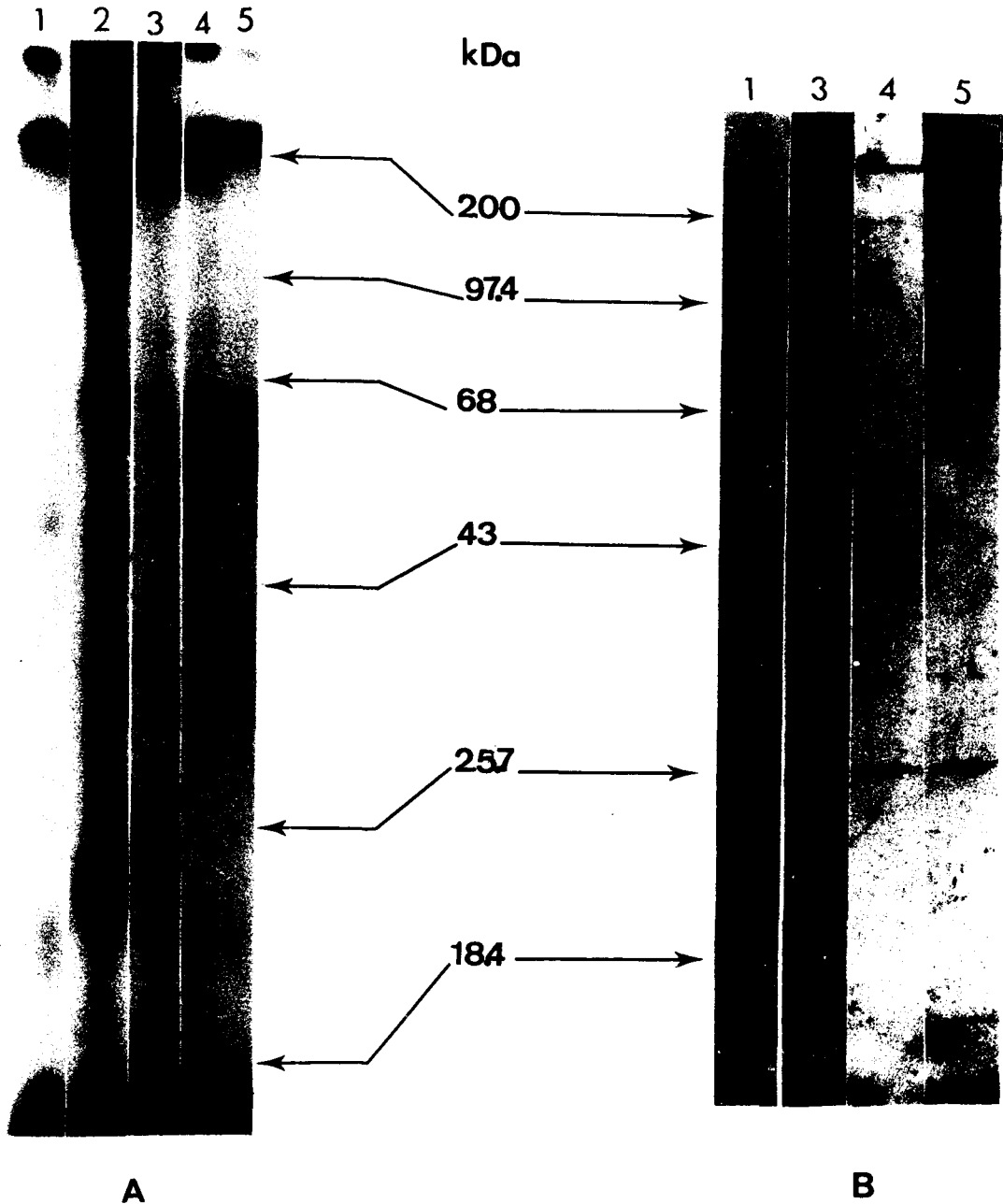


Figure 15 : Immunoprécipitation de SRP-A marqué à l'iode ^{125}I (A) et immunoblotting d'antigène schistosomule (B) par un sérum de rat sain (1), un sérum de rat infecté par *S. mansoni* J42 (2), un sérum de rat anti-26 kDa (3), et par des sérums Ab3 (4,5). Les produits immunoprécipités sont analysés sur un gel 13% SDS PAGE. Le gel est séché puis autoradiographié. L'antigène schistosomule est préalablement séparé sur un gel 13% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci est saturée par du PBS BSA 5%. Après incubation des sérums, les anticorps fixés sont révélés par un anti-sérum marqué à la peroxydase. La révélation est obtenue par l'HRP color.

La reconnaissance par l'anticorps IgE B48-14 et par les sérums polyclonaux Ab3 des mêmes antigènes démontrent clairement l'existence d'anticorps Ab3 de type β .

5. ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3: CYTOTOXICITE IGE DEPENDANTE

L'anticorps IgE monoclonal issue du clone B48-14 a été montré comme induisant une activité cytotoxique de type ADCC en présence de plaquettes, de macrophages et d'éosinophiles (Verwaerde *et al.* 1987)

Nous évaluons donc la présence d'anticorps IgE dans les sérums Ab3 en utilisant le test de cytotoxicité plaquettaire dépendante d'anticorps. Des travaux ont montré en effet que les plaquettes sont rendues cytotoxiques vis-à-vis du schistosomule par activation par des IgE spécifiques de l'antigène parasitaire à l'exclusion d'anticorps d'autres isotypes.

A ce stade il était important de connaître les activités fonctionnelles des anticorps Ab3.

5.1. Cinétique de l'induction de l'activité cytotoxique des plaquettes par les Ab3

Les sérums IgE Ab3 issus de la cinétique (II) sont testés en cytotoxicité plaquettaire dépendante d'anticorps. Le fait que la cytotoxicité soit réduite en chauffant 3h à 56°C ou en épuisant les sérums sur immunoabsorbant anti-IgE confirme la dépendance du phénomène vis-à-vis de l'IgE.

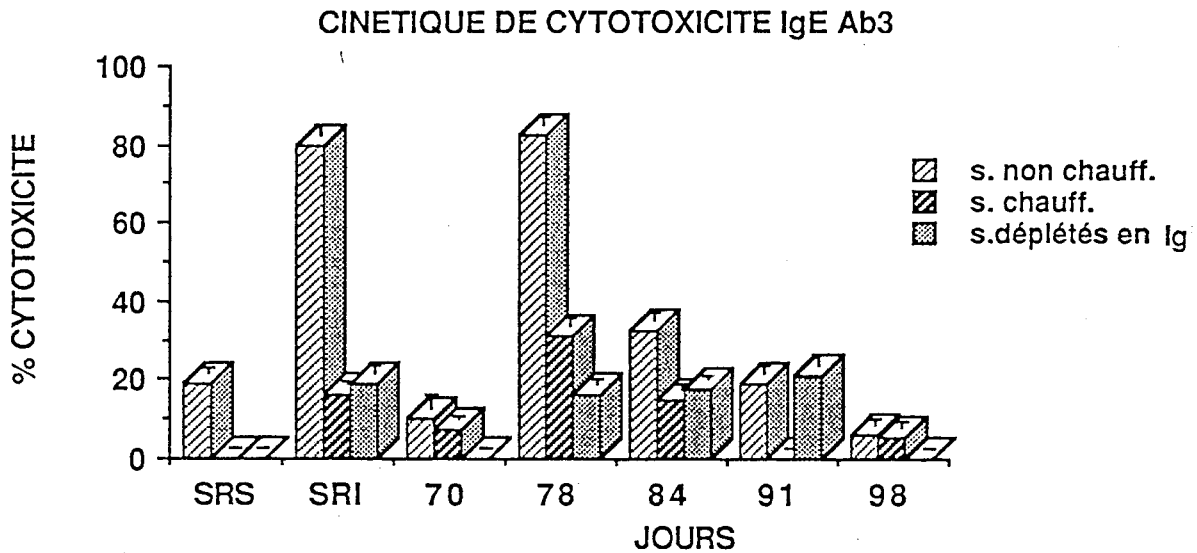


Figure 16 : cinétique d'apparition de la cytotoxicité plaquettaire. L'activité cytotoxique IgE dépendante d'un sérum issu de la cinétique II, un sérum de rat sain (SRS) et un sérum de rat infecté j42 (SRI) sont testés vis-à-vis du shistosomule. Les différents sérums sont chauffés 3h à 56°C ou passés sur un immunoadsorbant anti-IgE 1h à 4°C.

Le profil de cytotoxicité obtenu semble parallèle au dosage des anticorps IgE faits en immuno-empreinte (fig.15) avec un pic d'anticorps IgE vers j78 associé à une cytotoxicité plaquettaire maximum.

5.2. Tests d'inhibition de l'activité cytotoxique IgE dépendante des plaquettes

Selon le réseau de Jerne, la reconnaissance des Ab2 par les Ab3 peut entraîner l'inhibition de ces derniers. Nous avons testé la capacité des sérums Ab2 à bloquer l'activité cytotoxique de l'Ab1 et des sérums Ab3 en test ADCC plaquettes.

5.2.1. Inhibition de l'Ab1 par l'Ab2:

Afin d'éviter les effets cytotoxiques résiduels dus à la présence possible d'IgE Ab3, tous les sérums Ab2 utilisés pour les tests d'inhibition de cytotoxicité sont chauffés 3h. à 56°C avant leur utilisation.

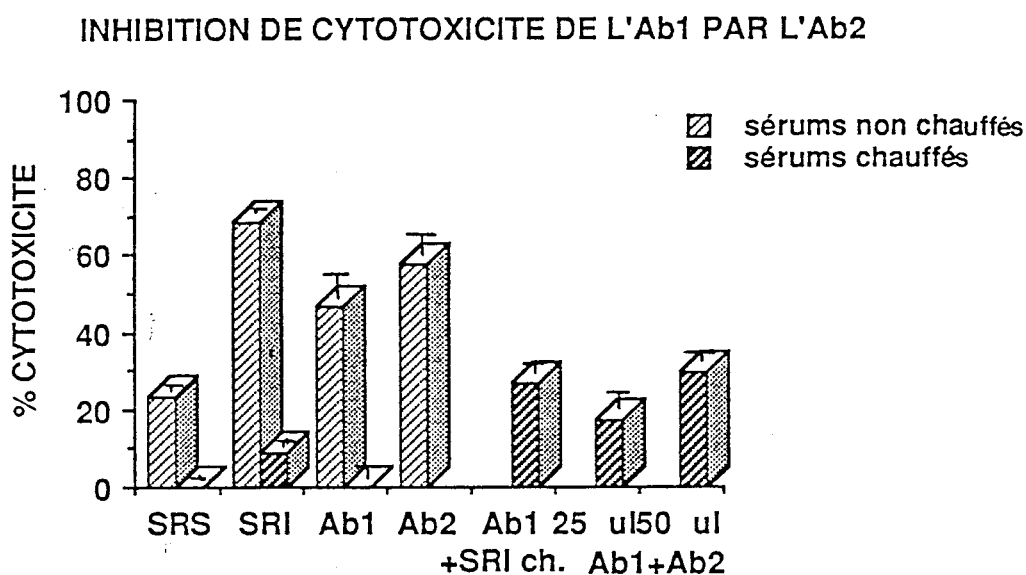


Figure 17 : inhibition de la cytotoxicité de l'Ab1 B48-14 par le sérum Ab2. Le surnageant du clone B48-14 est utilisé en présence de 10% de sérum de rat sain. Le sérum Ab2 est ajouté avec les plaquettes 30 min. avant l'Ab1 et les schistosomules. Le test de cytotoxicité est réalisé comme décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes."

Le surnageant de culture du clone B48-14 est dilué de façon à obtenir une cytotoxicité moyenne de 60% qui puisse être inhibée. Dans ces conditions, l'Ab2 inhibe de $65\% \pm 0.3\%$ SD l'activité cytotoxique induite par l'Ab1 (fig.17). Ces résultats montrent l'existence probable d'Ab2 de type β .

5.2.2. Inhibition de l'Ab3 par l'Ab2:

Des expériences d'inhibition de cytotoxicité sont réalisées dans les mêmes conditions avec les sérums Ab2 et Ab3. Une inhibition de la cytotoxicité de l'Ab3 de $76\% \pm 1.3\%$ SD est obtenue, moyenne de trois expériences (fig.18).

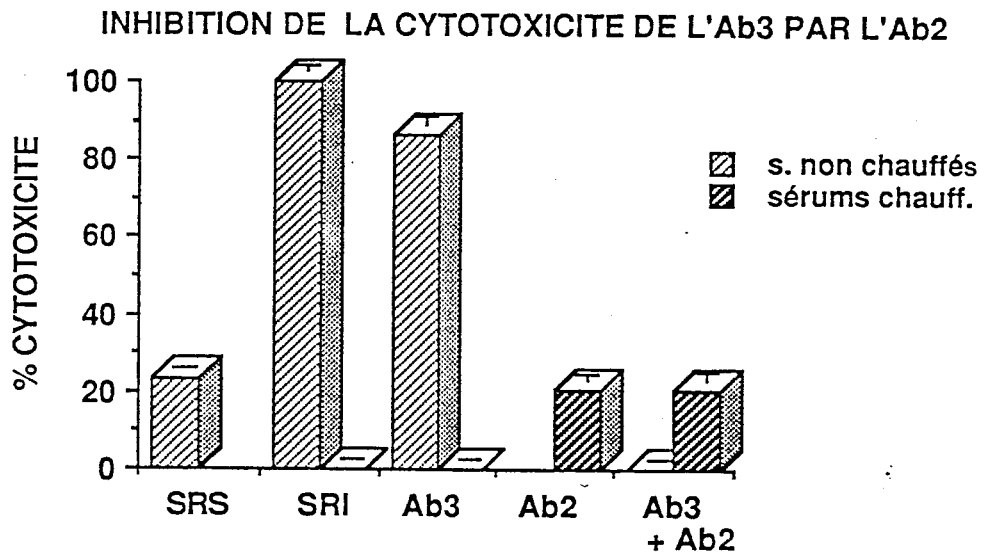


Figure 18 : Inhibition de la cytotoxicité des sérums Ab3 par le sérum Ab2. Ce test est réalisé comme dans le cas de la Fig 17.

Ces résultats suggèrent indirectement que l'Ab1 et les Ab3 reconnaissent le même épitope sur la molécule de 26 kDa. Il existe probablement dans les sérums des animaux immuns des Ab2 β et des Ab3 β .

6. ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3: CYTOTOXICITE IGG DEPENDANTE

Afin de savoir si les IgG Ab3 peuvent participer à des mécanismes d'ADCC, nous avons testé les sérums Ab3 IgG issus de la cinétique I en cytotoxicité éosinophile dépendante d'anticorps. Les sérums sont épuisés en IgG par passage sur protéine A sépharose.

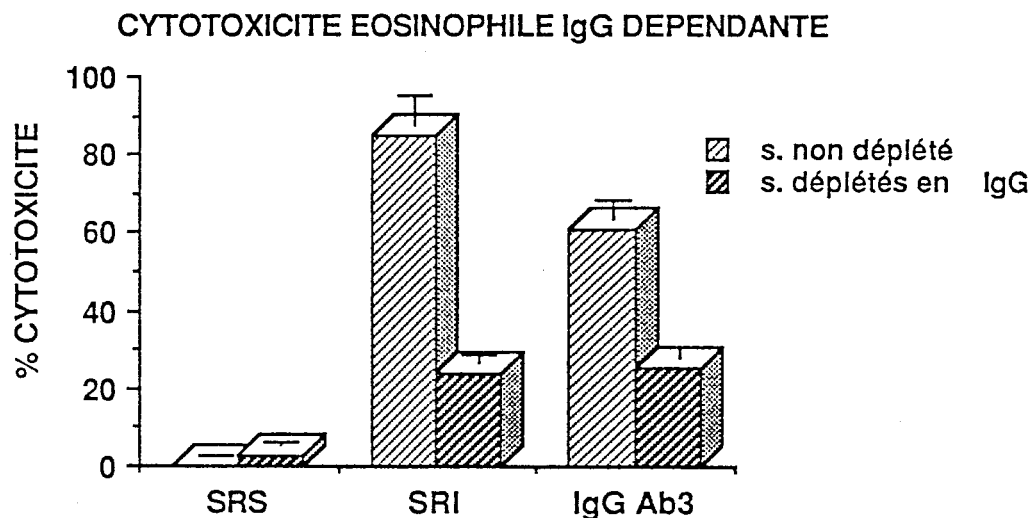


Figure 19 : Cytotoxicité des éosinophiles IgG-dépendante. Le pool de sérums utilisés pour le transfert passif des sérums (j64 ciné.I) Ab3 est testé par rapport à un sérum sain SRS et à un sérum infecté j42 (SRI).

La déplétion en IgG par passage sur protéine A sépharose réduit considérablement la cytotoxicité. Ces sérums ont une activité cytotoxique IgG dépendante élevée (fig. 19). D'autre part, nous avons montré que les sérums Ab3 induisent une cytotoxicité plaquettaire de l'ordre de 75%. On peut se poser la question de l'existence d'une synergie entre la cytotoxicité IgE et IgG.

En conclusion, les anticorps Ab3 induisent une activité cytotoxique des plaquettes-IgE et des éosinophiles-IgG et miment ainsi l'activité de anticorps Ab1 B48-14.

7. ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3 : TRANSFERT PASSIF *IN VIVO*

L'effet *in vivo* des anticorps anti-antiidiotypes est étudié par transfert passif de ces anticorps à des animaux infectés par *S. mansoni*. Les sérums de la même date de prélèvement de plusieurs animaux sont rassemblés afin de disposer d'une quantité suffisante, ils sont pris au pic d'apparition des Ab3 (jour 155 protocole III pour le pool IgE et au jour 64 protocole II pour le pool IgG). Le transfert se fait simultanément à l'infestation par *S. mansoni*. La charge parasitaire est déterminée trois semaines plus tard.

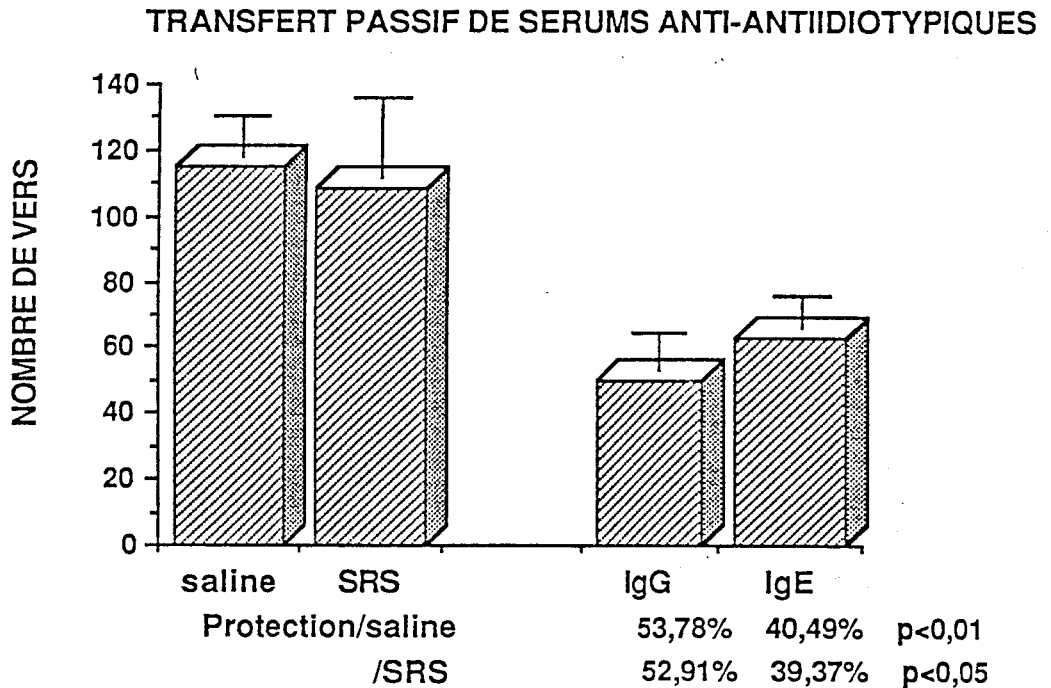


Figure 20 : Transfert passif des sérums IgG et IgE Ab3. 1 ml de sérum Ab3 IgG ou IgE, de sérum de rat sain (SRS), ou de solution saline sont injectés en i.p. et l'infestation est faite immédiatement. La charge parasitaire est déterminée par perfusion totale du foie trois semaines plus tard. L'analyse statistique des résultats est faite par comparaison des moyennes.

Les résultats présentés sur la fig.20 montrent que le transfert passif des anticorps IgE comme des anticorps IgG confère un niveau significatif de protection (40-50%), que l'on peut comparer à celui obtenu avec l'Ab1 B48-14 (50%).

Les anticorps IgE et les anticorps IgG Ab3 protègent par transfert passif des animaux contre une infection d'épreuve tout comme l'Ab1.

8. ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE CELLULAIRE T ANTI-AB2

Les travaux de Damonville et al., (1987) concernant des cellules T et des clones T anti-26 kDa montrent que ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'expression des IgE. En effet les surnageants de ces cellules T agissent directement sur les cellules du clone B48-14 pour induire la production *in vitro* de l'IgE. Les cellules T peuvent avoir un rôle "helper" dans la réponse IgE soit à cause de leur spécificité, ou à cause des lymphokines telles l'IL4 secrétée par ces cellules.

Nous avons voulu savoir si, avec des anticorps anti-Id (c'est à dire image interne de l'épitope) il était possible d'induire une population spécifique et quel pouvait être son rôle sur la régulation de la réponse IgE.

8.1. Test de transformation lymphoblastique

Par injection de sérums Ab2 agrégés par la glutaraldéhyde en présence d' IgG humaines, on prépare des cellules T anti-Ab2. Un test de transformation lymphoblastique (TTL) est effectué dès la sortie de l'animal. La spécificité des cellules est testée vis-à-vis des sérums Ab2 et d'un homogénat de schistosomules.

Ces cellules T anti-Ab2 sont testées vis-à-vis de l'antigène "schistosomule" par rapport à un antigène non relevant tel que l'ovalbumine.

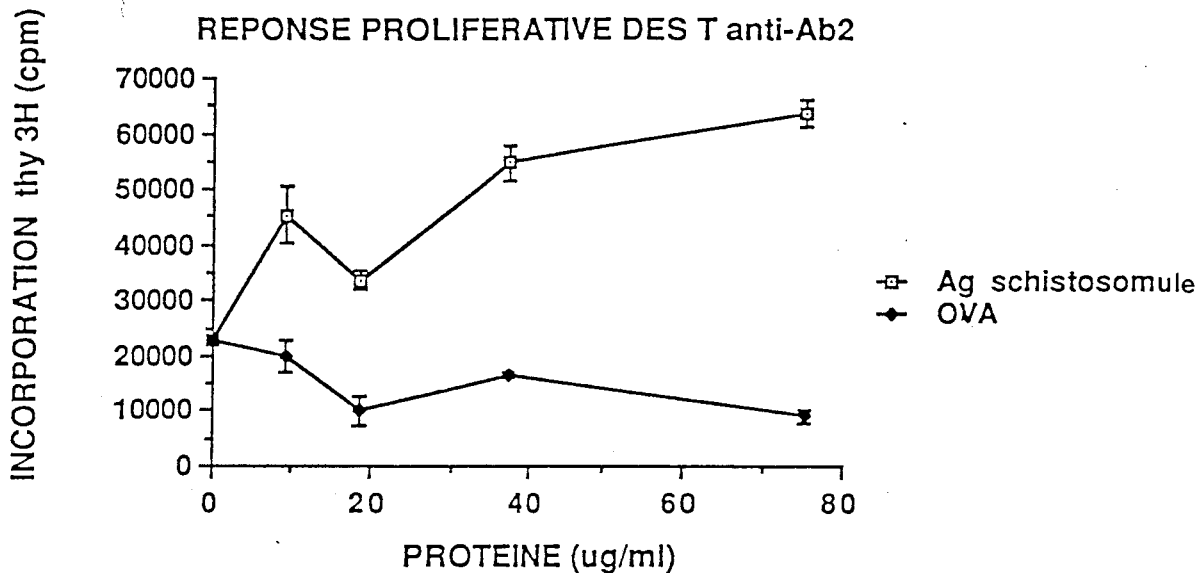


Figure 21 : TTL des cellules anti-Ab2 vis-à-vis de l'antigène schistosomule. 5×10^5 cellules T sont mises en présence d'APC et de concentrations variables d'antigènes (OVA, Ag Schle). Au bout de 5 jours de culture, la prolifération est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

La réponse que nous apporte ce test de prolifération est que des cellules sensibilisées avec des sérums antiidiotypes sont capables d'être restimulées avec de l'antigène "schistosomule", le même antigène donc qui est reconnu par l'anticorps Ab1.

8.2. Production de l'IL2 par les cellules T anti-Ab2

Des dosages d'interleukine 2 ont été faits sur les surnageants des cellules T anti-Ab2 en culture ainsi que pendant les tests de prolifération.

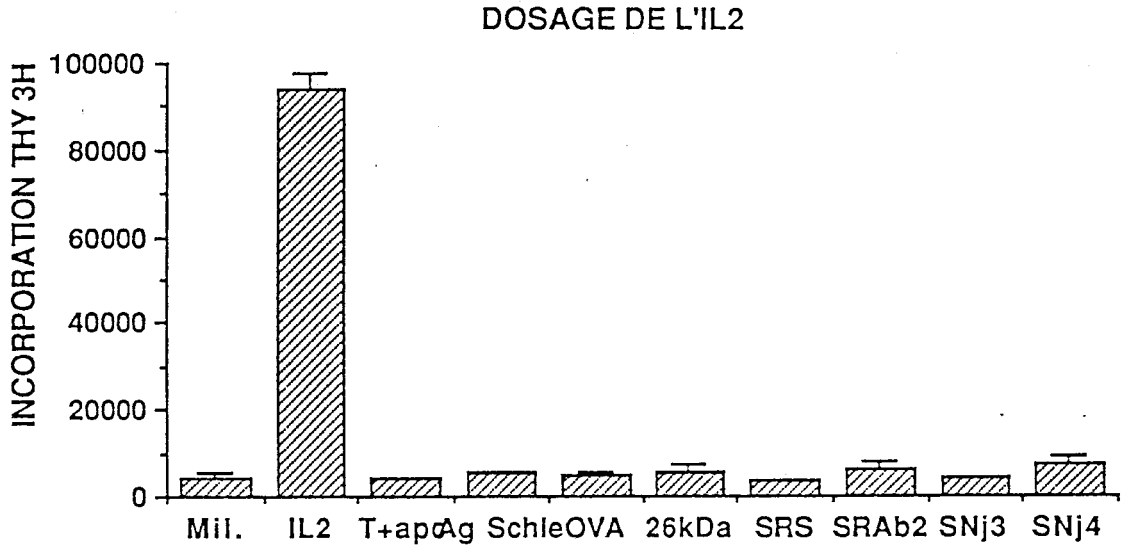


Figure 22 : Dosage de l'IL2 sur blastes Con A de souris. Les cellules spléniques de souris sont cultivées 48h en présence de Con A à 5 µg/ml, puis lavées par l'α méthyl mannopyrannoside. 10⁴ cellules sont mise en présence de quantités variables de surnageant de culture. La prolifération est estimée par incorporation de thymidine tritiée.

Quelque soit les conditions de culture, il n'a pas été possible de mettre en évidence de quantités détectables d'IL2. Il semble que ces cellules anti-Ab2 ne produisent pas d'IL2 et n'en nécessitent pas pour leur culture *in vitro*.

9. PHENOTYPAGE DES CELLULES T ANTI-Ab2

Selon les travaux de Mosman *et al.*, (1986) dans le modèle murin, il existerait au niveau des cellules T "helper" une hétérogénéité de nature et de fonction. Il divise les cellules "helper" en Th1 cellules productrices d'IL2 et d'interféron τ et les cellules Th2 productrices d'IL4 et d'IL5. Au niveau des cellules "helper" de rat les travaux concernant l'éventuelle hétérogénéité sont peu nombreux et seul Arthur *et al.*, (1986) propose le marqueur OX22 comme celui des Th1 chez le rat. Nous avons donc fait un phénotypage des cellules T anti-Ab2 après 6 semaines de culture.

Tableau I
Phénotypage des cellules T anti-Ab2 en culture

| marqueurs | W3/13 | W3/25 | OX8 | OX22 |
|-------------------|-------|-------|-----|------|
| % de fluorescence | 66 | 58 | 15 | 11 |

Les marqueurs des populations lymphocytaires de rat sont les suivants : W3/13 pour toutes les cellules T, W3/25 pour les cellules "helper", OX8 pour les cellules suppressives, et le marqueur OX22 pour les Th1/ Th2. On peut considérer que cette population se compose de cellules T "helper" et OX22- dans sa grande majorité, ce qui correspond probablement à des cellules de type Th2.

Des surnageants de ces cultures ont été produits dans différentes conditions. Il sera donc intéressant de tester dans des tests de synthèse d'IgE *in vitro* sur un myélome IgE et sur des cellules anti-DNP. De plus nous envisageons de transférer ces cellules à des animaux immunisés afin de mesurer un éventuel effet "helper" *in vivo*.

En conclusion, il est possible à l'aide d'anticorps antiidiotypes Ab2 d'induire une population cellulaire T qui répond de façon proliférative à l'antigène "schistosomule".

10. CONCLUSION

Ces travaux montrent donc qu'à l'aide d'un anticorps monoclonal IgE induisant l'activité cytotoxique des cellules effectrices (ADCC) et protecteur, il est possible :

- d'induire des anticorps antiidiotypes Ab2 et anti antiidiotypes Ab3;
- que ces anticorps Ab3 sont d'isotypes IgG et IgE;
- que ces Ab3 IgE et IgG reconnaissent les mêmes antigènes que l'Ab1;
- que les Ab3 induisent une activité cytotoxique dans différents modèles d'ADCC comme l'Ab1;
- que ces Ab3 IgG et IgE sont protecteurs par transfert passif comme l'Ab1
- enfin, qu'il est possible d'induire à l'aide d'Ab2 une population cellulaire T spécifique de l'antigène "schistosomule"

DISCUSSION ET CONCLUSION

La réponse anaphylactique au cours de la schistosomiase est un paramètre important de l'immunité développée par l'hôte vertébré infecté par *S. mansoni*. L'étude des allergènes aux différents stades d'évolution du parasite montre que le schistosomule porte des déterminants antigéniques spécifiquement reconnus par les IgE cytotoxiques. Le "Schistosomula Released Product" ou SRP, quantité très faible d'antigènes libérés par la larve induit préférentiellement une réponse d'isotype IgE plutôt que d'autres isotypes. Les travaux concernant la réponse immune dirigée contre le SRP montrent que les anticorps IgE anti-SRP-A obtenus par immunisation des rats sans adjuvant, participent aux différents mécanismes de cytotoxicité établis *in vitro* en présence des plaquettes, des éosinophiles, et de macrophages comme cellules effectrices. De plus le transfert passif des sérums confère à des rats de différentes souches une immunité protectrice contre une infection d'épreuve. L'épuisement en anticorps IgE des sérums anti-SRP-A avant leur transfert conduit à une diminution de la protection, ce qui démontre le rôle protecteur *in vivo* de ces anticorps IgE. L'analyse des antigènes cibles des anticorps IgE cytotoxiques anti-SRP a révélé deux antigènes majeurs de 26 et 22 kDa et de façon moins importante un antigène de 56 kDa alors que la réponse IgG anti-SRP est dirigée contre un nombre plus important d'antigènes répartis entre 14 et 150 kDa. Parmi ces trois allergènes présents dans le SRP, l'intérêt s'est particulièrement porté sur l'antigène de 26 kDa. En effet cette molécule est reconnue par les anticorps IgE des sérums d'infection, ce qui suggère sa pertinence *in vivo*. D'autre part, un anticorps monoclonal d'isotype IgE B48-14 reproduisant les effets des IgE des sérums anti-SRP a été préparé dans

notre laboratoire. Cet anticorps est spécifique de l'antigène 26 kDa. Il présente un haut taux de cytotoxicité *in vitro* en présence des cellules effectrices habituelles. De plus le transfert passif à des rats Lou/M de cet anticorps leur confère un taux de protection d'environ 50%. Cet anticorps monoclonal nous apparaissait donc être un outil intéressant pour étudier l'antigène de 26 kDa et analyser l'induction de la réponse IgE.

De nombreuses études ont montré la possibilité d'induire une immunité à l'aide d'anticorps anti-idiotypes dans les maladies parasitaires, en particulier dans la schistosomiase expérimentale du rat (Grzych *et al.* 1987). Nous nous sommes attachés à déterminer l'implication du réseau idiotypique dans le cas d'une réponse IgE protectrice.

RESEAU IDIOTYPIQUE ET REGULATION ISOTYPIQUE

L'immunisation avec l'anticorps monoclonal B48-14 Ab1 conduit à la production d'anticorps anti-idiotypes de première génération Ab2 et de deuxième génération Ab3. La technique d'immuno-empreinte utilisée pour analyser les Ab2 met en évidence pour les anticorps Ab2 tous les types d'anti-Id (α , β , ϵ , τ) tandis que par ce test l'on ne révèle que les anticorps d'activité anti-parasitaire, les Ab3 β . Les profils de courbes des différentes cinétiques varient selon le protocole d'immunisation utilisé, suggérant que la présentation de l'Ab1 joue un rôle dans l'amplitude, la qualité de la réponse immune ainsi que dans le rapport Ab2/Ab3. La réponse Ab3 "naturelle" est capable d'exprimer les mêmes activités que l'Ab1.

L'analyse des isotypes produits au cours de la réponse Ab3 est étudiée à l'aide d'anticorps anti-isotypes. Le fait le plus marquant est, outre la présence d'anticorps IgG anti-Id Ab3, celle d'anticorps IgE Ab3. Les deux Ab3, IgE et IgG, reconnaissent l'antigène de 26 kDa et sont cytotoxiques en présence d'éosinophiles (65% d'activité cytotoxique) ou de plaquettes (60 à

80%). Cette activité cytotoxique des Ab3 peut être inhibée par les IgG Ab2. Ces résultats obtenus *in vitro* sont confortés par ceux obtenus *in vivo* après le transfert passif des IgG et IgE Ab3.

Ces observations confirment la possibilité d'induire une immunité protectrice à l'aide d'anticorps anti-Id comme l'avait montré Grzych *et al.*, (1987). **L'originalité de notre travail réside dans la production d'anticorps IgE Ab3 capables de fonctions effectrices comme l'Ab1**, ce qui n'a jamais été montré à notre connaissance. Ces résultats posent la question fondamentale de la régulation de la synthèse des isotypes dans le réseau idiotypique. La sélection isotypique au cours de la cascade idiotypique peut être régulée soit par l'idiotope, soit par l'isotype de l'Ab1 injecté. Différentes études ont montré que la sélection isotypique semblait due plutôt à la forme tridimensionnelle des molécules qu'à un épitope donné, donc représenté par une structure primaire (Fish *et al.* 1987). Dans notre expérience un épitope porté par l'antigène de 26 kDa et l'idiotope porté par les Ab2 induisent tous les deux des IgE de mêmes spécificités et de mêmes fonctions. Cela veut-il dire que dans ce cas, la structure de l'épitope influencerait directement la sélection isotypique? quel est le rôle du à la partie Fc ϵ de l'Ab1? Il est intéressant de noter que l'apparition des IgE Ab3 est indépendante des protocoles utilisés, suggérant que la sélection isotypique ne dépende pas uniquement du mode initial de présentation de l'Ab1.

L'antigène de 26 kDa a été montré comme induisant des cellules T régulant la sécrétion des IgE via les cellules B (Damonville *et al.* 1988). On peut penser que l'idiotope de l'Ab2 (image interne de l'antigène) puisse induire des cellules T directement impliquées dans la sécrétion des IgE. La forte concentration d'IgE peut augmenter l'expression de facteurs T ayant une affinité pour les IgE telles que les "IgE Binding Factors" qui régulent la réponse IgE.

HYPOTHESE SUR LA NATURE DE L'ANTIGENE 26kDa

Certaines enzymes telles que les glutathion-transférases (GST) font l'objet de nombreuses études dans les modèles parasitaires. La stratégie concernant ces enzymes s'appuie sur les faits suivants: s'intéresser à des enzymes de détoxification du parasite afin de le rendre plus vulnérable aux défenses de l'hôte, de plus ces enzymes étant présentes à la surface du parasite, celui-ci est rendu plus sensible aux mécanismes anticorps dépendants. Dans le modèle *Schistosoma japonicum* une enzyme GST, molécule de 26 kDa a été clonée, la Sj26 (Mitchell *et al.* 1987). D'autre part, dans le modèle *Schistosoma mansoni* l'analyse d'une fraction éluat de colonne de glutathion montre deux groupes de molécules de 28 et 26 kDa. L'analyse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide montre quatre molécules à 26 kDa et une molécule à 28 kDa. La molécule GST de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* a été récemment clonée. Il s'agit de la molécule P 28-1 qui est un antigène dont le potentiel vaccinant a été montré (Balloul *et al.* 1987, Auriault *et al.* 1988). Pour la molécule Sm26, des résultats encore préliminaires montrent que les sérums Ab3 reconnaissent spécifiquement l'éluat GST-Sm. Il est donc possible que la molécule reconnue par l'anticorps IgE B48-14 soit l'une des glutathion-transférases du parasite *S. mansoni*. Cela reste à confirmer.

RESEAU IDIOTYPIQUE ET MEMOIRE IMMUNOLOGIQUE

Nos données expérimentales suggèrent qu'en dépit d'une faible quantité théorique d'Ab3 β , on observe une activité biologique importante. Au cours de la cascade idiotypique, la dilution des anticorps du même clone durant l'expansion clonale peut être compensée par la sélection par des anticorps anti-Id avec une forte affinité. Le réseau idiotypique restreint la

réponse anticorps au travers de couples épitope/paratope avec une haute affinité.

L'induction avec des sérums Ab2 de cellules T spécifiques de l'antigène de "schistosomule" montre la possibilité d'un réseau idiotypique au niveau cellulaire T. D'autres travaux sont en faveur de cette hypothèse, mais le rôle d'un tel réseau, ainsi que les relations des différentes composantes, à l'intérieur du réseau ne sont pas entièrement définis. En particulier certaines lignées sont restimulables avec ou sans cellules présentatrices d'antigène. De même certains anticorps antiidiotypes sont capables de transférer une immunité protectrice à différentes lignées de souris sans restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité. Le rôle des anticorps antiidiotypes dans la mémoire immune est plus conceptualisable. On peut en effet imaginer que par un relai continu des cellules T et d'anticorps de différentes générations, on puisse obtenir le maintien de la reconnaissance d'une structure donnée et ce, en l'absence d'antigène. Le réseau idiotypique serait le support solide de la mémoire immunitaire. Ce travail peut être une bonne illustration du réseau idiotypique comme porteur de la mémoire immunologique.

RESEAU IDIOTYPIQUE ET VACCINATION

De plus le fait que l'activité biologique soit conservée au cours de la cascade idiotypique montre l'importance et l'intérêt de l'épitope reconnu par l'anticorps IgE monoclonal ainsi que l'isotype et les idiotopes de l'anticorps B48-14. Une conséquence pratique de ces résultats concerne l'établissement d'une stratégie vaccinale dans le cadre de la schistosomiase. Il faut mettre l'accent sur l'intérêt que représente l'étude d'un épitope vaccinant au travers de la cascade idiotypique. Les techniques de la biologie permettent à l'heure actuelle de travailler avec un matériel de plus

en plus propre. Il faut donc se donner les moyens de bien choisir l'épitope "vaccinant". Nous avons souligné dans un paragraphe précédent l'implication possible du réseau de Jerne dans la mémoire immunitaire. Il semble donc primordial de connaître au travers de la cascade idiotypique le devenir d'un épitope choisi comme candidat vaccinant. La molécule de 26 kDa et plus particulièrement l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal B48-14 apparaît posséder une potentialité vaccinale certaine et pourrait être utilisée en association avec une autre molécule telle que l'antigène 28 kDa (Balloul *et al.* 1987).

D'autre part les conséquences de ces travaux dépassent les limites du domaine de l'immunologie parasitaire. Les anticorps IgE sont impliqués également dans les maladies allergiques, et la persistance d'une réponse IgE Ab3 suggère un rôle possible du réseau dans certains aspects des pathologies allergiques.

De plus il semble que l'utilisation des anticorps antidiotypes comme vaccin ouvre des possibilités telles que l'induction de cellules T cytotoxiques dans le cas de virus ou de bactéries intracellulaires où les mécanismes cellulaires sont essentiels à l'induction d'une immunité ce qui ne peut être obtenu avec des vaccins "classiques" (Finberg *et al.* 1987).

Le mécanisme de la sélection isotypique est encore mal connu. Mais le maintien d'un idiotope (spécificité) et d'un isotype (fonction) d'anticorps au cours de la cascade idiotypique souligne l'importance de ce processus dans l'amplification et la persistance d'une réponse immune.

MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL D'ORIGINE PARASITAIRE

1.1. Le cycle parasitaire

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

1.2. Préparation de schistosomule

Les schistosomules préparés par pénétration transcutanée de cercaires selon la méthode de Clegg et Smithers (1972), sont utilisés pour les tests de cytotoxicité dépendante d'anticorps. Pour toutes les autres expériences notamment la préparation d'antigène, sont utilisés des schistosomules préparés à partir de cercaires dont les appendices caudales sont brisées par agitation mécanique selon la méthode de Ramalho-Pinto *et al.*, (1974).

1.3. Préparation du Schistosomula Released Product (SRP).

Des schistosomules préparés mécaniquement sont lavés par du tampon Hank's Wallace puis incubés (20 000/ml) pendant 16h dans le même tampon. Le surnageant SRP est récupéré après centrifugation 150g pendant 2 min selon la technique modifiée (Auriault *et al.* 1984).

1.4. Préparation de l'antigène schistosomule

Les schistosomules sont lysés aux ultrasons à 25W par un Braun sonic 125 homogénéisateur à 4°C puis centrifugés à 100 00g pendant 1 h. Les protéines présentes dans le surnageant sont dosées par la méthode de Folin (Folin *et al.* 1951) et stockées à -20°C.

2. CULTURE CELLULAIRE

2.1. Milieux de culture

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

2.2. Culture des cellules

La culture des hybridomes sécrétant les anticorps monoclonaux B48-14 ou B42-170 (IgE témoin) se fait en milieu de culture (2.1) 10% SVF. Pour les lignées cellulaires T, les cellules sont cultivées en milieu "lignée" 10% SVF en présence de cellules thymiques irradiées (3000 rads) comme cellules présentatrices d'antigène APC et d'antigène "schistosomule" (50 µg/ml final).

2.3. Préparation des lymphocytes

La rate, les ganglions ou le thymus de souris ou de rat sont prélevés et dilacérés sur une gaze de nylon dans une solution tamponnée de Hank's (Hank's buffered salt solution ou HBSS). La suspension cellulaire est passée à travers un filtre de nylon (blutex, 90 mailles/cm²). Pour les cellules spléniques, un choc hypotonique avec du NaCl 0.2% permet d'éliminer les hématies. La préparation des lymphocytes T se fait par passage sur laine de nylon suivant la méthode de Julius *et al.*, (1978).

2.5. Tests de prolifération des lymphoblastes (TTL)

Pour les tests effectués sur les cellules sortant de l'animal, 5×10^5 cellules T sont incubées en présence de 1×10^6 APC avec différentes concentrations d'antigène en milieu "lignée" 10% SVF. Pour les cultures cellulaires en lignée continue seulement 10^4 cellules sont mises en présence de 5×10^6 APC. Après 5 jours, les cultures sont incubées en présence de 18.5 kBq de méthyle thymidine tritiée (185 GBq/mmol) (C.E.A., Gif sur Yvette, France). L'incorporation de thymidine est déterminée après récupération des cellules marquées par filtration sur fibre de verre avec un collecteur de cellules (Titertek harvester, Skatron, Lirbven Norvège) et comptage des filtres dans un compteur à scintillation liquide.

2.6. Dosage de l'Interleukine 2

Les surnageants des cultures de lignée cellulaire T sont prélevés à 24, 48, 72 h. La suspension cellulaire splénique de souris est ajustée à 10^6 /ml. 10^4 cellules par puits sont mises en présence des différentes

dilutions de surnageants pendant 48 h. Les cultures sont incubées avec 18.5 kBq de ³H-méthyl thymidine et filtrées 6 heures plus tard.

3. ANIMAUX

Toutes les expériences d'immunisation, de transfert, de préparation d'ascites sont faites chez le rat LOU/M (Institut Pasteur de Lille). Les souris sont des Balb/c issues de l'élevage de l'Institut Pasteur de Lille.

4. ANTIGENES

4.1 Préparation des IgE monoclonales B48-14 et B42-170

La préparation des anticorps IgE se fait à partir d'ascites recueillis chez l'animal par précipitation au sulfate d'ammonium saturé. Deux précipitations fractionnées de 40% et 60% sont faites à la suite l'une de l'autre, et les fractions enrichies en IgE sont dialysées de façon intensive contre de l'eau physiologique. Elles sont ensuite dosées par une méthode spécifique (Neyrinck *et al.* 1986) et réparties pour être stockée à -70°C.

4.2. Préparations des antigènes utilisés pour les immunisations

L'anticorps IgE préparée par précipitation est concentrée à 1 mg/ml puis copolymérisée par la glutaraldéhyde 25% en présence (5mg/ml) d'IgG humaines (fraction II de Cohn, Sigma St Louis USA) comme agent tolérogène. L'équivalent de 200 µg d'IgE est injecté par rat par voie sous-cutanée.



Les cellules du clone B48-14 sont recueillies par centrifugation 500 g pendant 10 min. puis lavées dans de l'HBSS. Les cellules sont ensuite agrégées par la glutaraldéhyde 25% en présence d'IgG humaines (5mg/ml) (Fraction II de Cohn). L'équivalent de 10^6 cellules est injecté par rat en sous-cutanée.

5. METHODES D'ANALYSE BIOCHIMIQUE

5.1. Gels acrylamide SDS PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis)

Les gels d'acrylamide sont faits selon la méthode de Laemmli *et al.* (1970) modifiée par Dissous *et al.* (1984). Un gel 13% SDS PAGE est utilisé au cours de toute notre analyse.

5.2. Electroélution

L'homogénat de schistosomules (5mg) est séparé sur un gel 13% SDS PAGE. Les bandes de gels correspondants à un poids moléculaire choisi (26, 56 kDa) sont prélevées sur le gel après coloration au bleu de bromophénol et électroéluées par la méthode de Mendel *et al.*, (1982) modifiée par Balloul *et al.*, (1987).

5.3. Immunoblotting

L'homogénat de schistosomule est séparé sur un gel 13% SDS PAGE et transféré sur nitrocellulose selon la méthode de Towbin *et al.*, (1979). Les sérums sont ensuite incubés avec le papier de nitrocellulose en présence de PBS 5% BSA. Les anticorps fixés sont révélés à l'aide d'anti-sérums marqués à la peroxidase. La révélation se fait avec l'HRP color (Horse Reagent Peroxidase, Biorad).

5.4. Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations sont faites selon la méthode de Dissous *et al.*, (1984). Les produits immunoprécipités sont analysés en gel SDS PAGE 13%. Le gel est ensuite séché puis autoradiographié.

5.5. Immuno-empreinte

De l'antigène est déposé par point sur une feuille de nitrocellulose, puis saturé dans un tampon PBS pH 7,4, NaCl 0.3M, caseine 0.015% pendant 1h. Les bandes de papier sont ensuite incubées avec les sérums dilués au 1/50, et après lavages, différents antisérums marqués à la peroxydase (Miles Yelda, Israël) sont ajoutés pour 2h d'incubation. Enfin après lavages on révèle la réaction par le HRP (Biorad). L'intensité de cette réaction est mesurée par un réflecteur densitomètre (Gretag, Regensdorf, Suisse).

6. TESTS DE CYTOTOXICITE

6.1. Test de cytotoxicité des plaquettes dépendante d'anticorps

Les plaquettes sont préparées selon la méthode de Joseph *et al.*, (1983) sur calciparine à partir de rats Fischer. Environ 8×10^9 plaquettes sont réparties en plaques 96 puits avec 20 μ l de sérum de rats et 50 schistosomules. Les surnageants d'hybrides (B48-14 ou B42-170) sont utilisés en présence de 10% de sérum de rat sain. Dans les expériences d'inhibition de cytotoxicité, les plaquettes sont préincubées avec le sérum inhibiteur 1/2 h avant l'addition du sérum effecteur (Ab3) ou du surnageant de culture (Ab1). Les contrôles sont faits en épuisant les

sérums sur un immunoabsorbant anti-IgE ou en les chauffant à 56°C. Le dénombrement des larves tuées d'aspect granuleux et opaque se fait sous microscope optique.

6.2. Test de cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps

Le test de cytotoxicité éosinophile dépendante d'IgG est fait selon la méthode de Butterworth *et al.*, (1976). Les sérums Ab3 chauffés sont préincubés avec les schistosomules à une dilution finale de 1/30. Après 18 h d'incubation les cellules sont ajoutées dans 200µl final de MEM/SVF/TRI. Pour le test de cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'IgE, les éosinophiles, les sérums et les schistosomules sont incubés ensemble pendant 24h. Les contrôles sont faits par chauffage ou épuisement, en IgE sur immunoabsorbant anti-IgE, en IgG par passage sur de la protéine A-sépharose des sérums. Dans les deux cas le pourcentage de cytotoxicité est mesuré comme précédemment.

7. TRANSFERT PASSIF

Plusieurs saignées de la même date (j64 cinétique I) sont rassemblés pour être injectés à des rats avant leur infestation par *Schistosoma mansoni* (1500 furcocercaires/rat).

La charge parasitaire est déterminée par perfusion totale des foies selon la méthode de Smithers *et al.*, (1965). Le nombre de vers récupérés chez les rats transférés avec les sérums Ab3 est comparé à celui des contrôles injectés avec du sérum de rat sain ou du sérum physiologique. Le pourcentage de protection est calculé par la formule $(a-b)/ax100$ où *a* est le nombre de vers obtenus chez les rats témoins et *b* le nombre de vers obtenus chez le groupe transféré par les sérums Ab3. Le test statistique consiste en un test de comparaison des moyennes.

ARTICLES

Ce travail a fait l'objet des publications et communications:

M. DAMONNEVILLE, F. VELGE, C. VERWAERDE, J. PESTEL, C. AURIAULT and A. CAPRON. 1987. Generation and functional analysis of T cells lines and clones specific for Schistosomula Released Products (SRP). *Clin. Exp. Immunol.* 69:299-307

C. VERWAERDE, M. JOSEPH, M. CAPRON, R. J. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, F. VELGE, C. AURIAULT and A. CAPRON. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138:4441-4446

F. VELGE-ROUSSEL, C. VERWAERDE, J. M. GRZYCH, C. AURIAULT and A. CAPRON. 1989. Protective effects of anti-antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26 kDa *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol* 142(7):

J. M. GRZYCH, F. VELGE-ROUSSEL, A. CAPRON. 1989. Contribution of antiidiotype antibodies in approches towards the immunoprophylaxis of schistosomiasis. *Advances in Immunol.* (sous presse)

AURIAULT, C., I. WOLOWCZUK, M. DAMONNEVILLE, F. VELGE-ROUSSEL, V. PANCRE, H. GRAS-MASSE, A. TARTAR and A. CAPRON. 1989. T cell antigens and epitopes in schistosomiasis. *Current Topics in microbiol. Imm.* (sous presse)

VELGE-ROUSSEL, F., J.M. GRZYCH, C. VERWEARDE, C. AURIAULT, A. CAPRON.
1989. Protective effects of anti-antiidiotypic antibodies obtained from a
monoclonal anti-*S. mansoni* IgE . Elsevier congress's book of "Idiotypic
network in Biology and Medicine". Gennep The Neerlands April 1989.

Communications

F. ROUSSEL, J. M. GRZYCH, C. VERWAERDE, C. AURIAULT et A. CAPRON.
Functional properties of an anti-antiidiotypic IgE antibodies prepared from
a monoclonal anti-*S. mansoni* IgE. Meeting SFI La Villette 7-8 avril 1988.

F. VELGE-ROUSSEL, J. M. GRZYCH, C. AURIAULT and A. CAPRON. 1989.
Protective activity of anti-antiidiotypic antibodies prepared from a
monoclonal anti-*S. mansoni* IgE. "Idiotypic Network in Biology and Medicine"
Genneps 17-20 Avril 1989.

Clin. exp. Immunol. (1987) **69**, 299-307

Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula released products (SRP-A)

MARTINE DAMONNEVILLE, FLORENCE VELGE, CLAUDIE VERWAERDE,
J. PESTEL, C. AURIAULT & A. CAPRON *Centre d'Immunologie et de Biologie
Parasitaire, Institut Pasteur, Paris, France*

(Accepted for publication 23 February 1987)

SUMMARY

Antigens present in the products released by the larval stage of schistosome (SRP-A) were shown to induce a strong cytotoxic and protective IgE response both in the rat and the monkey. T cell lines and clones specific for SRP-A or 26 kD antigens which are the main target of the cytotoxic IgE have been derived. The passive transfer of SRP-A specific T lymphocytes into infected rats led to an increase of the IgE response, conferring a significant level of protection to the rats. In coculture assays *in vitro*, these cell lines significantly enhanced the production of IgE by SRP-A sensitized rat spleen cells. This helper effect on the IgE response was confirmed with 26 kD T cell clone supernatants. Moreover, supernatants obtained after stimulation with phorbol myristate acetate were able to enhance the IgE production of a hybridoma B cell line (B48-14) producing a monoclonal IgE antibody, cytotoxic for the schistosomula.

Keywords *Schistosoma mansoni* T lymphocyte

INTRODUCTION

Resistance to *Schistosoma mansoni* in the rat is a complex phenomenon, which consists mainly of a specific protective immune response. Previous studies have shown the thymodependency of some essential components of the immune response, i.e. IgE production, hypereosinophilia, delayed type hypersensitivity (Phillips *et al.*, 1983; Capron *et al.*, 1983). The development of resistance was known to be impaired by thymectomy and was reliant upon T mechanisms. However, cytotoxic T cells seemed not to be involved in immune attack (Butterworth *et al.*, 1979). Progress made in the establishment of long term cultures in murine models has allowed the cloning of helper T cells specific for the schistosome egg antigen (SEA) derived from spleens of infected mice (Lammie, Linette & Phillips, 1985). SEA-reactive T cell clones were shown to augment granuloma formation *in vitro* and mediate delayed type hypersensitivity (DTH). In the rat model, a T cell clone, specific for the excretory or secretory products of the adult worm was shown to exert a helper activity *in vivo* towards the schistosomulum surface antigens (between 30 and 40 kD) involved in the protective IgG immune response (Pestel *et al.*, 1985).

The schistosomulum antigens deserve particular interest since the larval stage appears to be the main target of the protective immune response to schistosomiasis, which depends on the interaction of effector cells and anaphylactic antibodies. Recent work has shown that the injection without adjuvant of schistosomula-released products (SRP-A) into rats (Auriault *et al.*, 1984) or monkeys (Auriault *et al.*, 1985) induces a high cytotoxic IgE response.

Correspondence: M. Damonville, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167, CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex, France.

300

Martine Damonville et al.

Up to 83% protection was observed when the rats were immunized with SRP-A before infection (Damonville *et al.*, 1986b). Passive transfer experiments with anti-SRP-A antisera have shown the preponderant role of IgE antibodies in the protective immunity. A 26 kD antigen, identified as the main target of the anti-SRP-A IgE antibodies, was also recognized by the IgE antibodies of a 35-day infected rat serum (Damonville *et al.*, 1986b).

In the present study, we investigate the involvement of T cells in the protective immune response elicited by the injection of SRP-A or 26 kD into rats focusing on the IgE response. These T cell lines and clones, stimulated with schistosomulum antigens, have been derived *in vitro*. Some functional effects *in vitro* and *in vivo* of these cells are reported.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

A Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* was used through this study. Schistosomula were obtained *in vitro* using a mechanical procedure (Ramalho-Pinto *et al.*, 1974).

Preparation of SRP-A and homogenates

Schistosomula were incubated for 4 h at 37°C in Hank's balanced solution and washed in this medium (Auriault *et al.*, 1984). The parasites (20,000/ml) were then incubated for 16 h at 37°C. The parasite-free supernatant recovered after centrifugation is referred to as SRP-A. Schistosomulum, adult, cercariae homogenates and soluble egg antigen were prepared as described previously (Pierce *et al.*, 1983). Other antigens were kindly provided by H. Caron (Institut Pasteur, Lille, France).

Media and reagents

RPMI-1640 (Gibco, UK) containing 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin was usually supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate and 5–10% heat-inactivated fetal calf serum (Flabio, UK).

Source of IL-2

IL-2 containing medium was obtained by stimulation of murine EL4 tumour cells with phorbol myristate acetate (PMA) and controlled by its ability to support the growth of a long term cytotoxic T cell population (CTL-L) (Gillis & Watson, 1981).

Culture and cloning procedure

The Fischer rats (Iffa Credo, France) were immunized either with SRP-A (1 ml/rat) intraperitoneally (i.p.) without adjuvant or with the 26 kD antigen (see following section), corresponding to one gel per rat, injected subcutaneously with *Bordetella pertussis* as adjuvant (5×10^9 units, Institut Pasteur Production, France). After 7 days the cells were passed through nylon wool columns (Julius, Simpson & Herzenberg, 1973). Purified cells (2×10^5) were cultured with 3×10^6 irradiated syngeneic thymic cells (2000 rads) as antigen presenting cells (APC), IL-2 (5–10%) and schistosomulum antigen (50 µg/ml).

T lymphoblasts after several weeks of culture were cloned in limiting dilution conditions (1 to 100 cells/well) with 5×10^5 APC, *S. mansoni* antigen and IL-2. Growth was assessed either visually or by methyl [³H]-thymidine incorporation (specific activity: 376 Bq/mmol, CEA, Gif-sur-Yvette, France).

Functional characterization of the cell lines and the clones

Supernatant production. Supernatants were prepared by incubating 1×10^6 T cells in IL-2 free medium either with PMA (1 µg/ml) without APC or with schistosomulum antigen in the presence of APC. After 24 h the cells were washed extensively, and recultured in IL-2-free medium. Supernatants were collected 24 h later, and assayed for various lymphokine activities.

Interleukin 2 (IL-2) assay. IL-2 levels in the antigen stimulated cell supernatants were

S. mansoni schistosomulum specific T lymphocytes

301

determined with Con A stimulated lymphoblasts. Normal spleen cells (5×10^6 cells/ml) were stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/ml}$) for 72 h. The stimulated lymphoblasts washed extensively with 0.3 M methyl- α -D-mannopyranoside (Koch Light Lab., Cohnbrook, Bucks, UK) were incubated (10^4 cells/well) with supernatants (diluted to 1:4) for 24 h. Proliferation was monitored by a 16 h pulse with methyl [^3H]-thymidine. EL4 cell line standardized supernatants (diluted to 1:8) were used as positive control in the test.

Macrophage activating factor assay. MAF activity was quantified in a cytotoxicity assay by using schistosomula as target, and peritoneal exudate macrophages as effector cells (according to Bout *et al.*, 1981).

IgE helper activity test. Two sources of IgE producing cells were used, SRP-A sensitized Fischer rat spleen cells and a hybridoma cell line B48-14 producing a monoclonal IgE antibody specific for *S. mansoni* (Verwaerde *et al.*, in press). In the first case, the cells (5×10^4 cells/well) were co-cultured with 26 kD specific T cells (5×10^3 or 10^4 cells/well), with schistosomulum antigen ($10 \mu\text{g}$ protein) or without antigen in the conventional culture medium. After 5 days, the supernatants were recovered and tested for IgE content (pg/ml).

Secondly, hybrid cells (2×10^4 cells/well) were incubated with the supernatants (diluted to 1:4) of the T cells stimulated with PMA. Total IgE level (ng/ml) was measured in the supernatants, 48 h later.

Measurement of serum or supernatant total IgE and IgG. The method was described previously (Neyrinck *et al.*, 1986). IgE myeloma (IR 162) ($100 \mu\text{l}$), kindly provided by Professor Bazin (Belgium), was used as a standard: in the range of 100 pg to 100 ng/ml to measure the IgE in the B cell supernatant, in the range of 5 ng to $5 \mu\text{g/ml}$ for the B48-14 cell line or in the sera assay. The total IgG level in the sera was measured by a specific competitive radioimmunoassay with ^{125}I -labelled rat IgG (MIAB, Sweden).

Passive transfer of SRP-A specific T cells. One day before infection of the Fischer rats with 1000 cercariae, 15×10^6 T lymphocytes, just after being recovered from the animals, were injected intravenously (i.v.) into each rat. Control rats were injected i.v. with 15×10^6 T lymphocytes from normal rats. Parasite burdens were evaluated by liver perfusion 20 days after infection. The percentage of protection was calculated by the formula $(A - B/A) \times 100$ where A represents the number of worms recovered from infected rats and B the number of worms recovered from rats injected with normal or *S. mansoni* specific T lymphocytes. Groups of five rats were compared in these experiments.

Preparation of the 26 kD antigen. Schistosomulum homogenate (5 mg) was fractionated on 13% polyacrylamide slab gel using the discontinuous buffer of Laemmli (1970). The stained band corresponding precisely to the 26 kD molecules was eluted according to Mendel-Hartvig (1982). The samples were reanalysed to control the purity of the 26 kD antigen.

Analysis by flow cytometry. The surface phenotype of the cells was controlled by flow cytometry with the use of monoclonal antibodies against T and B cell subsets: W3/13 (pan T lymphocytes) and OX12 (B cells) (Seralab, UK). Briefly, the cells after incubation with the monoclonal antibodies were labelled with fluorescein-conjugated antibodies (sheep anti-mouse IgG, Cappel Lab., Cochranville, PA, USA). The population of fluorescein-labelled cells was quantified by an automated biological cell analysis and sorting system (50-H Cytofluorograph Ortho Instrument, Westwood, MA).

RESULTS

Proliferative response of SRP-A primed T lymphocytes

In the presence of stage specific antigens or lectins. In order to analyse the cross-reactivity of SRP-A primed T lymphocytes towards various stage *S. mansoni* specific antigens, T lymphocytes were prepared after 7 days from the spleen or mesenteric lymph nodes of Fischer rats immunized with SRP-A, and assayed in proliferation assays *in vitro*. Two sources of antigen presenting cells (APC) were tested to improve the culture conditions *in vitro* of the SRP-A T cells. Whilst no significant

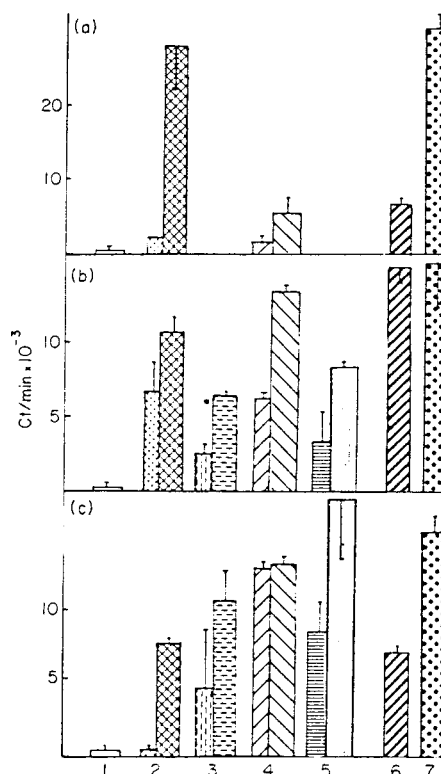


Fig 1. Antigen or lectin proliferative response of T lymphocytes recovered from Fischer rats immunized with SRP-A. A and B represent respectively the parathymic, and mesenteric lymph node cells and C the splenic cells. 1, controls; 2, 3, 4, and 5 represent stimulation of the cells with schistosomulum, cercariae, adult worm and soluble egg antigens, respectively; 5 µg/ml (left bar) and 50 µg/ml (right bar). 6 and 7, stimulation by PHA (5 µg/ml) and Con A (5 µg/ml).

response was observed with irradiated syngeneic spleen cells, irradiated syngeneic thymic cells could support the proliferation of SRP-A T cells. The SRP-A specific cells exhibited a proliferative response to each stage specific antigen tested (Fig. 1) depending on the dose, whereas no significant proliferation to unrelated antigens was observed (data not shown). A high responsiveness to the T mitogens, PHA and Con A, was observed, particularly with the mesenteric cells. No significant proliferation of the normal spleen cells was observed with 100 µg adult antigen (1083 ct/min ± 479), schistosomulum antigen (937 ct/min ± 462), or SEA (464 ct/min ± 184).

Passive transfer of immunity with T cells from donor rats immunized with SRP-A. The effect *in vivo* of these T cells was assessed by injecting them into syngeneic rats 1 day before infection. The splenic T cells (15 × 10⁶/rat), which were simultaneously controlled for their proliferative response to the schistosomulum antigen, conferred a substantial protection varying between 49 and 66% (Table 1) against *S. mansoni* infection comparing with the rats receiving 15 × 10⁶ spleen cells from normal syngeneic donors. Surface phenotype analysis of the SRP-A specific T cells revealed that the majority of the lymphocytes expressed W₃/13⁺ (80 to 90%) surface antigens after purification and about 10 to 20% the phenotype OX12. The injection of a smaller number of cells (8 × 10⁶/rat) failed to induce the same protective effect. The sera from passively transferred rats were tested for total IgE and IgG levels on day 20 after infection (Table 2). The total IgE levels were significantly enhanced in the groups of rats receiving the SRP-A specific T cells, whereas no significant difference between each group was noticed for the IgG response. As a control, a group of Fischer rats were transferred with SRP-A specific T cells (15 × 10⁶ rat), without infecting the rats, to investigate if the

S. mansoni schistosomulum specific T lymphocytes

303

Table 1. Passive transfer of T cells recovered from rats immunized with SRP-A into Fischer rats: liver perfusion

| Experiment no | Injected T cells | No of worms recovered \pm s.d. | % immunity | P value |
|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|---------|
| 1 | None | 45.4 \pm 15.1 | — | |
| | Normal spleen cells | 40.8 \pm 12.4 | 10.1 | > 0.05 |
| | Spleen cells from anti-SRP-A rats | 15.4 \pm 3.2 | 66.0 | < 0.05 |
| 2 | None | 127.1 \pm 19.8 | — | |
| | Normal spleen cells | 116.8 \pm 21.6 | 8.1 | > 0.05 |
| | Spleen cells from anti-SRP-A rats | 64.2 \pm 15.2 | 49.4 | < 0.05 |

Table 2. Total IgE and IgG levels of the sera from rats passively transferred with SRP-A specific T cells, and infected by *S. mansoni*

| Infected rats transferred with | IgE (ng/ml) | IgG (μ g/ml) |
|--|---------------|-------------------|
| No cells | 28 \pm 42 | 247 \pm 32 |
| Normal T cells | 20 \pm 28 | 285 \pm 47 |
| SRP-A specific splenic cells | 371 \pm 186 | 253 \pm 38 |
| Control: normal rats transferred with SRP-A specific splenic cells | | |
| day 0 | 20 | — |
| 21 | < 5 | — |

Table 3. Specificity of the proliferative response of 26 kD sensitized cells

| Antigens added to the T cell cultures | Proliferative responsiveness of splenic 26 kD specific lymphoblasts (ct./min) | | | |
|---------------------------------------|---|-----------------|------------------|------------------------------|
| | Cells just recovered from the Fischer rats | | | Cells after 3 months culture |
| | 25 μ g | 50 μ g | 100 μ g | 50 μ g |
| Schistosomulum antigen | 1670 \pm 1524 | 3013 \pm 1707 | 5030 \pm 1829 | 5171 \pm 456 |
| SEA | 1678 \pm 814 | 3694 \pm 2449 | 11932 \pm 6094 | 3940 \pm 433 |
| Cercariae | 1580 \pm 102 | 2216 \pm 1161 | 3580 \pm 132 | 4625 \pm 707 |
| Adult antigen | 3513 \pm 1930 | 3368 \pm 1767 | 9977 \pm 2536 | 4577 \pm 578 |
| <i>D. viteae</i> | | 495 \pm 160 | 1884 \pm 840 | |
| <i>F. hepatica</i> | | 638 \pm 198 | 1260 \pm 960 | |
| <i>E. granulosus</i> | | 583 \pm 332 | 2603 \pm 2440 | |
| <i>A. fumigatus</i> | | 505 \pm 208 | 316 \pm 274 | |
| Controls | | | | |
| APC alone | | 384 \pm 303 | | 148 \pm 73 |
| APC + antigen | | 192 \pm 25 | | — |
| Cells + APC | | 211 \pm 32 | | 172 \pm 10 |

OX 12⁺ cells were involved in the immune protective response. The levels of IgE and IgG in the transferred animals were as low as the levels in the naive rats.

Generation of 26 kD specific T clones. Assuming from the previous results that SRP-A specific T cell could induce a protective immune response into infected rats, enhancing specifically the IgE response, T cells were prepared from the spleens of Fischer rats immunized with the 26 kD antigen, which is the target of the protective IgE.

Two groups of rats were injected simultaneously using the same protocol, one group to recover the cells, the other to control the monospecificity of the anti-26 kD sera (Table 3).

An important cross-reactivity of the T cells was noticed with stage specific antigens particularly with SEA as observed with the SRP-A specific T cells. A proliferative response to unrelated antigens could be seen with the highest concentrations of antigens (100 µg protein).

The T cells were maintained in culture for 3 months to derive T cell clones specific for the 26 kD antigen and to appreciate the regulation of the IgE immune response by these clones. The 3 month-old T cells were controlled for the proliferative response to the stage specific schistosome antigens (Table 3).

Functional analysis of the 26 kD specific T cell clones. Among the 64 clones derived, eight clones were selected for functional analysis, according to their capacity to proliferate with schistosomulum antigens. The antigen-stimulated T cell supernatants were tested for IL-2 or MAF productions (Table 4). About 27% of the clones (all the 64 clones have been tested in this case) produced IL-2. The supernatants (diluted to 1:4) from the clones No 6, 11, 21 and 34 induced a high significant cytotoxicity towards the larvae. The two clones No 6 and 11 interestingly produced both IL-2 and MAF, the other six clones (21, 34, 64, 66, 67) either IL-2 or MAF.

Modulation of the IgE production by 26 kD specific T cell lines and clones. The ability of the 26 kD specific T cells to provide a helper function for IgE production was examined *in vitro* by culturing anti-SRP-A cells with 26 kD specific T cells. In the presence of T cells the ability of the SRP-A specific B cells to produce IgE was significantly enhanced, particularly with schistosomulum antigen in the culture (Fig. 2), whereas the B cells alone released spontaneously a very weak amount of IgE with or without antigen. These results suggested that the 26 kD specific T cell lines could enhance IgE production *in vitro*. T cell clones have been derived from these cells, and the corresponding supernatants were examined for their ability to induce IgE production.

The PMA-stimulated supernatants of T cell clones were tested for their effect *in vitro* on the IgE synthesis by the B48-14 hybrid cell clone, which produces an anti-*S. mansoni* specific cytotoxic monoclonal IgE antibody.

Table 4. Functional analysis of 26 kD specific T cell clones after antigenic stimulation: IL-2, MAF production and modulation of the IgE synthesis of the B hybrid B48-14 cell line

| Cell clone supernatant | IL-2 activity | MAF activity % of cytotoxicity | IgE (ng/ml) | Ratio |
|------------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|------------|
| Control | Medium | 906 ± 329 | Medium | 1770 ± 417 |
| | Positive | 19754 ± 2444 | Normal rat serum | |
| | | | Infected rat serum | |
| | | | 26 kD specific T cell line | |
| 6 | 2985 ± 152 | 75.7 ± 4.3 | 2239 ± 29 | 1.26 |
| 11 | 4309 ± 258 | 71.9 ± 13.3 | 1118 ± 222 | 0.63 |
| 21 | 1028 ± 210 | 70.7 ± 12.2 | | |
| 34 | 840 ± 208 | 80.4 ± 12.9 | 3821 ± 102 | 2.15 |
| 62 | 510 ± 420 | 40.2 ± 12.1 | 2401 ± 48 | 1.35 |
| 64 | 12274 ± 2100 | 28.5 ± 20.4 | | |
| 66 | 14284 ± 1980 | 17.0 ± 10.3 | | |
| 67 | 11369 ± 2110 | 23.2 ± 11.7 | | |

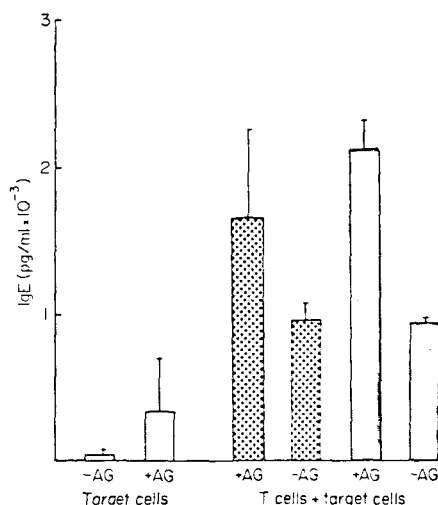


Fig. 2. IgE production by SRP-A specific cells in presence of 26 kD specific T cell lines with or without schistosomulum antigen (AG). Large dots, 5×10^3 T cells; small dots, 10^4 cells.

Among the sixty-four 26 kD-specific clones which were tested (Table 4), four clones induced a clear reproducible effect on the IgE synthesis. Three clones (6, 34, 62) have a helper activity (ratios varying between 1.2 to 2.15) whereas one clone (11) has an inhibitory effect on the IgE synthesis (0.63).

DISCUSSION

We have previously shown, both in the monkey and in the rat models, that anti-schistosomula released product antigens (SRP-A) antibodies can effectively kill the larvae of *Schistosoma mansoni* in the presence of effector cells such as platelets, macrophages and eosinophils (Auriault *et al.*, 1985). This report is the first of a series of studies concerning the induction of the immune response during schistosomiasis with a particular emphasis on the cellular aspects insisting on the role of T cells specific for the SRP-A antigens.

SRP-A and 26 kD sensitized T cell lines have been derived and tested for their ability to produce *in vitro* IgE helper function, IL-2 and MAF, or a protective effect *in vivo*. The cells have been maintained in culture *in vitro* by stimulation with schistosomulum homogenate. The feeble quantity of material after purification or the presence of SDS and acrylamide even after extensive dialysis did not allow restimulation of the cells with the purified antigen which was used to immunize the rats. Interestingly, the SRP-A T cells were stimulated with antigenic preparation from different *S. mansoni* life cycle forms, indicating the existence of common or cross-reactive determinants recognized by the T lymphocytes. Previous studies concerning the anti-SRP-A IgE response did not demonstrate such clear cross-reactivity for the B epitopes (Damonville *et al.*, 1986a). It thus appears necessary in a vaccinating strategy to determine the structures on the 26 kD molecule which are recognized by the protective antibodies (B epitopes) and the structures presented by the macrophages to the T lymphocytes (T epitopes) which are responsible for its immunogenicity.

The SRP-A specific T cell lines were shown to confer a significant protection to rats infected with *S. mansoni*. The sera of the rats passively transferred with SRP-A specific T cells displayed an important increase of the total IgE level whereas the total IgG level was not modified. These results corroborate those obtained by passive transfer experiments of anti-SRP-A IgE and confirmed that the antigens secreted by the larvae are of particular interest.

The 26 kD sensitized T cell lines co-cultured with spleen cells of SRP-A immunized rats significantly enhance IgE production *in vitro*. This suggests that among the antigens present in SRP-

A, the 26 kD molecule alone is able to induce T cells regulating the reagenic isotype production. Nevertheless the use of unpurified splenic anti-SRP-A cells as a source of B cells did not allow us to determine if these T cell factors acted directly on the B cells or through other cell populations. Hassner & Saxon (1983) showed that the secretion of IgE by a human myeloma cell line (U 266) could be regulated by T cell factors. Therefore, the rat B48-14 hybrid cell was used to test the IgE synthesis regulation by the supernatants of 26 kD antigen T cell clones and hybrids. After antigenic stimulation of these cells, some of them liberated lymphokine(s) able to modulate significantly the IgE synthesis produced by the B48-14 B hybridoma cell *in vitro*. The increase of the IgE synthesis observed was 25 to 155% with the clone supernatants. One clone (clone No 11) was also found exhibiting a suppressive effect on IgE synthesis (36% inhibition). Further experiments will be necessary to characterize the factors produced and to determine if their activities are isotype specific for the IgE response.

Stimulated T cells have been shown to excrete a number of soluble factors, able to regulate the functions of effector cells, as macrophages, platelets or eosinophils. Besides their helper activity for the cytotoxic antibody production it may be thus assumed that the 26 kD specific T cell lines and clones exert a stimulating activity on the effector cells. To test this hypothesis, the cell supernatants were assessed for the MAF production with a direct effect on the schistosomucidal activity of the activated macrophages. Moreover, it should be speculated that the 26 kD specific T cell clones may not only produce MAF but also lymphokines able to modulate the eosinophil or the platelet effector functions in the ADCC mechanisms, depending on the IgE antibodies.

On the basis of the results presented here, T lymphocytes specific for the antigens released by the schistosomula or for the 26 kD antigen alone have been shown to regulate the IgE response, and presumably the effector cell functions. Studies are being undertaken in our laboratories to determine the relationship between these antigens and the efficiency of the immunity directed against schistosomes.

The authors would like to thank F. Detoef, A. Delanoye, C. Vendeville, J. L. Neyrinck for their technical assistance. The secretarial assistance of C. Colson and M. F. Massard was appreciated. We are indebted to Dr J. P. Kusnierz for the flow cytometry analysis. This work was supported by the INSERM U267, the CNRS 624 and by the WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (Grant No 830196).

REFERENCES

- AURIAULT, C., DAMONVILLE, M., VERWAERDE, C., PIERCE, R.J., JOSEPH, M., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1984) Rat IgE directed against schistosomula released products (SRP-A) is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur. J. Immunol.* **14**, 132.
- AURIAULT, C., DAMONVILLE, M., JOSEPH, M., CAPRON, M., BILLAUT, P. & CAPRON, A. (1985) Defined antigens secreted by the larvae of schistosomes protect against schistosomiasis: induction of cytotoxic antibodies in the rat and the monkey. *Eur. J. Immunol.* **15**, 1168.
- BOUT, D.T., JOSEPH, M., DAVID, JR & CAPRON, A.R. (1981) *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages. *J. Immunol.* **121**, 1.
- BUTTERWORTH, A.E., VADAS, M.A., MARTZ, E. & SHER, A. (1979) Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni* but fail to induce damage. *J. Immunol.* **117**, 59.
- CAPRON, M., CAPRON, A., ABDEL-HAFEZ, S.K., BAZIN, H. & JOSEPH, M. (1983) Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody dependent mechanisms of resistance. *J. Immunol.* **131**, 1475.
- DAMONVILLE, M., AURIAULT, C., THOREL, T., VERWAERDE, C., PIERCE, A., STRECKER, G. & CAPRON, A. (1986a) Induction of a protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum released products: immunochemical properties of the target antigens. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **79**, 320.
- DAMONVILLE, M., AURIAULT, C., VERWAERDE, C., DELANOYE, A., PIERCE, R. & CAPRON, A. (1986b) Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released product antigens (SRP-A): role of IgE antibodies. *Clin. exp. Immunol.* **65**, 244.
- GILLIS, S. & WATSON, J. (1981) Interleukin 2 dependent cell culture of cytolytic T cell lines. *Immunology Rev.* **54**, 81.
- HASSNER, A. & SAXON, A. (1983) Inhibition of ongoing myeloma IgE synthesis *in vitro* by activated human T cells. *J. Immunol.* **130**, 156.
- JULIUS, M.N., SIMPSON, E. & HERZENBERG, L.A. (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3**, 645.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins

S. mansoni schistosomulum specific T lymphocytes

307

- during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- LAMMIE, P.J., LINETTE, G.P. & PHILLIPS, S.D.M. (1985) Characterization of *Schistosoma mansoni* antigen-reactive T cell clones that form granuloma *in vitro*. *J. Immunol.* **134**, 4170.
- MENDEL-HARTVIG, I. (1982) A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate containing polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **121**, 215.
- NEYRINCK, J.L., DESSAINT, J.P., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1986) Measurement of picogram quantities of rat IgE from *in vitro* culture supernatant of B lymphocytes in experimental helminth infection. *Int. Archs applied Immunol.* **80**, 342.
- PESTEL, J., DISSOUS, C., DESSAINT, J.P., LOUIS, J., ENGERS, H. & CAPRON, A. (1985) Specific *Schistosoma mansoni* rat T cell clones. I. Generation and functional analysis *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, **134**, 4132.
- PIERCE, R.J., VERWAERDE, C., DAMONNEVILLE, M., LEPRESLE, L. & CAPRON, A. (1983) Allergens of *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of the IgE response in human and experimental infections towards characterized allergens from adult worm products. *Int. Archs applied Immunol.* **72**, 219.
- PHILLIPS, S.M., BENTLEY, A., LINETTE, G., DOUGHTY, B. & CAPRON, M. (1983) The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance. *J. Immunol.* **131**, 1466.
- RAMALHO-PINTO, G., GAZINELLI, G., HOWELLS RE MOTA SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A. & PELLEGRINO, J. (1974) *Schistosoma mansoni* defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **36**, 360.
- VERWAERDE, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R.J., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C. & CAPRON, A. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **138**, (in press).

PROTECTIVE EFFECTS OF ANTI-ANTIIDIOTYPIC IgE ANTIBODIES OBTAINED FROM AN IgE MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR A 26-KILODALTON *Schistosoma mansoni* ANTIGEN¹

F. VELGE-ROUSSEL,² C. VERWAERDE, J. M. GRZYCH, A. AURIAULT, AND A. CAPRON

From the Centre d'immunologie et de biologie parasitaire, unité mixte, INSERM 167, CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, B. P. 245, 59019 Lille Cedex, France

A rat IgE mAb specific for larval Ag (26 kDa, 56 kDa) has been shown to protect rats against *Schistosoma mansoni* infection. Immunizations of Lou/M rats performed with this IgE (Ab1) induced the production of antiidiotypic antibodies (Ab2). Moreover, after this Ab2 production, anti-antiidiotypic antibodies (Ab3) were revealed. The screening of Ab3 isotypes showed the presence of IgG Ab3 and more interestingly of IgE Ab3, i.e., the same isotype as Ab1. These IgE and IgG antibodies recognized predominantly the 26-kDa Ag and were cytotoxic for schistosomula in the presence of platelets for IgE Ab3 and eosinophils for IgG Ab3. Both IgE and IgG Ab3 conferred by passive transfer protective immunity to infected rats (up to 50%). Thus the immunization with an IgE mAb led in part to the production of Ab3 of the same isotype ~~xxx~~ Ab1.

In conclusion, these results suggest that the isotype selection of the antibodies of the third generation (Ab3) might be influenced by the Ab1. The respective role of the idiotope and isotype of Ab1 in isotype regulation is discussed.

The reality of the Idiotype network theory, elaborated by Jerne in 1974 (1) is now admitted by numerous investigators. Its experimental implication in autoimmune diseases and in several pathologies has been well documented. Since the simple notion of antibody considered as a foreign Ag, multiple definitions were added to the network theory. Different types of anti-Id³ antibodies (2, 3) have been defined, such as α , β , and ϵ antibodies classified by their physical relationship with the Ag-binding site. The diversity of the various anti-Id antibodies ~~xxx~~ supports the hypothesis of a complex network. One of the most interesting features of the anti-Id antibodies was their ability to mimic the stereospecificity and functionality of the original Ag (4). This concept was well illustrated by the work of Reilly and Root (5) with glucagon and insulin receptors as models. The essential notion of an internal image of the Ag borne by the anti-Id anti-

bodies is the basis for using these as potential surrogate Ag. The capacity of anti-Id antibodies to induce the production of protective antibodies and cellular immunity was clearly demonstrated in reovirus and streptococcus infections in mice (6).

The efficiency of anti-Id antibody was also demonstrated in experimental parasitic infections, notably in African trypanosomiasis (7), and more recently in schistosomiasis (8). In the latter case, an anti-Id mAb (Ab2) produced against a rat monoclonal IgG2a (Ab1), specific for a glycoprotein of 38 kDa was shown to induce anti-Id antibodies (Ab3) which were directed against the same 38-kDa Ag and possessed the same cytotoxic properties as the Ab1. These results indicated that Ab3 of IgG isotype can express the same functional activity as the Ab1, and could represent an approach for the determination of Idotope involvement in protective immunity.

In rat schistosomiasis, as well as anaphylactic IgG subclass antibodies (9), IgE antibodies have been shown to be cytotoxic against the larval stage of the parasite. In the presence of eosinophils (10), macrophages (11), and platelets (12). Moreover, a strong cytotoxic and protective IgE response was induced by the injection of SRP-A into rats (13); the anti-SRP-A IgE response was directed toward only three Ag of 56, 26, and 22 kDa. The 26-kDa larval Ag recognized by the IgE of 35-day infected rat sera is of particular interest. Indeed, it can be considered as the major target of the protective IgE response during schistosomiasis, by inducing Th cell activation through their specific receptor (14). An IgE mAb (B48-14), specific for the 26-kDa Ag, has been reported by Verwaerde et al. (15). This IgE mAb displayed the same immunologic properties as an anti-SRP-A IgE antibody, i.e., it was cytotoxic in the presence of inflammatory effector cells, and highly protective in vivo as demonstrated by its passive transfer to *Schistosoma mansoni* infected rats (up to a 50% reduction in worm burden).

The aim of the present work was to define in rat experimental schistosomiasis the role of the Ab2 and Ab3 elicited by the injection of B48-14 IgE mAb to syngeneic rats with a particular emphasis on isotypic selection and consequently the effector role of the Ab3.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and Ag. A Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* was maintained in *Blomphalaria glabrata* snails as invertebrate hosts and golden hamsters as vertebrate definitive hosts. For biochemical analysis schistosomula of *S. mansoni* were prepared according to the method of Ramalho-Pinto et al. (16) and referred to as mechanically prepared schistosomula. For the cytotoxicity assays, schistosomula were prepared according to the skin penetration tech-

Received for publication August 31, 1988.

Accepted for publication December 29, 1988.

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

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

³ Abbreviations used in this paper: anti-Id, antiidiotypic; Ab1, Ab2, and Ab3, first, second, and third generation antibodies of antiidiotypic antibody; SRP-A, schistosomulum released product Ag.

IgE ANTI-Id ANTIBODIES PROTECT AGAINST *S. mansoni* SCHISTOSOMIASIS

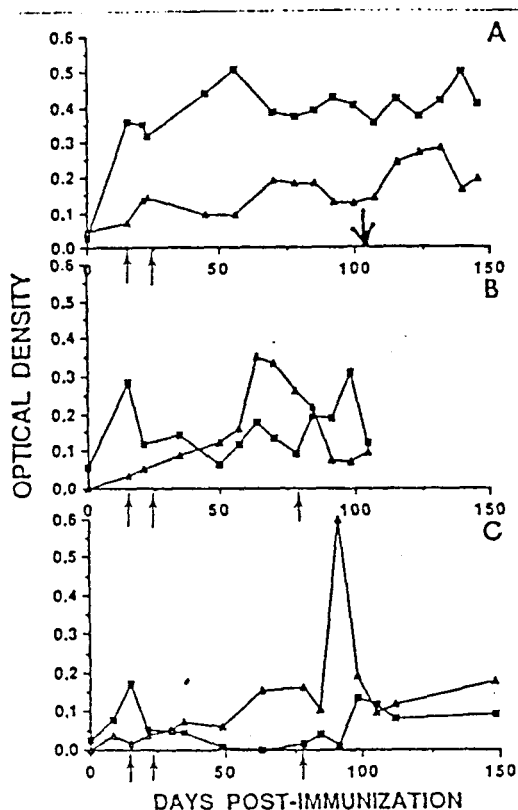


Figure 1. Kinetics of appearance of anti-Id (Ab2) (■) and anti-anti-Id (Ab3) (Δ) antibodies. Three different immunization protocols were used: (A) injection of aggregated purified B48-14 IgE, (B) injection of aggregated cells of the B48-14 clone, and (C) injection of soluble Ag B48-14 IgE. Dates of boost injections are arrowed. The amount of antibodies was determined by dot-blot immunoassay against B48-14 culture supernatant or against schistosomulum Ag in the case of Ab3. Values represented the mean of five rats per group.

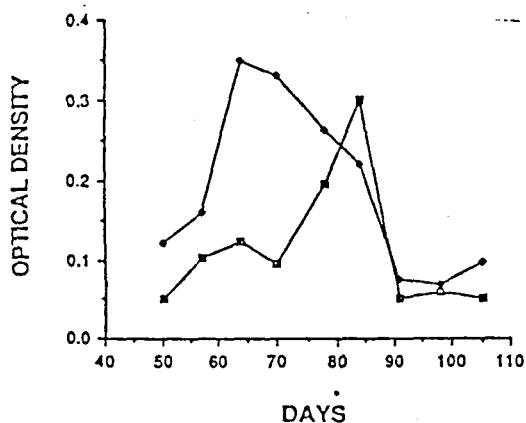


Figure 2. IgE and IgG Ab3 response of one rat immunized with aggregated cells of the B48-14 clone (Fig. 1B). The serum was analyzed against schistosomulum Ag by dot-blot immunoassay. The reaction was revealed by peroxidase-labeled anti-rat IgG for IgG isotype (♦) and by a rabbit anti rat IgE serum followed by a peroxidase labeled anti rabbit serum for the IgE isotype (□). Optical density values were determined by using a light reflecting densitometer.

IgE Ab3 production appeared approximately 3 wk after the maximal production of IgG Ab3. The level of anti-schistosomulum IgE present in Ab3-containing sera produced by using the protocol of Figure 1B was nearly the same as a 42-day *S. mansoni*-infected rat serum (0.45 OD U against 0.55 OD U).

Ag specificity of Ab3. As has been previously reported (15), the monoclonal IgE B48-14 recognized two mole-

cules of 26 and 56 kDa by immunoprecipitation of radiolabeled SRP-A (Fig. 3A). The sera produced according to the three protocols, selected at the peak of the production of Ab3, were tested by immunoprecipitation with labeled SRP-A followed by a SDS-PAGE or after Western blotting of schistosomulum Ag. As shown in Figure 3, B and C IgG Ab3 immunoprecipitated a molecule of 56 kDa labeled SRP-A. In contrast, a 26-kDa Ag was revealed after Western blotting. This can be explained by the difference of Ag preparation in the different techniques. By dot-blot immunoassay by using the individual electrophoreted molecules, we revealed that IgE Ab3 recognize the 26-kDa Ag (Table I). Nevertheless the recognition of the same Ag by Ab1 and Ab3 antibodies strongly suggested the existence of "natural" type β Ab3 (2) in the sera tested.

IgE-dependent cytotoxicity. The fact that the IgE monoclonal B48-14 Ab1 was shown to be highly cytotoxic in an antibody-dependent cellular cytotoxicity platelet dependent system (15) led us to investigate the cytotoxicity of IgE Ab3 in presence of platelets as effector cells. The Ab3 IgE containing sera used in this experiment were those produced by the Figure 1B protocol. The level of anti-schistosomulum IgE Ab3 detected by dot-immunoassay seemed to be parallel to the platelet-dependent cytotoxic activity of the sera (Figs. 2 and 4). The maximum level of cytotoxicity was observed at day 84, corresponding closely to the highest level of IgE measured by dot-blot. IgE dependence of the cytotoxicity was verified by depleting the sera by heating at 56°C or passage on anti-IgE immunoadsorbent. The capacity of Ab2 containing sera to block Ab1 and Ab3 platelet-dependent cytotoxicity was tested. To avoid residual cytotoxic effects due to the possible presence of IgE Ab3 present in Ab2 sera, all sera used for the inhibition test were heated for 3 h at 56°C before use. Moreover, the Ab1 B48-14 culture supernatant was diluted in order to obtain near 60% of cytotoxicity and so being inhibitable. In these conditions, an inhibitory effect of Ab2 sera on Ab1- and Ab3-dependent platelet cytotoxicity was observed (Figs. 5 and 6). In the case of Ab1 B48-14, Ab2 containing sera inhibited 65% \pm 0.3% SD, whereas 76% \pm 1.3% SD inhibition was obtained with Ab2 in IgE Ab3-dependent cytotoxicity. These results support the view that Ab1 and Ab3 recognize the same epitope on the 26-kDa schistosomulum Ag. On the other hand, sera taken at the peak of production of IgE Ab3 (second experiment, day 78) were tested in IgE eosinophil-dependent cytotoxicity assay. We obtained a cytotoxic level up to 45 to 50%, similar to the cytotoxicity of the monoclonal Ab1 B48-14 (data not shown).

IgG-dependent cytotoxicity. The cytotoxic activity of the IgG Ab3 pooled sera used for passive transfer was tested in eosinophil-dependent assay. Sera were shown to exhibit a killing activity against *S. mansoni* larvae up to 75% (Fig. 7) whereas a normal rat serum gave only 3% killing and an infected rat serum 87%. Controls were made by depleting sera in IgG on protein A-Sepharose.

Protective effect of Ab3. The in vivo effect of anti-anti-Id antibodies was investigated by passive transfer of Ab3-containing antisera to infected rats. Pooled sera taken at day 155 (third experiment) for IgE containing sera and day 64 (second experiment) for IgG Ab3-containing sera were chosen in order to have sera with one major isotype

IgE ANTI-Id ANTIBODIES PROTECT AGAINST *S. mansoni* SCHISTOSOMIASIS

nique described by Clegg and Smithers (17) and referred to as skin-transformed schistosomula. Schistosomulum Ag were prepared by sonication of mechanically prepared schistosomulum larvae at 25 W by using a Braconic homogenizer (Gulley, Rochester) followed by a 3500 x g centrifugation for 20 min. The supernatant was recovered and stored at -20°C. SRP-A was made by incubating mechanically prepared schistosomula for 18 h at 37°C in HBSS in a 5% CO₂ atmosphere as previously described (13). The 26-kDa and 56-kDa Ag were prepared by electroelution of polyacrylamide strips (18) after separation of schistosomulum Ag (5 mg) on 13% SDS-polyacrylamide gels.

IgE mAb. Rat IgE antibody (B48-14) (15) was obtained by fusion of non-Ig-secreting IR 983F myeloma cells with spleen cells of LOU/M rats immunized with adult worm homogenate. Ascitic fluids were produced by i.p. injection of 10⁶ cells per LOU/M rat and puncture was carried out 2 wk later. The fluid was centrifuged at 4°C at 1000 x g for 20 min and the supernatant stored at -70°C until used. For immunization experiments, the monoclonal IgE was purified by ammonium sulfate precipitation (40 to 60%) of ascitic fluid followed by dialysis first against distilled water, secondly against PBS. This IgE preparation was used for the immunizations. The same protocol was performed for the purification of an unrelated monoclonal IgE used as control. For the cytotoxicity assays, the crude culture supernatant of B48-14 clone was used. For the dot-blot immunoassay, B48-14 cells in exponential phase were cultured in RPMI 2% FCS (GIBCO, France) for 2 days, then the supernatants were collected and concentrated in collodion bags to 60 µg/ml (Sartorius, GmbH, FRG).

Immunization procedures. Ab1 Immunogens were prepared according to three methods: 1) ammonium sulfate precipitated B48-14 IgE (1 mg/ml) copolymerized with human IgG (5 mg/ml, ratio 1/1) with 25% glutaraldehyde according to the method of Avrameas and Ternynck (19) and referred to as aggregated B48-14 Ag. 2) B48-14 cells fixed with 25% glutaraldehyde (20 µl for 10⁷ cells), and 3) ammonium sulfate precipitated B48-14 IgE (1 mg/ml) in PBS. All the preparations were injected s.c. The first injection was carried out in CFA (GIBCO, France), the second in IFA (GIBCO), and the others in PBS every 2 wk. In the first experiment LOU/M male rats (3 mo, 5 rats per experiment) were injected with aggregated B48-14 Ag (200 µg/rat). In the second experiment, injections were performed with 10⁷ B48-14 fixed cells per rat, and in the third experiment ammonium sulfate purified B48-14 IgE in PBS was injected (200 µg/rat). The rats were bled every 2 wk after the first injection. Sera were recovered by centrifugation and stored at -20°C.

Dot blot immunoassay. Nitrocellulose sheets (Schleicher & Schuell, BA45, FRG) were cut into 4 x 30 mm strips. For the screening of Ab2, 1 µl of monoclonal IgE (60 µg/ml) was dotted on to the strips. Nitrocellulose paper was saturated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.3 M NaCl, and 0.15% casein (Hammarstein, Erck, FRG) for 1 h and then incubated with various serum samples (diluted 1/50 in the same buffer) for 3 h. After three washes, an anti-rat peroxidase labeled IgG (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) (1/200 diluted) was added on the strips for 1 h. The colored reaction was developed with 600 µg/ml horseradish peroxidase color reagent (Bio-Rad, Richmond, CA), 20% cold methanol, 0.06% H₂O₂ 30% in PBS. The intensity of the spots was measured with a light reflecting densitometer (Gretag, Regensburg, Switzerland) and expressed in OD units. In comparison with a control made with an unrelated monoclonal IgE and normal rat serum. The screening of Ab3 was carried out by using 1 µl of schistosomulum Ag (10 mg/ml) dotted on nitrocellulose, and the different isotypes of Ab3 were revealed, for IgG by anti-rat peroxidase-labeled serum (Miles Laboratories), for IgE by a double sandwich technique with a rabbit anti-rat IgE (dilution 1/2000) (MIAB, Uppsala, Sweden) revealed by an anti-rabbit peroxidase-labeled serum 1/200 diluted (Pasteur, France).

Immunoprecipitation and western blotting analysis. For immunoprecipitation, SRP-A was radiolabeled by using the iodogen method (20) and incubated with various rat antisera. The immune complexes were adsorbed on protein A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and analyzed on 13% SDS-PAGE (21). Western blotting was carried out on schistosomulum Ag separated on 13% SDS-PAGE, then transferred to a nitrocellulose sheet (22). Briefly, Ag blotted papers were incubated with 10 µg/ml of sera and fixed antibodies were revealed with anti-rat peroxidase-labeled serum (Miles Laboratories) as previously described (23).

Platelet-dependent cytotoxicity. Platelets were prepared according to the method of Joseph et al. (12) from Fisher rat blood collected with calciparine. About 8 x 10⁹ platelets were dispensed in flat-bottomed microplates (Corning Glass Work, Corning, NY) with 20 µl of normal or immunized rat sera and 50 schistosomula (200 µl final). The B48-14 clone supernatant was used in the presence of 10% normal rat serum. In some experiments, the inhibition of platelet cytotoxicity was carried out. In this case, platelets were preincubated

with heated sera thought to be inhibitory 30 min before the addition of effector sera (Ab3RS) or culture supernatants (Ab1). Dead schistosomula were enumerated by microscopical examination after 24-h incubation in 5% CO₂ at 37°C. Controls were made by depleting the sera on IgE either by heating at 56°C or on an anti-IgE immunoadsorbent.

Eosinophil-dependent cytotoxicity. For IgG-dependent cytotoxicity tests (9), experiments were carried out in sterile plastic microplates with flat-bottomed wells. Heated Ab3 sera were preincubated with 50 schistosomula per well in a final dilution of 1/30 at 37°C. After 18-h incubation, rat peritoneal cells were added in 200 µl final volume in MEM/FCS/synthetic peptide (glycyl-histidyl-lysine). For IgE-dependent cytotoxicity (10), schistosomula, eosinophils, and sera were incubated 24 h in microtiter plates. Controls were made by heating sera 3 h at 56°C or after depletion of IgE on an anti-rat IgE immunoadsorbent. In both kinds of experiments, the percentage of cytotoxicity was measured as described above.

Passive transfer experiments. One milliliter of pooled sera of immunized rats was injected i.p. into male LOU/M rats (3 mo old), followed by infection with 1000 *S. mansoni* cercariae per rat. Parasite worm burden was evaluated 21 days after infection by liver perfusion according to the protocol of Smithers and Terry (24). Control animals were injected i.p. with 0.15 M NaCl (1 ml/rat) or normal rat serum (1 ml/rat). The percentage of protection was calculated by the formula $(2X) \left(\frac{a-b}{a} \right) \cdot 100$, where *a* is the number of worms recovered from rats injected with saline buffer or normal rat serum and *b* the number of worms recovered from rats injected with IgG or IgE anti-Id Ab (Ab3).

RESULTS

Production of Ab2 and Ab3. The production of anti-Id and anti-anti-Id antibodies to the monoclonal IgE B48-14 was investigated according to three immunization protocols (see *Materials and Methods*). Classical tests of competition usually made for Ab2 detection was unusable in this case due to the low affinity of B48-14 for the schistosomulum Ag. It should be noted that the method of screening (dot-blot immunoassay) in the case of polyclonal sera detected all types of Ab2 (Ab2 α and Ab2 β and Ab2-Ab3 complexes), but allowed the detection of only uncomplexed Ab3 β . Because different Ag were used for the detection of Ab2 and Ab3, intrinsic values of OD cannot be compared but can be used to follow the kinetics of the Ab2/Ab3 ratio.

The kinetics of appearance of Ab2 and Ab3 antibodies in the sera of rats immunized by all three methods presented a different profile as shown in Figure 1. As already reported in the literature, a high level of variability between individual responses was observed. For one immunization protocol curves of individual responses were parallel but could be delayed. Only the profile (Fig. 1A), corresponding to the injection of aggregated antibodies, showed a high level of production of Ab2, whereas the injection of aggregated cells (Fig. 1B) seems in our model to be the best protocol for producing a high level of Ab3. The inhibition experiment of Ab3 containing sera by Ab2 sera was assessed by dot-immunoassay. Up to 33% \pm 0.21% SD of inhibition was obtained and confirmed the presence of Ab2 β in the sera. For all the following experiments, we used sera from experiment of Figure 1B for in vitro assays. For biochemical experiments, all the sera from the three protocols were employed.

Analysis of the isotypes of the Ab3 produced. Both IgE and IgG specific for schistosomulum Ag were evidenced in the Ab3-containing sera by using specific antisera (Fig. 2). IgE antibodies detected in this assay could not be the injected B48-14 because the IgE half-life in serum is a few days (26). Moreover, the injected B48-14 was aggregated by glutaraldehyde, except in the third experiment. Whatever the immunization procedure used,

004

Figure 3. Ag recognition by monoclonal IgE B48-14 and anti-anti-Id antibodies (Ab3). (A) Immunoprecipitation of iodine-labeled SRP-A by monoclonal IgE B48-14 and a polyclonal anti-26-kDa rat serum (α 26RS), controls with a normal rat serum (NRS), infected rat serum (IRS) and unrelated monoclonal IgE (α IgE). (B) Immunoprecipitation of iodine-labeled SRP-A by anti-anti-Id antibodies (Ab3, RS 1 and 2). Sera were chosen at the peak of production of Ab3 antibodies, i.e., for Ab2, RS 1 experiment 1, day 64, and for Ab3, RS 2, experiment 2, day 120. (C) Western blotting of Ab3 against schistosomulum Ag.

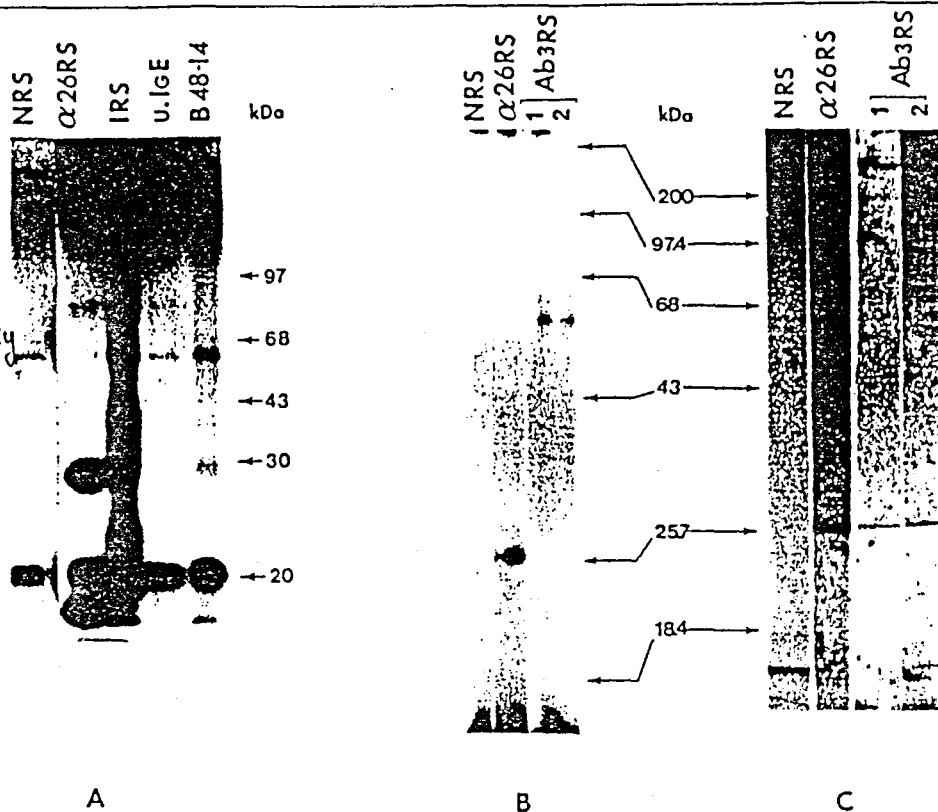


TABLE I
Analysis of the IgE Ab3 response^a

| Days of Immunization | OD U | |
|----------------------|--------|--------|
| | 26 kDa | 56 kDa |
| 92 | 0.67 | 0.09 |
| 100 | 0.59 | 0.09 |
| 132 | 0.55 | 0.09 |
| 148 | 0.78 | 0.15 |
| 154 | 0.83 | 0.12 |
| 160 | 0.85 | 0.13 |
| Controls | | |
| NRS ^b | 0.18 | 0.07 |
| IRS | 0.23 | 0.03 |

^a IgE Ab3 specific for schistosomulum 26-kDa and 56-kDa Ag were measured by dot-blot immunoassay: on individual electroeluted molecules with the same sera as described in Figure 3.

^b Controls were performed with normal (NRS) and infected rat sera (IRS) (day 42 infected rat sera) against 26-kDa and 56-kDa Ag.

represented. These sera were injected into rats which were simultaneously infected with *S. mansoni* cercariae. The worm burden was determined 3 wk later. Results presented in Figure 8 indicate that the passive transfer of both IgE and IgG Ab3-containing sera conferred a significant level of immunity (40 to 50%), similar to that observed with the Ab1 B48-14 (50%) (15).

DISCUSSION

Several studies have shown the possibility of inducing protective immunity with anti-Id antibodies in experimental parasitic diseases (7), particularly in the *S. mansoni* rat schistosomiasis model (8). In this case, the IgE response is considered as an important parameter of the immunity and was notably studied through the anti-SRP-A IgE response. Indeed the immunity conferred by SRP-A Ag is in part supported by specific IgE antibodies especially directed toward a major Ag of 26 kDa. An IgE (B48-14) mAb specific for this Ag has been produced (15),

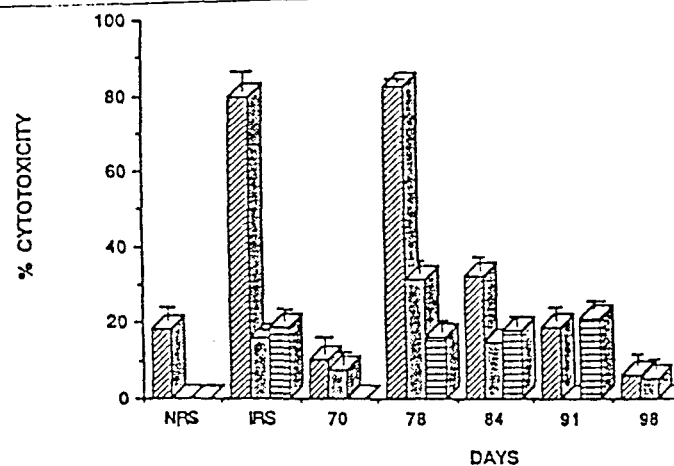


Figure 4. Effect of Ab3 on the platelet-dependent cytotoxicity for *S. mansoni* schistosomula. This assay was performed with the same serum used in kinetic of appearance of IgE and IgG Ab3 (Fig. 3). The percentage of cytotoxicity was measured after 24 h of incubation. Controls were the same sera heated 3 h at 56°C (□) or depleted in IgE after passage through an anti-IgE immunoabsorbent (■). The percentage of cytotoxicity represents the mean of three experiments \pm SD.

reproducing the activity of an anti-SRP-A serum in that it was cytotoxic in vitro in the presence of inflammatory cells and protective after its passive transfer to infected rats. We were thus interested in determining the involvement of the idiotypic network in the case of a protective IgE response.

Immunization with the monoclonal IgE B48-14 induced the production of Ab2 and, later on, of naturally induced Ab3. The dot-blot immunoassay used to screen the Ab3 antibodies, detected all the different types of anti-Id (α , β , ϵ , and σ) (2). In contrast, the Ab3 screening was based on the detection of the anti-parasitic antibody activity

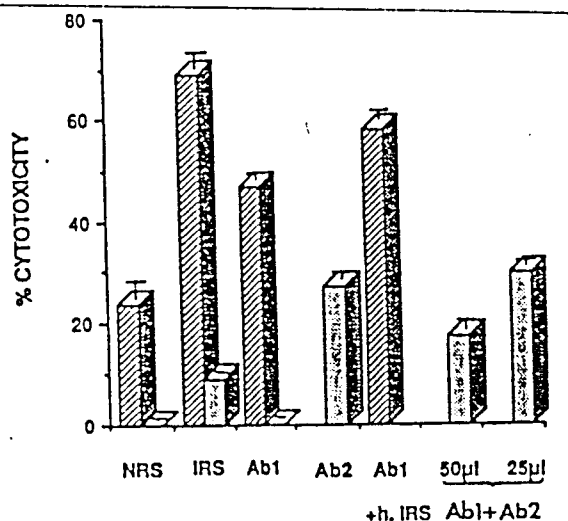


Figure 5. Inhibitory effect of Ab2 antibodies on Ab1 (B48-14) platelet-dependent cytotoxicity. Controls were done with heated (□) or unheated (▨) normal rat serum (NRS), infected rat serum (IRS). Platelets were preincubated with 25 or 50 µl of heated Ab2 serum (Ab1 + Ab2) (□) or heated-infected serum (h. IRS) (▨) as control. The B48-14 culture supernatant (Ab1) was then added together with schistosomulum larvae. The percentage of cytotoxicity was measured after a 24-h incubation period. The values indicate the mean of duplicate ± SD.

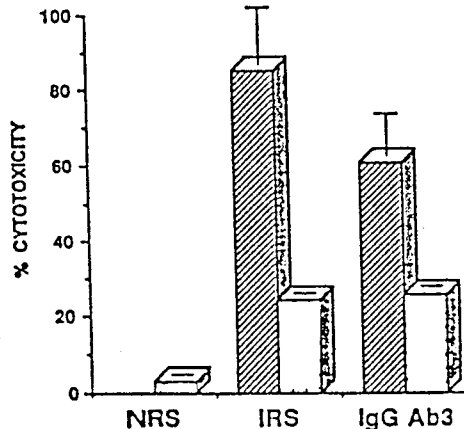


Figure 7. Eosinophil-dependent cytotoxicity of IgG Ab3 antibodies. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 h of incubation with effector cells (LOU rat peritoneal cells enriched in eosinophils). Sera tested in this experiment were the pool of IgG Ab3 (▨) also used for passive transfer experiment. Controls were performed by IgG depletion of the sera on Protein A-sepharose (□).

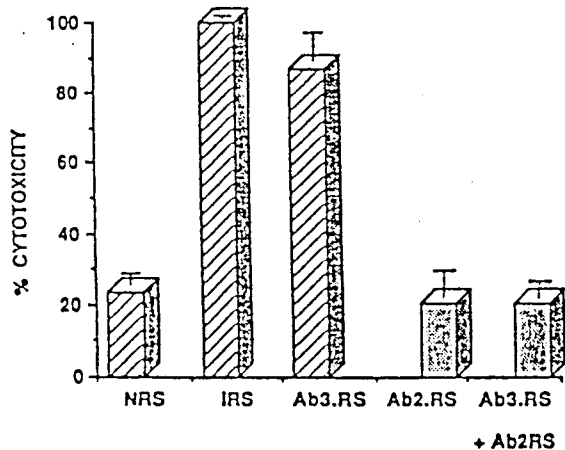


Figure 6. Antagonistic effect of Ab2 on the platelet-dependent cytotoxicity of Ab3 antibodies. Platelets were preincubated with heated Ab2 (Ab2.RS) then incubated with Ab3 containing sera (Ab3.RS). The percentage of cytotoxicity was measured after 24 h (mean of four replicate experiments).

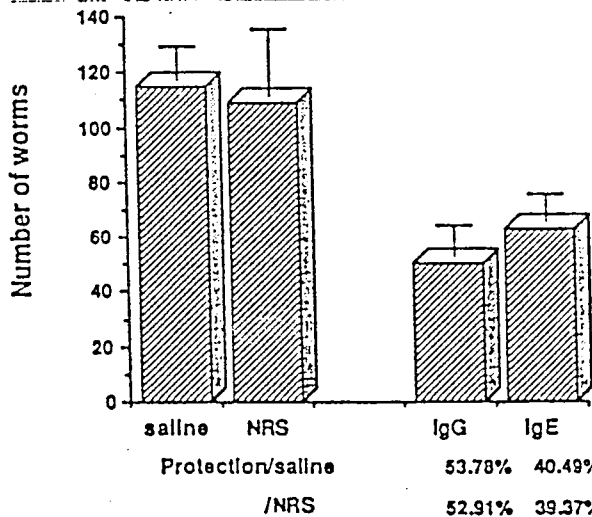


Figure 8. In vivo protective role of anti-anti-Id antibodies Ab3 of IgE and IgG isotypes. Passive transfer was made by i.p. injection of a pool of sera taken at the peak of production of IgE or IgG Ab3. Saline buffer or normal rat serum (NRS) was performed as control. Each group of five rats was immediately infected with 1000 *S. mansoni* cercariae. The worm burden recovered was determined 21 days after liver perfusion.

i.e., the Ab3β antibodies. The kinetic profiles varied according to the three protocols of immunization used, suggesting that the presentation of Ab1 may play a role in the amplitude, the quality of the immune response, and in the ratio of Ab2/Ab3. The polyclonal "natural" Ab3 exhibited functional activities close to that observed with the Ab1. The nature of the anti-Id response was studied by screening the isotypes of the different anti-anti-Id antibodies (Ab3). The most interesting was the production together with IgG Ab3, of Ab3 of the IgE isotype. Both IgG and IgE Ab3 predominantly recognized the 26-kDa Ag and were also cytotoxic in the presence of eosinophils (65% of cytotoxic activity) or platelets (up to 60 to 80%). This Ab3-induced cytotoxicity, like that of Ab1, could be inhibited by the IgG Ab2 (Fig. 6). These results obtained in vitro were supported in vivo by the protection conferred by the passive transfer of both IgG and IgE Ab3 peaks.

Our results confirm the possibility of inducing protec-

tive immunity against schistosomiasis via the idiotypic cascade as already shown by Grzych et al. (8). The production of IgE Ab3 exhibiting effector functions has never been described to our knowledge. The induction of Ab3 IgE by a monoclonal IgE raises the question of isotype regulation during the idiotypic cascade. The fact that through this cascade biologic activity was preserved, emphasized the importance both of the epitope recognized by Ab1 and the Ab1 isotype. It is worth noting that the appearance of IgG and IgE Ab3 seems to be independent of the protocols used, suggesting that isotypic selection during the idiotypic cascade did not necessarily depend on the mode of initial antigen presentation. Isotypic selection of antibodies during the idiotypic cascade could be determined either by the idiopeptide itself or by the isotype of Ab1. Several studies (27-29) show that a given epitope does not itself induce a preferential association between a Vh region and a given H chain, but that the macromolecular form of the Ag is responsible for isotype selection (30). In contrast, in our experiments one epitope

IgE ANTI-Id ANTIBODIES PROTECT AGAINST *S. mansoni* SCHISTOSOMIASIS

borne by the 26-kDa Ag and an Idiotope of Ab2 both induced IgE antibodies of the same specificity and effector function. Does this mean that in this case the structure of the epitope could directly influence the isotype selection? The 26-kDa molecule was shown to induce T cells regulating the secretion of IgE antibodies by B cells (14). We could speculate that the Idiotope of Ab2 (Internal Image of the epitope) has the same properties and could prime T cells directly involved in the production of IgE. Even if the Idiotope of the B48-14 could direct antibody production toward an IgE response, does the Fc ϵ portion of Ab1 influence isotype regulation toward an IgE production? Indeed, the increase of the seric IgE level could enhance the expression of T cell factors with affinity for IgE such as IgE-binding factors that selectively regulate the IgE response (31). One of the IgE-binding factors potentiates the IgE response (IgE-potentiating factor) and its expression is under the control of IgE itself (32). Immunizations with B48-14 Fab'2 could answer this question and the experiment is in progress.

Our experimental data strongly suggest that, in spite of the low theoretical quantity of Ab3 β (3), we observed an efficient and preserved biologic activity. Along the idiotypic cascade, the dilution of antibodies of the same clone during the clonal expression might be balanced by the selection of anti-Id antibodies with a high level of biologic activity. The idiotypic network should restrict the antibody response toward epitope/paratope couples of high affinity and immunologic efficiency (3X).

One practical consequence of our results concerns the establishment of a vaccine strategy against schistosomiasis. The 26-kDa molecule and more particularly the epitope recognized by the B48-14 mAb appeared to have immunoprophylactic potentiality and could be used in association with another molecule (33) described as a potential vaccine. The work reported here could be a good illustration of the idiotypic network displaying a "long term memory" (34). On the other hand, this work passes beyond the domain of parasitic diseases. As the IgE antibodies are also involved in allergic diseases, the persistence of IgE Ab3 suggest a possible role of the idiotypic network in some pathologic aspects of allergies.

The mechanism of isotype selection remains unknown; however, the maintenance of isotope (i.e., specificity) and isotype (i.e., function) of the antibodies during the Id \rightarrow Id \rightarrow Id \rightarrow cascade outlines the importance of this process in the amplification and the persistence of an immune response.

Acknowledgments. Authors wish to thank Christine Mazingue and Raymond J. Pierce for kind and helpful discussions.

REFERENCES

- Jerne, N. K. 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Inst. Pasteur* 125C:373.
- Bona, C., and T. Moran. 1985. Idiotypic vaccines. *Ann. Inst. Pasteur* 136C:3.
- Jerne, N. K. 1984. Idiotypic network and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.* 79:5.
- Lindeman, J. 1979. Homobodies do they exist? *Ann. Inst. Pasteur* 130C:311.
- Reilly, T. M., and R. T. Root. 1986. Production of idiotypic and anti-idiotypic antibodies in BALB/c mice response to immunization with glucagon, vasopressin or insulin: supporting evidence for the network concept. *J. Immunol.* 137:2.
- Sharpe, A. H., G. N. Gaulton, K. K. MacDade, B. N. Fields, and M. J. Greene. 1984. Syngenic monoclonal anti-idiotypic can induce cellular immunity to reovirus. *J. Exp. Med.* 160:1195.
- Sachs, D. L., K. Esser, and A. Sher. 1982. Immunization of mice against african trypanomiasis using anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 155:1108.
- Grzych, J. M., M. Capron, P. H. Lambert, C. Dissous, S. Torres, and A. Capron. 1986. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 316:6023.
- 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. *Nature* 8:12.
- Capron, M., H. Bazin, G. Torpier, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophil. *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 *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature* 253:475.
- Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Vlens. 1983. A new function for platelet IgE-dependent killing of schistosomules. *Nature* 3003:5920.
- Auriault, C., M. Damonville, C. Verwaerde, R. J. Pierce, M. Joseph, M. Capron, and A. Capron. 1984. Rat IgE directed against schistosomula released product is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14:132.
- Damonville, M., F. Velge, C. Verwaerde, J. Pestel, C. Auriault, and A. Capron. 1987. Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula released products (SRP-A). *Clon. Exp. Immunol.* 69:299.
- Verwaerde, C., M. Joseph, M. Capron, R. J. Pierce, M. Damonville, F. Velge, C. Auriault, and A. Capron. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138:4441.
- 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.
- 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.
- Mendel-Hartvig, I. 1982. A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate containing polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.* 121:215.
- Avrameas, S., and T. Ternynck. 1969. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochimistry* 6:53.
- Markwell, M. A. K., and C. P. Fo. 1978. Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eukaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycosuril. *Biochemistry* 17:4807.
- Dissous, C., C. Dissous, and A. Capron. 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3:215.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4350.
- Pierce, R. J., and A. Capron. 1987. Western blot: Principles et methodologies. In *Techniques biochimiques d'analyse des antigenes de membranes*. D. Charron, ed. INSERM, Paris, p. 43.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory host with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55:965.
- 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.
- Bazin, H., and R. Pauwels. 1982. IgE and IgG2a isotypes in the rat. *Prog. Allergy* 32:52.
- Teale, J. M., and K. M. Abraham. 1987. The regulation of antibody class expression. *Immunol. Today* 8:4.
- Teale, J. M., and N. R. Klinman. 1984. Control of the production of different class of antibody. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Raven Press, New York, p. 519.
- Couteller, J-P., and J. Van Snick. 1985. Isotypically restricted activation of B lymphocytes by lactic-dehydrogenase virus. *Eur. J. Immunol.* 15:250.
- Fish, S., and T. Manser. 1987. Influence of the macromolecular form of a B cell epitope on the expression of antibody variable and constant region structure. *J. Exp. Med.* 166:711.
- Ishizaka, K. 1984. Regulation of IgE synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2:159.
- Katz, D. H. 1985. The IgE antibody system is coordinately regulated by Fc ϵ R epsilon-positive lymphoid cells and IgE-selective soluble factors. *Int. Arch. Allergy, Appl. Immunol.* 77:21.
- Bailoul, J. M., Pierce, R. J., Grzych, J. M., and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kDa antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem.* 17:105.
- Bona, C. A., and B. Pernis. 1984. Idiotypic networks. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Raven Press, New York, p. 577.

BIBLIOGRAPHIE

- ARTHUR R.P., D. MASON (1956) "T cell that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogenic stimulation." *J.Exp. Med.* 163:74.
- AURIAULT, C., J.M. BALLOUL, R.J. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, P. SONDERMEIJER, A. CAPRON (1987) "Helper T cells induced by purified 28 kDa antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection." *Inf. Immun.* 55(5):1163.
- AURIAULT, C., M. DAMONNEVILLE, C. VERWAERDE, R.J. PIERCE, M. JOSEPH, M. CAPRON, A. CAPRON (1984) "Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*." *Eur.J.Immunol.* 14:132-138.
- BALLOUL, J.M., P. SONDERMEYER, P., D. DUYU, M. CAPRON, J.M. GRZYCH, R.J. PIERCE, D. CARVALLO, J.P. LECOCQ, A. CAPRON (1987) "Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes." *Nature*, 326:149-153.
- BONA, C., H. HEBER-KATZ, W.E. PAUL (1981) Idiotypic-antiidiotypic regulation. I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti(antiId) antibodies and to activation of silent clones. *J.Exp.Med.* 153:951-967.
- BONA, C.A., C.Y. KANG, H. KOHLER, M. MONESTIER (1986) "Epibody : the image of the network created by a single antibody." *Immunol. Rev.* 90:115.
- BONA, C.A., H. KOHLER (1984) "Anti-idiotypic antibodies and internal images in monoclonal and anti-idiotypic antibodies : probes for receptor structures and functions" (J.C. Venter, G.M. Fasler and J. Lindstrom, Eds.), Alan Liss Inc., New-York.p 123.
- BOUT, D., M. JOSEPH, J.R. DAVID, A. CAPRON (1981) "*In vitro* killing of *S.mansoni* schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages." *J. Immunol.* 121:1-5.

- BRUCK, C., M.S. CO, M. SLAOUI, G.N. GAULTON, T. SMITH, B.N. FIELDS, J.I. MULLING, M.I. GREENE (1986) Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal α II and its comparison to the sequence of the internal antigen. *Proc.Natl.Sci.Acad.USA* 83:6578.
- BUTTERWORTH, A. E., R. F. STURROCK, C. HOUBA, P. M. REES (1975) "Eosinophils as mediators of antibody dependent damage to schistomula." *Nature* 256:727
- CAPRON, A., J. P. DESSAINT, M. CAPRON, M. JOSEPH, J. PESTEL. (1980) "Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:849
- CAPRON, M., A. CAPRON (1986) "Rats, mice and men models for immune effector mechanisms against schistosomiasis." *Parasitology Today* 2:69-75.
- CAPRON, M., A. CAPRON, G. TORPIER, H. BAZIN, D. BOUT, M. JOSEPH. (1978) "Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells." *Eur. J. Immunol.* 8:127
- CAPRON, M., A. CAPRON, J.P. DESSAINT, G. TORPIER, S.G.O. JOHANSSON, L. PRIN (1981) "Fc receptor for IgE on human and rat eosinophils." *J.Immunol.* 126:2087.
- CAPRON, M., A. CAPRON, S.K. HAFEZ, H. BAZIN, M. JOSEPH, S.M. PHILLIPS (1983) "Immunological response of athymic rats to *Schistosoma mansoni*." *J. Immunol.* 131:1475.
- CAPRON, M., C. LEPREVOST, G. TORPIER, A. CAPRON. (1989) "The second receptor for IgE in eosinophil effector function." *Progr. Allergy.(sous presse)*
- CAPRON, M., D. CAMUS, Y. CARLIER, J. F. M. FIGUEIREDO, A. PRATA, A. CAPRON (1977) "immunological studies in human schistosomiasis. II. Cytotoxic antibodies for *schistosoma mansoni* schistosomule. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 26:248

- CAPRON, M., J. A. NOGUEIRA, J. P. PAPIN, A. CAPRON. (1984) "Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils." *J. Immunol.* 132:462
- CLEGG, J. A., S. R. SMITHERS. (1972) "The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *S. mansoni* during cultivation *in vitro*." *Int. J. Parasitol.* 2:79
- CLEVELAND, W.L., N.H. WASSERMAN, R. SARANGARAJAN, A.S. PENN, B.F. ENLANGER (1983) "Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by normally functioning auto-idiotypic mechanism." *Nature (London)* 305:56.
- COFFMANN, R.L., J. OHARA, M.W. BOND, J. CARTY, A. ZLOTNICK, W.E. PAUL (1986) "B cell stimulatory factor 1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells." *J.Immunol.* 136:4538.
- DAMONNEVILLE, M., C. AURIAULT, C. VERWAERDE, A. DELANOYE, R.J. PIERCE, A. CAPRON (1986) "Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A) : role of IgE antibodies. *Clin. exp. Immunol.* 65:244-252.
- DAMONNEVILLE, M., F. VELGE, C. VERWAERDE, J. PESTEL, C. AURIAULT, CAPRON A. (1987) "Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula released products (SRP-A)." *Clin. exp. Immunol.* 69:279-307.
- DAMONNEVILLE, M., J. WIETZERBIN, V. PANCRE, M. JOSEPH, A. DELANOYE, A. CAPRON, C. AURIAULT (1988) "Recombinant tumor necrosis factor mediate platelets cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae." *J.Immunol.* 140:3962-3965.
- DE BAETS, M.H., J. VERSCHUREN, VAN BREDA, P.J.L. VRIESMAN (1987) "Experimental autoimmune myasthenia gravis." *Monogr.Allergy* 25:1.

- DESSAINT, J.P., M. CAPRON, D. BOUT, A. CAPRON (1975) "Quantitative determination of specific IgE levels in patients with schistosomiasis (*S.mansoni* or *S.haematobium*)." *Clin.exp.Immunol.* 20:47.
- DISSOUS, C., PRATA, A., A. CAPRON. (1984) "Human antibody response to *schistosoma mansoni* defined by protective monoclonal antibodies." *J. Infect. Dis.* 149:227
- DOUGTHY, B., S. M. PHILLIPS. (1982) "Delayed hypersensitivity granuloma formation and modulation around *schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. II. Regulatory T cell subsets." *J. Immunol.* 128:37
- EICHMAN, K. (1975a) "Idiotype suppression. II. Amplification of a suppressor T cell with antiidiotypic activity." *Eur.J.Immunol.* 5:511.
- EICHMAN, K. (1978) "Expression and function of idiotypes on lymphocytes." *Adv. Immunol.* 26:195-254.
- EICHMAN, K., K. RAJEWSKY (1975b) Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody". *Eur.J.Immunol.* 5:661.
- ERTL, H.C., M.A. SKINNER, R.W. JINBERG (1986) "Induction of anti-viral immunity by an antiidiotypic antibody directed as a Sendaï virus specific T helper cell clone." *Int.Rev.Immunol.* 1:41.
- ERTL, H.C.J., R.W. FINBERG (1984) "Sendaï virus specific T cell clones : induction of cytotoxic T cells by an anti-idiotypic antibody directed against a helper T cell clone". *PNAS* 81:2830.
- FINBERG, R.W., H.ERTL (1987) "The use of anti-idiotypic antibodies as vaccines against infections agents." *Clin. Rev. in Immunol.* 7(4):269.
- FINKELMAN, F.D., I.M. KATONA, J.F. URBAN, I. HOLMES, J. OHARA, A.S. TUNG, J. SAMPLE, W.E. PAUL (1988) IL4 is required to generate and sustain *in vivo* IgE responses. *J.Immunol.* 141:2335.
- FRANCOTTE, M., J. URBAIN (1984) "Induction of anti-tobacco mosaic virus antibodies in mice by rabbit anti-idiotypic antibodies." *J.Exp.Med.* 160:1485.

- GAZZINELLI R.T., M.J. MORATO, R.M.B. NUNES, J.R. CANCADO, Z.BRENER, G. GAZZINELLI (1988) "Idiotype stimulation of T lymphocytes from *Trypanosoma cruzi*-infected patients." *J.Immunol.* 140:3167.
- GEORGE, A.J.T., S.G. FOLKARD, T.J. HAMBLIN, F.K. STEVENSON (1988) "Idiotypic vaccination as a treatment for a B cell lymphoma." *J. Immunol.* 141:2168-2174.
- GLEICH, G.J., C.R. ADOLPHSON (1986) "The eosinophil leukocyte : structure and function." *Adv. Immunol.* 39:177.
- GRZYCH, J. M., M. CAPRON, H. BAZIN, A. CAPRON. (1982) "*in vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies." *J. Immunol.* 129:2739
- GRZYCH, J.M., M. CAPRON, P.H. LAMBERT, C. DISSOUS, S. TORRES, A.CAPRON (1987) "An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis." *Nature (London)* 316:74-76.
- HERLYN, D., ?? KOPROWSKI (1987) "Anti-idiotypic immunization of cancer patients : Modulation of the immune response." *Proc.Natl.Sci.Acad.USA* 84:8635-8051.
- HUFF, T.F., J. YODOI, T. VEDE, K. ISHIZAKA (1984) "Presence of an antigenic determinant common to rat IgE-potentiating factor IgE suppressing factor and Fcε receptors on T and B lymphocytes." *J.Immunol.* 132:406-412.
- IKUTA, K., M. TAKAMI, C. VON KIM (1987) "Human lymphocyte Fc receptor for IgE : sequence homology of its cloned cDNA with animal lectine." *Proc.Natl.Sci.Acad.USA* 84:819.
- ISHIZAKA, K. (1984) "Regulation of IgE synthesis." *Ann.Rev.Immunol.* 2:159.
- ISHIZAKA, K. (1985) "Isotype-specific T cell factory for the regulation of the IgE response." *Critical Reviews in Immunol.* 5:289.
- ISHIZAKA, K. (1988) "IgE binding factors and regulation of the IgE antibody response." *Ann. Rev. Immunol.* 6:513-34.

- ITO, K., T. SWADA, S. SATO (1972) "Increased serum IgE levels individuals infected with *Schistosoma japonicum*, *Wuchereria bancrofti* or Hookworm and the changes by treatment in schistosomiasis." *Jap.J.Exp.Med.* 42:115.
- IWATA, M., M. AKASAKI, K. ISHIZAKA (1984) "Modulation of the biological activation of IgE-binding factors. VI. The activation of phospholipase by glycosylation-enhancing factor." *J.Immunol.* 133:1505.
- JARDIEU, P., T. UEDE, K. ISHIZAKA (1985) "Presence of an antigen specific T cell subset that forms IgE-suppressive factor and IgG-suppressive factor on antigenic stimulation." *J. Immunol.* 135:922-929.
- JARETT, E., H. BAZIN (1974) "Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection." *Nature* 251:613.
- JERNE, N.K. (1974) "Toward a network theory of the immune system." *Ann. Immunol.*, 125C:373.
- JERNE, N.K., J. ROLAND, P.A. CAZENAVE (1982) "Recurrent idiotypes and internal images." *Eur.Mol.Biol.J.* 1:243-247.
- JONES, S., Y. CHEN, P. ISAKON, J. LAYTON, E. PURY, C. WORD, KRAMMER P.H., TUCKER P., E.S. VITETA (1983) "Effect of T cell-derived lymphokines containing B cell differentiation factor(s) for IgG (BCDF τ) on gamma-specific mRNA in murine B cells." *J.Immunol.* 131:3049.
- JOSEPH, M., A. CAPRON, A. E. BUTTERWORTH, R. F. STURROCK, V. HOUBA. (1978) "Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro* : induction by immune complexes containing IgE and *schistosoma mansoni* antigens." *Clin. Exp. Immunol.* 33:48
- JOSEPH, M., A. CAPRON, J.C. AMEISEN, M. CAPRON, H. VORNG, V.PANCRE, J.P. KUSNIERZ, C. AURIAULT (1986) "The receptor for IgE on blood platelets." *Eur.J.Immunol.* 16(3):306-312.

- JOSEPH, M., C. AURIAULT, A. CAPRON, H. VORNG, P. VIENS. (1983) "A new function for platelets in IgE-dependent killing of schistosome." *Nature* 303:810
- JOURDANE, J., A. THERON, C. COMBES (1980) "Demonstration of several sporocysts generation as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*." *Acta Tropica* 37:177.
- JULIUS, M.H., E. SIMPSON, L.A. HERZENBERG (1973) "A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes." *Eur.J.Immunol.* 3:643-649.
- KATZ, D.H., T. HAMAOKA, B. BENACERRAF (1973) "Induction of immunological tolerance in bone marrow-deprived lymphocytes of the IgE antibody class." *Proc.Natl.Sci.Acad.USA* 7:2776.
- KAUFMANN, S.H.E., K. EICHMAN, J. MULLER, L.J. WRAZEL. (1985) "Vaccination against the intracellular bacterium *listeria monocytogenes* with a chronotypic antiserum." *J.Immunol.* 134:4123.
- KAYE, J.S., J. PORCELLI, J. TITE, B. JONES, C.A. JANEWAY (1983) "Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinant, unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigens absenting cells in the activation of T cells". *J.Exp.Med.* 158:836.
- KELSOE, G., M. RETH, K. RAJEWSKY (1981) "Control of idiotope expression by monoclonal anti-idiotypic and idiotope-bearing antibody." *Eur. J. Immunol.*, 11:418.
- KENNEDY, R.C., J.W. EICHBERG, R.E. LANFORD, G.R. DRESSMAN (1986) "Antidiotypic antibody vaccine for type B biral hepatitis in chimpanzees." *Science*, 232:220.
- KIM, B.S. (1979) "Mechanisms of idiotype suppression. II. Requirement of specific antigen for B-cell inactivation by anti-idiotypic antibody." *J. Immunol.* 123:2499.

- KISHIMOTO, T. (1982) "IgE class-specific suppressor T cells and regulation of the IgE response." *Progress in Allergy* 32:265-317.
- KISHIMOTO, T., Y. HIRAI, M. SUEMMA, K. KANISKI, Y. YAMAMMAY (1978) Regulation of antibody response in different-immunoglobulin classes. IV. Properties and functions of IgE-class specific suppressor factors released from DNP bacterium-primed T cells. *J. Immunol.*, 121:2106.
- KISHIMOTO, T., Y. HIRAI, M. SUEMURA, Y. YAMAMURA (1976) "Regulation of antibody response in different immunoglobulin classes. I. Selective suppression of anti-DNA IgE antibody response by preimmunization of DNP-coupled mycobacterium." *J.Immunol.* 117:396.
- KOHLER, H., C. BONA (1986) Idiotope vaccines. *Int.Rev.Immunol.* 1:1.
- KUBELLA, C.F., A. RUPPEL, P.H. KRAMMER, D. GEMSA (1981) "Killing of Schistosomula of *S.mansoni* by macrophage induction by T cell clone-derived lymphokines and interferon gamma." *Parasitology* 92:325-336.
- KUNKEL, H.G., M. MAUNIK, R.C. WILLIAMS (1963) "Individual antigenic specificities of isolated antibodies." *Science*, 140:1218-1219.
- LAEMMLI, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680.
- LIDER, O., T. RESHEF, E. BERAUD, A. BEN-NUN, I.R. COHEN (1988) "Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental auto-immune encephalomyelitis." *Science* 239:181.
- LIMA, M.S., G. GAZZINELLI, E. NASCIMENTO, J. CARVALHOPANA, M.A. MONTESANO, D.G. COLLEY (1986) "Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. Evidence for anti-idiotypic T lymphocyte responsiveness." *J.Clin.Invest.* 78:983.

- LIU, F.T., C.A. BOGOWITZ, R.F. BARGATZE, M. BINNECHER, D.H. KATZ (1979)
"Immunological tolerance to allergic protein determinants properties of
tolerance induced in mice treated with conjugates of protein and
synthetic copolymer of D-glutamin acid and D-lysine (D-GL)." *J.
Immunol.*, 123:2456.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL (1951) "Protein
measurement with the folin phenol reagent." *J.Biol. Chem.* 193:265.
- MADDISON, S. E., L. NORMAN, S. J. GEIGER, 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
- MARCELLETTI, J.F., D.H. KATZ (1984) "FcεR+ lymphocytes and regulation of
the IgE antibody system. III. Suppressive factor of allergy (SFA) is
produced during the *in vitro* FcεR expression cascade and displays
corollary physiologic activity *in vivo*." *J.Immunol.* 133:2837-2844.
- MEUER, S.L., J.L. HODGON, R.E. HUSSEY, J.P. PROTENTIS, S.F. SCHLOSSMAN,
E.L. REINHERZ (1983) "Antigen like effects of monoclonal antibodies
directed at receptors on human T cell clones." *J.Exp.Med.* 158:988-
993.
- MOSSMAN, T., H. CHERWINSKI, M. BOND, R. COFFMAN (1986) "Two-types of
murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of
lymphokines activities and secreted proteins." *J.Immunol.* 136:2348.
- MOTA, I., D. WONG (1969) "Homologous and heterologous passive cutaneous
anaphylactic activity of mouse antisera during the course of
immunization." *Life Sc.* 8:813.
- MOZES, E., H. ZINGER (1987) "Characterization and biologic activities of an
anti-idiotypic specific T cell line and its derived clones." *J. Immunol.*
139:3364.

- MÜLLER, C.E., K. RAJEWSKY (1984) "Idiotope regulation by isotype switch variants of two monoclonal anti-idiotypic antibodies." *J.Exp. Med.* 159:759.
- MEEKER, T., J. LOWDER, D.G. MALONEY, R.A. MILLER, K. THIELEMANS, R. WARNKE, R. LEVY (1985) "A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy." *Blood* 63:1349.
- NEYRINCK, J.L., J.P. DESSAINT, C. AURIAULT, A. CAPRON (1986) "Measurement of picogram quantities of rat IgE from *in vitro* culture supernatants of B lymphocytes in experimental helminth infections." *Int. Archs All. appl. Immunol.* 80:342.
- OLLIER, P., J. ROCCA-SERRA, G. SOMME, J. THEZE, M. FOUGEREAU. (1985) "The idiotypic network and the internal image possible regulation of gum line network by paucigen encoded Ab (α IL) antibodies in the GAT system." *EMBO J.* 4:3681.
- ORR, T.S.C., P.A. RILEY, J.E. DOE (1972) "Potentiated reagin response to egg albumin in *Nippostrongylus braziliensis* infected rats. III. Further studies on the time course of the reagin response." *Immunology* 22:211.
- OTTENSEN, E., R.W. POINTDEXTER, R. HUSSAIN (1981) "Detection, quantitation and specificity of anti-parasite IgE antibodies in human schistosomiasis *mansoni*." *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 30:1228.
- LOUDIN, J., M. MICHEL (1963) "Une nouvelle forme d'allotype des globulines τ du sérum de lapin, apparemment lié à la fonction et à la spécificité des anticorps." *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 257:805
- PANCRE, V., M. JOSEPH, A. CAPRON, J. WIETZERBIN, J.P. KUSNIERZ, H.VORNG, C. AURIAULT (1988) "Recombinant human interferon- τ induces increased IgE receptor expression on human platelets." *Eur.J.Immunol.* 18:829.

- PANCRE, V., M. JOSEPH, C. MAZINGUE, J. WIETZERBIN, A. CAPRON, C. AURIAULT (1987) "Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines : role of gamma interferon." *J.Immunol.* 138:4490.
- PEARCE, E.J., S.L. JAMES, S. HIENY, D.E. LANAR, A. SHER (1988) "Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a vaccination with schistosome paramyosin (Sm47), a non-surface parasite antigen." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5678.
- PENE, J., F. ROUSSET, F. BRIENE, I. CHRETIEN, J. WIDEMAN, J.Y.BONNEFOY, J.E. DE VRIES (1988) "Interleukin-5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen." *Eur.J.Immunol.* 18:929-935.
- PEREZ, H., J. A. CLEGG, S. R. SMITHERS. (1974) "Acquired immunity to schistosoma mansoni in the rat : measurement of immunity by lung recovery technique." *Parasitology* 69:349
- PHILLIPS S.M., P.J. PERRIN, D.J. WALKER, N.G. FATHELBAB, G.P.LINETTE, M.A. IDRIS (1988) "The regulation of resistance to *Schistosoma mansoni* by auto anti-idiotypic immunity." *J.Immunol.* 141:1728.
- PRAPUTPITTAYA K., J. IVANYI (1987) "Stimulation by anti-idiotype antibody of murine T cell response to the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*." *Clin. exp. Immunol.* 70:307.
- PRIN, L., M. CAPRON, A.B. TONNEL, O. BLETRY, A. CAPRON (1983) "Heterogeneity of human blood eosinophil : variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origine of hypereosinophilia." *Int.Archs appl. Immunol.* 72:336.
- RAJEWSKY, K., T. TAKEMORI (1983) "Genetics expression and function of idiotypes." *Ann.Rev.Immunol.* 1:569.

- REESE, A.D.M., A. SCOGING, N. DOBSON, K. PRATUTPITTAYA, D.YOUNG, J. IVANY, J. R. LAMB (1987) "T cell activation by anti-idiotypic antibody mechanism of interaction with antigen reactive T cells." *Eur.J.Immunol.* 17:197.
- ROITT, I.M., Y. M. THANAVALA, D. K. MALE, F.C. HAY (1985) "Anti-idiotypes as surrogate antigens : structural considerations." *Immunol. Today* 6:2657.
- ROTH, C., J. ROCCA-SERRA, R. SOMME, M. FOUGEREAU, J. THESE (1985) "The gene repertoire of the GAT immune response : comparison of the VHκ and D region used by anti-GAT antibodies and monoclonal antibodies produced after anti-idiotypic immunization." *Proc.Natl.Acad.Sci* 82:4788.
- ROUSSEAU, R., D. BOUT, H. BAZIN, A. CAPRON.(1980) "homocytotropic antibody responses during murine schistosomiasis. A follow-up study of both total immunoglobulins and *schistosoma mansoni* specific antibodies." *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 62:86
- SACKS, D.L., K. ESSER, 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, A. SHER (1985) "A molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies." *J.Immunol.* 135:4155.
- SADUN, E. H., T. GORE. (1970) "Schistosoma mansoni and schistosoma haematobium homocytotropic reagin-like antibodies in infection of man and experimental animals." *Exp. Parasitol.* 28:435

- SCHEIBER, A.B., P.O. CONRAD, C. ANDRE, B. VRAY, A.D. STROBERG (1980)
"Anti-alprenolol anti-idiotypic antibodies bind to β -adrenergic
receptors and modulates catecholamine sensitive adenylate cyclase."
Proc.Natl.Sci.Acad.USA 77:7384-7389.
- SHARPE, A.G., K. GAULTON, K. Mc DADE, B. FIELD, M. GREENE (1984)
"Syngeneic monoclonal anti-idiotypes can induce cellular immunity to
reovirus." *J.Exp.Med.* 160:1195.
- SHER, A., B.F. HALL, M.A. VADAS (1978) "Acquisition of murine major
histocompatible complex gene products by schistosomula of
Schistosoma mansoni." *J. Exp. Med.* 146:567.
- SHER, A., S. R. SMITHERS, C. D. MC KENZIE. (1975) "Passive transfer of
acquired resistance to *schistosoma mansoni* in laboratory mice."
Parasitology 70:347
- SILBERSTEIN, D.S., J.R. DAVID (1986) "Tumor necrosis factor enhances
eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae." *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA* 83:1055.
- SMITHERS, S. R., R. J. TERRY. (1965) "acquired resistance to experimental
infections of *schistosoma mansoni* in the albinos rat." *Parasitology*
55:711
- SNAPPER, C.M., F.D. FINHELMAN, W.E. PAUL (1988) "Regulation of IgG1 and
IgE production by interleukin 4." *Immunological Reviews*, n°102.
- STEIN, K.E., T. SODERSTROM (1984) "Neonatal administration of idiotypic or
anti-idiotypic primes for protection against *Escherichia coli* K13
infection in mice." *J. Exp. Med.* 160:1001.
- STEVENSON, F.K., G.T. STEVENSON (1986) "Therapeutic strategies for B cell
malimancies involving idiotypic anti-idiotypic interactions." *Intern.
Rev. Immunol.* 1:303.

- SUEMURA, M., J. YODOI, M. HIRASHIMA, K. ISHIZAKA (1980) "Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanisms of enhancement of IgE response by IgE potentiating factor." *J.Immunol.* 125:148.
- SY, M.S., A.R. BROWN, B. BENACERRAF, M.I. GREENE (1980) "Antigen and receptor driven regulatory mechanism. III. Induction of delayed-type hypersensitivity to azobenzeneanone with anticross-reactive idiotypic antibodies." *J.Exp.Med.* 151:896.
- UEDE, T., F. HIRATA, M. HIRASHIMA, K. ISHIZAKA (1983) "Modulation of the biological activities of IgE-binding factors. Identification of glycosylation inhibiting factor as a fragment of lipomodulin." *J.Immunol.*, 130:878.
- URBAIN, J., C. WUILMART, P.A. CAZENAVE. (1981) "Idiotypic regulation in immune network". *Cont. Topics in Mol. Immunol.* 8:113.
- VAN CLEAVE, V.H., C.W. NAEVE, D.W. METZGER (1988) "Do antibodies recognize aminoacid side chains of protein antigens independently of the carbon backbone ?" *J. Exp. Med.* 167 : 1841.
- VERWAERDE, C., C. AURIAULT, M. DAMONNEVILLE, J.L. NEYRINCK, C.VENDEVILLE, A. CAPRON (1986) "Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis." *Scand.J. Immunol.* 24:509.
- VERWAERDE, C., M. JOSEPH, M. CAPRON, R.J. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, F. VELGE, C. AURIAULT, A. CAPRON (1987) "Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*." *J.Immunol.* 138:4441.
- VON LICHTENBERG, F., L. S. RICHTIE. (1961) "Cellular resistance against schistosomula of *schistosoma mansoni* in *Macacca muletta* monkeys following prolonged infections." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10:859

- WETTERWALD, A., O. TOFFLER, A.L. DE WECK, K. BLASER (1986) "Suppression of established IgE antibody responses with isologous anti-idiotypic antibody in guinea pigs." *Mol. Immunology* 23:347.
- WIKLER, M., J.D. FRANSSEN, C. COLLIGNON, O. LEO, B. MARIANNE, P. VAN DE WALLE, D. DE GROOTE, J. URBAIN (1979) "Idiotypic regulation of the immune system." *J. Exp. Med.* 150:189.
- WILLIAMS, W.V., H.R. GUY, J.A. COHEN, D.B. WEINER, M.I. GREENE (1988) "Molecular and immunology analyses of a functional internal image formed by an anti-receptor antibody." *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 139:659.
- YODOI, J., M. HIROSHIMA, B.R. BLOOM, K. ISHIZAKA (1981) "Formation of IgE-binding factors by rat lymphocytes. I. Induction of IgE-binding factors by poly I:C and interferon." *J. Immunol.* 127:1579.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

| | pages |
|---|-------|
| ABREVIATIONS..... | 7 |
| RESUME | 9 |
| INTRODUCTION..... | 12 |
| GENERALITES..... | 15 |
| LA SCHISTOSOMIASE..... | 16 |
| 1. <u>LE CYCLE</u> | 16 |
| 2. <u>LA REPONSE IMMUNE AU COURS DE LA</u> | |
| <u>SCHISTOSOMIASE EXPERIMENTALE</u> | 18 |
| 2.1. L'immunité concomitante..... | 19 |
| 2.2. La réponse cellulaire et granulomateuse..... | 19 |
| 2.3. La réponse humorale..... | 20 |
| 3. <u>LES MECANISMES EFFECTEURS</u> | 20 |
| 3.1. Cytotoxicité par anticorps léthaux..... | 22 |
| 3.2. Cytotoxicité cellulaire | 22 |
| 3.2.1. Cytotoxicité des macrophages anticorps-dépendante..... | 23 |
| 3.2.2. Cytotoxicité des éosinophiles anticorps-dépendante | 23 |
| 3.2.3. Cytotoxicité des plaquettes dépendante d'anticorps..... | 24 |
| 3.3. Mécanismes dépendants de lymphokines | 25 |
| 3.4. Pertinence in vivo des mécanismes effecteurs | 26 |
| 3.5. Antigènes cibles de l'immunité..... | 27 |
| <u>REGULATION DE LA REPONSE IgE</u> | 30 |
| 1. <u>GENERALITES</u> | 30 |

| | |
|---|----|
| 2. <u>REGULATION SPECIFIQUE D'IgE</u> | 30 |
| 2.1. Facteurs décrits par Ishizaka..... | 31 |
| 2.2. Nature et régulation des IgE-BF..... | 31 |
| 2.3. Modèle décrit par Katz..... | 34 |
| 3. <u>REGULATION ANTIGENE-SPECIFIQUE</u> | 36 |
| 4. <u>REGULATION PAR LES ANTICORPS ANTIIDIOTYPES</u> | 36 |
| 5. <u>REGULATION PAR LES LYMPHOKINES</u> | 37 |
| 6. <u>LA REPONSE IgE AU COURS DE LA SCHISTOSOMIASE</u> | 38 |
| 6.1. Généralités..... | 38 |
| 6.2. Modulation de la réponse IgE par les produits parasitaires | 39 |
| 6.3. Réponse IgE contre les produits d'excrétion du schistosomule (SRP-A)..... | 39 |
| 6.4. Conclusions | 41 |
| LES ANTICORPS ANTIIDIOTYPES..... | 42 |
| 1. <u>STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES</u> | 43 |
| 1.1. les variations isotypiques | 44 |
| 1.2. Les variations allotypiques | 44 |
| 1.3. Les variations idiotypiques | 44 |
| 2. <u>L'IDIOTYPIE</u> | 46 |
| 2.1. Découverte de l'idiotypie..... | 46 |
| 2.1.1. Expérience de Oudin et Michel..... | 46 |
| 2.2. Différentes catégories d'idiotopes..... | 46 |
| 3. <u>LE RESEAU IDIOTYPIQUE</u> | 47 |
| 3.1. La théorie du réseau idiotypique | 47 |
| 3.1.1. Hypothèse de Jerne..... | 47 |
| 3.2. Etude du réseau idiotypique | 48 |
| 3.2.1. Rôle immunorégulateur du réseau idiotypique..... | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.2.1.1. Induction d'une suppression..... | 48 |
| 3.2.1.2. Activation d'une réponse immune | 50 |
| 3.2.2. Réseau idiotypique infini? | 50 |
| 3.2.3. Différents anticorps antiidiotypes | 51 |
| 3.3. Notion d'image interne..... | 53 |
| 3.3.1. Topologie..... | 53 |
| 3.3.2. Etudes structurales..... | 54 |
| 3.4. Applications des anticorps antiidiotypiques..... | 56 |
| 3.4.1. Vaccins | 56 |
| 3.4.2. Thérapie du cancer..... | 58 |
| 3.4.3. Maladies autoimmunes..... | 59 |
| 4. <u>LYMPHOCYTES T ET ANTIIDIOTYPES</u> | 59 |
| 4.1. Circuit suppresseur | 60 |
| 4.2. Cellules T et antiidiotypes..... | 61 |
| 5. <u>CONCLUSION</u> | 63 |
| RESULTATS..... | 64 |
| 1. <u>CINETIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE</u> <u>L'ANTIGENE DE 26 kDa</u> | 67 |
| 2. <u>ANALYSE DE LA SPECIFICITE DE</u> <u>L'ANTICORPS MONOCLONAL B48-14</u> | 68 |
| 3. <u>ETUDE DE LA REPONSE ANTIIDIOTYPE</u> | 68 |
| 3.1. Cinétique de la réponse antiidiotypique..... | 69 |
| 3.1.1. Premier protocole: | 69 |
| 3.1.2. Second protocole: | 71 |
| 3.1.3. Troisième protocole:..... | 72 |
| 3.2. Analyse des isotypes de la réponse Ab3 | 73 |
| 4. <u>ANALYSE BIOCHIMIQUE DES CIBLES ANTIGENIQUES DES Ab3</u> | 75 |

| | |
|--|----|
| 5. <u>ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3 : CYTOTOXICITE IgE DEPENDANTE</u> | |
| 5.1. Cinétique de l'induction de l'activité cytotoxique des plaquettes par les Ab3..... | 76 |
| 5.2. Tests d'inhibition de l'activité cytotoxique IgE dépendante des plaquettes..... | 77 |
| 5.2.1. Inhibition de l'Ab1 par l'Ab2:..... | 78 |
| 5.2.2. Inhibition de l'Ab3 par l'Ab2: | |
| 6. <u>ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3 :</u> <u>CYTOTOXICITE IGG DEPENDANTE</u> | 79 |
| 7. <u>ANALYSE FONCTIONNELLE DES Ab3 :</u> <u>TRANSFERT PASSIF <i>IN VIVO</i></u> | 81 |
| 8. <u>ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE CELLULAIRE T ANTI-Ab2</u> | 82 |
| 8.1. Test de transformation lymphoblastique..... | 82 |
| 8.2. Production de l'IL2 par les cellules T anti-Ab2..... | 83 |
| 9. <u>PHENOTYPAGE</u> | 84 |
| 10. <u>CONCLUSION</u> | 86 |
| | |
| DISCUSSION ET CONCLUSION..... | 87 |
| | |
| MATERIELS ET METHODES | 94 |
| 1. <u>MATERIEL D'ORIGINE PARASITAIRE</u> | 95 |
| 1.1. Le cycle parasitaire..... | 95 |
| 1.2. Préparation de schistosomule..... | 95 |
| 1.3. Préparation du Schistosomula Released Product (SRP)..... | 95 |
| 1.4. Préparation de l'antigène schistosomule..... | 96 |
| 2. <u>CULTURE CELLULAIRE</u> | 96 |
| 2.1. Milieux de culture | 96 |
| 2.2. Culture des cellules..... | 96 |
| 2.3. Préparation des lymphocytes | 97 |

| | |
|--|-----|
| 2.4. Tests de prolifération des lymphoblastes (TTL)..... | 97 |
| 2.5. Dosage de l'Interleukine 2..... | 97 |
| 3. <u>ANIMAUX</u> | 98 |
| 4. <u>ANTIGENES</u> | 98 |
| 4.1 Préparation des anticorps IgE monoclonaux B48-14 et B42-170.. | 98 |
| 4.2. Préparations des antigènes utilisés pour les immunisations..... | 98 |
| 5. <u>METHODES D'ANALYSE BIOCHIMIQUE</u> | 99 |
| 5.1. Gels acrylamide SDS PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis). | 99 |
| 5.2. Electroéluion | 99 |
| 5.3. Immunoblotting..... | 99 |
| 5.4. Immunoprécipitation..... | 100 |
| 5.5. Immuno-empreinte..... | 100 |
| 6. <u>TESTS DE CYTOTOXICITE</u> | 100 |
| 6.1. Test de cytotoxicité des plaquettes dépendante d'anticorps..... | 100 |
| 6.2. Test de cytotoxicité des éosinophiles dépendante d'anticorps... | 101 |
| 7. <u>TRANSFERT PASSIF</u> | 101 |
| ARTICLES..... | 103 |
| BIBLIOGRAPHIE | 121 |

