

66138

N° d' ordre : 699

50376

1991

78

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS**

THESE

Présentée à l' Université de LILLE I pour obtenir

le grade de Docteur

par

Isabelle WOLOWCZUK

*

Détermination et analyse des épitopes T fonctionnels de l' antigène
protecteur Sm28 GST du parasite trématode *Schistosoma mansoni*.



Présentée le: 15 Février 1991

devant la Commission d' Examen

Membres du Jury:

Président: Mr J. MONTREUIL

Rapporteurs: Mme G. SPIK

Mr C. AURIAULT

Examineurs: Mme H. GRAS-MASSE

Mr A. CAPRON

Mr A. E. BUTTERWORTH

*A Christiane et Enneric,
Anne-Françoise et Alain,
Laurent,
Richard,
A ma famille.*

A mes amis,

*pour ce qu'ils sont et parce
que je les aime.*

Ce travail a été réalisé :

au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité mixte INSERM U167-CNRS 624) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Professeur André Capron et dans le groupe du Docteur Claude Auriault, avec la collaboration étroite du groupe dirigé par le Professeur André Tartar.

ainsi qu'à l'Institut de Recherches Médicales de Nairobi (Kenya) dans le groupe du Docteur Kimani Gachuhi, en collaboration avec le Docteur Anthony E. Butterworth, de Cambridge.

Avec le soutien financier du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, de l'Institut Pasteur de Lille et de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Je tiens à remercier très vivement:

Monsieur le Professeur André Capron, qui m'a accueillie, conseillée et suivie avec une grande bienveillance, tout au long des années passées au sein de son laboratoire. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect, de ma gratitude et de mon affection.

Monsieur le Docteur Claude Auriault, pour sa disponibilité de chaque instant et pour les moments d'enthousiasme partagés.

Mesdames les Professeurs Geneviève Spik et Hélène Gras-Masse, Monsieur le Professeur Jean Montreuil et Monsieur le Docteur Anthony Butterworth, qui ont acceptés de juger l'ensemble de ce travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Merci à tous ceux et toutes celles qui m'ont aidée et soutenue au cours de ce travail. Ils sont nombreux, à l'Institut Pasteur de Lille comme à Nairobi, à avoir su "être là", avec gentillesse...

A Anne, Catherine, Christine, Didier, Françoise, Isabelle, Jérôme, Martine, Monique, Nathalie et Véronique, aussi simplement que sincèrement : je vous embrasse très amicalement.

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

.1. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28 antigen.

I. Wolowczuk, C. Auriault, H. Gras- Masse, C. Vendeville, J-M Balloul, A. Tartar, and A. Capron.

J. Immunol. (1989) 142, 1342-1350.

.2. T cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection.

I. Wolowczuk, C. Auriault, H. Gras- Masse, C. Mazingue, C. Vendeville, A. Tartar and A. Capron.

(1990) in press in: *International Archives of Allergy and Applied Immunology*.

.3. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28 GST antigen in rat, mouse and monkey: 1: Partial protection of Fischer rat after active immunization.

I. Wolowczuk, C. Auriault, M. Bossus, D. Boulanger, H. Gras- Masse, C. Mazingue, R. J. Pierce, D. Grezel, G. D. Reid, A. Tartar, and A. Capron.

(1991) accepté pour publication dans: *Journal of Immunology* (issue March 15th 1991).

.4. A study of human and primate lymphocyte responses to synthetic peptides of the Sm28 GST protective antigen of *Schistosoma mansoni*.

I. Wolowczuk, G. Kimani, D. Boulanger, A. E. Butterworth, H. Gras- Masse, A. Tartar, J. H. Ouma, R. Tarara, G. D. Reid, D. Koech, C. Auriault and A. Capron.
(1991) soumis à publication dans "*European Journal of Immunology*".

.5. T- Cell Antigens and Epitopes in Schistosomiasis.

C. Auriault, I. Wolowczuk, M. Damonville, F. Velge- Roussel, V. Pancré, H. Gras - Masse, A. Tartar, and A. Capron.

Current Topics in Microbiology and Immunology (1990) vol. "T cell Paradigms in Parasitic and Bacterial Infections" ed. Springer- Verlag. 155, 3-20.

.6. Epitopic characterization and vaccinating potentialities of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST).

C. Auriault, I. Wolowczuk, H. Gras- Masse, M. Marguerite, D. Boulanger, A. Capron, and A. Tartar.

(1991) soumis à publication dans: "*Peptide Research*".

.7. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides.

C. Auriault, H. Gras- Masse, I. Wolowczuk, R. J. Pierce, J-M Balloul, J-L Neyrinck, H. Drobecq, A. Tartar, and A. Capron.

J. Immunol. (1988) 141, 1687-1694.

.8. Dual expression of protection against experimental schistosomiasis in mice and baboons immunised with the Sm28 glutathione S transferase.

D. Boulanger, G. D. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J-M Balloul, D. Grezel, M. F. Otieno, S. Guerret, J-A. Grimaud, A. E. Butterworth and A. Capron.

(1991) soumis à publication dans: *Parasite Immunol.*

.9. Progress towards Vaccination Against Schistosomiasis.

A. Capron, J-M Balloul, D. Grezel, J-M Grzych, I. Wolowczuk, C. Auriault, D. Boulanger, M. Capron, and R. J. Pierce.

(1989) *Progress in Immunology*. eds. Springer- Verlag, VII, 979-987.

.10. Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides.

C. Auriault, H. Gras- Masse, R. J. Pierce, A. E. Butterworth, I. Wolowczuk, M. Capron, J. H. Ouma, J-M Balloul, J. Khalife, J-L Neyrinck, A. Tartar, D. Koech and A. Capron.

(1990) *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1918-1924.

.11. Advances toward a Vaccine against Schistosomiasis.

R. J. Pierce, C. Auriault, D. Boulanger, M. Capron, D. Grezel, J-M Grzych, F. Velge- Roussel, C. Verwaerde, I. Wolowczuk and A. Capron.

(1990) *Immune Recognition and Evasion: Molecular Aspects of Host-Parasite Interaction*. 105-121.

Présentations lors de Congrès:

.1. Cellular and humoral components of mice response to a protective antigen (P28) of *Schistosoma mansoni*.

I. Wolowczuk, C. Auriault, H. Gras- Masse, A. Tartar, A. Capron.

Réunion commune des Sociétés Française et Anglaise d'Immunologie. Paris (7-8 Avril 1988).

.2. Correlation between physico- chemical predictions and B or T- cell epitopes localization in a vaccinating protein.

H. Gras- Masse, I. Wolowczuk, C. Auriault, A. Tartar, and A. Capron.

Ecole Normale Supérieure de Lyon, (8-10 Septembre 1989).

.3. Correlation between physico- chemical predictions and B or T- cell epitopes localization in a vaccinating protein.

H. Gras- Masse, I. Wolowczuk, C. Auriault, A. Tartar, and A. Capron.

Immunogenicity, Steamboat Springs, Colorado, (21-28 Janvier 1989).

.4. Induction of a protective immunity toward schistosomiasis with a multiple antigenic peptide.

C. Auriault, I. Wolowczuk, H. Gras- Masse, D. Boulanger, A. Tartar and A. Capron.

UCLA, Californie, Août 1989.

.5. Etude d' un antigène vaccinant vis- à- vis de *Schistosoma mansoni*.

C. Auriault, R. J. Pierce, I. Wolowczuk, and A. Capron.

Electrophorèse en Aquitaine, Bordeaux, 14,15 et 16 Décembre 1989.

.6. T cell epitopes of the P28 antigen in schistosomiasis.

I. Wolowczuk, C. Auriault, H. Gras- Masse, A. E. Butterworth, G. Kimani, A. Tartar, and A. Capron.

Congrès International de Parasitologie, Paris, 20-24 Août 1990.

.7. Immunity and morbidity in human schistosomiasis.

G. Kimani, B. Were, M. Roberts, I. Wolowczuk, A.E. Butterworth, J. Ouma, D. Koech, and A. Capron.

Congrès International de Parasitologie, Paris, 20-24 Août 1990.

Brevet d'Invention

Fragment peptidique comprenant une séquence issue de la protéine 28 kDa de *Schistosoma mansoni* et compositions vaccinales et/ou thérapeutiques comprenant ledit fragment.

I. Wolowczuk, C. Auriault, A. Capron; A. Tartar, H. Gras- Masse.

Brevet n° 89.17421 (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur).

SOMMAIRE

Abréviations	12
Résumé	13
Introduction	15
Travaux personnels	88
Discussion et conclusion	218
Références bibliographiques	230
Table des matières	250

ABREVIATIONS

- ADCC** : cytotoxicité dépendante d'anticorps
- Ag** : antigène
- APC** : cellule présentatrice d'antigène
- CAP** : préparation antigénique extraite de la cercaire
- CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité
- CTL** : lymphocyte T cytotoxique
- GST** : glutathion-S-transférase
- HSR** : hypersensibilité retardée
- Ig** : immunoglobuline
- IL-** : interleukine
- IFN- γ** : interféron gamma
- LcB** : lymphocyte B
- LcT** : lymphocyte T
- LcTh = Th** : lymphocyte T "*helper*"
- LK** : lymphokine
- SEA** : préparation antigénique extraite de l'oeuf
- Sm28GST** : antigène de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* présentant une activité glutathion-S-transférase
- S.ula** : préparation antigénique extraite du schistosomule
- SWAP** : préparation antigénique extraite du ver adulte
- TcR** : récepteur T
- TNF** : *tumor necrosis factor*

RESUME

L'antigène de 28 kiloDalton du parasite Trématode *Schistosoma mansoni* : Sm28GST, a été préalablement démontré comme pouvant induire des niveaux de protection très élevés dans différents modèles animaux, rongeurs et primates.

L'analyse de la séquence primaire de la molécule Sm28GST, a conduit à la synthèse de sept peptides qui ont été utilisés pour identifier les épitopes T et B majeurs de la molécule vaccinnante.

Deux d'entre ces peptides (correspondants aux acides aminés 24-43 et 115-131) contiennent des déterminants T majeurs de l'antigène Sm28GST. En effet, les peptides 24-43 et 115-131 induisent la prolifération *in vitro* de lymphocytes T de rat Fischer ou de souris Balb/c immunisés par la molécule de 28kiloDalton, recombinante ou native.

Une étude chez le rat Fischer montre que l'épitope contenu dans le peptide 24-43 est un épitope "helper" d'une réponse IgE: le transfert passif de lymphocytes T spécifiques du 24-43 augmente la production d'IgE anti-Sm28GST.

Une construction multi-épitopique comprenant 8 copies du peptide 115-131 (dénommée "octopus"), est immunogène et antigénique dans trois modèles animaux différents: le rat, la souris et le babouin. De plus, la pré-immunisation de rat Fischer par cette construction en octopus du peptide 115-131, les protègent d'une infection ultérieure par le parasite.

Ces structures épitopiques sont exposées au système immunitaire durant l'infection de rats, de souris ou de babouins. Une analyse de la réactivité lymphocytaire de jeunes enfants kenyans infectés par *Schistosoma mansoni* (après ou avant traitement par le praziquantel : drogue anti-helminthique) montre que les déterminants fonctionnels identifiés chez l'animal sont également reconnus par le système immunitaire humain. De plus, cette étude a permis l'identification d'un peptide majoritairement reconnu dans les populations humaines infectées : le peptide 190-211, correspondant à la partie C-terminale de la molécule Sm28GST.

Ces travaux ont permis d'identifier des épitopes "inducteurs", "protecteurs", voire impliqués dans la pathologie et d'envisager ainsi comme possible, même si de nombreuses questions restent posées, l'utilisation de constructions chimiques artificielles utilisant ces divers peptides pour orienter la réponse immune de l'hôte parasité vers les mécanismes protecteurs aboutissant à la destruction du parasite et/ou la limitation des manifestations pathologiques dont il est responsable.

INTRODUCTION

I. PREFACE

Toutes les formes de vie, qu'elles soient végétales ou animales, invertébrées ou vertébrées, sont continuellement exposées à l'invasion par des organismes parasites.

La capacité à s'accommoder ou résister à de telles infections, a fait l'objet d'une très grande pression sélective au cours de l'évolution. Elle détermine en effet le succès de la survie de l'espèce parasitée.

Cependant, bien loin de représenter une spécialisation étrange et quelque peu dégénérée, le parasitisme est au contraire une étape vers l'adaptation plus ou moins parfaite entre deux espèces, résultant d'une balance complexe, dynamique et extraordinairement raffinée.

Il y a de plus en plus d'évidences que la complexité des réponses immunes ou le haut degré de polymorphisme des systèmes d'histocompatibilité, peuvent être attribués aux pressions sélectives exercées par l'infection parasitaire.

L'évolution simultanée du parasite et de son hôte, aboutissant à une association compatible avec la survie des deux partenaires, est la clé du maintien des affections parasitaires au cours du temps et ceci depuis des milliers d'années.

L'étude de l'univers des Parasites - par les connaissances qu'elle apporte dans des domaines fondamentaux de la Biologie et notamment de l'Immunologie, s'inscrit donc au premier plan dans celle de la connaissance du monde vivant (A. Capron, 1990).

II. GENERALITES

Les **Helminthes** sont des invertébrés métazoaires appartenant à l'embranchement zoologique des vers. Les relations qu'entretiennent ces parasites avec leurs hôtes, l'homme en particulier, sont la démonstration d'une adaptation quasi-parfaite.

En effet, cette association existait déjà dans l'Ancienne Egypte comme le mentionne le célèbre Papyrus médical Eber. Plus de 2000 ans se sont écoulés et les infections par helminthes sont encore très répandues sur les trois continents et sont responsables de maladies très graves de l'homme et du bétail.

II.1. Qu'est-ce que la Bilharziose?

C'est l'une des infections parasitaires affectant l'homme les plus répandues dans le monde. Seul le paludisme la précède par ordre d'importance sur le plan socio-économique et du point de vue de la santé publique dans les régions tropicales et sub-tropicales. En tant que risque professionnel dans les zones rurales des pays en développement, la **schistosomiase** vient au premier rang en ce qui concerne la prévalence parmi les maladies à transmission par l'eau.

Les schistosomiasés constituent un complexe d'infections parasitaires acquises par l'homme dans toute une gamme d'habitats d'eau douce, elles sont transmises par certains mollusques aquatiques ou amphibies, mais l'homme, comme le mollusque, est responsable de la diffusion de la maladie. Un des facteurs de la contamination de

l'environnement est le manque d'hygiène des populations. En fait, les êtres humains contractent la maladie par leur contacts répétés avec une eau douce contaminée lorsqu'ils se livrent à l'agriculture, la pêche, à des activités ménagères ou ludiques.

Il existe dans le monde 2 formes principales de bilharziose.

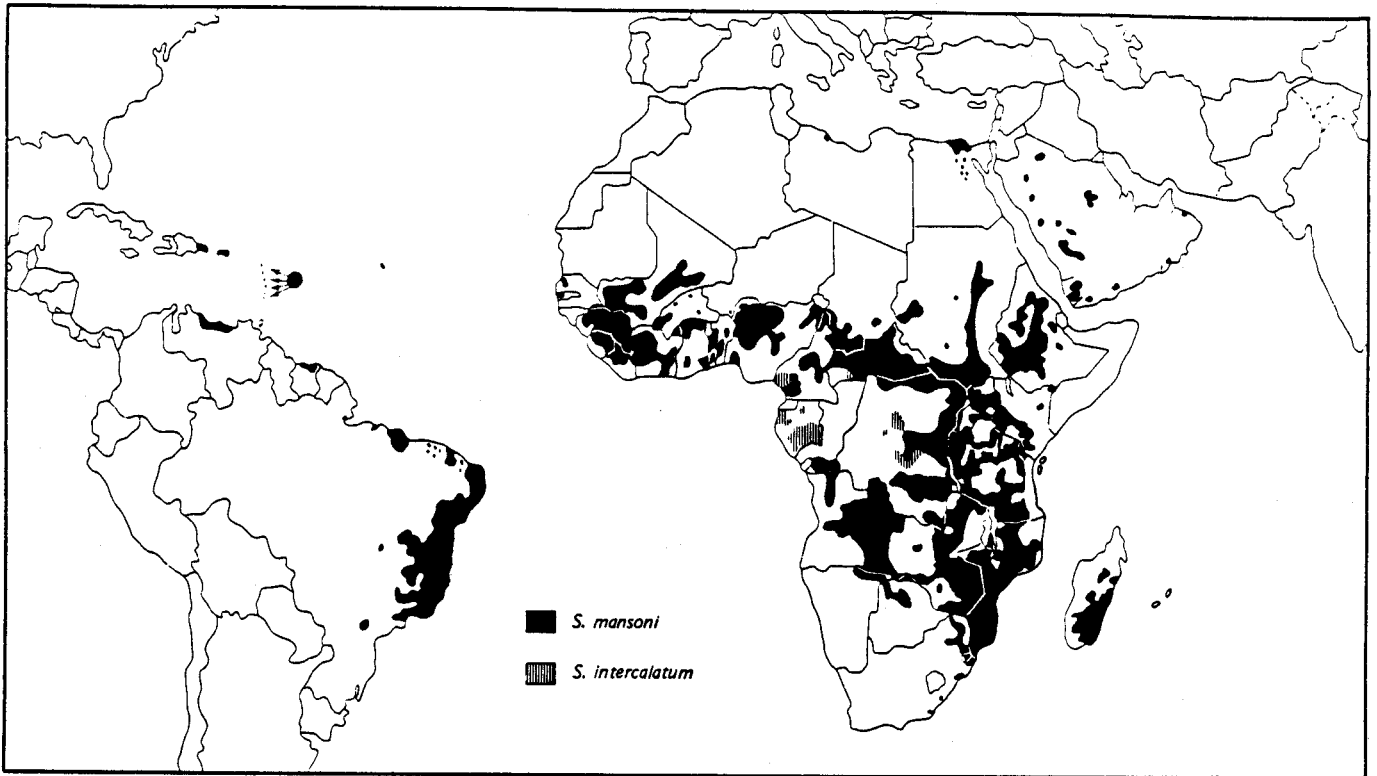
La forme urinaire est provoquée par des vers adultes du genre *Schistosoma haematobium* qui déposent leurs oeufs dans les vaisseaux irrigant la vessie. Les formes intestinales sont dues aux réactions provoquées par les oeufs provenant des vers adultes qui vivent dans les veines porte et mésentérique. L'une des formes de schistosomiase intestinale est due à *Schistosoma mansoni* et l'autre à *Schistosoma japonicum* ou *Schistosoma mekongi*.

Schistosoma intercalatum provoque une forme de schistosomiase rectale et génitale.

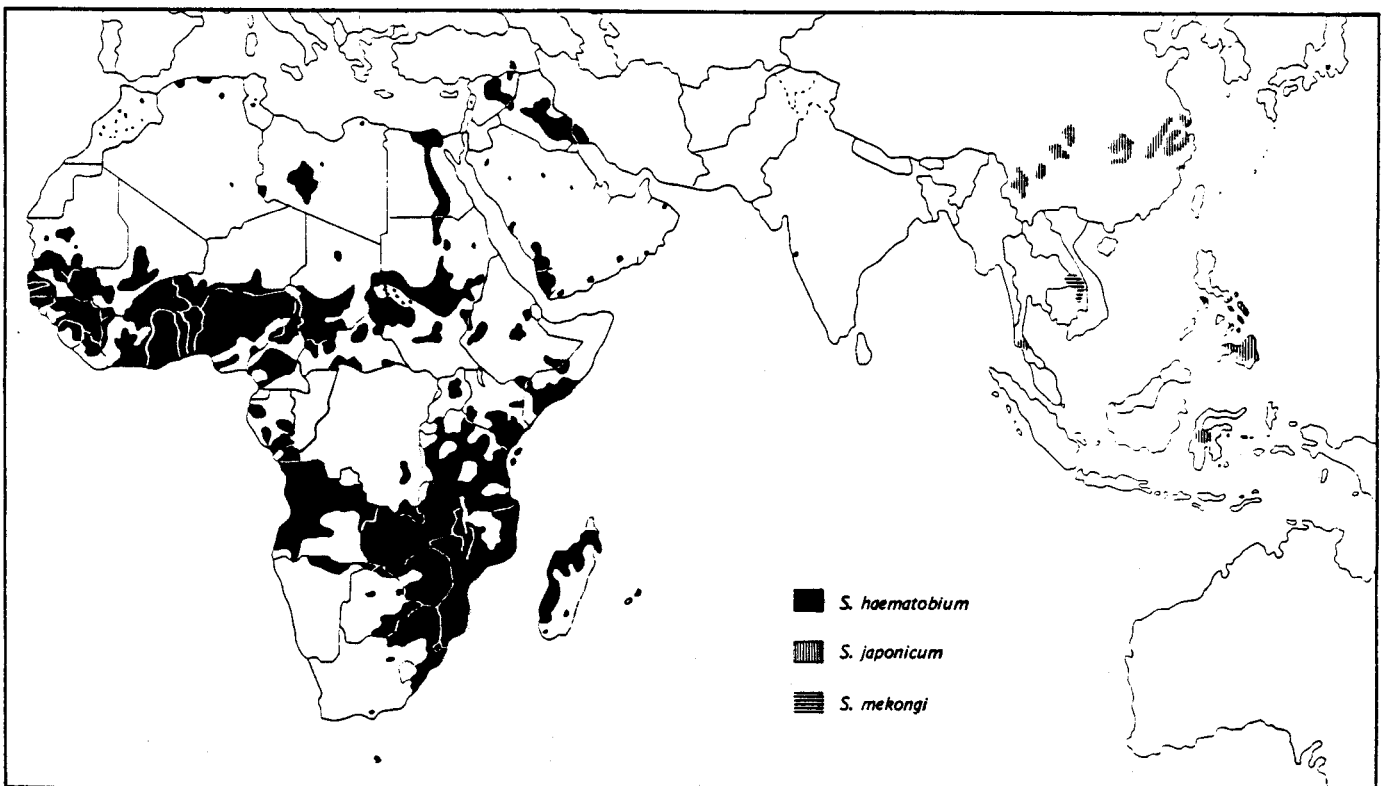
II.2. Distribution géographique.

La prévalence mondiale de la schistosomiase serait, d'après l'estimation la plus récente (Organisation Mondiale de la Santé, 1987) de l'ordre de 200 millions de cas. A ce nombre, déjà considérable de personnes effectivement infectées, s'ajoute celui de 600 millions d'individus exposés au parasite du fait de la pauvreté, de l'ignorance, de la médiocrité du logement, d'une mauvaise hygiène et de la rareté - sinon de l'absence - d'installations sanitaires.

Du fait de sa prévalence, de sa très large distribution dans les trois continents (la schistosomiase est actuellement endémique dans 74 pays: Figure I), et de l'importance de la morbidité et de la mortalité - et donc de la souffrance - qu'elle entraîne, la schistosomiase reste l'un des problèmes



Global distribution of schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and *S. intercalatum*, 1985
 Distribution mondiale de la schistosomiase due à *Schistosoma mansoni* et *S. intercalatum*, 1985



Global distribution of schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* and *S. japonicum*, 1985
 Distribution mondiale de la schistosomiase due à *Schistosoma haematobium* et *S. japonicum*, 1985

Figure 1.

(d'après: "Atlas de la répartition mondiale des schistosomiasés", O. M. S. 1987)

majeurs de santé publique dans les pays tropicaux et sub-tropicaux.

De plus, les aires de répartition des schistosomiasés évoluent sans cesse:

- Autrefois, l'infection par *S. japonicum* sévissait dans 6 pays, aujourd'hui on ne la trouve plus qu'en Chine, Indonésie et aux Philippines.

- *S. haematobium* est endémique dans 53 pays, du Brésil au Surinam et à certaines îles des Caraïbes mais récemment l'infestation par *S. haematobium* a été observée à Sao Tomé-et-Principe.

- Enfin, *S. mansoni* est endémique dans 40 pays mais cette infection est depuis peu notée au Niger et en Oman et encore plus récemment (le premier cas a été détecté en Janvier 1988), une épidémie fulgurante et gravissime de bilharziose à *S. mansoni* s'est déclarée dans la région de Saint-Louis, au Sénégal.

II.3. Le genre *Schistosoma*: approche taxonomique.

Les Schistosomes sont des helminthes, appartenant à la classe des Trématodes et au genre *Schistosoma* (ou *Bilharzia*) vivant à l'état adulte dans les vaisseaux sanguins des hôtes (homme ou autres vertébrés) qu'ils infestent.

L'utilisation de la technique conventionnelle de coloration au Giemsa a permis à Grossman, A. I. *et al.* (1981) de démontrer que le caryotype de *Schistosoma intercalatum* est très similaire à celui de *Schistosoma mansoni*. Par contre, les caryotypes de *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongi* sont très différents de ceux des autres espèces de schistosomes (Grossman, A. I. *et al.*, 1980). Le génome des schistosomes consiste en 8 paires de chromosomes, le génome haploïde contiendrait $2,7 \times 10^8$ paires de bases composé de 60% de séquences d'ADN fortement ou moyennement répétées et d'environ 30% de séquences simple-copie (Short, R. B. *et al.*, 1981). Le génome de ce parasite est environ dix fois plus grand

que celui des protozoaires et représente près d'un dixième du génome humain. Sa complexité est similaire à celle des mollusques et des éponges (Simpson, A. J. G. *et al.*, 1982).

Le genre *Schistosoma* appartient à la famille des *Schistosomatidae*, parmi les douze membres de cette famille seul *Schistosoma* est associé à l'homme. Dix-huit espèces de schistosomes infestant l'homme ou les animaux sont connues actuellement (Tableau I). Les cinq espèces principales se répartissent en 3 groupes, caractérisés par la morphologie de leur oeufs (Figure 2):

a) oeuf ovale et muni d'un éperon latéral (*S. mansoni*)

b) oeuf ovale et muni d'un éperon terminal (*S. haematobium* et *S. intercalatum*)

c) oeuf rond et muni d'un éperon minuscule (*S. japonicum* et *S. mekongi*)

On a observé la présence de schistosomes analogues à *S. mansoni* chez le rat (*S. rodhaini*) et de nombreux parasites analogues à *S. haematobium* et pondant des oeufs à éperon terminal chez divers animaux, et parfois l'homme, par exemple *S. bovis* et *S. matthei* en Afrique australe.

En fait, la taxonomie des schistosomes est beaucoup plus complexe puisque des variations intra-spécifiques et des hybridations ont été rapportées (Nadler, S. A., 1987) par l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de sondes d'ADN ou des techniques telles que l'analyse des protéines ou des isoenzymes (Rollinson, D., 1984; Rollinson, D. *et al.*, 1985; Fletcher, M. *et al.*, 1981). L'existence de ces hétérogénéités a des implications pratiques évidentes pour la lutte contre la maladie.

Les schistosomes de l'espèce *S. mansoni* par exemple, isolés dans différentes régions géographiques, n'ont pas tous la même capacité de se développer chez les diverses espèces et souches de mollusques-hôtes (différences portant sur la longueur du ver adulte, la dimension des oeufs et la période de prépatence à l'intérieur du mollusque).

Groupe *S. haematobium*

<i>S. haematobium</i> Bilharz, 1852 Weinland, 1858	<i>Bulinus</i>	Afrique et régions adjacentes	primates
<i>S. intercalatum</i> Fisher, 1934	<i>Bulinus</i>	Afrique	primates
<i>S. mattheei</i> Veglia et Le Roux, 1929	<i>Bulinus</i>	Afrique	porcins et ruminants primates
<i>S. bovis</i> Blanchard, 1895 Sonsino, 1876	<i>Bulinus</i> <i>Planorbe</i>	Afrique et régions adjacentes	porcins et ruminants
<i>S. curassoni</i> Brumpt, 1931	<i>Bulinus</i>	Afrique	porcins et ruminants
<i>S. margrebowie</i> Le Roux, 1933	<i>Bulinus</i>	Afrique	porcins et ruminants
<i>S. leiperi</i> Le Roux, 1955	<i>Bulinus</i>	Afrique	porcins et ruminants

Groupe *S. mansoni*

<i>S. mansoni</i> Sambon, 1907	<i>Biomphalaria</i>	Amérique du Sud Caraïbe, Afrique Madagascar	primates et rongeurs
<i>S. rodhaini</i> Brumpt, 1931	<i>Biomphalaria</i>	Afrique	rongeurs et carnivores
<i>S. edwardiense</i> Thurston, 1964	<i>Biomphalaria</i>	Afrique	porcins et ruminants
<i>S. hippopotami</i> Thurston, 1963	???	Afrique	porcins et ruminants

Groupe *S. indicum*

<i>S. indicum</i> Montgomery, 1906	<i>Indoplanorbis</i>	Inde, Sri-Lanka Sud-est asiatique	porcins et ruminants
<i>S. spindale</i> Montgomery, 1906	<i>Indoplanorbis</i>	Inde, Sri-Lanka Sud-est asiatique	porcins et ruminants
<i>S. nasale</i> Rao, 1933	<i>Indoplanorbis</i>	Inde, Sri Lanka	porcins et ruminants
<i>S. incognitum</i> Chandler, 1926	<i>Lymnaea</i> <i>Radix</i>	Inde Sud-est asiatique	rongeurs, carnivores porcins et ruminants

Groupe *S. japonicum*

<i>S. japonicum</i> Katsudara, 1904	<i>Oncomelania</i>	Chine, Japon Philippines Taïwan, Indonésie	primates, rongeurs carnivores, porcins et ruminants
<i>S. mekongi</i> Voge, Bruckner et Bruce, 1978	<i>Tricola</i>	Sud-est asiatique	primates, carnivores
<i>S. sinensium</i> Pao, 1959	<i>Tricola</i>	Sud-est asiatique	rongeurs

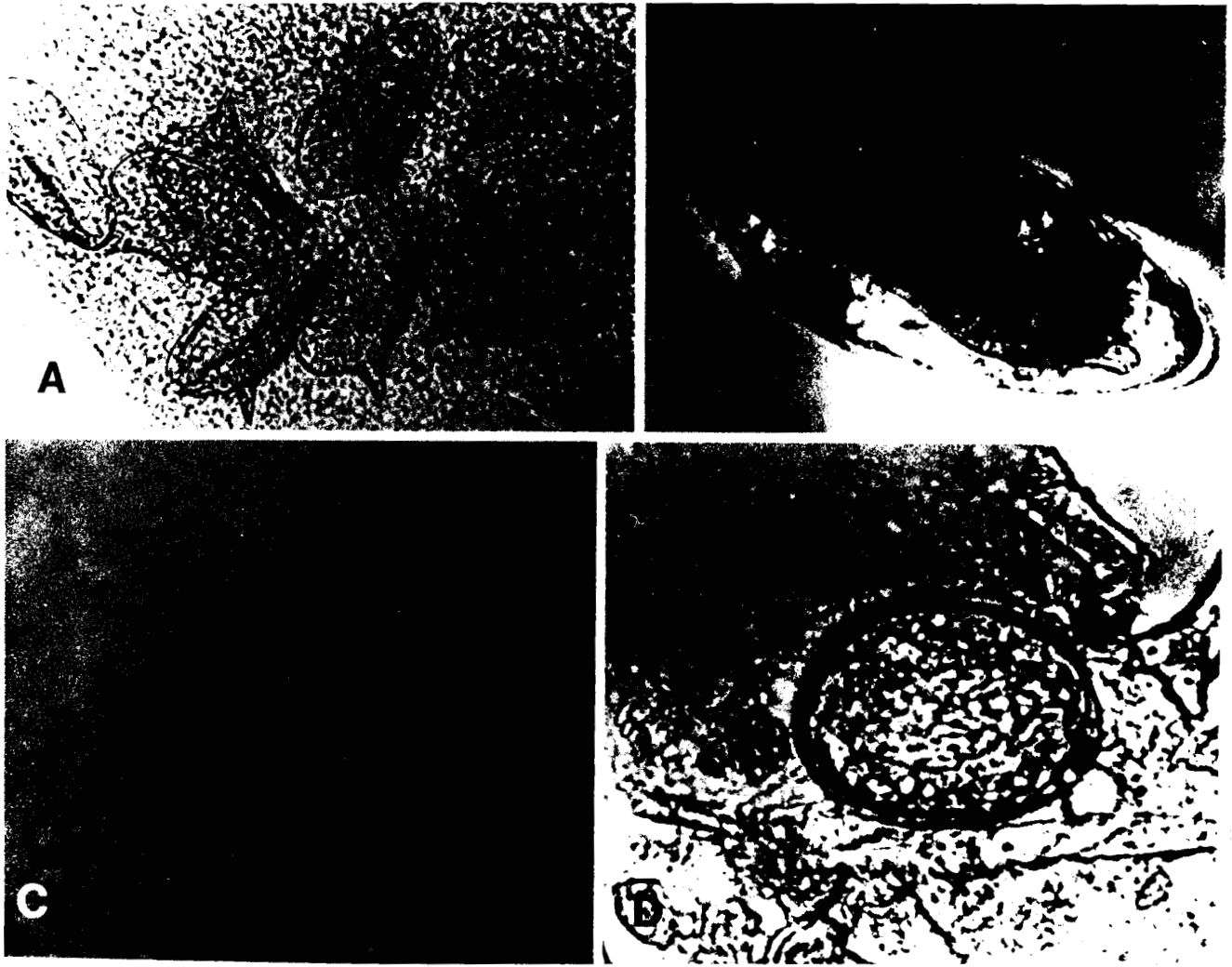


Figure 2:

Morphologies des oeufs de schistosomes.

- | | | | | |
|---|---|--|---|--------------|
| A | } | Oeufs de <i>Schistosoma mansoni</i> : éperon latéral | } | Oeufs Ovales |
| B | | | | |
| C | : | Oeuf de <i>Schistosoma haematobium</i> : éperon terminal | | |
| D | : | Oeuf de <i>Schistosoma japonicum</i> : éperon minuscule | | |

(d' après "The radiology of Tropical Diseases with epidemiological, radiological and clinical correlation." Reeder, M. M. and Palmer, P. E. S.)

De même, les spécimens de *S. haematobium* isolés en Afrique et dans les régions voisines présentent parfois une infectiosité extrêmement différente à l'égard de diverses espèces de mollusque-hôte du groupe *Bulinus*.

Enfin, il a été découvert à Loum (Cameroun) des hybrides naturels de *S. haematobium* et *S. intercalatum*: depuis une dizaine d'années, le nombre de cas de schistosomiase intestinale provoquée par *S. intercalatum* baisse notablement, tandis que celui des cas de schistosomiase urinaire provoquée par *S. haematobium* et le parasite hybride augmente. L'étude au laboratoire a permis de démontrer que l'hybridation conduit à une augmentation du pouvoir infestant vis-à-vis des mollusques-hôtes et des animaux de laboratoire ainsi qu'une stimulation de la croissance et de la capacité de reproduction des parasites hybrides.

II. 4. Le cycle biologique: Tableau II et Figure 3.

Le cycle évolutif des trois espèces (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*) est identique dans ses grandes lignes, nécessitant l'intervention d'un mollusque d'eau douce spécifique pour chaque espèce (respectivement: *Planorbis*, *Bulinus* et *Oncomelania*). La période de prépatence dans l'hôte intermédiaire mollusque d'eau douce représente le temps entre l'infection du mollusque par les miracidia et l'émergence des premières cercaires. La période de prépatence dans l'hôte définitif représente le temps entre l'infection initiale et l'apparition d'oeufs dans les excréments. Elle est assez caractéristique pour chaque espèce de schistosomes, toutefois elle peut varier entre les différentes souches et être beaucoup plus longue chez des hôtes non favorables. La longueur de la période de prépatence chez le mollusque hôte est beaucoup plus dépendante de facteurs de l'environnement tels que la température mais aussi de la taille et de l'âge du mollusque, du nombre de miracidia

	<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. japonicum</i>
Longueur de la femelle (en mm.) (Loker, 1983)	13,5-22,5	7,2-14	15-30
Longueur du mâle (en mm.)	5-11	5-11	5-11
Nombre d' oeufs utérins (moyenne) (Loker, 1983)	4-56 (29)	1	(161)
Taille de l' oeuf (longueur x largeur μm)	144 x 58	142 x 60 (Kusel, 1970)	81 x 63 (Loker, 1983)
Taille de la cercaire (en μm)	483 (Capron, 1965)	516 (Faust, Hoffman, 1934)	333 (Loker, 1983)
Nombre d'oeufs excrétés par jour (Loker, 1983)	22-203	66-495	560-2200
Période de prépatence chez le mollusque (en jours)	20-35	20-35	>40
Période de prépatence chez l' hôte définitif (en jours) (Loker, 1983)	56	34	34

Tableau II.

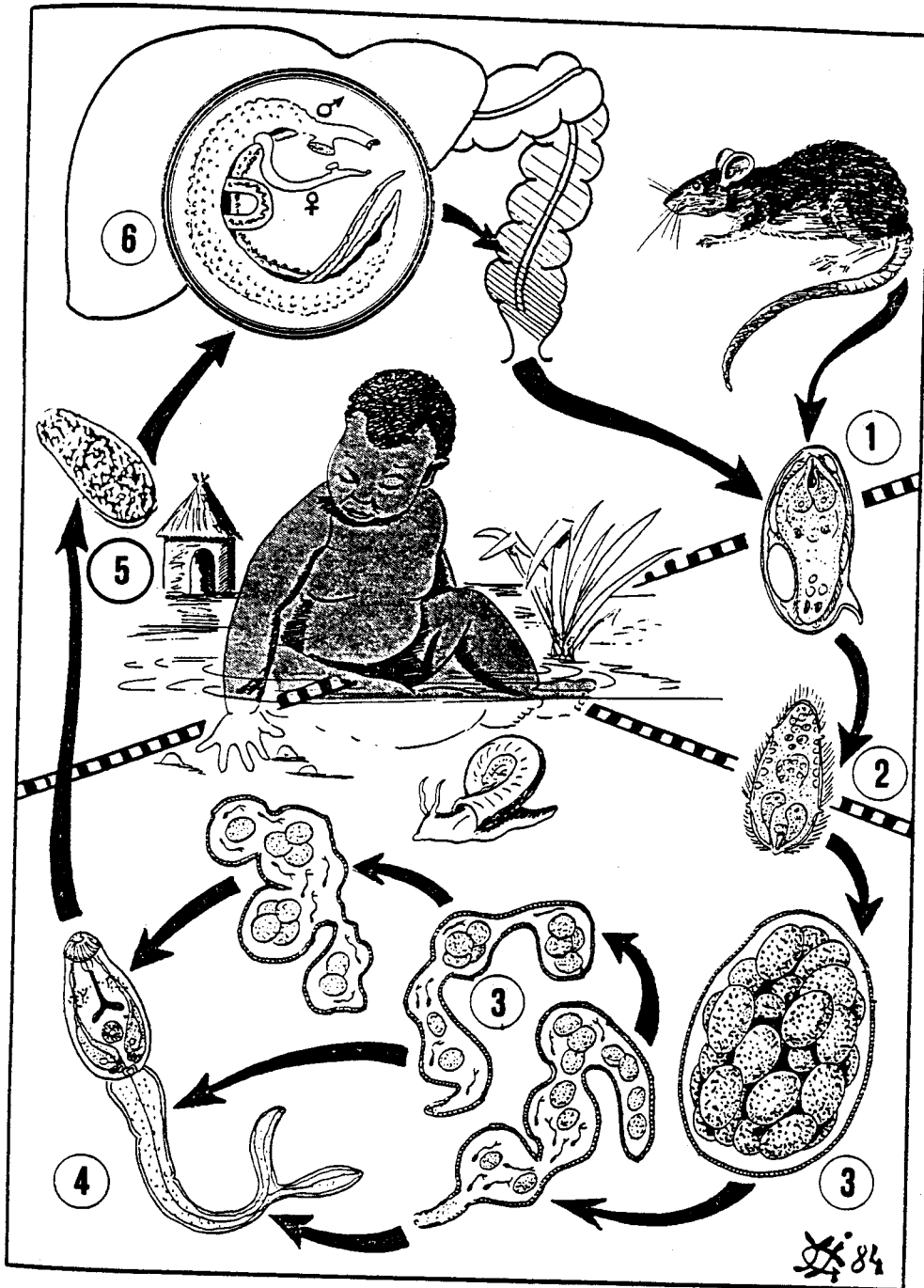


Figure 3 : Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (d'après GOLVAN, Y.J., Ed. Flammarion, 1969)

pénétrants et de la compatibilité entre le schistosome et son mollusque intermédiaire.

La connaissance schématique du cycle est essentielle car elle permet de comprendre le mode d'infestation, les phases évolutives de la maladie et d'en déduire les notions prophylactiques.

Dans l'eau et le mollusque-hôte intermédiaire.

Les oeufs (1) de schistosomes excrétés par l'organisme de l'hôte définitif éclosent lorsqu'ils atteignent l'eau, libérant un jeune parasite minuscule : le miracidium (2). Les premières études sur les conditions d'éclosion indiquent que les facteurs principaux sont la température (qui doit être entre 25 et 30° C), la luminosité et la pression osmotique. L'hypotonicité (osmolarité proche de 12 mOsM) semble être le facteur principal de l'induction de l'éclosion. Cette valeur est souvent celle de l'eau douce. Le mécanisme d'éclosion est un phénomène purement physique (l'eau pénètre dans les vacuoles créant un phénomène de turgescence qui va aboutir à l'éclatement de l'enveloppe) qui a lieu même quand le miracidium est mort. Une fois libéré, le miracidium nage frénétiquement (vitesse = 2 mm/s. en moyenne) à l'aide de fins cils qui le recouvrent, en quête de son hôte mollusque d'eau douce, dans lequel il pourra poursuivre son développement. Le miracidium ne survit pas dans l'eau au delà de 8 à 12 heures (Chernin, E. *et al.*, 1962; Prah, S. K. *et al.*, 1977).

A l'intérieur du mollusque, le miracidium bourgeonne, donnant des sporocystes (3). La suite du développement s'effectue dans l'hépatopancréas du mollusque et aboutit à la formation des furcocercaires (4), larves à queue fourchue, de 500 µm de long. La durée totale du cycle chez le mollusque est de un mois.

La multiplication intense du parasite chez le mollusque aboutit à la formation, à partir d'un seul miracidium, de milliers de cercaires qui émergent du mollusque aux heures chaudes de la journée, en général entre 10 et 16 heures en pays tropical (Pitchford, R. J. *et al.*, 1969; Nojima, H. *et*

al., 1982). Elles peuvent vivre en eau libre pendant 24 heures au maximum. En effet la principale réserve d'énergie de la cercaire est le glycogène contenu dans la queue et le corps et Lawson, J. R. *et al.* (1980) ont montré que cette réserve diminue de façon exponentielle après la libération de la cercaire dans l'eau. Elles doivent donc pénétrer à travers la peau de leur hôte définitif (le plus souvent l'homme) dans ce court délai.

Dans l' hôte définitif.

Les cercaires se fixent sur l'épiderme grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La pénétration à travers la peau de l'hôte définitif a été décrite par Haas, W. *et al.* (1982). Elle se fait en moins d'une heure (Cousin, C. E. *et al.*; 1981) et fait intervenir une action mécanique et une action chimique (sécrétion d'enzymes lytiques: Landsperger, W. J. *et al.*, 1982).

L'évolution qui va alors se poursuivre dans l'organisme-hôte définitif est alors absolument fascinante et implique des modifications qui vont très vite permettre au parasite de s'adapter à son "nouveau mode de vie": modifications de structure (Stirewalt, M. A., 1974; Mac Laren, D. J., 1980), de morphologie (en traversant la peau de leur hôte définitif, les cercaires perdent leur queue) et biochimiques: apparition de nouvelles molécules (Tableau III). Elles se transforment ainsi en schistosomules (5)

Déjà à ce niveau le parasite va faire preuve d'une capacité d'adaptation particulièrement rapide et efficace puisque d'organisme adapté à la vie en eau douce, il devient capable de survivre dans un milieu où l'osmolarité est augmentée. De récents travaux (Miller, K. J., 1986) ont permis de montrer le rôle des oligosaccharides de surface dans l'adaptation d'un organisme à des variations de pression osmotique. Dans le cas de *S. mansoni*, des expériences réalisées dans notre laboratoire (Dissous, C. *et al.*, 1987; Grzych, J. M. *et al.*, 1987) ont abouti à l'identification d'une structure glycanique commune au parasite, à son hôte intermédiaire mollusque d'eau douce (*Biomphalaria glabrata*) et à un mollusque marin primitif (*Megathura crenulata*).

Poids moléculaire
(kilodalton)

Références

>150	Dissous <i>et al.</i> 1985; Yi <i>et al.</i> 1986.
105 ^a	Taylor <i>et al.</i> 1981; Samuelson et Caulfield, 1982.
92-97	Simpson <i>et al.</i> 1983; Knight <i>et al.</i> 1984.
80 ^a	Taylor <i>et al.</i> 1981; Samuelson et Caulfield, 1982.
66-68 ^a	Taylor <i>et al.</i> 1981; Simpson <i>et al.</i> 1983.
53-54 ^a	Samuelson et Caulfield, 1982; Smith et Clegg, 1985.
44-46 ^a	Taylor <i>et al.</i> 1981; Samuelson et Caulfield, 1982.
40-41 ^a	Dissous <i>et al.</i> 1981; Samuelson et Caulfield, 1982.
38 ^a	Simpson <i>et al.</i> 1983; Dissous <i>et al.</i> 1985.
37	Dissous <i>et al.</i> 1981, 1985.
32	Knight <i>et al.</i> 1984; Dissous <i>et al.</i> 1985.
27-28 ^a	Taylor <i>et al.</i> 1981; Samuelson et Caulfield, 1982.
24	Taylor et Butterworth, 1982; Taylor <i>et al.</i> 1984.
22 ^a	Samuelson et Caulfield, 1982; Simpson <i>et al.</i> 1983.
19-20 ^a	Samuelson et Caulfield, 1982; Simpson <i>et al.</i> 1983.
16-17 ^a	Samuelson et Caulfield, 1982; Knight <i>et al.</i> 1984.
14-15	Taylor <i>et al.</i> 1981; Simpson <i>et al.</i> 1983.

^a: glycosylation: Samuelson et Caulfield, 1982.

Tableau III:

Macromolécules caractérisées à la surface du jeune
schistosomule de *Schistosoma mansoni*.

(d'après: "Cercariae to liver worms: Development and migration in the mammalian host."
R.A.Wilson, *in*: "The Biology of Schistosomes, from genes to latrines" Eds. D. Rollinson, A.J.G.
Simpson.)

Ensuite le schistosomule parvient dans les poumons par transport lymphatique ou veineux. De là, il gagne les veines portes intra-hépatiques par voie circulatoire (cette phase migratoire dure 10 à 21 jours). Il poursuit alors son développement jusqu'à la différenciation et la maturation sexuelle (en 3 semaines environ). Les vers accouplés vont demeurer pendant plusieurs années: chez l'homme cette durée a été estimée de 2 à 20 ans, parfois même 30 ans (Vermund, S. H. *et al.*, 1983). Le couple de schistosomes adultes (6) (mâle et femelle) se déplace ensuite à contre-courant, grâce à leur ventouse, vers les lieux de ponte. Le nombre d'oeufs excrétés journallement varie beaucoup entre les espèces (Loker, E. S., 1983). Ils pourront avoir 2 destinées:

- les oeufs bloqués dans les tissus détermineront la formation du **granulome bilharzien** que nous détaillerons ultérieurement. D'autres, emportés passivement par le courant veineux, iront dans les poumons et d'autres organes où ils induiront également la formation de granulomes.
- ceux (environ la moitié des oeufs pondus) qui réussissent leur migration vont traverser la muqueuse et tomber dans la lumière de la vessie (*S. haematobium*) ou de l'intestin (*S. mansoni*, *S. japonicum*).

Ils sont alors éliminés dans les excréments, et le cycle recommence...

II. 5. Les conséquences de l'infection par *S. mansoni*.

L'infection par *S. mansoni* affecte les individus de différentes manières. Tandis que certains seront porteurs asymptomatiques du parasite, d'autres développeront une forme sévère (Kloetzel, K., 1964; Katz, N. *et al.*, 1966). Dans les populations très fortement infectées, la prévalence des formes sévères peut atteindre 5 à 10%. Les raisons de ces différences sont mal connues. Nous évoquerons plus loin les facteurs de prédisposition de l'hôte à l'infection mais il est clair que l'importance de la charge

parasitaire va influencer le développement des manifestations sévères de la maladie.

Par la suite, les lésions qui vont apparaître sont essentiellement causées par les oeufs plus que par les vers adultes (Cheever, A. W. *et al.*, 1965).

Les lésions causées sont dues:

- à la déposition locale d'oeufs et à la formation du granulome bilharzien.

- à la réponse immune systémique de l'hôte: lympho-prolifération, lésions dues à des dépôts d'immun-complexes (notamment au niveau des glomérules rénaux: Gentilini, M. et Duflo, B., 1982). Les réponses cellulaires systémiques vont persister durant la phase chronique de la maladie mais sous une forme atténuée.

**III. LA REPONSE IMMUNE CONTRE *SCHISTOSOMA MANSONI*
DANS LES MODELES ANIMAUX.**

III.1. Les modèles animaux.

La connaissance et la compréhension - encore incomplètes - de l'immunologie de la schistosomiase, ont été largement facilitées par le fait que de nombreux animaux de laboratoire sont susceptibles à l'infection par *Schistosoma mansoni*.

III.1.a. La spécificité d'espèce.

Différents critères expérimentaux définis par Stirewalt, M. A. *et al.* (1951), permettent de déterminer le degré de résistance vis-à-vis du parasite:

* Le nombre d'animaux infestés par rapport au nombre d'animaux exposés au parasite.

* Le pourcentage de furcocercaires qui ont effectivement pénétré dans l'organisme hôte.

* L'importance de la charge parasitaire c'est-à-dire le nombre de vers adultes présents dans l'animal infecté.

* Le nombre et la distribution des oeufs dans l'organisme et dans les excréments. Ce dernier critère est toujours le plus utilisé sur le terrain dans les zones d'endémie pour déceler la maladie et en évaluer l'importance clinique.

C'est ainsi que depuis de nombreuses années, des différences de susceptibilité à l'infection par *S. mansoni* ont pu être clairement établies:

** Le hamster est considéré comme l'hôte le plus susceptible. En effet, il permet la maturation complète des parasites. Du fait de l'obtention facile de vers adultes et du grand nombre d'oeufs viables récupérés, le

hamster est utilisé pour assurer le maintien du cycle parasitaire dans la plupart des laboratoires, en association avec un élevage de mollusques-hôtes intermédiaires.

** La souris est également très susceptible à l'infection par *S. mansoni* même si elle ne permet pas la récupération d'un aussi grand nombre de parasites que le hamster. Cependant, sa petite taille la rendant facile à manipuler, ce modèle est très utilisé au laboratoire.

** Le lapin et le cobaye sont peu utilisés. Les vers adultes sont de taille normale mais ils ne pondent pas ou peu d'oeufs. Le cobaye reste très peu utilisé même si de récents travaux (Pearce, E. J. et Mc Laren, D. J. 1983; Rogers, M. V. 1986) montrent que cet animal développe une importante résistance à la réinfection associée à une pathologie limitée, la plupart des oeufs pondus étant non viables et non excrétés dans les fèces.

** Le rat est un modèle tout-à-fait particulier dans l'étude de la schistosomiase. Il s'infecte et les formes larvaires accomplissent le stade de migration hépatique. Mais dès la 4^{ème} semaine, il y a une chute brutale de la charge parasitaire et à la 6^{ème} semaine, la majorité des vers ont été éliminés (Smithers, S. R. et Terry, R. J. 1965^a; Maddison, S. E. *et al.*, 1970).

** Le singe Rhésus (*Macaca mulatta*) est également un hôte très susceptible à l'infection mais lorsqu'il est massivement infecté, le nombre d'oeufs pondus décroît brusquement après 8 à 12 semaines (Smithers, S. R. et Terry, R. J. 1965^b).

** Le babouin olive (*Papio anubis*) est très susceptible à l'infection par *S. mansoni* (Sadun, E. M. *et al.*, 1966), et permet la maturation complète du parasite. Le nombre d'oeufs pondus est important.

** L'homme, quant à lui, se comporte comme un hôte susceptible chez lequel des infections de longue durée ont été observées.

III.1.b. Le choix du modèle animal.

En 1958, Kagan divise les espèces animales en 3 catégories suivant leur comportement face à l'infection par les schistosomes.

Ainsi l'on définit:

- *** Les hôtes résistants (le pigeon: les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme).
- *** Les hôtes partiellement résistants (rat, singe Rhésus).
- *** Les hôtes susceptibles (hamster, souris, babouin, homme).

Toutefois, il est important de souligner que chaque modèle animal a ses propres avantages et désavantages.

Le rat par exemple, ne permet pas un développement complet du parasite. Le peu de schistosomes restant 4 semaines après l'infection sont mal développés et produisent un petit nombre d'oeufs non viables. Ce modèle est clairement inapproprié pour étudier la pathologie causée par les oeufs et la relation entre résistance et pathologie. Cependant, le rat développe une immunité à la réinfection très importante dont nous détaillerons les mécanismes dans un chapitre suivant.

La souris chez qui le développement du parasite est complet, constitue un modèle idéal pour étudier les modifications immuno-pathologiques liées au dépôt des oeufs dans les tissus. De plus, l'existence de nombreuses souches parfaitement définies sur le plan génétique, font de la souris un modèle des plus utiles pour l'étude du contrôle génétique de la réponse immune vis-à-vis de *S. mansoni*. Cependant, la plus petite infection réalisable chez la souris (1 couple de vers adultes) serait équivalente à une infection par 2000 à 3000 couples chez l'homme. Or, des études *post-mortem* réalisées par Cheever, A. W. (1968) au Brésil, ont montré que 90% des sujets avaient moins de 10 couples de parasites et que 10%

avaient entre 160 et 320 couples de *S. mansoni*.

Les études au laboratoire ont permis de montrer que les comportements différents du rat et de la souris face à l'infection par *S. mansoni*, sont en fait le reflet de réponses immunitaires également différentes: si pour le rat, l'immunité protectrice fait essentiellement intervenir des mécanismes dépendant d'anticorps, pour la souris c'est principalement la composante cellulaire qui est en jeu.

Chacun de ces modèles partageant des caractéristiques avec l'infection humaine, analyser les mécanismes immuns de l'un et de l'autre est donc indispensable à la compréhension de la réponse immune développée chez l'homme.

III.2. Les caractères généraux de la réponse immune vis-à-vis des schistosomes.

Comme la majorité des helminthes, les schistosomes ne se multiplient pas chez leur hôte définitif. La durée de vie des vers adultes est de 10 ans en moyenne pour *S. mansoni*.

La chronicité de l'infection mais également le caractère dynamique du développement du parasite dans l'organisme hôte, expose ce dernier de façon répétée à un grand nombre d'antigènes depuis le stade larvaire jusqu'aux stades adulte et enfin oeuf, du parasite.

La "parade" habituelle du système immunitaire face à des stimulations répétées ou continues, est de diminuer ou de moduler la réponse, de façon à éviter les hyper-réactivités qui auraient des conséquences néfastes pour l'organisme hôte. Dans le cas de l'infection par *S. mansoni*, cette modulation existe et pourrait expliquer le contrôle de la réaction granulomateuse.

La nature même du cycle de vie du parasite est un des éléments-clés permettant de comprendre le caractère unique de l'immunologie de la schistosomiase.

III.2.a. L'immunité concomitante.

A des degrés divers, la plupart des espèces animales développent une résistance à la réinfection par *S. mansoni*. Cette immunité est d'un caractère particulier puisqu'elle est dirigée contre les formes larvaires d'une nouvelle infection, alors même qu'elle est inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme.

Le terme d'immunité concomitante a été proposé en 1969 par Smithers et Terry pour décrire cette situation tout-à-fait particulière où une immunité à la réinfection apparaît en présence d'une infection active. Des travaux réalisés *in vivo* par transfert de vers adultes dans différents organismes hôtes et *in vitro* (Smithers, S. R. et Terry, R. J. 1967), ont permis de montrer que peu de temps après leur pénétration, les jeunes schistosomes acquièrent à leur surface des antigènes de l'hôte ce qui les protègent contre l'attaque immune qu'ils ont eux-mêmes déclenchée.

Par ailleurs, ce concept implique qu'il existe certaines communautés antigéniques entre le schistosome adulte et le schistosomule.

II.2.b. Les composantes de la réponse immune vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*.

Le parasite vivant dans les vaisseaux, libère des produits métaboliques d'excrétion ou de sécrétion, sources d'antigènes circulants présents sous forme libre ou d'immun-complexes, qui pourront stimuler le système immunitaire de l'hôte.

* L'immunité développée contre *S. mansoni* est **thymo-dépendante**. En effet, des animaux à fonction thymique déficiente présentent une très faible résistance à la réinfection (Capron, M. *et al.*, 1983; Phillips, S. M. *et al.*, 1983). Le caractère thymodépendant de l'immunité vis-à-vis de *S. mansoni* implique une coopération entre les deux principaux compartiments du système immunitaire: celui des lymphocytes B et celui des lymphocytes T.

* Néanmoins, contrairement aux infections bactériennes et virales, les lymphocytes T ne semblent pas impliqués directement dans des mécanismes de cytotoxicité contre le parasite (Butterworth, A. E. *et al.*, 1979^a). Bien que des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques d'alloantigènes soient capables de se fixer sur le parasite recouvert par le même alloantigène, aucune destruction du parasite n'est observée. Ces mêmes CTL sont cependant capables d'exercer leur activité cytotoxique vis-à-vis de cellules cibles tumorales appropriées.

Plus récemment, il était démontré que des lymphocytes T stimulés par des mitogènes, des antigènes solubles ou des alloantigènes pouvaient "tuer" le schistosomule (Ellner, J. J. *et al.*, 1982). La pertinence *in vivo* de cette observation reste toutefois très discutée.

* Cependant, si les cellules T ne participent pas directement à la destruction du parasite leur implication indirecte n'en est pas moins effective:

- par leur rôle inducteur de la prolifération et différenciation des cellules B qui produiront des anticorps impliqués dans des mécanismes de cytotoxicité cellulaire mettant en jeu d'autres cellules effectrices.
- par la production de certaines lymphokines qui pourront activer directement les cellules effectrices en l'absence d'anticorps.

* C'est ainsi que nous avons choisi de détailler à présent l'immunité protectrice, en considérant:

- l'immunité non spécifique
- et
- l'immunité spécifique dépendante d'anticorps ou de lymphokines

III.3. Les mécanismes de l'immunité non spécifique.

La part de l'immunité non spécifique dans la réponse immune développée contre *S. mansoni* est plus difficile à apprécier que celle de l'immunité spécifique; dans celle-ci, le parasite est affecté - voire détruit - par une réponse humorale ou cellulaire résultant toujours d'une sensibilisation préalable de l'hôte.

Toutefois, il est important de garder présente à l'esprit l'existence de tels mécanismes qui participent également à la résistance de l'organisme hôte vis-à-vis de l'infection parasitaire.

III.3.a. Le complément.

* Les cercaires (Machado, A. J. *et al.*, 1975), comme les schistosomules (Sher, A. 1976), sont capables d'activer la voie alterne du complément *in vitro*.

De plus, les cercaires (Machado, A. J. *et al.*, 1975) ou les schistosomules (Tavarès, C. A. P. *et al.*, 1978; Santoro, F. *et al.*, 1979) peuvent être "tués" *in vitro* par le complément activé par la voie alterne. Cette activité cytocide du complément peut être amplifiée en présence de cellules portant des

recepteurs pour le C3b, activées en présence de complément mais en l'absence d'anticorps spécifiques (Ottesen, E. A. *et al.*, 1977; Ramalho-Pinto, F. J. *et al.*, 1978; Mc Kean, J. R. *et al.*, 1981).

Chez le rat, la déplétion en complément conduit à une diminution très significative de l'immunité à la réinfection (Santoro, F *et al.*, 1982). Par contre l'utilisation de souris déficientes en complément ne montre aucune différence quant au développement de la résistance (Sher, A. *et al.*, 1982).

* La présence de récepteurs pour le C1q (Santoro, F. *et al.*, 1980; Ouaissi, A. *et al.*, 1981) et le C3b (Ouaisi, A. *et al.*, 1980; Samuelson, J. C. *et al.*, 1980) à la surface du schistosomule, est également à considérer. En effet il a été démontré que ces structures vont pouvoir inhiber la cascade d'activation du complément (Faeron, D. T. 1980; Iida, K. *et al.*, 1981), ce qui peut représenter un moyen d'évasion pour le parasite.

* En 1982, Ruppel, A. *et al.* étudient la résistance vis-à-vis de *S. mansoni* chez des souris ayant un taux normal de composant C5 (la lignée B10.D2 "nouvelle") par rapport à des souris déficientes en C5 (la lignée B10.D2 "ancienne"). Ils démontrent un développement meilleur des vers chez les souris ayant un taux normal de C5: le C5 réagirait avec le C3b présent à la surface du parasite limitant ainsi l'activité cytocide du complément.

III.3.b. Les cellules "natural killer" (NK).

L'augmentation d'une activité de type NK a été rapportée dans la schistosomiase murine (Attalah, A. M. *et al.*, 1980; Abe, T. *et al.*, 1983) mais il n'y a aucune évidence d'un rôle direct de ces cellules sur la cible larvaire. Une altération de ces activités dans des infections aiguës ou des formes hépatosplénomégaliqes graves, a été suggérée chez l'homme (Barsoum, I. S. *et al.*, 1984).

III.3.c: Les macrophages.

Certaines activations du macrophage conduisent à une activité létale de cette cellule vis-à-vis du schistosomule et en absence d'anticorps spécifiques. Le MIF : Macrophage Inhibitory Factor, des IgG agrégées non spécifiques en présence de complément, sont capables de rendre des macrophages normaux cytotoxiques pour le parasite (Bout, D. *et al.*, 1981, Auriault, C. *et al.*, 1981).

Toutefois, bien que cela soit clairement établi chez la souris, l'existence de ces mécanismes chez l'homme reste très discutée puisque l'activité létale des monocytes décroît au cours de la schistosomiase humaine (Olds, G. R. *et al.*, 1981; Nogueira-Machado, J. A. *et al.*, 1983).

III.3.d. La réaction inflammatoire.

L'efficacité de la réaction inflammatoire déclenchée par la pénétration du parasite est également importante. La démonstration du rôle crucial joué par cette réponse dans l'immunité protectrice de la souris, a été apportée par Mc Laren, D. J. *et al.*, en 1987. L'administration d'un anticorps monoclonal de rat spécifique des neutrophiles de souris, diminue de 45% le développement de l'immunité concomitante.

Par ailleurs, Mahmoud, A. A. F. *et al.*, (1979) démontrent que l'on peut obtenir une augmentation de la résistance à la réinfection après induction des réactions inflammatoires par des agents chimiques ou bactériens. De même, Bout, D. *et al.*, (1986) montrent que des plaquettes saines incubées avec une protéine inflammatoire (CRP = C- Reactive Protein) produite notamment au cours de l'infection par *S. mansoni* sont capables de "tuer" des schistosomules *in vitro*, en l'absence d'anticorps. Le transfert passif des plaquettes activées par la CRP conduit à une protection significative contre

l'infection.

III.4. Les mécanismes de l'immunité spécifique.

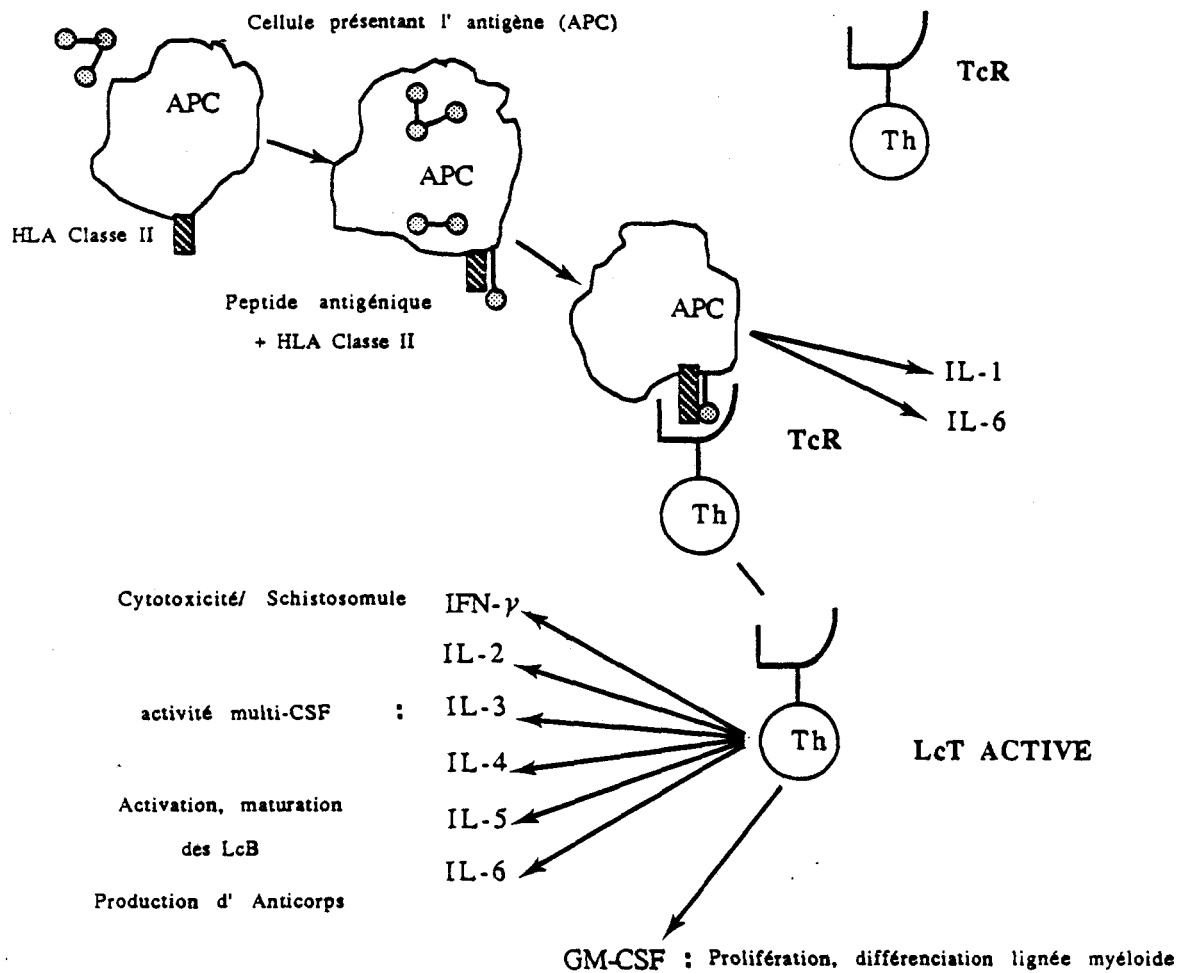
Le système immunitaire contrôle la résistance à la réinfection par *S. mansoni* mais également les mécanismes de régulation de la pathologie associée à l'infection.

La nature thymodépendante de l'immunité vis-à-vis de *S. mansoni* implique que la prolifération puis la différenciation des cellules de la lignée B (LcB: lymphocyte B), nécessitent l'aide des cellules de la lignée T (LcT: lymphocyte T). En effet, les LcT activés à la suite de la reconnaissance spécifique de l'antigène, produisent de nombreux médiateurs solubles appelés "lymphokines" dont certains faciliteront la réponse des LcB face au même antigène (Figure 4).

Cette coopération étroite et réciproque entre les cellules T et les cellules B - (en effet si les produits de sécrétion des LcT aident à la maturation des LcB en cellules productrices d'anticorps, il a été démontré que lymphocytes B et anticorps interviennent dans la sélection puis le maintien du répertoire T d'un individu (Martinez, A. *et al.*, 1988) - rend donc inadéquate la totale séparation de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire. En réalité, cette distinction sera faite sur la base de la nature (humorale ou cellulaire) des mécanismes effecteurs impliqués dans la protection contre le parasite.

III.4.a. Immunité spécifique dépendante d'anticorps: mécanismes et cellules effectrices.

L'immunité à la réinfection chez le rat est essentiellement basée sur ce premier type de mécanismes effecteurs. C'est pourquoi ce modèle expérimental est le plus approprié à l'étude des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC):



Intéactions cellulaires pendant l'induction puis le développement d'une réponse immunitaire contre les antigènes de *S. mansoni* (modèle minimal).

Captation et dégradation de l'Ag par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) conduisant à l'expression en surface des APC de fragments antigéniques associés aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Reconnaissance du complexe Ag + Classe II du CMH par le Th portant un récepteur spécifique à sa surface.

Résultant en la production d' IL-1 par les macrophages

fixation de l' IL-1 sur son récepteur

expression du r-IL-2

production d' IL-2

Les LcTh stimulés libèrent de nombreuses lymphokines qui vont agir sur la prolifération et/ou la maturation des autres populations cellulaires.

Figure 4

* L'infection du rat par *S. mansoni* conduit à une réponse humorale très importante avec une production remarquable d'anticorps anaphylactiques (Sadun, E. H. *et al.*; 1970; Rousseaux-Prévost, R. *et al.*, 1978): IgE et IgG2a.

* Dès 8 à 10 jours après la pénétration, les jeunes parasites libèrent de grandes quantités de produits métaboliques : c'est ainsi que des antigènes circulants et des immun-complexes se retrouveront dans la circulation de l'hôte (Santoro, F. *et al.*, 1978, Stevens, W. J. *et al.*, 1983).

* Des expériences de transfert de sérum (Capron, A. *et al.*, 1980^a) ou traitement par des anticorps anti- μ (Bazin, H. *et al.*, 1980), montrent le rôle essentiel de la réponse humorale dans l'immunité protectrice du rat.

* Des études *in vitro* montrent que l'ADCC est un des premiers mécanismes de défense contre le parasite (Capron, A. *et al.* 1980^b).

* L'analyse précise de ces mécanismes d'ADCC montre la participation de cellules effectrices non lymphoïdes - donc non "conventionnelles" - pro-inflammatoires d'origine médullaire: **macrophages, plaquettes et éosinophiles**, ainsi que l'interaction étroite de ces cellules avec des anticorps anaphylactiques (en particulier IgE) (Capron, A. *et al.*, 1987^a).

* Enfin, la cible de ces mécanismes d'ADCC est le stade larvaire du parasite, le ver adulte n'étant aucunement affecté (Dessein, A. *et al.*, 1981).

4. a. 1: Les macrophages.

* Les tous premiers travaux réalisés par Capron, A. *et al.*, (1975^{a,b}) montraient que des macrophages de rat devenaient cytotoxiques pour le schistosomule en présence de sérums immuns non chauffés. Cette activité était inhibée par chauffage à 56 °C et non restaurée par l'addition d'une source de complément frais. Ces résultats laissaient donc supposer la

participation des anticorps de classe IgE, autre facteur thermolabile du sérum. L'activité des sérums immuns pouvait être supprimée par déplétion en IgE mais non en IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM ou IgA (Capron, A. *et al.*, 1977).

* La présence de récepteurs pour l'IgE à la surface des macrophages de rat a ensuite été démontrée (Dessaint, J. P. *et al.*, 1979; Boltz-Nitulescu, G. *et al.*, 1981).

* L'étape initiale du mécanisme d'ADCC médiée par les macrophages et dépendant d'IgE, est une étape d'adhésion de la cellule au parasite. Il ne s'agit pas d'un effet direct sur la surface de la larve mais sur le compartiment sub-tégumental, en particulier les cellules musculaires et les mitochondries (Mac Laren, D. J. et James, S. L. 1985).

4. a. 2: Les plaquettes.

La participation des plaquettes en tant que cellules effectrices dans l'immunité anti-*S. mansoni* a été démontrée par Joseph, M. *et al.* (1983). Des plaquettes prélevées chez le rat 5 à 8 semaines après infection sont capables de "tuer" *in vitro* des schistosomules. L'immuno-adsorption des IgE ou l'inhibition par des protéines myélomateuses, indiquent clairement la nature IgE dépendante du mécanisme d'ADCC médié par les plaquettes.

La démonstration de l'existence d'un récepteur pour l'IgE à la surface des plaquettes est récente (Joseph, M. *et al.*, 1986). Ce récepteur pourrait être le même que celui des macrophages et des éosinophiles mais cela reste à vérifier.

4. a. 3: Les éosinophiles.

Parce que l'hyper-éosinophilie est une des caractéristiques majeures

de l'infection par *S. mansoni*, il était légitime d'étudier le rôle éventuel de l'éosinophile comme cellule effectrice vis-à-vis du parasite.

* La fonction effectrice des éosinophiles a ainsi pu être démontrée chez l'Homme (Butterworth, A. E. *et al.*, 1975), le Babouin (Butterworth, A. E. *et al.*, 1976^a), le Rat (Mc Kenzie, C. D. *et al.*, 1977) et la Souris (Kassis, A. I. *et al.*, 1979).

* La connaissance du mécanisme d'ADCC médié par les éosinophiles vient en grande partie de travaux réalisés dans notre laboratoire, utilisant le rat comme modèle d'expérience.

Ce mécanisme dépend de 2 classes d'anticorps anaphylactiques: l'IgE (Capron, M. *et al.*, 1981^a) et l'IgG2a (Capron, M. *et al.*, 1978).

Ces travaux ont également permis de montrer la participation des mastocytes comme cellules accessoires. Ces cellules libèrent un médiateur chimio-attractif pour l'éosinophile: l'ECF-A: Eosinophil Factor of Anaphylaxis (Capron, M. *et al.*, 1981^b).

De plus, Auriault, C. *et al.* (1983) ont démontré qu'une activité protéasique de type collagénase libérée par la larve, augmente l'activité schistosomicide de l'éosinophile. Cet effet est associé à une expression accrue de récepteurs pour la partie Fc des IgG sur la cellule.

* La plupart des travaux réalisés jusqu'à présent montrent qu'il y a interaction directe entre l'éosinophile et la surface de la larve, cette interaction étant médiée par un ligand. Les éosinophiles portent à leur surface des récepteurs pour la partie Fc des IgG (Rabellino, E. M. et Metcalf, D. 1975; Butterworth, A. E. *et al.*, 1976^b) et pour le C3 (Tai, P. C. et Spry, C. J. 1976) C3b et C3d (Anwar, A. R. et Kay, A. B. 1977).

Plus récemment, Capron, M. *et al.*, 1981^c, ont démontré la présence de récepteurs pour l'IgE à la surface de cette cellule.

* Des études de microscopie électronique ont montré qu'après interaction étroite de l'éosinophile avec la surface du parasite, la cellule libère le contenu de ses granules sur la surface de la cible (Mac Laren, D. J.

et al., 1978). L'éosinophile se sépare alors du schistosomule du fait de l'accumulation du contenu des granules entre la cellule et sa cible. La cytotoxicité qui est ensuite observée ferait intervenir des composantes telles que la peroxydase de l'éosinophile (Capron, M. *et al.*, 1988), la MBP (Major Basic Protein) (Butterworth, A. E. *et al.*, 1979^b) ou l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) (Mac Laren, D. J. *et al.*, 1981).

III.4.b L'immunité spécifique dépendante de lymphokines.

La seconde catégorie de mécanismes effecteurs jouant un rôle important dans l'immunité protectrice anti-*S. mansoni*, est celle dépendante de lymphokines.

Les lymphocytes T activés et les macrophages sécrètent de nombreuses molécules qui représentent autant de signaux essentiels pour les autres cellules lors de la réponse immunitaire.

Par l'intermédiaire de certaines lymphokines sécrétées par la cellule T (IL-2, IL-4, IL-5), la cellule B poursuit sa maturation jusqu'au stade ultime de différenciation de cette lignée: le stade du plasmocyte sécrétant les anticorps de divers isotypes (Melchers, F. et Andersson, J. 1986). Nous l'avons vu, certaines classes (IgE) et sous-classes (IgG2a) d'anticorps interviendront directement dans les mécanismes d'ADCC contre le schistosomule. Parallèlement, des lymphokines produites par les LcT iront activer les fonctions schistosomicides d'autres cellules effectrices (macrophages, éosinophiles, plaquettes).

Ces mécanismes ont été essentiellement étudiés dans le modèle murin. En effet, les arguments en faveur d'un rôle prédominant de ces mécanismes dans l'immunité à la réinfection de la souris, s'accumulent:

* James, S. L. en 1984^a, démontre que l'immunisation de souris par des antigènes larvaires en présence de BCG et par voie intradermique,

conduit à une protection très significative (51%). Par ailleurs, ces animaux présentent des réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) très fortes en corrélation avec l'immunité.

* L'antigène d'oeuf de *S. mansoni* déclenche une réaction d'HSR responsable de la formation du granulome bilharzien (Boros, D. L. et Warren, K. S. 1970).

* Des expériences utilisant des souris nude montrent que la fonction T est indispensable au développement d'une réaction d'HSR.

* Chez la souris, les études de l'immunité à la réinfection sont essentiellement basées sur 2 modèles expérimentaux:

- celui de l'infection par des parasites vivants avec développement de l'immunité concomitante.

- celui de la "vaccination" par des cercaires irradiées, ne pouvant aller jusqu'à la maturation complète.

L'immunité à la réinfection observée dans chacun de ces 2 modèles n'est pas totalement identique: 1) la résistance acquise après une infection commence avec le dépôt des oeufs et atteint un pic 4 à 6 semaines plus tard (Smithers, S. R. et Terry, R. J. 1967; Dean, D. A. 1983).

Par contre l'immunité qui suit l'injection de parasites irradiés est beaucoup plus rapide, atteignant un plateau 5 semaines après l'infection (Dean, D. A. 1983). 2) l'immunité après infection n'est pas spécifique d'espèce de schistosomes (Smithers, S. R. et Doenhoff, M. J. 1982) tandis que celle acquise après injection de cercaires atténuées est spécifique (Bickle, Q. D. *et al.*, 1985; Moloney, N. A. et Webbe, G. 1987). Dans les 2 cas, la T-dépendance a été démontrée puisque des souris nude ne développent pas de résistance à la réinfection (Sher, A. *et al.*, 1982) et la déplétion *in vivo* en une sous-population de LcT (L3T4) supprime la résistance acquise après une simple exposition à des cercaires irradiées (Kelly, E. A. et Colley, D. G. 1988).

* Les cellules effectrices impliquées dans les mécanismes de

cytotoxicité indépendants d'anticorps, sont de trois ordres: macrophages, éosinophiles et plaquettes. Toutefois, si le lymphocyte T ne peut être considéré comme une cellule directement effectrice, nous verrons que sa participation est centrale et essentielle au développement puis à la régulation, de ces mécanismes.

4. b. 1: Les macrophages.

* Les macrophages activés par des lymphokines sont cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules en absence d'anticorps (Mahmoud, A. A. F. *et al.*, 1979, Bout, D. *et al.*, 1981, James, S. L. *et al.*, 1982).

* Des LcT de souris infectées produisent de l'interféron gamma (IFN γ) après stimulation par des antigènes parasitaires (James, S. L. 1986).

* L'interféron gamma est le principal facteur produit par les LcT, responsable de l'activation des macrophages en cellules effectrices cytotoxiques à la fois pour le jeune parasite ("stade peau": 3 heures après la pénétration) et le parasite "stade post-migration pulmonaire" (4 à 5 jours après la pénétration) (Pearce, E. J. et James, S. L. 1986).

Sans entrer dans la polémique toujours d'actualité concernant le site d'élimination effectif des larves (au niveau de la peau ou immédiatement après le passage par les poumons?), nous pouvons toutefois noter que les larves de 4 à 5 jours sont réfractaires à toutes les attaques *in vitro* étudiées jusqu'à ce jour (en particulier les mécanismes d'ADCC). Deux exceptions : le macrophage activé par l' IFN γ et les protéines cationiques libérées par l'éosinophile et le neutrophile (Mc Laren, D. J. *et al.*, 1984). Ainsi, les jeunes schistosomules deviendraient rapidement résistants aux mécanismes d'ADCC, mais au stade post-pulmonaire, ils resteraient susceptibles à l'action des fonctions effectrices des macrophages dépendantes de lymphokines (Bout, D. *et al.*, 1981).

* Des lignées de souris génétiquement déficientes en fonctions macrophagiques ou en production de lymphokines sont incapables de développer une immunité à la réinfection par *S. mansoni* (James, S. L. et Sher, A. 1983) aussi bien dans le cas d'une immunité concomitante que dans celui d'une immunité acquise après exposition à des parasites atténués.

* Des macrophages sont présents autour des larves au niveau des sites d'élimination du parasite lors d'une infection expérimentale (Ward, R. E. et Mc Laren, D. J. 1987).

Tout ceci suggère très fortement que les mécanismes décrits *in vitro* sont efficaces lors de l'infection et participent à l'immunité développée *in vivo*.

4. b. 2: Les plaquettes.

* Des plaquettes humaines normales incubées avec des surnageants de LcT CD4 stimulés par des antigènes parasitaires sont cytotoxiques *in vitro* vis-à-vis des schistosomules.

* Les caractérisations physicochimiques de ces facteurs suggèrent très fortement la participation de l'IFN γ .

Cette hypothèse a été confirmée par le fait que des anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-IFN γ neutralisent cet effet (Pancré, V. *et al.*, 1987).

De plus, la présence d'IFN γ à des concentrations compatibles avec un effet *in vivo*, dans les surnageants de LcT CD4 de patients infectés ainsi que la vérification que l'IFN γ recombinant possède également cet effet ont établi sans ambiguïté le rôle de l'IFN γ dans l'activité schistosomicide des plaquettes.

* Des expériences de transfert passif de plaquettes incubées avec l'IFN γ la veille de l'infection conduit à une protection importante (70%) (Pancré, V. *et al.*, 1989).

* En plus de son effet direct sur la cytotoxicité plaquettaire, l'IFN γ agit

également indirectement sur la cytotoxicité IgE dépendante en augmentant l'expression du récepteur pour l'IgE à la surface de la plaquette (Panqué, V. *et al.*, 1988).

* Des molécules autres que l'IFN γ et libérées par les LcT après stimulation antigénique, peuvent agir sur la plaquette: dans notre laboratoire, M. Damonville (1988) a montré que le TNF β (et dans une moindre mesure, le TNF α) est capable de rendre les plaquettes cytotoxiques pour les schistosomes. Plus récemment, V. Panqué a démontré que l'IL-6 (Panqué, V. *et al.*, 1990) ou l'IL-4 (Panqué, V. *manuscript en préparation*) sont également capables d'activer l'activité schistosomicide des plaquettes humaines.

* Enfin, l'existence d'une activité suppressive de la fonction cytotoxique plaquettaire a été démontrée dans notre laboratoire (Panqué, V. *et al.*, 1987). La PASL (:Platelet Activity Suppressive Lymphokine) est produite par les LcT après stimulation antigénique. L'action de la PASL peut être reproduite par l' Ubiquitine qui, comme son nom l'indique, est présente dans toutes les cellules. Tout d'abord identifiée dans des préparations d'hormones thymiques (thymosine fraction β_1 et thymopoïétine) (Stutman, O. 1983), les recherches du groupe de Weissman ont montrées que l'ubiquitine intervient dans la migration des lymphocytes du sang vers les tissus lymphoïdes spécifiques, faisant partie des récepteurs de localisation ("homing") des lymphocytes (Gallatin, W. *et al.*, 1986). L'analyse comparative des deux activités a été réalisée très récemment dans notre laboratoire, ce travail est actuellement en cours de publication (Panqué, V. *et al.*, 1991).

4. b. 3: Les éosinophiles.

* Il existe un lien entre la fonction T et l'éosinophilie puisqu'en effet la déplétion en cellules T mais non en cellules B, supprime la réponse

éosinophilique (Vadas, M. A. 1981).

* L'éosinophilie corrèle avec les réactions d'HSR obtenues après immunisation par des antigènes parasitaires en présence de BCG (Colley, D. G. et James, S. L. 1979).

* L'activité cytotoxique des éosinophiles tissulaires ou du sang circulant vis-à-vis des schistosomules et des oeufs, peut être induite par des facteurs relargués par les LcT après stimulation par des antigènes spécifiques (Colley, D. G. et James, S. L. 1979). De plus, ce mécanisme est médié par des lymphokines différentes de celles impliquées dans l'activation des macrophages, en particulier l'IL-5.

* Le TNF active la cytotoxicité des éosinophiles vis-à-vis de la larve de *Schistosoma mansoni* (Silberstein, D. S. *et al.*, 1986)

III.5. Régulation de la réponse immune vis-à-vis de *S. mansoni*; la réaction granulomateuse.

III.5.a: L'hôte contrôle l'invasion par *S. mansoni*.

Nous l'avons vu, les études de la réponse immune de l'hôte vertébré vis-à-vis de l'infection par *S. mansoni*, ont surtout visé à comprendre les bases de la résistance de l'hôte ainsi que la pathologie qui résulte de l'infection. L'exposé des mécanismes effecteurs, spécifiques ou non spécifiques, médiés par des anticorps ou des lymphokines, montre qu'en réalité ces événements n'ont pas lieu indépendamment les uns des autres. Bien au contraire, la coopération entre les compartiments T et B du système immunitaire est totale et aboutit à une régulation extrêmement fine et précise de la réponse vis-à-vis du parasite.

* L'homologie morphologique des lymphocytes T et B contraste très fortement avec leur hétérogénéité fonctionnelle et il y a très peu de cellules de mammifères qui, sous une apparence si semblable, cachent une

si large diversité d'activités. La distinction en LcT et LcB date de 1968 (Mitchell, G. F. et Miller, J. F.), avec la démonstration que les cellules (B) responsables de la production des anticorps, doivent être séparées des cellules (T) responsables des réactions d'HSR, de la cytotoxicité ainsi que de la régulation des fonctions du système immunitaire.

* Par la suite, il fut montré que des LcT ayant des fonctions différentes expriment à leur surface des molécules également différentes (Raff, M. C. et Cantor, H. 1971; Cantor, H. et Boyse, E. A. 1975) ce qui a permis une étude plus précise des spécialisations fonctionnelles des lymphocytes.

Il n'est pas question ici de passer en revue la totalité des **marqueurs de surface** identifiés à l'heure actuelle, simplement les LcT ont tout d'abord été classés en 2 sous-populations:

- les LcT inducteurs ou "helper" que nous appellerons LcTh ou Th.
- les LcT cytotoxiques ou à fonction suppressive.

-Marqueurs de surface de Th/Tc-Tsu-

	T inducteur (Th)	T cytotoxique/supprimeur
- chez l' homme	CD4 (T4)	CD8 (T8)
- chez la souris	L3T4	Lyt2
- chez le rat	W3/25	OX8

* Plus récemment, le domaine de l'Immunologie Cellulaire a été quelque peu "révolutionné" par l'observation que les LcT CD4 (Th) peuvent être divisés au moins en 2 sous-populations sur la base de **productions différentielles de lymphokines** après stimulation antigénique ou mitogénique (Mosmann, T. R. *et al.*, 1986): c'est ainsi que l'on distingue les **Th1** et les **Th2**.

Tous ces travaux découlent d'études de clones T murins et l'existence de sous-populations Th équivalentes chez le rat et plus encore chez l'homme,

est actuellement très discutée.

En plus de profils de sécrétion de lymphokines (LK) distincts - et clairement définis chez la souris - les clones Th1 et Th2 ont des fonctions différentes, résumées dans la **Tableau IV**.

Les LcTh1 sont impliqués dans les mécanismes d'HSR et l'activation des macrophages: ils ont parfois été décrits sous le terme de "T inflammatoires" par certains auteurs (Bottomly, K. *et al.*, 1988). Les LcTh2, quant à eux, sont des "helpers" vrais: 80% des clones Th2 actuellement décrits et toute spécificité confondue, sont capables d'induire la croissance et la différenciation des LcB *in vitro*. Cette nomenclature Th1, Th2 est maintenant admise par tous, mais elle amène tout de même un certain nombre de réflexions. Tout d'abord quant à la transposition à d'autres modèles que la souris (le rat, en particulier) et surtout à l'homme. Ensuite, les Th1 et Th2 ainsi définis ne représentent pas la totalité du compartiment T "helper" : Waldman, H. *et al.* (1976) identifient d'autres sous-populations par des expériences de dilution limite, Tada, T. *et al.* (1978) séparent d'autres populations Th en fonction de l'expression ou de la non-expression de déterminants de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité.

Plusieurs équipes ont décrit des réponses humorales et cellulaires mutuellement exclusives, dans différents modèles expérimentaux (Crowle, A. J. *et al.*, 1966; Parish, C. R. 1972; Heinzel, F. P. *et al.*, 1989).

Si ces réponses sont dues principalement aux Th1 et aux Th2 cela suppose que ces cellules vont contrôler réciproquement leur croissance et/ou leur fonction.

En effet plusieurs mécanismes de régulation de Th1 sur Th2 et vice-versa, ont été décrits:

- l'IFN γ inhibe la croissance des Th2 (Fernandez-Botran, R. *et al.*, 1988; Gajewski, T. F. et Fitch, F. W. 1988).

	Th1	Th2
<u>Marqueurs de surface</u>	L3T4 ⁺ Lyt2 ⁻	L3T4 ⁺ Lyt2 ⁻
<u>Lymphokines</u>		
IFN γ	++	-
IL-2	++	-
Lymphotoxines	++	-
GM-CSF	++	+
TNF	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	++
CSIF* = IL-10	-	+
<u>"Aide aux fonctions B"</u>	+/-	++
<u>Sélection isotypique</u>		
IgM, IgG1	+	++ (IL-4)
IgA	+ (IFN γ et IL-2) (Murray <i>et al.</i> 1985)	++ (IL-4, IL-5) (Murray <i>et al.</i> 1987)
IgG2a	++ (IFN γ) (Snapper et Paul, 1987)	+
IgE	-	++ (IL-4)
<u>Suppression de la réponse B</u>	+ (IFN γ)	non décrit
<u>Hypersensibilité retardée</u>	+ (IFN γ)	-
<u>Activation des macrophages</u>	++ (IFN γ et LT)	-
<u>La "réponse type" attendue</u> <u>/S. mansoni?</u>	activation des macrophages cytotoxicités Ac/LK : Immunité cellulaire	Taux ++ Ac IgE (IL-4) Eosinophilie (IL-5) : Immunité humorale

*Cytokine synthesis inhibitory factor = IL-10

Tableau IV

- la prolifération des Th1 est inhibée par un facteur libéré par les Th2 et encore non identifié (Horowitz, J. B. *et al.*, 1986).

- l'effet de l'IL-4 sur les cellules de la lignée B est inhibé par l'IFN γ (Mond, J. M. *et al.*, 1985; Coffman, R. L. *et al.*, 1986; Snapper, C. M. et Paul, W. E. 1987).

- les Th2 libèrent un facteur: le CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor) différent de celui décrit par Horowitz et qui inhibe la production d'IL-2 et d'IFN γ par les Th1 (Fiorentino, D. F. *et al.*, 1989). Le CSIF, cytokine récemment identifiée, est à présent dénommée IL-10. Produite par les Th2 activés et par les LcB (O' Garra, A. *et al.*, 1990; Suda, T. *et al.*, 1990), l'IL-10 inhibe toute sécrétion de LK par les Th1 mais n'a aucun effet sur leur prolifération (Moore, K. W. *et al.*, 1990).

La nature même des cellules présentatrices d'antigène (CPA) va être essentielle dans l'orientation Th1/Th2 de la réponse immune. Très schématiquement, la présentation de l'antigène par les LcB orienterait vers une réponse de type Th1 tandis que la présentation par les macrophages serait responsable de l'activation des Th1 (Janeway, C. A. Jr. *et al.*, 1988).

Qu'en est-il des Th1/Th2 dans l'infection par *Schistosoma mansoni*?

L'immunité est T-dépendante (Sher, A. *et al.*, 1982), plus précisément Th-dépendante (Kelly, E. A. et Colley, D. G. 1988). La nature Th1 ou Th2 de la réponse immune anti-*S. mansoni* est encore mal connue. Toutefois ainsi que nous l'avons décrit en abordant les mécanismes effecteurs, de nombreux résultats expérimentaux indiquent que les mécanismes dépendants d'anticorps sont essentiels au développement de l'immunité protectrice, en particulier la réponse IgE chez le rat (Capron, A. *et al.*, 1987^b) et chez l'homme (Hagan, P. en Gambie et Dunne, D. W., au Kenya, communications personnelles). En se basant sur le schéma Th1/Th2, cette

réponse serait plutôt de nature Th2.

Par ailleurs, les mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire sont également importants, notamment au niveau de la formation du granulome, comme cela a été démontré chez la souris. Le macrophage étant très largement impliqué dans ces mécanismes (James, S. L. 1986) et l' IFN γ étant la principale LK responsable de son activation (James, S. L. *et al.*, 1984^b), il s'agirait plutôt d'une réponse de type Th1.

Les recherches menées par le groupe d'A. Sher aux Etats-Unis (James, S. L. et Sher, A. 1990; Grzych, J. M., communication personnelle), dans le modèle d'infection ou dans celui de l'immunisation par des parasites atténués, montrent que les 2 types de réponses peuvent exister (en fonction du protocole expérimental) voire même co-exister (selon la réponse que l'on examine):

- l'éosinophilie et la réponse IgE sont sous contrôle des Th2:

Le traitement d'animaux par un anticorps monoclonal anti-IL-4 supprime la réponse IgE, celui par un anti-IL-5 diminue très fortement l'éosinophilie.

- si la réponse Th2 semble dominer lors d'une infection expérimentale par des parasites vivants, l'injection de cercaires irradiés oriente vers une réponse de type Th1 (l'on peut supposer que l'une des raisons est que les Ag parasitaires ne sont pas "vus" de la même façon par le système immunitaire, la "localisation géographique" des réponses n'est probablement pas la même ainsi que la nature des cellules présentant l'antigène).

- la réponse Th2 lors de l'infection est majoritairement dirigée contre les antigènes d'oeuf.

- les animaux traités par un anti-IL-5 présentent une altération considérable de la maturation des éosinophiles présents autour de l'oeuf du parasite. Les granulomes sont pratiquement dépourvus d'éosinophiles qui représentent normalement 40% de la population cellulaire du granulome bilharzien. La conséquence directe en est bien sûr la diminution de la taille

du granulome, la fibrose restant identique à celle des témoins ainsi que le nombre d'oeufs tissulaires et fécaux.

Par contre, un traitement par un anticorps anti-IFN γ n'a aucun effet sur la formation du granulome *in vivo*.

Ainsi, la réponse Th2 dirigée contre les antigènes d'oeufs au cours de l'infection, va impliquer des LK autres que l'IL-5 au niveau de la réaction granulomateuse.

La réaction autour de l'oeuf de schistosome, qui est une manifestation d'HSR (Boros, D. L. et Warren, K. S. 1970) par définition médiée par les Th1, fait donc également intervenir une réponse de type Th2.

Il a été décrit par Mathew, R. C. et Boros, D. L. en 1986, que l'activation des Th est indispensable à la formation du granulome. Un granulome en phase aiguë a un diamètre de 350 μm et est très riche en cellules: éosinophiles, phagocytes, fibroblastes, lymphocytes et neutrophiles. Puis, il va y avoir diminution de la taille du granulome qui, de cellulaire devient fibreux.

Les mécanismes qui interviennent dans le développement puis la modulation du granulome sont très complexes: l'IL-2 et l'ESP (eosinophil stimulation promoter) interviennent (James, S. L. et Colley, D. G. 1978), ainsi que les facteurs d'activation ou d'inhibition de la migration du macrophage (MAF, MIF), des facteurs de stimulation des fibroblastes (Wyller, D. J. *et al.*, 1978) et des produits dérivant de la cascade du complément (Kunkel, S. L. *et al.*, 1984). Des facteurs sériques interviennent également dans la régulation négative du granulome, en particulier des anticorps anti-idiotypiques mimant des épitopes d'Ag d'oeufs (Powell, M. R. et Colley, D. G. 1985).

L'étude de la modulation spontanée de la réponse granulomateuse revêt un intérêt certain puisque souvent, parallèlement à la formation de ces petits granulomes, une amélioration de la physiopathologie de la maladie est observée.

La régulation négative qui a lieu durant la phase chronique est initiée par des LcT Lyt2 (Doughty, B. L. et Phillips, S. M. 1982). Il existe très peu de données dans la littérature sur la nature des sécrétions des Lyt2, toutefois l'étude des quelques clones murins Lyt2 montre un profil de sécrétion identique à celui des Th1 (Prystowsky, M. B. *et al.*, 1982; Kelso, A. *et al.*, 1984). Pendant la phase chronique, il y a donc production d'IFN γ autour de l'oeuf or il est clair que l'IFN γ joue un rôle essentiel dans la régulation du granulome en diminuant la synthèse de collagène par les fibroblastes. De plus, des récepteurs pour l'IFN γ , le TNF et l'IL-1 ont été décrits à la surface de la matrice de collagène (Grimaud, J. A. 1990). Le rôle de ces récepteurs n'est pas connu actuellement.

Pour résumer, l'immunorégulation du granulome est le résultat de mécanismes multiples agissant de concert de façon à ce que l'organisme hôte s'adapte le mieux possible à la libération d'antigènes d'oeufs qui va persister très longtemps. L'immunorégulation correcte de la réponse granulomateuse est bénéfique pour l'hôte: des animaux athymiques infectés développent une morbidité très importante (Phillips, S. M. *et al.*, 1980), les lésions du tissu hépatique sont plus nombreuses (Byram, J. E. et von Lichtenberg, F. 1977). Des animaux sans fonction B ne modulent pas leur granulome (Cheever, A. W. *et al.*, 1985). Des animaux déficients en éosinophiles ne peuvent cataboliser l'oeuf (Olds, G. R. et Mahmoud, A. A. F. 1980).

III.5.b: Le parasite contrôle et régule la réponse immune de l'hôte.

Parallèlement aux mécanismes de régulation que met en place l'hôte pour contrôler et limiter l'infection parasitaire, le parasite développe de son côté des mécanismes remarquables d'ingénuité pour échapper aux

réponses immunes de l'hôte (pour revues: Smithers, S. R. et Doenhoff, M. J. 1982; Mac Laren, D. J. 1984^b).

Nous n'allons pas les décrire tous et nous avons choisi d'évoquer uniquement ceux qui vont contrôler les fonctions effectrices exposées précédemment.

* Dessaint, J. P. *et al.* (1977) décrivent la libération par les vers adultes de *S. mansoni* d'un facteur de faible poids moléculaire, capable d'inhiber sélectivement la prolifération lymphocytaire. Ce facteur a été dénommé SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor). Le SDIF inhibe également la génération des CTL ainsi que leur activité cytolytique. Enfin, un effet inhibiteur de la réponse IgE est obtenu *in vivo* par traitement avec le SDIF. Cet effet est observé aussi bien en réponse primaire qu'en réponse secondaire, et chez des rats bons ou mauvais producteurs d'IgE.

Enfin, le SDIF inhibe la dégranulation mastocytaire *in vitro* et *in vivo* et donc par conséquent l'activation des éosinophiles en cellules effectrices schistosomicides. Le mécanisme de cytotoxicité dépendant des plaquettes est également inhibé par le SDIF.

En créant une immunosuppression chez l'hôte, le SDIF pourrait participer à l'un des mécanismes de défense du parasite.

* Contrairement au ver adulte, les produits d'incubation du schistosomule (SRP) (:Schistosomule Released Products) augmentent de façon non-spécifique la prolifération des LcT et des LcB (Auriault, C. *et al.*, 1984^a).

* Régulation de l'activité des macrophages.

Auriault, C. *et al.* (1981) montrent l'hydrolyse des IgG fixées à la surface du schistosomule par des enzymes parasitaires du groupe des sérine protéases et des métalloprotéases. Les peptides résultant de ce "découpage" enzymatique présentent une activité inhibitrice importante de l'activité des macrophages (Auriault, C. *et al.*, 1980). En effet, ils diminuent

fortement la cytotoxicité des macrophages dépendante d'IgE vis-à-vis du schistosomule. La molécule responsable de cet effet inhibiteur est un tripeptide : le TKP (Thr- Lys- Pro). De plus, l'injection de TKP à des souris infestées par *S. mansoni* se traduit par une diminution importante de la formation des granulomes (Himmi, E. H. *et al.*, 1985).

Enfin, après hydrolyse des IgG, la partie Fc restant fixée à la membrane de schistosomule peut activer le complément par la voie classique. Cette consommation de complément pourrait avoir comme conséquence une diminution des mécanismes effecteurs dépendant du complément.

*** Par des anticorps bloquants.**

L'intervention des anticorps bloquants dans la régulation de la fonction effectrice des éosinophiles fut démontrée par Grzych, J. M. *et al.* (1984) à partir d'une étude réalisée sur un anticorps monoclonal anti-schistosomule de classe IgG2c reconnaissant le même antigène qu'un anticorps IgG2a cytotoxique en présence d'éosinophile (Grzych, J. M. *et al.*, 1982). Alors que cet anticorps IgG2c n'exprime aucune activité cytotoxique pour le schistosomule, il empêche *in vitro* l'activité des IgG2a.

Ainsi l'immunologie de la schistosomiase est caractérisée par des vagues d'attaques contrecarrées par des mécanismes d'échappement ou de régulation du parasite interférant avec les réponses immunes effectrices.

A la fois pour les mécanismes effecteurs mis en jeu contre le ver adulte ou l'oeuf, et pour la réponse granulomateuse développée autour de l'oeuf, des facteurs humoraux et cellulaires interviennent. La détermination des isotypes d'anticorps produits, leur spécificité épitopique; la connaissance des lymphokines libérées (au niveau des LcT en périphérie du granulome, il serait intéressant d'analyser la production de LK *in situ*), permettront peut-être, par le choix de protocoles

expérimentaux judicieux, de moduler la réponse immune et de l'orienter vers celle qui sera bénéfique pour l'organisme hôte.

III.6. Approche génétique de l'immunité vis-à-vis de *S. mansoni*.

En 1979, Wassom, D. L. *et al.* démontrent que les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) jouent un rôle dans la résistance des souris à l'infection par le parasite nématode *Trichinella spiralis*. Il s'agissait de la première démonstration directe de l'influence du CMH sur la résistance ou la susceptibilité d'un organisme hôte vis-à-vis d'une infection parasitaire même si, dès 1942 Ackert avait décrit l'importance de la Génétique dans l'immunité développée contre de nombreuses helminthiases, en particulier la schistosomiase.

Le contrôle génétique de la réponse immune de l'hôte à l'infection par le parasite est très complexe. Les gènes impliqués sont nombreux et situés à différents loci dans, mais aussi parfois en dehors, du CMH.

III.6.a. Influences génétiques sur la résistance ou la susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*

6. a. 1: Résistance naturelle.

La relation du parasite avec son hôte est le résultat d'une très longue évolution au cours de laquelle le parasite a développé des mécanismes lui permettant de survivre dans l'environnement structural et physiologique de l'hôte. Ces mécanismes restent encore peu connus.

6. a. 2: Résistance acquise.

Les mécanismes de la résistance acquise que nous avons détaillés précédemment, représentent pour l'hôte la meilleure façon de contrôler l'infection par un parasite qui, de son côté, s'est parfaitement adapté à la survie dans l'organisme hôte.

Des facteurs génétiques peuvent influencer ces mécanismes tant au niveau de leur initiation que de leur expression. Ainsi, les variations génétiques au sein d'une population hôte se reflèteront dans le contrôle plus ou moins réussi de l' infection.

III.6.b. Analyses expérimentales de l'influence génétique sur la résistance ou la susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*.

La souris est l'animal le plus utilisé pour ce type d'analyse, en effet son CMH (appelé H-2) est parfaitement connu. C'est le seul CMH pour lequel tous les loci ont été identifiés et positionnés. Le H-2 est situé sur le chromosome 17 et est divisé en régions et sous-régions:

* Les régions H-2 K, H-2 D et H-2 L codent pour les Ag de classe I. Ces antigènes sont de nature glycoprotéique et sont présents à la surface de toutes les cellules d'un organisme: ils sont également appelés "Ag d'histocompatibilité" ou "Ag de transplantation".

* La région H-2 I regroupe plusieurs gènes codant pour des glycoprotéines uniquement exprimées à la surface de certaines cellules de l'organisme (les LcB, LcT, macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques, les spermatozoïdes). Ces molécules constituent les Ag de classe II ou "Ag Ia". La région I est divisée en 2 sous-régions: I-A et I-E.

* La région H-2 S est située entre H-2 I et H-2 D, elle ne fait pas

partie, au sens physiologique du terme, du complexe H-2. En effet, elle code pour des molécules qui n'ont aucune homologie avec les produits des régions H-2 K, I, D et L. Les produits de la région S sont des protéines sériques sécrétées par les cellules hépatiques.

Par ailleurs, il existe de très nombreuses lignées de souris dont la constitution génétique (en particulier au niveau du H-2) est parfaitement connue.

C' est ainsi que l'on définit:

- des lignées prototypes.

L'une des principales caractéristiques des Ag du CMH est de présenter un polymorphisme moléculaire très important.

L'**haplotype** définit une collection particulière d'allèles des gènes du H-2: tous les individus d'une lignée prototype sont homozygotes pour l'ensemble des allèles représentant l'haplotype.

Les souris appartenant aux lignées prototypes sont représentatives des haplotypes prototypes connus (une vingtaine actuellement).

Par exemple: Balb/c est d'haplotype H-2^d : { K^d I^d S^d D^d L^d }
 C57Bl. 10 est d'haplotype H-2^b : { K^b I^b S^b D^b L^b }
 CBA est d'haplotype H-2^k : { K^k I^k S^k D^k L^k }

- des lignées congéniques (souches I)

Des souris congéniques sont génétiquement identiques sauf au niveau d' un segment de chromosome de longueur non définie et incluant le complexe H-2.

- des lignées congéniques recombinantes (souches RI).

Des souris congéniques recombinantes diffèrent uniquement au niveau

d'une zone strictement égale au complexe H-2.

Par croisement successifs de lignées RI, on peut obtenir des hybrides intra-H-2 et ainsi "disséquer" les gènes du CMH et étudier leur influence sur les réponses immunes.

- des lignées "sélectionnées".

Gowen, en 1960, sélectionne des souches susceptibles ou résistantes vis-à-vis de maladies infectieuses. Biozzi, G. *et al.* (1972; 1985) produisent des lignées bonnes ou mauvaises productrices d'anticorps.

L'intérêt des lignées sélectionnées est de pouvoir analyser les relations biologiques entre une fonction du système immunitaire et la réponse de l'hôte à l'infection.

La constitution génétique des souris influe à la fois sur la pathologie et sur la réponse immune lors de l'infection par *Schistosoma mansoni*:

* Des animaux de H-2 différents, infectés, n'ont pas la même charge parasitaire (Fanning, M. M. *et al.*, 1984) et ne modulent pas le granulome ni l'hépatosplénomégalie de la même manière (Fanning, M. M. *et al.*, 1981; 1985).

* Les anticorps produits lors de l'infection de souris de H-2 différents ne reconnaissent pas les mêmes antigènes (Kee, K. C. *et al.*, 1986). La spécificité et la fonctionnalité des lymphocytes T sont également différentes (James, S. L. *et al.*, 1981).

* Blum, K. et Cioli, D. (1978) infectent par *S. mansoni* des souris "Biozzi" bonnes ou mauvaises productrices d'anticorps. Ils constatent que la résistance naturelle à l'infection, mesurée par le nombre de vers et d'oeufs présents dans le foie, est plus forte chez les mauvaises productrices tandis que la résistance à la réinfection est semblable chez les 2 lignées. Ce qui suggère là encore le rôle de l'immunité à médiation cellulaire lors de la

réinfection, dans le modèle murin.

* Des souris d'haplotypes différents ne développent pas la même résistance après vaccination par des cercaires irradiées (Sher, A. *et al.*, 1984).

Pour le moment, aucune corrélation directe n'a pu être établie entre une constitution génétique particulière et un type de réponse ou une pathologie caractéristiques lors de l'infection par *S. mansoni*. Ce qui laisse supposer la complexité de la régulation génétique de la réponse anti-*S. mansoni*, avec l'intervention de gènes situés dans le H-2 mais aussi en dehors de cette région (Bickle, Q. *et al.*, 1980; Dean, D. A. *et al.*, 1981; Fanning, M. M. *et al.*, 1981).

Par ailleurs, le MHC contrôle la réponse immune d'un organisme vis-à-vis de certains antigènes (Benacerraf, B. *et al.*, 1972).

L'un des moyens de contrôle est la restriction de reconnaissance de l'Ag par les LcT: en effet même si quelques exceptions ont été décrites, les Th sont restreints par les Ag de classe II, tandis que les T cytotoxiques sont restreints par les Ag de classe I.

Les lignées R ou RI sont particulièrement utiles pour étudier le contrôle génétique de la réponse immune lors de l'infection par le parasite mais également après immunisation par des Ag ayant des propriétés "vaccinantes". En effet, l'utilisation d'un large éventail d'H-2, permettra de définir des haplotypes déterminant une bonne ou une mauvaise réponse vis-à-vis de l'infection ou de l'immunisation. L'intérêt de ce type d'analyse est de se rapprocher de la situation humaine dans laquelle les individus seront, bien que l'exposition au parasite soit équivalente, plus ou moins susceptibles à l'infection. L'on peut par ailleurs considérer que l'objectif principal d'une vaccination est de protéger les individus les plus susceptibles à l'infection et d'utiliser une préparation antigénique reconnue par le système immunitaire du plus grand nombre possible d'individus.

**IV. LA REPOSE IMMUNE CONTRE *SCHISTOSOMA MANSONI*
CHEZ L' HOMME.**

Ce chapitre décrit les réponses immunes que les schistosomes stimulent chez l'homme et discute les rôles que différents mécanismes de l'immunité sont supposés jouer. Il est maintenant clair que l'immunité à l'infection est essentielle dans la détermination de la prévalence et de l'intensité de l'infection chez les individus dans les régions endémiques. Cette affirmation aurait été difficile à supporter (Warren, K. S. 1982) sans les résultats des études de réinfection. Ces études essaient de relier des tests *in vitro* de réactivité immunologique, aux niveaux de réinfection après traitement.

IV.1. Quelques définitions et caractéristiques de l'épidémiologie de la schistosomiase humaine.

* La prévalence de l'infection représente la proportion d'individus infectés à un moment donné: elle est généralement exprimée sous forme de pourcentage.

* L'incidence de l'infection représente la fréquence d'apparition de nouvelles infections dans une population parfaitement définie et sur une période donnée. L'incidence donne des informations sur les conditions de transmission dans une région particulière, elle permet également d'évaluer l'effet de différentes mesures de contrôle (traitement des patients, emploi de molluscicides) sur la transmission (l'efficacité du contrôle se traduira par une réduction de l'incidence).

* L'intensité de l'infection mesure la charge parasitaire chez un sujet ou un groupe de sujets, cette mesure est en réalité indirecte puisqu'il s'agit du nombre d'oeufs excrétés.

Il y a eu peu d'études sur la relation entre la charge parasitaire et le nombre d'oeufs excrétés. Toutefois, si dans les infections "récentes" il y a une corrélation entre la charge parasitaire, le nombre d'oeufs et la

pathologie, par contre dans les infections chroniques cette corrélation peut ne plus exister. De plus, des analyses récentes (Medley, G. et Anderson, R. N. 1985; Smith, G. 1987) montrent que dans les cas d'infections massives, les couples de vers pondent moins d'oeufs.

La prévalence et l'intensité de l'infection sont reliées: en général, plus la prévalence est élevée dans un groupe et plus l'intensité d'infection est importante (Jordan, P. 1972).

*** Corrélation entre la fréquence des contacts avec l'eau parasitée et l'infection.**

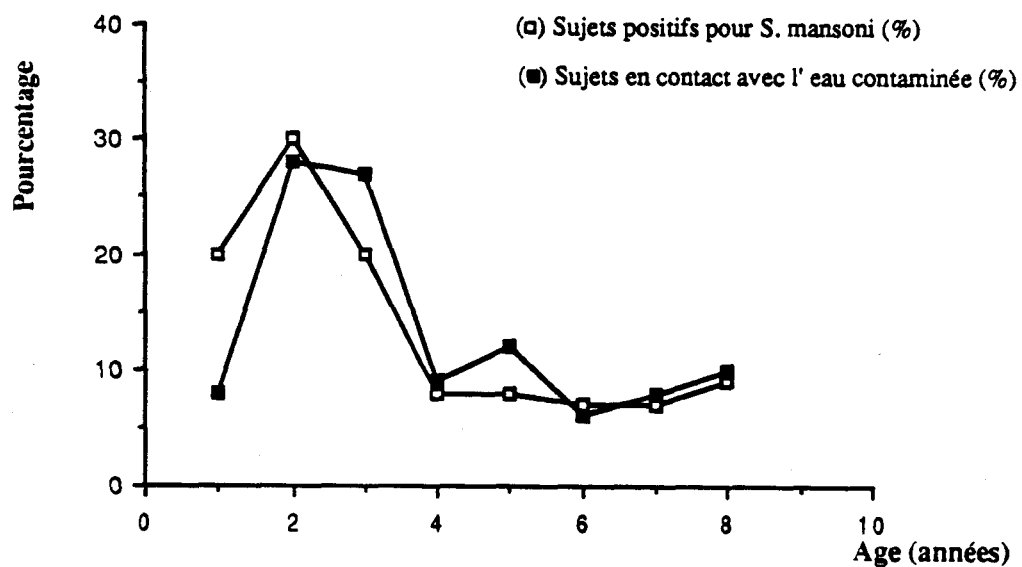
Des mesures du contact d'une population avec l'eau infectée, associées à des études parasitologiques et biologiques, sont essentielles pour mieux comprendre et évaluer l'infection.

En général, les femmes sont plus fréquemment en contact avec l'eau parasitée que les hommes (collecte de l'eau à rapporter au village, lavages de vêtements ou d'ustensiles) et les enfants ont plus de contacts que les adultes (lorsqu'ils se baignent ou jouent).

Le risque d'infection va dépendre de nombreux facteurs: la durée d'exposition, les parties du corps exposées, le moment de la journée (la libération des miracidiums par les mollusques se faisant selon un rythme tout-à-fait précis).

Ainsi, il existe une corrélation entre l'importance des contacts avec l'eau parasitée et la prévalence et l'intensité de l'infection dans une population humaine (Figure 5).

Comme le montre cette figure, les contacts sont très élevés chez les enfants très jeunes (0 à 9 ans) et les adolescents (10 à 20 ans) et, point essentiel, l'évolution de l'intensité de l'infection est tout-à-fait parallèle.



**Corrélation entre la fréquence des contacts avec l'eau et l'infection,
chez des sujets mâles infectés par *S. mansoni* dans une région
endémique à Ste Lucie (Gambie).**

Pour chaque groupe d'âge, le nombre de sujets positifs (□) et les contacts avec l'eau (■) sont exprimés en pourcentage.

Figure 5

(d'après Jordan *et al.* 1980)

*** Distribution de l'intensité de l'infection dans une population humaine.**

L'intensité moyenne d'infection, mesurée par l'excrétion des oeufs est, nous l'avons vu, beaucoup plus importante dans les groupes de sujets jeunes que dans ceux de sujets plus âgés.

De plus, à l'intérieur de chaque groupe d'âge, seul un petit nombre de patients présenteront des infections élevées tandis que la majorité a des infections relativement modérées (Anderson, R. M. et May, R. M. 1985).

Cette observation est commune à de nombreuses helminthiases.

Les raisons en sont nombreuses et impliquent:

- des facteurs comportementaux, sociaux ou démographiques (âge, sexe) qui créeront une hétérogénéité dans la fréquence des contacts avec l'eau parasitée et donc dans le degré d'immunité acquise.

- des facteurs génétiques (contrôlant en partie la compétence immunologique des hôtes).

- et des facteurs nutritionnels (malheureusement, il y a bien souvent association entre ces infections parasitaires et une malnutrition sévère).

*** Prédilection à l'infection par *S. mansoni*.**

La comparaison entre les intensités d'infection d'un même sujet avant et après traitement a permis de définir l'existence de prédilection à l'infection par *S. mansoni*, chez l'homme (Anderson, R. M. et Medley, G. F. 1985).

La question essentielle qu'apporte ce type d'analyse est bien sûr le rôle de l'Immunité et de la Génétique dans ces différences d'infection. Anderson, R. M. et May, R. M. (1985^b) montrent que la diminution de la charge parasitaire chez les adultes est corrélée avec la fréquence d'exposition dans l'enfance. Ce qui signifie que le degré de l'immunité acquise dépend de la sommation d'infections répétées faibles et semble responsable de la diminution de l'établissement et/ou de la survie du parasite (Crombie, J. A.

et Anderson, R. M. 1985)

Par ailleurs, des études réalisées par Abdel-Salem, E. *et al.* (1979) ont montré l'influence du CMH, donc de la constitution génétique de l'hôte, sur la susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*.

IV.2. Preuves épidémiologiques de l'Immunité chez l'Homme.

Les preuves de la part importante de l'immunité dans la détermination des niveaux d'infection par les schistosomes chez l'homme, sont nombreuses.

Le premier argument vient de la constatation que la maladie est à la fois plus fréquente et plus grave chez les individus jeunes. Les formes graves rencontrées chez l'adulte correspondent généralement à de premières infections de sujets n'ayant jamais été exposés au parasite.

Les observations initiales, et relativement détaillées, d'une résistance chez l'homme, ont été faites par Gerber, J. H. en 1952. Lors d'une étude épidémiologique de l'infection par *S. haematobium* dans une petite région de la Sierra Leone, cet auteur constate que la protection maximale est observée chez des individus ayant reçu une première infection faible suivie de nombreuses réinfections faibles elles aussi, tandis que la protection minimale correspond à des cas d'infections primaires importantes associée à des réinfections croissantes.

La plupart des données de la littérature sur ce sujet sont évidemment des preuves indirectes de l'existence d'une immunité chez l'homme. Il est facile de comprendre pourquoi les expériences de réinfection de volontaires sont rares. Cependant, certaines ont été décrites: Fischer, A. C. en 1934, rapporte des réinfections par *S. intercalatum* de 6 pêcheurs volontaires, au Congo Belge.

En 1970, Walker, A. R. P. identifie 2 groupes d'enfants ayant les mêmes

fréquences de contacts avec l'eau parasitée par *S. haematobium*, mais l'un des groupes est résistant tandis que l'autre est susceptible à l'infection.

Wilkins, H. A. *et al.* (1978, 1984^a, 1984^b) montrent que l'apparition de nouvelles infections par *S. haematobium* dans une population est 1000 fois plus importante chez les enfants que chez les adultes. Cependant aucune donnée n'existait dans ce travail concernant les contacts avec l'eau infectée et bien qu'il soit peu probable que les enfants aillent 1000 fois plus souvent dans l'eau que les adultes, certains auteurs ont longtemps expliqué ces différences de réinfection uniquement par des différences de contacts avec l'eau (Warren, K. S. 1973).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent fortement le rôle de l'immunité dans l'infection par schistosomes chez l'homme.

Cependant, les démonstrations les plus claires et convaincantes sont venues récemment des études de réinfection après traitement.

Dans une étude préliminaire au Kenya, Sturrock, R. F. *et al.* (1983) montrent qu'un certain nombre d'enfants traités par l'hycanthone, ne se réinfectent pas. Butterworth, A. E. *et al.* (1984, 1985) identifient ensuite parmi de jeunes écoliers Kenyans traités à l'oxamniquine, un groupe d'enfants ayant de fréquents contacts avec l'eau parasitée mais de faibles niveaux de réinfection par *S. mansoni* (moyenne du nombre d'oeufs dans les selles de 30 par gramme); ils dénomment ce groupe: "résistant". Dans cette même étude, un second groupe d'enfants est identifié comme étant "susceptible" à l'infection (moyenne d'oeufs supérieure à 100 par gramme) à contact égal avec l'eau contaminée. De plus, l'âge moyen du groupe des enfants résistants est de 2 ans supérieur à celui du groupe des enfants susceptibles, ce qui est en faveur d'une acquisition de la résistance dépendant de l'âge.

Hagan, P. (1985) fait les mêmes observations dans le cas de l'infection par *S. haematobium*, en Gambie. A notre connaissance, aucune analyse de

réinfection n' a été réalisée pour le moment dans le cas de *S. japonicum*.

En plus du suivi de l'intensité d'infection des populations, des mesures détaillées des densités de mollusques infectés ainsi que du nombre de cercaires, sont réalisées pendant les périodes de transmission. La transmission des schistosomiasés est maximale après les pluies. Au Kenya, où nous avons travaillé plusieurs mois, il y a 2 saisons des pluies: de mars à mai puis d'octobre à décembre. Comme par ailleurs, beaucoup de mollusques meurent pendant les saisons sèches, la transmission dans ce pays ne dure que quelques semaines, tout de suite après les pluies.

Les études épidémiologiques "sur le terrain" sont des études à long-terme: la réinfection après traitement est suivie au sein de populations parfaitement définies, vivant dans des zones endémiques où la transmission est élevée. Il est important de connaître, pour mieux contrôler, la population de mollusques, de définir son habitat et d'identifier les périodes de transmission maximales au fil des ans. Connaître les habitudes de vie des populations, les respecter tout en tâchant d'améliorer les conditions sanitaires, alimentaires et l'approvisionnement en eau, est également indispensable. L'intégration de toutes ces données à la connaissance de la pathologie: sa prévention, ses composantes biologiques, immunologiques, sociales, ou économiques, tout cela rend compte de la complexité mais également de l'importance de telles analyses.

IV.3. Réponses humorales lors de l'infection humaine.

Tous les stades de développement du parasite sont reconnus *in vitro* par des sérums humains d'infection (Simpson, A. J. G. *et al.*, 1986). Le stade schistosomule reste le stade cible principal des mécanismes de cytotoxicité mais l'oeuf peut l'être également. La destruction des

schistosomules, à quelque stade que ce soit de leur développement, sera bénéfique pour l'hôte. Comme le seront toutes réponses aboutissant à la destruction des vers adultes ou réduisant leur fécondité.

Les mécanismes effecteurs identifiés chez l'animal, décrits dans le chapitre précédent, sont également retrouvés chez l'homme. Ils impliquent les **monocytes** (Ellner, J. J. et Mahmoud, A. A. F. 1979) en présence d'**IgE** (Joseph, M. *et al.*, 1978) ou d'**IFN γ** (Cottrell, B. *et al.*, 1989); les **plaquettes** et l'**IgE** (Joseph, M. *et al.*, 1978), l'**IL-4** ou l'**IL-6** (Pancre, V. *et al.*, 1990); et les **éosinophiles** (Butterworth, A. E. *et al.*, 1974, 1975) en présence d'anticorps anaphylactiques **IgE**, **IgG1** et **IgG3** (Capron, A. *et al.*, 1980). L'activité schistosomicide des **neutrophiles** a également été décrite (Anwar, A. R. E. *et al.*, 1979) mais elle n'a pas été confirmée par d'autres auteurs (Butterworth, A. E. *et al.*, 1982).

De nombreuses études ont été réalisées afin d'analyser les éventuelles corrélations entre une réponse immune protectrice (du type ADCC, par exemple) et la résistance à la réinfection.

* Dans les premiers travaux réalisés au Kenya, Sturrock, R. F. *et al.* (1983) montrent que les enfants ayant des taux élevés d'éosinophiles et d'anticorps ont de faibles niveaux de réinfection par *S. mansoni*.

* Des résultats complémentaires sont ensuite obtenus en Gambie par Hagan, P. *et al.* (1985) dans le cas de *S. haematobium*.

* Dans le cas de l'infection par *S. mansoni* (David, J. R. *et al.* 1980) comme de celle par *S. haematobium* (Hagan, P. *et al.* 1985), les éosinophiles de patients ayant les éosinophilies les plus importantes, ont des activités schistosomicides accrues *in vitro*.

* Au Kenya, les études de réinfection d'un groupe de jeunes écoliers fortement infectés ont révélé une situation différente et quelque peu plus

complexe (Butterworth, A. E. *et al.*, 1987).

En effet, tous ces enfants, les plus âgés - résistants - comme les plus jeunes - demeurant susceptibles à la réinfection après traitement- présentaient des réponses immunes protectrices tout-à-fait équivalentes, dont, par exemple, des taux élevés d'anticorps impliqués dans l'ADCC médiée par les éosinophiles, *in vitro*.

La caractéristique du groupe des plus jeunes enfants était la présence dans leur sérum d'IgM spécifiques d'antigènes d'oeuf. Ces anticorps reconnaissent un antigène majeur de l'oeuf, de nature polysaccharidique dénommé K3 (Dunne, D. W. *et al.*, 1987^a) ainsi qu'un antigène présent au niveau du schistosomule.

Cela a conduit à l'hypothèse selon laquelle ces anticorps pourraient bloquer les mécanismes effecteurs dirigés contre le schistosomule et ainsi empêcher l'expression de l'Immunité, mécanisme déjà décrit chez le rat (Grzych, J. M. *et al.*, 1984).

Par la suite, d'autres expériences ont montré que ces IgM peuvent bloquer l'ADCC médiée par les éosinophiles et dépendante des IgG du même sérum d'infection (Khalife, J. *et al.*, 1986) et, plus récemment, les IgG₂ et les IgG₄ ont été démontrées comme appartenant également à cette catégorie d'anticorps dits "bloquants" (Dunne, D. W. *et al.*, 1987^b).

La résistance vis-à-vis de la réinfection par *S. mansoni* ne serait donc pas due à la présence d'Ac ayant des fonctions effectrices protectrices mais plutôt à l'absence d' Ac bloquants.

Ainsi, le lent développement de l'Immunité pourrait s'expliquer par:

- (1) l'apparition très précoce de réponses protectrices (IgG₁, IgG₃) dirigées contre le stade larvaire, associée à:
- (2) l'apparition parallèle d'Ac (IgM, IgG₂, IgG₄) bloquant ces mêmes réponses protectrices. Ces anticorps seraient dirigés contre des antigènes

polysaccharidiques de l'oeuf partageant des épitopes avec des antigènes larvaires.

(3) la diminution lente des Ac bloquants avec le temps, permettra ainsi l'expression des réponses protectrices et, par conséquent, de l'Immunité.

Bien sûr l'immunité chez l'homme ne se résume pas à cette balance entre réponse protectrice et réponse bloquante. Comme chez l'animal de laboratoire, elle est multifactorielle et donc infiniment plus complexe. Toutefois, la connaissance de ces mécanismes est essentielle dans le développement d'un vaccin efficace pour lequel il faudra limiter, voire empêcher, l'apparition des anticorps bloquants.

* Les taux d'IgE sériques sont élevés chez les sujets vivant dans les zones endémiques (Mendès, E. et Mendès, N. F., 1982) ainsi que chez ceux présentant une infection chronique (Evengard, B. *et al.*, 1988).

Pierce, R. J. *et al.* (1990) dans notre laboratoire, ont recherché les antigènes reconnus par les IgE de sérums d'individus infectés: ils ont ainsi identifiés 3 molécules cibles des IgE: la paramyosine (Sm97), la myosine et une molécule de 70 kDa. La détermination de ces antigènes reconnus par les IgE est très importante d'autant que très récemment, P. Hagan en Gambie (manuscript sous presse dans "Nature") et D. W. Dunne au Kenya ont montré une corrélation très nette entre la présence d'IgE spécifiques du ver adulte et l'existence d'une immunité à la réinfection.

* Plusieurs travaux ont cherché à identifier les antigènes reconnus par les sérums des patients immuns: Butterworth, A.E. *et al.* (1985) mettent en évidence une reconnaissance dirigée contre des Ag de 27 et 24.5 kDa du parasite.

Une étude comparable, menée par Dessen, A. *et al.* (1988) à Bahia, Brésil, montre une association de la résistance après traitement à une

séroréactivité dirigée préférentiellement vers un antigène larvaire de 37 kDa. Enfin, Correa-Oliveira, R. *et al.* (1990) à Minas Gerais, Brésil, mettent en évidence une réponse humorale anti-paramyosine plus élevée chez les sujets immuns.

IV.4. Réponses lymphocytaires lors de l'infection humaine.

Si les analyses sérologiques sont nombreuses, les études cellulaires sont beaucoup plus rares, ce qui est sans doute lié aux nécessités de "terrain": le transport des échantillons depuis le lieu de prélèvement jusqu'au laboratoire où ils seront traités, nécessite souvent plusieurs heures, ce qui peut poser parfois des problèmes pour la bonne conservation des cellules. De plus, les manipulations cellulaires nécessitent un environnement technologique lourd, coûteux et donc parfois difficile à mettre en place dans les pays concernés.

La plupart des analyses de réactivité cellulaire de sujets infectés, avant et après traitement, ont utilisés des lymphocytes périphériques du sang circulant mis en contact *in vitro* avec des préparations antigéniques "grossières" extraites des différents stades de développement du parasite (le ver adulte: SWA; la cercaire: CAP et l'oeuf: SEA) (Colley, D. G. *et al.*, 1977; Abdel-Salam, E. *et al.*, 1981). Bien que ces antigènes de stade partagent un certain nombre de déterminants (Sm28 GST, en particulier, est présente au niveau du ver adulte, de l'oeuf et de la larve), ils induisent cependant des réponses différentes et caractéristiques.

* Colley, D. G. *et al.* (1977) puis Ottesen, E. A. *et al.* (1978) démontrent que la réactivité lymphocytaire vis-à-vis des extraits du ver adulte et de la cercaire, augmente avec la chronicité de l'infection. La réponse vis-à-vis de l'extrait d'oeuf, au contraire, est plus élevée en phase aïgue.

* D'autres travaux ont permis de confirmer ces observations et ont également démontré la présence de facteurs sériques pouvant inhiber spécifiquement la prolifération des LcT en réponse aux antigènes parasitaires (Ottesen, E. A. et Poindexter, R. W. 1980).

En plus de facteurs sériques suppresseurs ou de substances suppressives libérées par le parasite lui-même (le SDIF), des cellules à activité suppressive ont également été décrites, réduisant la réactivité lymphocytaire des patients (Todd, C. W. *et al.*, 1979). Cette immunomodulation de la réponse cellulaire au cours de l'infection, responsable de l'altération de la réponse immune, est importante à garder à l'esprit dans l'interprétation de résultats expérimentaux.

* Colley, D. G. *et al.* (1986) montrent que des enfants résistants à la réinfection après traitement, présentent des réactivité lymphocytaires plus élevées vis-à-vis de SWA et de CAP.

Toutefois, les travaux réalisés au Kenya pour étudier les réponses cellulaires n'ont pas confirmés ces observations chez les sujets immuns (que ce soit en terme de prolifération des lymphocytes ou de production d'IFN γ - mesure indirecte de l'activation des macrophages) (Butterworth, A. E. *et al.*, (1988).

V. LES ANTIGENES PROTECTEURS.

L'un des objectifs principaux de la recherche dans le domaine de l'immunologie de la schistosomiase est l'identification et la caractérisation des antigènes induisant des réponses protectrices chez l'hôte parasité.

Nous n'allons pas décrire tous les antigènes du parasite (Norden, A. P. et Strand, M. 1984) mais nous nous limiterons à ceux démontrés comme potentiellement vaccinnants dans différents modèles expérimentaux.

* Smith, M. A. et Clegg, J. A. (1985) utilisent 3 anticorps monoclonaux d'isotypes IgM et IgG₃, pour isoler des antigènes de surface du schistosomule de masses apparentes 155.000 et 53.000 Da. Les taux de protection obtenus chez la souris sont identiques avec les 2 antigènes: 15 % (en terme de réduction de la charge parasitaire).

L'immunisation de singes *cynomolgus* par l'Ag 155 kDa permet un niveau de protection de 40 %.

* Tarrab-Hazdai, R. *et al.* (1985) purifient un Ag de 200 kDa à partir de la cercaire en utilisant des anticorps monoclonaux d'isotypes IgG₁. Ces auteurs obtiennent un taux de protection de 34 % chez les souris immunisées par la préparation antigénique purifiée de 200 kDa.

* Comme nous l'avons évoqué dans le Chapitre consacré à "La réponse immune vis-à-vis de *S. mansoni* dans les modèles animaux", les travaux du groupe de Sher sur la souris P ont démontré une association entre l'immunité à médiation cellulaire et la protection (James, S. L. et Cheever, A. W. 1985).

James, S. L. *et al.* (1985, 1986) obtiennent 50 % de résistance chez des souris immunisées par des extraits de vers adultes en BCG, et démontrent que la protection est associée à l'activation des macrophages. Par la suite, les chercheurs de ce même groupe montrent que l'antigène impliqué n'est pas une molécule de surface ni une molécule sécrétée mais la paramyosine, molécule intracellulaire de masse 97.000 Da (Sm 97).

Cette molécule a été clonée (Lanar, D. E. *et al.*, 1986). La Sm 97 native purifiée ou la molécule recombinante protègent les souris à 30 % d'une

infection par *S. mansoni* (Pearce, E. J. *et al.* 1988).

Boutin, P. (communication personnelle) dans notre laboratoire, a obtenu une copie plus complète de Sm 97 et montré que cette molécule était un allergène majeur de *S. mansoni*, ce qui souligne son importance potentielle. Très récemment, Correa-Oliveira, R. *et al.* (1990) dans une étude réalisée au Brésil, mettent en évidence une réponse humorale anti-Sm 97 plus élevée chez les sujets immuns.

Si chez la Souris, il a été démontré que Sm 97 induit une forte réponse cellulaire, jusqu'à présent aucune étude de réactivité lymphocytaire n'a été faite dans une population humaine infectée.

* Auriault, C. *et al.* (1984^b) montrent que le schistosomule libère des molécules regroupées sous le terme générique de "SRP" (:Schistosomula Released Products) contrôlant la synthèse de certains isotypes, en particulier les IgE. En effet, ces auteurs démontrent que le SRP possède une propriété potentialisatrice de la réponse IgE associée à une activité sérine-protéase. L'injection de SRP sans aucun adjuvant, protège des rats Fischer à 84 %. Les sérums anti-SRP transfèrent l'immunité protectrice, cette propriété étant abolie si l'on élimine sélectivement les IgE (Damonville, M. *et al.*, 1986^a).

Deux antigènes majeurs de 22 et 26 kDa sont ensuite identifiés dans le SRP. Ces molécules sont des antigènes cibles des IgE cytotoxiques dans les réactions d'ADCC médiées par les éosinophiles, les plaquettes et les macrophages (Damonville, M. *et al.*, 1986^b).

L'antigène de 26 kDa a été tout particulièrement étudié dans notre laboratoire, allergène majeur du parasite, il représente lui aussi un candidat potentiel intéressant.

Damonville, M. *et al.* (1987), dérivent des lignées cellulaires T spécifiques de l'Ag 26 kDa et montrent qu'elles augmentent significativement la production d'IgE *in vitro* et qu'elles participent à l'immunité protectrice.

Verwaerde, C. *et al.* (1987) obtiennent un anticorps monoclonal d'isotype

IgE, produit à partir d'animaux immunisés par des extraits de ver adulte, reproduisant les effets des IgE anti-SRP: cet Ac monoclonal que nous appellerons Ac1, est cytotoxique dans des systèmes d'ADCC et confère une immunité protectrice à des rats. L'Ac1 reconnaît dans le SRP une molécule à 26 kDa. Velge-Roussel, F. *et al.* (1989) confirment l'importance de cet antigène en démontrant que l'immunisation par l'Ac1 engendre des anticorps de seconde (Ac2) et de troisième (Ac3) générations, les Ac3 ayant les mêmes propriétés, cytotoxiques et protectrices, que l'Ac1. Par ailleurs, les Ac3 reconnaissent l'Ag 26 kDa. La poursuite de cette étude a conduit ces auteurs à montrer que les LcT spécifiques des Ac2 augmentent de façon très importante les réponses IgE, IgG et IgA anti-26 kDa des animaux immunisés par la molécule purifiée, ou infectés par *S. mansoni*.

Le transfert passif de LcT anti-Ac2 protège les rats d'une infection (Velge-Roussel, F. *et al.*, manuscrits soumis à publication).

Cette approche originale constitue une démonstration indirecte de l'importance de cet antigène dans l'immunité protectrice chez le rat.

* La plupart des travaux sur les antigènes protecteurs concernent des protéines. Cependant plusieurs études récentes ont montrées que les carbohydrates peuvent participer de manière importante à l'antigénicité des molécules de surface du schistosomule et jouer un rôle dans le développement de l'immunité.

Dissous, C. *et al.* (1985) identifient un Ag de 38 kDa à la surface de la cercaire et du schistosomule.

Un anticorps monoclonal IPLSm1, spécifique de cet Ag, reconnaît un déterminant glucidique présent sur la cercaire, le ver adulte et la larve parasitaire.

La preuve que cet épitope glucidique peut médier l'immunité chez le rat, est apportée par Grzych, J. M. *et al.* (1985) qui produisent un anticorps monoclonal anti-IPLSm1, porteur de la copie protéique de l'épitope glucidique de l'Ag de 38 kDa. En effet, l'immunisation par l'Ac anti-idiotypique protège les rats à 50-70 % d'une infection par *S. mansoni*.

Cependant, la réponse immune contre ces épitopes glucidiques semble être complexe. L'épitope porté par l' Ag de 38 kDa peut induire à la fois une réponse protectrice et une réponse bloquant la réponse protectrice chez le rat (Grzych, J. M. *et al.*, 1984) et l'homme (Khalife, J. *et al.*, 1986).

L'Ag Sm 28 GST

Nous terminerons l'exposé des antigènes protecteurs par celui vers lequel s'est porté- et se porte -notre intérêt: l'Ag P28 ou Sm28 GST.

Afin d'identifier les antigènes du ver adulte également présents à la surface du schistosomule, et pouvant être détectés parmi les produits de translation d'ARN messagers *in vitro*, Balloul, J. M. *et al.* (1985) séparent un extrait de ver adulte de *S. mansoni* par SDS-PAGE puis électro-élution.

Parmi 10 fractions distinctes (correspondant aux bandes les plus colorées), 3 induisent une réponse humorale après injection chez le rat. Cependant, un seul anti-sérum, dirigé contre la bande située à 28 kDa, immunoprécipite un Ag en surface de la larve et un produit de traduction des ARN messagers du ver adulte et du schistosomule.

Cette fraction électro-éluée induit des niveaux de protection élevés chez le rat Fischer et la souris Balb/ c. Auriault, C. *et al.* (1987) montrent que des LcT spécifiques de cette préparation sont restimulables *in vitro* par les antigènes parasitaires, et protecteurs *in vivo* après transfert passif.

Par la suite, l'utilisation d' anti-sérum spécifique conduit à l'isolement d'un clone d' ADN complémentaire correspondant à l' Ag protecteur P28 ou Sm28 GST (Balloul, J. M. *et al.*, 1987).

L'immunisation de rats et de hamsters avec la protéine de fusion donne des réductions de charge parasitaire respectivement de 67 et 52 % .

La séquence complète de la Sm28 GST est ensuite obtenue. Cet antigène n'est pas une protéine intégrale de membrane mais c'est un Ag sécrété, transitoirement exprimé à la surface du parasite. Par ailleurs, l'Ag P28 possède une activité glutathion-S-transférase (GST) (Taylor, J. B. *et al.*,

1988) mais aucune homologie n'a été trouvée avec l'un des membres de la famille des GST de mammifères.

D'autres protéines recombinantes de schistosomes ont une activité GST: c'est le cas de la molécule de 26 kDa de *S. mansoni* (Sm26 GST) clonée par Trottein, F. *et al.* (1990) et de celle de *S. japonicum* (Sj26 GST) clonée par Smith, D. B. *et al.* (1986).

Les GST représentent un large groupe d'isoenzymes pouvant se lier à une grande variété de ligands. Après purification, deux sous-unités de 25000 Daltons de poids moléculaire environ peuvent être isolées. On les trouve généralement dans des cellules comme les hépatocytes et les érythrocytes sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères. Les GST sont impliquées dans les processus de détoxification (Mitchell, G. F. *et al.*, 1989) en conjugant des substrats électrophiles de l'oxydation des lipides membranaires au glutathion réduit.

La neutralisation de ces fonctions enzymatiques, empêcherait le détoxification ce qui rendrait alors le parasite sensible aux produits toxiques libérés lors du développement de la réponse immune. L'on comprend donc l'intérêt de l'étude de l'activité GST de la P28, nous l'évoquerons dans la **Discussion-Conclusion**. Dans notre laboratoire a pu être montré une participation de cette activité dans certaines manifestations de l'infection, en particulier au niveau de la pathologie induite par l'oeuf.

Sm28 GST est présente au niveau de 3 autres espèces majeures de schistosomes: *S. haematobium*, *S. japonicum* et *S. bovis*, ce qui en fait un candidat au vaccin d'autant plus intéressant.

TRAVAUX PERSONNELS

Au cours des dernières années, les recherches sur les schistosomiasés ont fait l'objet d'un intérêt croissant du fait de leur incidence considérable sur la santé publique et le développement socio-économique de nombreux pays tropicaux et sub-tropicaux.

L'immunoprophylaxie de ces infections représenterait un progrès considérable et cela justifie tout-à-fait les investissements importants réalisés tant aux niveaux nationaux qu'internationaux.

En effet, même si des mesures de contrôle modernes existent (contrôles biologique ou chimique des vecteurs hôtes intermédiaires), et malgré le développement d'une drogue schistosomicide très efficace (le praziquantel : pzq), leur utilisation à long-terme et à l'échelle de tout un pays n'est pas envisageable. Par ailleurs, plusieurs cas de pharmaco-résistance des souches parasitaires ont été décrits et la réinfection de sujets après traitement par le pzq est très fréquente (surtout chez les sujets jeunes) dans les zones endémiques, nécessitant des thérapies répétées et des surveillances constantes.

Nous l'avons vu, les études réalisées sur les animaux de laboratoire ont permis de démontrer que l'immunité protectrice vis-à-vis de l'infection par *S. mansoni* fait intervenir à la fois des mécanismes humoraux et cellulaires. De plus, comme nous l'avons évoqué dans l'Introduction, les nombreuses relations existant entre les LcB et les LcT rendent la séparation entre immunité humorale et immunité cellulaire plus théorique que réelle. Une réponse immune efficace contre le parasite nécessitera l'intervention synchronisée de nombreux événements impliquant les cellules B, les cellules T et leur produits de sécrétion (anticorps et lymphokines).

La caractérisation, puis la production en masse de la molécule **SM28 GST**, dans notre laboratoire, suivies des démonstrations multiples de son caractère protecteur dans de nombreux modèles animaux : le rat, la souris, le hamster ou le babouin (Balloul *et al.* 1987 ^{a,b}), nous ont conduit à rechercher, les structures épitopiques T (reconnues par les cellules T) et B (reconnues par les cellules B) majeures de la molécule vaccinnante **Sm28 GST**.

Notre objectif étant de déterminer en utilisant des peptides synthétiques dérivant de la séquence primaire de l'antigène **Sm28GST**, les épitopes T et B impliqués dans des mécanismes effecteurs protecteurs. Les résultats obtenus font l'objet de ce mémoire.

- l'article 1 (p.95) présente l'analyse de la réponse immune anti-Sm28GST (molécule recombinante), dans le modèle murin et décrit la sélection des peptides synthétiques de Sm28GST. Une première approche de la restriction génétique de la réponse immune anti-Sm28GST par les produits du CMH est réalisée.

- l'article 2 (p.104) correspond à la détermination des épitopes T "helper" et des épitopes B, dans le modèle du rat Fischer immunisé par la molécule recombinante.

-l'article 3 (p.115) étudie les réponses lymphocytaires T vis-à-vis des peptides synthétiques chez des rats Fischer et des souris Balb/c infectés par *S. mansoni* ou immunisés par les antigènes "de stade" du parasite (extraits antigéniques de vers adultes, larves et oeufs).

-l'article 4 (p.148) correspond à l'étude plus précise d'un peptide dérivant de Sm28GST : le peptide 115-131, chez le rat, la souris et le babouin.

-l'article 5 (p.190) étudie la réactivité lymphocytaire vis-à-vis des peptides identifiés dans les précédents travaux, chez le babouin chroniquement infecté et chez 62 enfants kenyans (avant ou après chimiothérapie par pzq) infectés par *S. mansoni*.

ARTICLE 1

*

Immunité protectrice induite par l'antigène P28 de *Schistosoma mansoni*, dans le modèle murin.

*

Le but de ce travail était de déterminer, puis d'analyser, la nature immunologique (humorale et/ou cellulaire) de la réponse protectrice obtenue chez la souris après immunisation par Sm28 GST. La littérature rapporte en effet la prédominance des mécanismes d'immunité à médiation cellulaire dans le modèle murin, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre consacré aux "Réponses immunes dans les modèles animaux". Lorsque nous avons commencé cette analyse, nous savions que la souris Balb/c était protégée d'une infection par *S. mansoni*, après immunisation par la Sm28 GST. Nous nous sommes donc demandé quels étaient les mécanismes, anticorps- dépendants ou anticorps- indépendants, impliqués dans cette protection.

Pour cela, nous avons immunisé des souris Balb/c par la molécule recombinante Sm28 GST, puis réalisé des expériences de transfert passif:

- * de sérum anti- Sm28 GST
- * de LcT spécifiques de Sm28 GST

afin d'évaluer la participation de l'une ou l'autre de ces composantes dans la protection.

* Les sérums des souris immunisées ont été testés par dosage radioimmunologique afin de quantifier les IgG spécifiques de Sm28 GST.

* La spécificité cellulaire, quant à elle, a été déterminée par un test de transformation lymphoblastique *in vitro*, en présence de la forme

recombinante de Sm28 GST ou des formes natives, présentes au niveau des Ag "de stade" du parasite: le ver adulte (Ag SM), la larve (S.^{ula}) et l'oeuf (SEA).

Le transfert passif des lymphocytes T spécifiques de Sm28 GST s'est fait soit avec les populations (L3T4⁺ + Lyt2⁺) soit uniquement la population "helper" L3T4⁺.

* La protection a été estimée par la mesure de la charge parasitaire (c' est-à-dire le nombre de vers adultes récupérés après perfusion des animaux) ou le nombre d'oeufs présents au niveau du foie. Cette première partie de l'article nous a conduite aux observations suivantes:

* Le transfert de sérum anti- Sm28 GST ne réduit pas la charge parasitaire des souris receveuses infectées.

* Le transfert de (L3T4⁺ + Lyt2⁺) spécifiques de Sm28 GST ne réduit pas la charge parasitaire, mais augmente les taux d'IgG spécifiques de Sm28 GST et diminue fortement le nombre d'oeufs au niveau du foie des animaux transférés.

* Le transfert de L3T4⁺ spécifiques de Sm28 GST réduit la charge parasitaire.

Afin de déterminer, *in vitro*, le mécanisme par lequel les LcT anti- Sm28 GST protègent les souris d'une infection- test, nous avons, et cela constitue la seconde partie de ce travail, regardé si ces cellules produisaient des facteurs pouvant participer aux mécanismes de destruction du schistosomule:

* Les LcT spécifiques de Sm28 GST produisent après stimulation par l'antigène correspondant, des lymphokines pouvant rendre plaquettes et macrophages cytotoxiques vis-à-vis du parasite.

Par ailleurs, l'IFN γ intervient dans la cytotoxicité macrophage-dépendante.

Une première approche immunogénétique de la réponse vis-à-vis de cet antigène a été réalisée en utilisant 6 lignées de souris sur 2 fonds génétiques différents (Balb et C57 Bl.) et exprimant les 3 haplotypes H-2^{b,d,k}. L'haplotype H-2^b détermine une mauvaise réponse tandis que les haplotypes H-2^k et ^d déterminent de bonnes réponses vis-à-vis de Sm28 GST.

Cette approche de la restriction génétique, liée ou non au H-2, vis-à-vis d'une molécule aux propriétés vaccinales, est essentielle.

Nous y reviendrons dans la **Discussion-Conclusion**.

Enfin, H. Gras- Masse et M. Bossus, dans le laboratoire du Professeur A. Tartar ont sélectionnés puis synthétisés des peptides synthétiques dérivant de la séquence de Sm28 GST.

La sélection était basée sur des critères physicochimiques tels que l'hydrophilie, l'accessibilité et la mobilité, elle a aboutit à la synthèse de 3 peptides: le 24-43, le 115-131 et le 140-153. C'est ainsi que nous avons analysé la reconnaissance de ces peptides par des LcT murins spécifiques de la Sm28 GST. Le peptide 24-43 induit la prolifération la plus élevée et l'utilisation de sous- fragments de ce peptide, représentant sa partie N-terminale (peptide 10-36) ou sa partie C-terminale (peptide 29-53) a permis de localiser plus précisément l'épitope T contenu dans le peptide 24-43, du côté N-terminal. De plus, des lymphocytes T spécifiques du peptide 24-43 sont restimulables *in vitro* par la Sm28 GST recombinante ainsi que par l'Ag extrait du ver adulte, les antigènes extraits du schistosomule et de l'oeuf induisant des proliférations beaucoup plus faibles.

En conclusion: ce premier travail a permis de démontrer la participation des lymphocytes T spécifiques de Sm28 GST, dans

la réduction de la charge parasitaire chez les animaux vaccinés, avec la participation de lymphokines telles que l'Interféron gamma.

Toutefois, la nature dichotomique de la réponse anti-Sm28 GST apparaissait déjà avec l'implication des lymphocytes T dans la réduction de la charge parasitaire et celle de facteurs sériques (anticorps?) dans la réduction des oeufs pondus.

Ainsi donc, la question que nous nous posions au début de ce travail ne peut recevoir de réponse aussi exclusive: l'immunité protectrice induite par l'injection de Sm28 GST fait intervenir à la fois des mécanismes humoraux et des mécanismes cellulaires.

PROTECTIVE IMMUNITY IN MICE VACCINATED WITH THE *Schistosoma mansoni* P-28-1 ANTIGEN¹

I. WOLOWCZUK,^{2*} C. AURIAULT,* H. GRAS-MASSE,[†] C. VENDEVILLE,* J.-M. BALLOUL,*
 A. TARTAR, AND A. CAPRON*

From the *Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire and †Laboratoire de chimie des Biomolécules, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France

The P28-1 Ag induces a strong protective immunity toward *Schistosoma mansoni* infection in various experimental models. T lymphocytes of mice immunized with the recombinant P28-1 Ag were stimulated in vitro by schistosome Ag of different development stages and by three P28-1 Ag-derived synthetic peptides. The most significant stimulation was achieved with the 24-43 peptide. The use of two fragments of this peptide showed that the P28-1 T lymphocyte specificity concerned essentially the NH₂ terminal sequence of the 24-43 peptide. Moreover, T lymphocytes specific for the 24-43 peptide were stimulated by both schistosome Ag and the recombinant P28-1 protein. The passive transfer of (Th + Ts) lymphocytes recovered from P28-1 Ag-immunized mice increased the IgG response to P28-1 and its peptides during infection but did not protect against a challenge infection, such as the passive transfer of anti-P28-1 sera. In contrast, P28-1 specific Th cell lines maintained in culture for 2 mo, passively transferred a strong protection (50%) to infected mice. Supernatants of P28-1-specific T cells obtained after stimulation with the corresponding Ag, were able to confer cytotoxic properties to platelets and macrophages. The presence of IFN- γ for the cytotoxicity mediated by platelets and macrophage activating factor for the cytotoxicity mediated by macrophages in these supernatants is in a large part responsible for the parasite killing observed. Finally, a preliminary immunogenetical approach with H-2 congenic mice on BALB background showed that the P28-1 Ag T cell response was under the control of the MHC and that the H-2^b haplotype determined a low response to P28-1 Ag and its peptides while H-2^d and k haplotypes determined high responders.

The P28-1 Ag is one of the major Ag of *Schistosoma mansoni*, transitory present at the schistosomulum surface and clearly implied in the protective immunity against *S. mansoni*. Indeed, immunization with the na-

tive molecule or with the recombinant fusion protein obtained after molecular cloning, induced a strong protective immunity in rat, mouse, hamster (1, 2), and monkey models (3). In the rat model, the humoral response bore a preponderant part in the protective mechanisms after active immunization with the P28-1 Ag (1, 4). Moreover, in this model, the identification of epitopes of the P28-1 that elicit T lymphocytes helping the B cells to produce protective antibodies has been recently described (5).

In contrast to what was observed in the rat schistosomiasis, the protective immunity in the mouse essentially involved antibody-independent cellular mechanisms (6-8). Therefore, the study of the immune response to P28-1 in the mouse model, including cellular-mediated cytotoxic mechanisms, immunopathologic and immunogenetical studies, will enlarge our knowledge about the immune response toward this protective Ag.

It is now clear both in experimental animals and in humans that immunity to schistosomes cannot be anything than multifactorial (9, 10). Therefore mouse and rat models that appear to have different mechanisms of resistance provided complementary informations. The mouse, allowing the maturation of adult worms and the deposition of eggs which subsequently elicit strong immunopathologic reactions, has some characteristics in common with human infection. However, as far as the humoral response is concerned, rats and humans have common characteristics.

A wide variety of "immune behaviors" will be generated in the human population and these complementary approaches in mouse and rat models will be useful to increase the immunogenicity of a future synthetic or recombinant vaccine against schistosomiasis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

H-2 congenic mice on BALB background were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur de LILLE or purchased from the C.S.E.A.L. (CNRS, Orléans, France).

Parasite Life Cycle

A Puerto-Rican strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Schistosomula were prepared after skin penetration by the method of Clegg and Smithers (11) for the cytotoxicity assays.

Ag Preparations

Adult worm antigen was prepared by homogenizing adult worms in PBS (0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.4) using a Potter-Elvehjem followed by a centrifugation of the homogenate at

Received for publication July 5, 1988.

Accepted for publication November 22, 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 This work was supported by INSERM U167-CNRS 624 and received financial assistance from UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.

² Address correspondence and reprint requests to Isabelle Wolowczuk, Centre d'Immunologie, Unité Mixte INSERM U. 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France.

10,000 × *g* for 20 min. Schistosomulum Ag was prepared by sonication of frozen-thawed mechanical schistosomula (12, 13). Soluble egg Ag was prepared according the method of Boros and Warren (14).

Recombinant P28-1 Ag

A full length cDNA encoding for the P28-1 Ag of *S. mansoni* was expressed in *Escherichia coli* using a PL-expression vector (15). This construction, obtained after direct insertion of cDNA originating from λ TG06 which contains a nearly complete copy of the coding region, directed the synthesis of a cII fusion protein containing 172 amino acids of the carboxyl-terminal end of the native 28-kDa Ag. The recombinant "P28-1 protein" (rP28-1) was prepared by A. Vidal from Transgene S.A. (Strasbourg, France). Protein titration was performed by the method of Lowry et al. (16).

Preparation of synthetic peptides. The determination of the primary structure of P28-1 by sequencing the cDNA clone (2) allowed the prediction of exposed sequences according to their hydrophobicity using the Hopp and Woods's method (17), or according to their mobility or accessibility, based (H. Gras-Masse, A. Tartar, unpublished methods) respectively, on statistical data derived from displacement values (18) or partition coefficients of aminoacids between interior or exterior of globular proteins (19). Peptides synthesized by solid phase synthesis (20) on chloromethyl-resin were protected as follows: Arg (Tos), Cys (Acm), Asp and Glu (OBzl), Ser and Thr (Bzl), Lys (ClCbz), Tyr (2-6 diClBzl). After HF cleavage, the crude peptides were purified by gel filtration on Fractogel TSK HW40-S (Merck, Darmstadt, FRG) in aqueous HCl pH 2, and lyophilized. They were checked for homogeneity by TLC and reverse phase-HPLC, and for identity by amino acid analysis after total acid hydrolysis.

Conjugation of Synthetic Peptides with Carrier Proteins

Peptides 24-43 and 140-153 were conjugated to TT³ (kindly given by Mérieux Institut, Lyon, France) or to OVA (Miles Research, Elkhart, IN) with glutaraldehyde/peptide (1.5 μmol) was dissolved with the carrier protein (2 mg) in 100 mM sodium phosphate pH 7, and pH was then adjusted to pH 8 with sodium hydrogenocarbonate. 20 μl of a 2.5% glutaraldehyde solution was then added daily during 3 days with continuous stirring. After 4 days, the resulting mixture was dialyzed exhaustively against 0.15 M NaCl. Peptide 115-131 was conjugated through its thiol group to TT or to OVA using 6-maleimidocaproic acyl-N-hydroxysuccinimide as heterobifunctional cross-linking agent (21). The approximate amount of peptides coupled to carrier proteins in the complexes was 1/1, these conjugates were sterilized by filtration on 0.22 μm (Sartorius, Göttingen, Germany).

Lymphocyte Culture Medium

For all cultures, RPMI 1640 (GIBCO, Courbevoie, France) was supplemented with 5.10⁻⁵ M 2β-ME (MERCK, Darmstadt, FRG), 2 mM L-glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 20 mM HEPES (N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethane sulfonic acid) (Sigma, St. Louis, MO), and 10% heat inactivated FCS (GIBCO).

Ig and Immunologic Reagents

Anti-mouse Fcγ was provided by MIAB (Uppsala, Sweden). Murine rIFN-γ (sp. ac. of 3 × 10⁷ U/mg) produced by Genentech Inc., South San Francisco, CA, were kindly provided by Boehringer Ingelheim (Vienna, Austria). Polyclonal antibody to mouse rIFN-γ (neutralizing capacity: 5000 U/10 U) were gifts from L. Catinot (Institut Curie, Paris, France).

SRIA

Microtiter plate wells (microtest flexible assay plate, Falcon, Oxnard, CA) were coated during 48 to 50 h at room temperature with 0.1 ml/1 μg of rP28-1 or with 0.1 ml/5 μg of synthetic peptides in 0.015 M Na₂CO₃/0.035 M NaHCO₃ buffer pH 9.6. A 2-h saturation at room temperature was then carried out by addition of 0.1 ml PBS (0.1 M) containing 3% BSA. The plates were washed twice in PBS containing 0.3% BSA before the addition of 0.1 ml appropriated dilutions of unknown sera. The plates were then incubated at room temperature for 26 h, then again washed twice in PBS-0.3% BSA. A final 12- to 18-h incubation with 10⁵ cpm ¹²⁵I labeled anti-mouse

³ Abbreviations used in this paper: TT, tetanus toxoid; SRIA, solid phase RIA; cpm, counts/min.

IgG (Chloramine T method, sp. ac. 222 kBq/μg) was allowed to detect the presence of IgG specific for P28-1 and its peptides in the sera. After a last three times wash, as described above, the wells were cut out and counted in a gamma counter (LKB, Broma, Sweden) with a counting efficiency of 60%. The increased bound radioactivity in the presence of positive sera (Bx) vs a negative control (Bo) were calculated according to the formula:

$$\Delta + \% = [(B_x - B_o) / B_o] \cdot 100$$

Immunization Procedures

The rP28-1 protein (50 μg) was mixed 1/1 with CFA and injected into the base of the tail of mice on day 0. On day 10, animals were bled and draining lymph nodes were removed. Control mice were injected with TT or OVA using the same protocol.

The 24-43 synthetic peptide (50 μg protein) coupled to TT and emulsified in CFA was injected using the same route of injection on day 0. On days 7 and 14, the mice were re-injected with 25 μg of uncoupled peptide without adjuvant. Animals were bled and draining nodes were removed on day 19.

Infection Procedure

Mice were exposed percutaneously to 300 cercariae of *S. mansoni* 18 h after T lymphocyte- or serum-transfers. Parasite burdens were evaluated by total perfusion 25 days after infection. The numbers of worms obtained from experimental groups of 10 mice injected with P28-1 specific T lymphocytes (B) or anti-P28-1 sera (B') were compared with those obtained from experimental groups of 10 mice injected with OVA specific T lymphocytes (A) or anti-OVA sera (A'). The percentage of protection was calculated by the formula: (A-B/A) × 100 (or (A'-B'/A') × 100) (22).

Preparation of Specific T Lymphocytes

Draining lymph nodes were harvested aseptically and lymph node cell suspensions were prepared. The T lymphocytes were then separated by passage through a nylon wool column (23) and maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in lymphocyte culture medium.

Production of lymphokine-containing supernatants. Lymphokines were prepared by in vitro stimulation of 10⁷ T lymphocytes with 4 μg/ml of recombinant P28-1 protein in the presence of 5 × 10⁶ syngeneic irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 Al, 100 Ku, 8 mA) splenic APC in lymphocyte culture medium. Supernatants were harvested 48 h after antigenic stimulation, aliquoted and frozen. T lymphocytes cultured with P28-1 antigen, T lymphocytes with unrelated Ag (OVA), and T lymphocytes with APC were used as controls.

Specificity of T lymphocytes. For the proliferation assays, 5 × 10⁵ T cells and 10⁶ APC were cultured with Ag in a total volume of 0.2 ml in flat-bottomed 96 well plates (Nuncion, Roskilde, Denmark). On day 5, 18.5 kBq of [³H]TdR (sp. ac. 37 GBq/mmol, TMM-79A CEA, Gif-Sur-Yvette, France) were added to each well. Then 18 h later, the cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the amount of incorporated [³H]TdR was measured in a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku-Finland).

Long-term culture procedure. T cells (10⁷) and APC (4.10⁶) were cultured with 30 μg of rP28-1 Ag in a total volume of 1 ml in 24 well plates (Falcon 3047). T lymphocytes were re-stimulated weekly with rP28-1 Ag. IL-2 was first added only 20 days after the recovering from animals. IL-2 containing medium was obtained by stimulation of murine EL-4 tumor cells with PMA. IL-2 activity of the conditioned medium was tested by its ability to allow the growth of a long term cytotoxic T cell population.

Macrophage-Mediated Cytotoxicity Assays

BALB/c mouse peritoneal macrophages were dispensed in 0.1 ml Eagle's MEM (DIFCO, Detroit, MI) containing 10% FCS, into each well of a flat-bottomed microtiter plate (Nuncion) and were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 1 to 1 h 30 min. The plates were then gently washed twice with MEM and 0.15 ml MEM containing 15% heat-inactivated FCS were added. After an overnight incubation of the cells at 37°C in 5% CO₂, 50 skin-prepared schistosomula were added with the different supernatants. After a last 18-h incubation, the larvae were examined and counted as dead if they were immobile, granular, and opaque.

Platelet-Mediated Cytotoxicity Assays

The mouse platelets have been prepared as previously described (24). Briefly 1 ml heparinized blood diluted to 1 ml MEM was centri-

fused for 10 min at $400 \times g$ at 4°C . The supernatant fractions containing platelets were washed with heparinized MEM and centrifuged 10 min at $5000 \times g$ at 4°C . Then the platelets were dispensed in each well of a flat-bottomed microtiter plate. A total of 50 skin-schistosomula, $20 \mu\text{l}$ of normal rat serum, and different dilutions of lymphocyte culture supernatants were added simultaneously and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 atmosphere. Dead and alive schistosomula were counted as described above.

Adoptive Transfer Experiments

In vivo transfer of P28-1 specific T lymphocytes. T cells (10 to 15×10^6) were injected i.v. in 0.25 ml PBS, pH 7.4, 18 h before exposure to *S. mansoni* cercariae. Control mice were injected i.v. with 10 to 15×10^6 OVA specific T lymphocytes.

In vivo transfer of anti-P28-1 sera. Sera (0.15 ml) were injected i.v. 18 h before infection. The sera were tested to detect the presence of IgG specific for rP28-1 by SRIA procedure on microtiter plate wells coated with rP28-1, an anti-OVA serum was used as negative control. The increase bound radioactivity obtained was $\Delta\% = 70\%$. Anti-OVA sera were injected as control in this experiment.

Analysis by Flow Cytometry

Before passive transfer experiments, the surface phenotype of the cells was controlled by flow cytometry using monoclonal antibodies against T cells subsets: anti-L3T4 and anti-Lyt-2 (Serlab, Ltd. Crawley Down, UK). Briefly, the cells after incubation with the mAb were labeled with fluorescein-conjugated antibodies. The population of fluorescein-labeled cells was quantified by an automated biologic cell analysis 50-H cytofluorograph (Ortho-Instrument, Westwood, MA).

RESULTS

Activation of rP28-1 Ag-primed T lymphocytes by native protein. To analyze if rP28-1 Ag-primed T cells can recognize the native protein, lymph node T lymphocytes of BALB/c mice immunized with the rP28-1 Ag, were assayed in in vitro proliferation assays toward various stage *S. mansoni*-specific Ag. The rP28-1-specific T cells exhibited a dose-dependent proliferative response to rP28-1, adult worm, and larval Ag, whereas a weak proliferation was observed with SEA. As a control, an unrelated Ag such as OVA did not induce a significant stimulation of rP28-1 Ag-specific T cells (Fig. 1).

Passive transfer of immunity with T cells from donor mice immunized with rP28-1 Ag. The in vivo effect of these T cells was estimated after their injection into syngeneic mice 1 day before *S. mansoni* infection. Their specificity toward the rP28-1 Ag and the schistosome Ag of different development stages was simultaneously controlled by in vitro proliferation assays. When specific T cells were transferred just after recovering from the animals (the cytofluorometric analysis of this population indicated that 50% of the nylon wool non-adherent cells were L3T4⁺ and 42% were Lyt-2⁺) no protection was

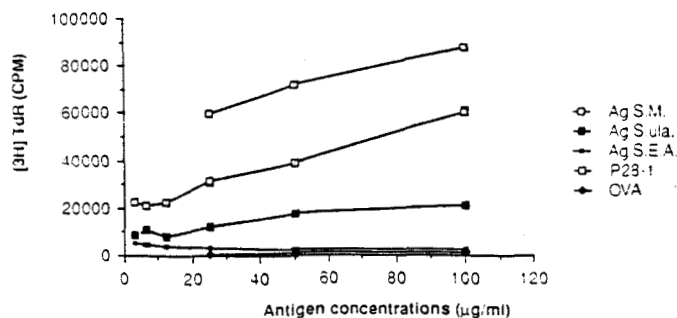


Figure 1. In vitro proliferative response of T lymphocytes from mice immunized with the rP28-1 Ag after stimulation with various *S. mansoni* Ag preparations containing the native form of the molecule.

conferred compared with mice receiving OVA-specific T cells (Fig. 2A).

During the infection the animals were bled every 7 days and the levels of circulating P28-1- and peptides-specific antibodies was identified by SRIA (see *Materials and Methods*). Thus, passive transfer of rP28-1-specific T cells led to a dramatic increase of the IgG response to P28-1 and its peptides (24-43, 115-131, 140-153) (Fig. 2B).

In opposite, when rP28-1-specific T cells were cultured for 2 mo (exogenous IL-2 was added only 3 wk after recovering from the animals), the passive transfer of this population, strongly enriched in L3T4⁺ lymphocytes (cytofluorometric analysis indicated 83% L3T4⁺ and undetectable Lyt-2⁺ cells for experiment 1, 80% L3T4⁺, and 5% Lyt-2⁺ for experiment 2) conferred a substantial protection: 48 to 53% against *S. mansoni* infection, compared with mice receiving T cells lines specific for an unrelated Ag (OVA) (Fig. 3).

Passive transfer experiments with anti-P28-1 sera. To analyze if the humoral response toward the rP28-1 Ag might also have a protective role, passive transfer experiments were carried out by injecting BALB/c mice with anti-P28-1 or anti-OVA sera before *S. mansoni* infection. No decrease of the parasite burden was observed in animals passively transferred with anti-P28-1 sera compared to the control group receiving anti-OVA mouse sera.

Induction of platelet cytotoxic properties by T lymphocyte supernatants. rP28-1 specific T lymphocytes were stimulated in vitro with the rP28-1 Ag ($4 \mu\text{g/ml}$) and supernatants were tested for their ability to induce platelets from normal BALB/c donors into cytotoxic effectors toward schistosomula.

As shown in Figure 4, a significant induction of cytotoxicity was observed with these supernatants. This effect was dose-dependent and reached a plateau at the dose of $75 \mu\text{l}$ supernatants per well. Nevertheless, the doses of 50 and $25 \mu\text{l}$ also induced significant cytotoxicity so they were used for the following experiments. In contrast, no cytotoxicity was observed with the supernatants obtained after incubation of rP28-1 specific T lymphocytes with an unrelated Ag (OVA).

Various authors have reported the presence of IFN- γ in the supernatants of lectin- or Ag-stimulated T lymphocytes (25) and that IFN- γ was one of the factors responsible for the induction of human platelet cytotoxic functions (26). So we demonstrated that murine rIFN- γ -induced platelets into cytotoxic effector cells toward *S. mansoni* larvae (Fig. 5A). In addition, an anti-(murine rIFN- γ) polyclonal antibody inhibited the platelet cytotoxicity induced by rP28-1 specific T lymphocyte supernatants (Fig. 5B).

Induction of macrophage cytotoxic properties by T lymphocyte supernatants. The supernatants were tested for their capacity to induce macrophages from normal BALB/c mice into effector cells toward schistosomula. As shown in Figure 6, these supernatants contained lymphokine(s) able to induce macrophage larvicidal potentialities but the use of different concentrations of anti-(murine rIFN- γ) polyclonal antibody failed to inhibit this effect (the cytotoxicity obtained with supernatants and anti-(murine rIFN- γ) was 40%).

Identification of T cell antigenic sites on rP28-1 pro-

A	EXPERIMENT 1		EXPERIMENT 2	
	PASSIVE TRANSFER OF	worm recovery	% protection	worm recovery
LT anti- P28-1	54	not significant	58	not significant
LT anti-OVA	58		61	

Figure 2. A. Total perfusion of mice passively transferred with rP28-1 specific Th + Ts lymphocytes before *S. mansoni* infection. B. rP28-1 and peptides specific IgG levels in the sera from mice passively transferred with rP28-1 Th + Ts cells, and infected by *S. mansoni*.

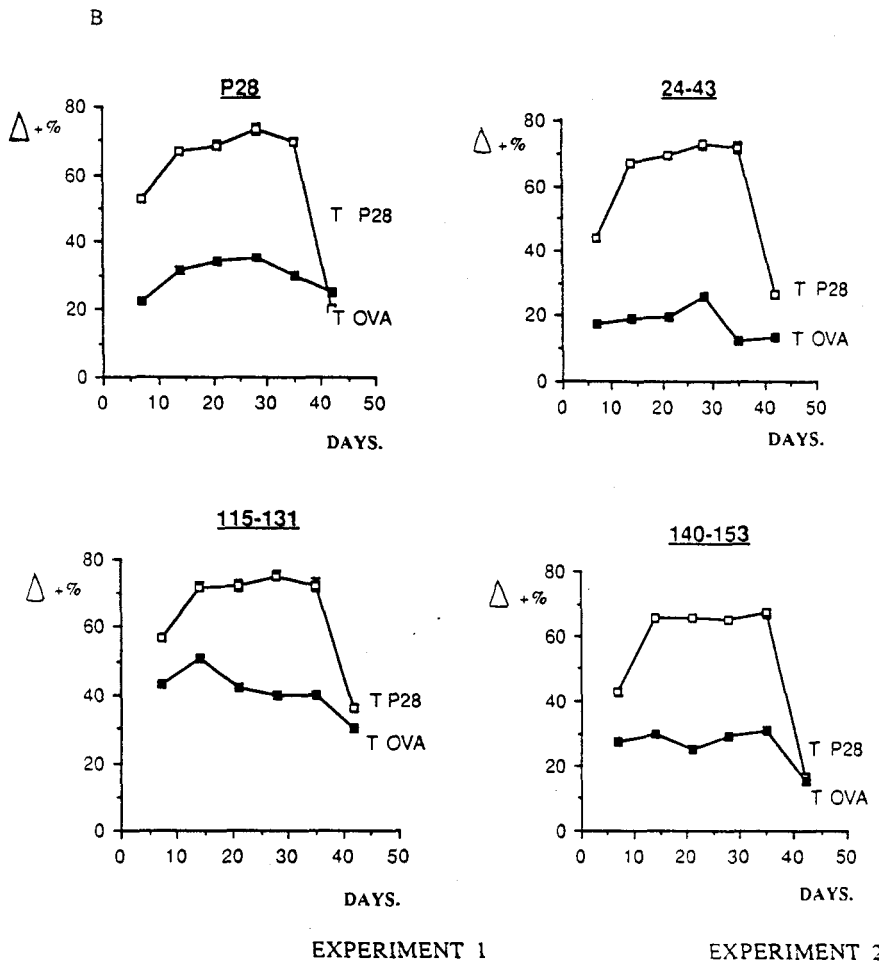


Figure 3. Total perfusion of mice passively transferred with rP28-1-specific Th lymphocytes, and infected by *S. mansoni*.

PASSIVE TRANSFER OF	EXPERIMENT 1		EXPERIMENT 2	
	worm recovery	% protection	worm recovery	% protection
LT anti-P28-1	31	53%	27	48%
LT anti-OVA	65		52	

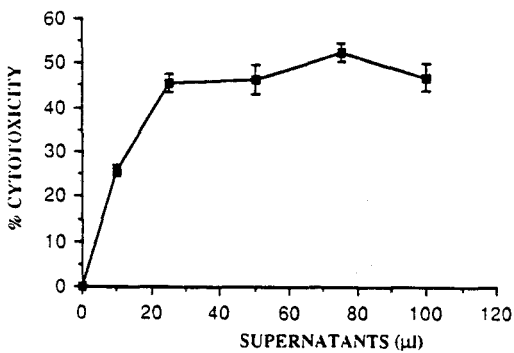


Figure 4. Platelet-dependent cytotoxicity toward schistosomula using rP28-1-specific T lymphocytes supernatants. The cytotoxicity was appreciated as the percentage of dead larvae.

tein. The research of hydrophilicity, accessibility, and mobility regions in rP28-1 protein led to the identification of three putative epitopes in the 24-43, 115-131, and 140-153 peptides. P28-1-specific T lymphocytes exhibited a significant proliferative response after incubation with these three peptides linked to a carrier protein (OVA) in the presence of APC. In contrast, no proliferation was observed when synthetic peptides alone or the carrier (OVA) were presented to T cells (Fig. 7A). The maximal response was obtained with the 24-43-OVA synthetic peptide. The finest determination of the major T cell site on the 24-43 peptide was undertaken using two synthetic peptides framing the 24-43 peptide: 10-36 and 29-53 peptides representing, respectively, the NH₂ and COOH ends of the 24-43 peptide. Figure 7B shows that the major stimulation was obtained with the 10-36 peptide whereas

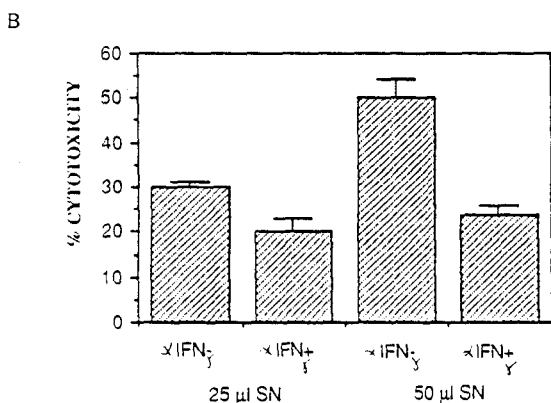
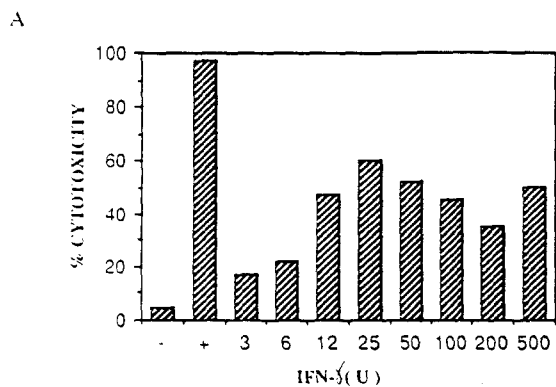


Figure 5. A. Platelet dependent cytotoxicity toward schistosomula using rIFN- γ . The negative control was normal rat serum (NRS) (-) and the positive control was serum of infected rats recovered 42 days after *S. mansoni* infection (+). B. Inhibition of the platelet cytotoxicity obtained with the r-P28-1 T lymphocytes supernatants with an anti-(mouse rIFN- γ) polyclonal antibody (B).

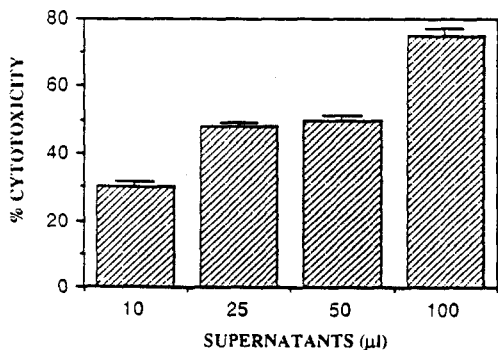


Figure 6. Induction of macrophage-dependent cytotoxicity toward schistosomula by rP28-1-specific T lymphocytes supernatants.

the 29-53 peptide led to a weaker proliferative response. These results suggested that one of the major T cell epitopes of rP28-1 Ag is located at the NH₂ extremity of the molecule.

Stimulation of 24-43 primed T lymphocytes by native and rP28-1 Ag. The evidence for a schistosome-specific response of 24-43-specific T cells was established by stimulating these lymphocytes with schistosome antigenic extracts of different development stages. A major stimulation was obtained (Fig. 8A) with the adult worm Ag whereas the ones observed with larval and egg Ag were weaker and equivalent to that obtained with an unrelated Ag (OVA). The recombinant protein elicited a

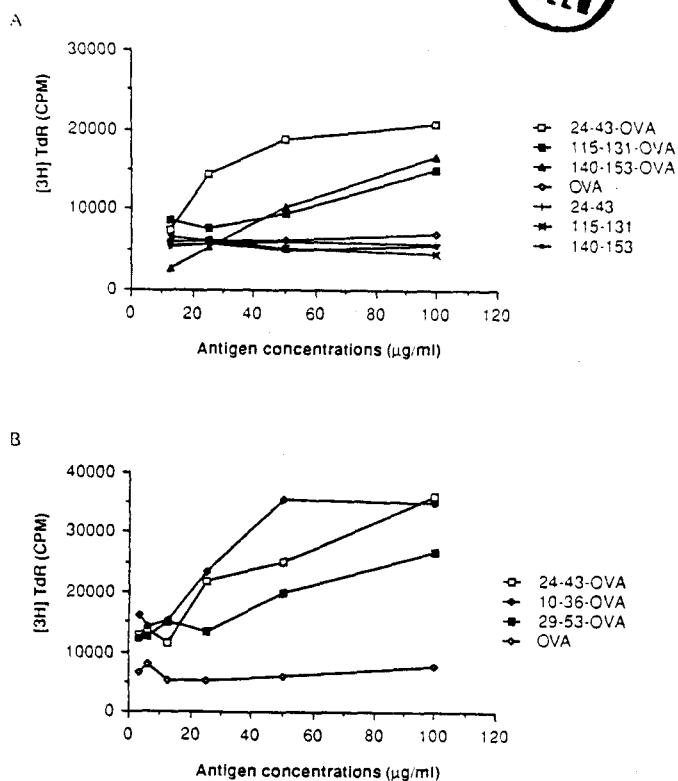


Figure 7. In vitro proliferative response to T lymphocytes from mice immunized with the rP28-1 Ag after stimulation with the 24-43, 115-131, and 140-153 peptides linked or not to carrier protein (OVA) (A). Proliferative response of anti-rP28-1 T lymphocytes using 24-43, 10-36, and 29-53 peptides coupled or not to OVA (B). After 5 days culture (16-h pulse, 0.5 μ Ci/well) results are expressed as the mean of two triplicate cultures. Student's *t*-test was used for the comparison of means between non-stimulated cells and cells stimulated with peptides linked to a carrier protein. At the concentrations 25 and 50 μ g/ml the proliferative responses were significantly different ($p < 0.05$).

significant proliferation so as the synthetic peptides 24-43, 10-36, and 29-53 linked on a carrier (OVA) (Fig. 8B). In opposite, no stimulation was observed with peptides alone (3000 cpm for 24-43, 2300 cpm for 10-36 and 2500 cpm for 29-53).

Genetic influence on immune response in mice immunized with rP28-1 Ag. Different H-2 congenic strains of mice on the BALB background were immunized with the rP28-1 Ag. Lymph node cell proliferation in response to P28-1 and its peptides were then determined. As a first step of an immunogenetical approach, we tested three strains of mice: BALB/c (H-2^d), BALB/k (H-2^k), and BALB/b (H-2^b). The results presented in Figure 9 clearly showed that d and k haplotype mouse T cells responded to the vaccinating protein P28-1, whereas b haplotype expressing mice appeared to be low responders toward this Ag and its peptides. These results were confirmed using strains of mice exhibiting another background (C57bl.10) (data not shown).

DISCUSSION

Vaccination trials of rats, mice, hamsters (1, 2), and monkeys (3) with the rP28-1 Ag, have resulted in significant protection against an experimental infection by *S. mansoni* cercariae. Moreover, these experiments have clearly shown the involvement of the humoral response in the protective immunity in the rat model. Indeed, immunization with the P28-1 protective Ag led to the

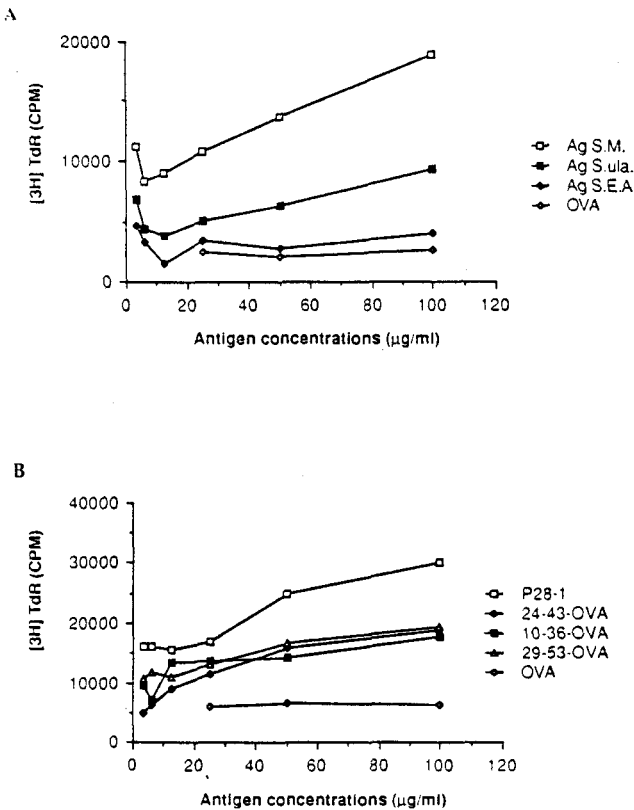


Figure 8. Proliferative response obtained after stimulation of 24-43 specific T lymphocytes with schistosome antigenic extracts of different development stages (A) and with the 24-43, 10-36, and 29-53 peptides coupled or not on OVA (B). For 25 and 50 µg/ml, the proliferative responses obtained after 29-53-OVA and 10-36-OVA stimulations were significantly different ($p < 0.05$).

production of cytotoxic antibodies resulting in the destruction of the parasite (4).

In contrast, in the murine model, conflicting informations have been obtained about the mechanisms by which challenge *S. mansoni* worms were killed in previously infected mice (27). Some serum transfer experiments suggested a possible role of circulating antibodies (28, 29) whereas others did not (30, 31). Moreover, it has been recently shown that the invasive larvae of *S. mansoni* were susceptible to extracellular killing by lymphokine-activated macrophages (32) and indicated an in vivo correlation of specific delayed type hypersensitivity, macrophage activation, and IFN production, with a resistance to a challenge infection by *S. mansoni*. Therefore, T cell-dependent cellular immunity against schistosomes seemed to play a preponderant role in the mouse model.

Therefore, the purpose of this work was to determine whether the rP28-1 Ag also generated in the mouse, an immune response essentially involving cellular mechanisms and to precise the major epitopes of this antigen that elicited T cell immunity.

First, keeping in mind the fact that the rP28-1 Ag was able to induce a strong protective immunity in the mouse (1), the involvement of humoral and cellular components in this protection was analyzed by passive transfer experiments. (1) The passive transfer of anti-rP28-1 sera failed to protect mice against an experimental infection. (2) No reduction of worm burden was obtained when infected mice received rP28-1-specific T lymphocytes representing two T cell subpopulations bearing L3T4

(helper) and Lyt-2 (suppressor) phenotypes in spite of a strong increase of the IgG response to rP28-1 and its peptides in the sera. Moreover, a dramatic reduction (56%, $p < 0.01$) (Auriault et al. manuscript in preparation) of eggs number in the liver of the animals was observed (the size and the morphology of the granuloma were not modified).

Taken together, these results showed that, in the mouse model, the anti-rP28-1 antibodies were not efficiently involved in the protective mechanisms and led us to analyze the eventual relationship between the increase of the humoral response and the diminution of the eggs number in the liver of the passively transferred mice. This observation is doubly pertinent because the same result has been obtained in our laboratory with some of the vaccinated baboons. (3) If these antibodies are involved, do they act upon egg-laying, egg-deposition, or sexual maturation of the female?

(3) When infected mice were passively transferred with an L3T4⁺ enriched rP28-1 antigen specific T lymphocyte population (T cells bearing Lyt-2 phenotype were spontaneously eliminated by a long term culture), a significant (50%) reduction of worm burden was observed. The results summed up in points (2) and (3) confirmed recent studies utilizing selective elimination of T cell subsets (L3T4⁺ and Lyt-2⁻) and specifying their activity in the context of their in vivo effects upon the development of resistance to schistosomes (33). The simplest explanation could be that the first passive transfer experiment with L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cell subsets, reproduced the in vivo balance of their activities: the cells expressing the Lyt-2 phenotype suppressed the development of an optimal immunity, failing to protect the animals against a challenge infection. However, when animals were transferred with rP28-1-specific T lymphocytes depleted of the suppressive population (Lyt-2⁻) by a 2 mo culture, the L3T4⁺ T cells allowed the development of protective immunity and, as a consequence, a significant reduction of worm burden after cercariae infection. Moreover, in the analysis of these results we have to take into account that the long term culture maintained preferentially Th cells producing IL-2 and IFN- γ (Th1) implicated in cellular mediated immunity (particularly delayed type hypersensitivity) to the detriment of Th cells of the Th2 subset which played a major role in the humoral response (34). Taken together, these results strongly suggested that the protective immunity obtained in rP28-1 vaccinated mice essentially involved cellular components.

In an attempt to understand the protective effect of rP28-1-specific T lymphocytes observed in vivo, we have examined if these cells, upon an in vitro stimulation with the rP28-1 Ag, were able to produce lymphokines inducing immune cells into cytotoxic effectors toward schistosomula. The involvement of macrophages (35, 36) and platelets (24) in the protective immunity directed toward the parasite *S. mansoni* has been recently demonstrated in vivo and in vitro, the killing properties of the platelets were shown to be due to the presence of specific IgE (37) or to lymphokines such as IFN- γ (24) and TNF (38). Moreover, IFN- γ has been identified as a factor able to induce in the absence of antibodies, anti-schistosomulum properties into macrophages (39). Our results showed that rP28-1-specific T lymphocytes produced lymphokines involved in cytotoxicity mechanisms resulting in

P28-1 IN MOUSE MODEL

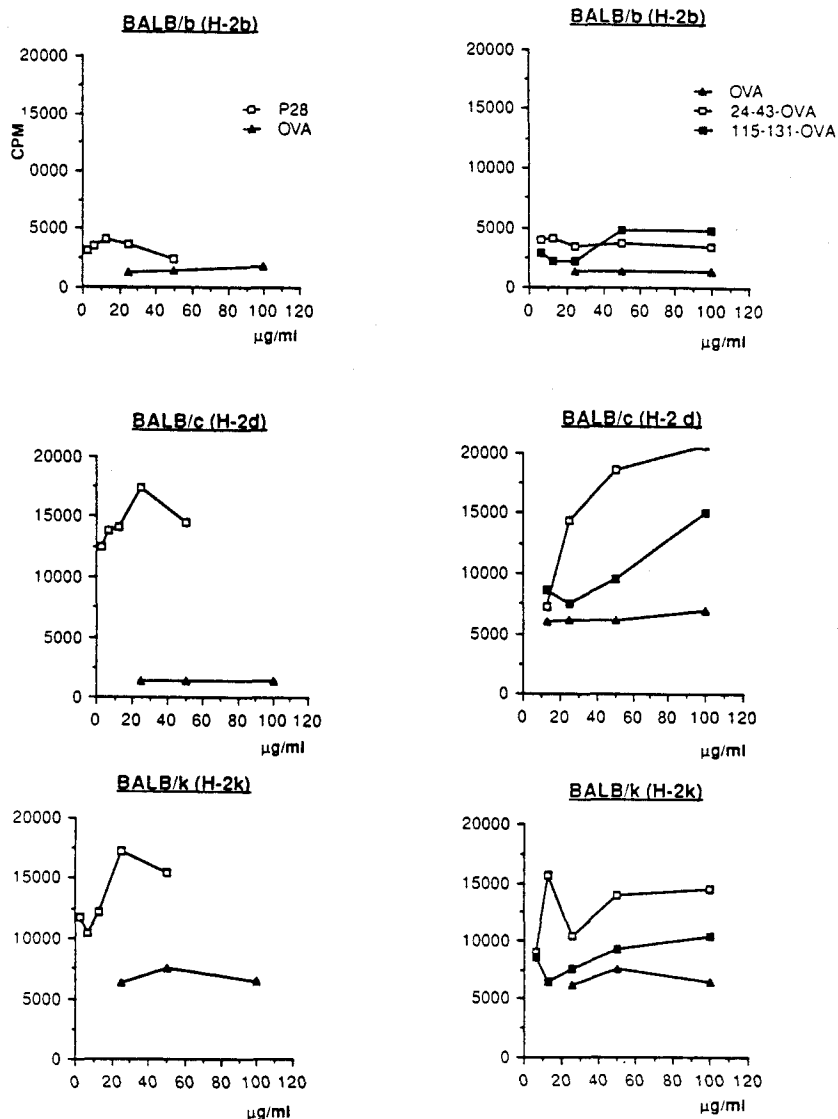


Figure 9. Proliferative response of rP28-1-specific T lymphocytes from mice of three different haplotypes on the BALB background with the rP28-1 Ag, the 24-43 and the 115-131 peptides linked or not on a carrier protein (OVA).

the destruction of the parasite. The implication of IFN- γ as one of these lymphokines, in our study, was established with platelets but not with macrophages, suggesting that the supernatants contained lymphokines else than IFN- γ involved in this cytotoxicity (MAF, TNF).

In this context, T cell clones specific for the rP28-1 Ag now in preparation will perhaps allow an analysis of the respective role of IL-2, IFN-producing cells (Th1) and IL-4, IL-5-producing cells (Th2). Moreover, IL-4 has been demonstrated to be implicated in the regulation of the IgE response in the mouse (40) indeed regarding the role played by the anaphylactic antibodies in the rat model, only this approach would precisely determine if these antibodies are also involved in the protection conferred after passive transfer of IL-4 producing cells to previously infected mice. The next step of this study was the determination of the major immunogenic sites of the rP28-1 Ag using synthetic peptides derived from the sequence of the recombinant molecule.

Among the three peptides tested: 24-43, 115-131, and 140-153, one of them the 24-43 peptide, was able to elicit a strong rP28-1-specific T cell proliferation but only when linked to a carrier protein. One explanation could be that the conjugation sites of the carrier protein pro-

vided appropriate amino acids facilitating TCR binding or that the attachment of the 24-43 peptide on the carrier stabilized a conformation that the peptide alone could not maintain free in solution, leading to different processings by the APC.

The identification of the fine T cell site was then undertaken using peptides framing the NH₂ (peptide 10-36) or the COOH (peptide 29-53) end of the 24-43 peptide: the results showed that the stimulation of rP28-1-specific T cells required the NH₂ portion of the peptide. Recently, it has been demonstrated (41) that, in the rat model, the stimulation of rP28-1-specific B cells required the COOH part of the 24-43 peptide which consequently contained epitopes for T and B cells located at distinct areas of its amino acid sequence.

Finally an immunogenetical approach of the immune response toward rP28-1 Ag was undertaken through three different haplotypes (H-2^b, H-2^d, and H-2^k) on two backgrounds (BALB and C57B1.10). These preliminary results showed that the H-2^b haplotype expressing mice were low responders to rP28-1 Ag so as to its peptides, but we have to take into account the fact that this concerned T cells from immunized mice. The same analysis is at present underway using T lymphocytes from in-

fecting mice expressing various haplotypes because the P28-1 Ag would not be presented in the same way during *S. mansoni* infection and probably not generated T cell populations of the same fine specificity. Obviously, the determination of low and high responders to P28-1 so as the research of immunodominant epitopes of this vaccinating Ag would be done both by immunization and infection procedures using the greater number of haplotypes on different backgrounds, even those that failed in vaccinating protocols with irradiated cercariae (42) such as P/JN.

This would give clear-cut information relating genetically determined responsiveness to rP28-1 Ag and the knowledge of the peptides that generate a strong protective immunity through humoral mechanisms (developed in the rat model) or through cellular mechanisms (developed in the mouse model) will be useful for the construction of a vaccine using synthetic peptides of the P28-1 Ag.

Acknowledgments. The authors thank J-L. Neyrinck and J-P. Decavel for expert technical assistance and Christine Mazingue and Martine Damonville for kind and helpful discussions. We are indebted to Dr. J-P. Kusnierz for the flow cytometry analysis.

REFERENCES

- Balloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138:3448.
- Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvallo, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326:149.
- Balloul, J. M., D. Boulanger, P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvallo, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *Schistosoma mansoni* expressed in *E. coli*. In: *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*. Alan R. Liss, Inc., New York, p. 77.
- Balloul, J. M., R. J. Pierce, J. M. Grzych, and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17:105.
- Auriault, C., J. M. Balloul, R. J. Pierce, M. Damonville, P. Sondermeyer, and A. Capron. 1987. Helper T cells induced by a purified 28-kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. *Infect. Immun.* 55:1163.
- James, S. L., J. K. Lazdins, M. S. Meltzer, and A. Sher. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 67:255.
- James, S. L., R. Correa-Oliviera, and E. J. Leonard. 1984. Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.* 133:1587.
- Sher, A., S. Hiény, S. L. James, and R. Asofsky. 1982. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. *J. Immunol.* 128:1880.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, J. H. Ouma, and A. E. Butterworth. 1987. Immunity to Schistosomes: Progress toward vaccine. *Science* 238:1065.
- Capron, M., and A. Capron. 1986. Rats, mice and men-models for immune effectors mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today.* 2:69.
- 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.
- Ramalho-Pinto, G., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. A. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
- Capron, A., M. Capron, H. Dupas, D. Bout, and A. Petitprez. 1974. Etude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiose humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 4:613.
- Boros, D. L., and K. S. Warren. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132:488.
- Courtney, M., A. Buchwalder, L. H. Tessier, M. Jaye, A. Benavente, A. Balland, V. Kohli, R. Lathe, P. Tolstoshev, and J. P. Lecocq. 1984. High level production of biologically active human γ -antitrypsin in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:669.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Hopp, T. P., and K. R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3824.
- Ponnuswamy, P. K., and R. Bhaskaran. 1984. Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. *Int. J. Protein Res.* 24:168.
- Janin, J. 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 277:491.
- Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149.
- Lee, A. C., J. E. Powell, G. W. Tregae, H. D. Niall, and V. C. Stevens. 1980. A method for preparing beta-HCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. *Mol. Immunol.* 17:749.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55:695.
- Julius, M. H., E. Simpson, and L. A. Herzenberg. 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3:645.
- Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorn, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810.
- Epstein, L. B. 1984. The special significance of interferon gamma. In: *Interferon, Vol. 2. Interferon and the Immune System*. J. Vilcek and E. E. Maeyer, eds. Elsevier, Amsterdam, p. 185.
- Pancré, V., M. Joseph, C. Mazingue, J. Wietzerbin, A. Capron, and C. Auriault. 1987. Induction of platelets cytotoxic functions by lymphokines: role of gamma interferon. *J. Immunol.* 138:4490.
- Von Lichtenberg, F. 1985. Conference on contended issues of immunity to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:78.
- Sher, A., S. R. Smithers, and P. MacKenzie. 1975. Passive transfer of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in laboratory mice. *Parasitology* 70:347.
- Smith, M. A., J. A. Clegg, D. Snary, and A. J. Trejdosiewicz. 1982. Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with an IgM monoclonal antibody. *Parasitology* 84:83.
- Maddison, S. E., and I. C. Kagan. 1979. Adoptive transfer of protective immunity in experimental schistosomiasis in the mouse. *J. Parasitol.* 65:515.
- Harrison, R. A., G. Bickle, and M. J. Doenhoff. 1982. Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology* 84:93.
- James S. L., J. K. Lazdins, S. Hiény, and P. Natovitz. 1983. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. VI. T cell-dependent lymphokine-mediated activation of macrophages in response to *Schistosoma mansoni* antigens. *J. Immunol.* 131:1481.
- Phillips, S. M., G. P. Linette, B. L. Doughty, J. E. Byram, and F. Von Lichtenberg. 1987. *In vivo* T cell depletion regulates resistance and morbidity in murine schistosomiasis. *J. Immunol.* 139:919.
- Kurt-Jones, E. A., S. Hamberg, J. Ohara, W. E. Paul, and A. K. Abbas. 1987. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness. *J. Exp. Med.* 166:1774.
- James, S. L., A. Sher, J. K. Lazdins, and M. S. Meltzer. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. II. Killing of transformed schistosomula *in vitro* by macrophages activated as a consequence of *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* 128:1535.
- James, S. L., P. C. Natovitz, W. L. Farrar, and E. J. Leonard. 1984. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis: macrophage activation in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae. *Infect. Immun.* 44:469.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph, J. C. Ameisen, and A. B. Tonnel. 1986. From parasites to allergy: a second receptor for IgE. *Immunol. Today.* 7:15.
- Damonville, M., J. Wietzerbin, V. Pancré, M. Joseph, A. Delannoye, A. Capron, and C. Auriault. 1988. Recombinant tumor necrosis factor mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J. Immunol.* 140:3962.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, M. E. Wiebe, and B. Y. Rubin. 1983. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158:670.
- Snapper, C. M., F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1988. Regulation of IgG₁ and IgE production by interleukin 4. *Immunol. Rev.* 102:51.

41. Auriault, C., H. Gras-Masse, I. Wolowczuk, R. J. Pierce, J. M. Balloul, J. L. Neyrinck, H. Drobecq, A. Tartar, and A. Capron. 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *S. mansoni* P28 antigen in the rat model using synthetic peptides. *J. Immunol.* 141:1687.
42. James, S. L., and A. Sher. 1983. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with irradiated cercariae. III. Identification of a mouse strain, P/N, that fails to respond to vaccination. *Parasite Immunol.* 5:567.

ARTICLE 2

*

Analyse des épitopes T et B de l'antigène P28 de *Schistosoma mansonii* par l'utilisation de peptides synthétiques dans le modèle expérimental du rat.

*

L'objectif de ce travail était de déterminer les épitopes B et T "helper" de Sm28 GST, en utilisant 3 peptides de synthèse dérivant de la séquence de la molécule recombinante: le 24-43, le 115-131 et le 140-153. Cette étude a été faite chez le rat pour lequel les mécanismes d'immunité à médiation humorale prédominent. Dans le cas de la protection induite par Sm28 GST, les Ac (IgG et IgE) spécifiques de Sm28 GST rendent les éosinophiles cytotoxiques pour la larve *in vitro* et transfèrent l'immunité à des animaux receveurs *in vivo*.

-- Détermination des épitopes B de Sm28 GST (analyse par immunopreinte et Western- Blotting).

Des sérums de rats infectés (42 jours) ou immunisés par Sm28 GST, contiennent des IgG spécifiques du 24-43 et du 115-131.

Un sérum anti- 24-43 reconnaît une bande à 28 kDa parmi les Ag extraits du ver adulte, ce qui n'est pas le cas d'un sérum anti- 115-131.

Ces techniques n'ont pas permis de détecter des IgE spécifiques du 24-43 ni du 115-131, dans les sérums des animaux immunisés par Sm28 GST.

Le 24-43 et le 115-131 contiennent donc des épitopes B, cibles des IgG spécifiques de Sm28 GST.

-- Détermination des sous- classes d' IgG spécifiques du 24-43 et analyse fonctionnelle.

Des sérums de rats infectés ou immunisés par Sm28 GST (Fischer ou Brown Norway) contiennent des IgG2a spécifiques du 24-43. Aucun isotype bloquant IgG2c n'est détecté dans ces sérums.

Le sérum des rats Fischer infectés contient également des IgG1 spécifiques du 24-43.

Les sérums des rats immunisés par 24-43 ou 115-131 sont capables de rendre les éosinophiles cytotoxiques pour le schistosomule *in vitro*.

Ainsi, les peptides 24-43 et 115-131 contiennent des épitopes B cibles des Ac cytotoxiques impliqués dans les mécanismes d'ADCC aboutissant à la destruction du parasite.

-- Détermination des épitopes T de Sm28 GST.

Le peptide 24-43 induit la prolifération la plus importante des cellules de rats infectés ou immunisés par Sm28 GST. La restimulation par le 115-131 est plus faible, le 140-153 induisant une prolifération moins reproductible entre les nombreuses expériences réalisées, sans doute à cause d'une constitution chimique le rendant très instable en solution.

-- Détermination des épitopes T et B du 24-43

Ainsi que nous l'avons vu dans l'Article 1, nous disposions de peptides représentant les parties N- (10-36) et C- (29-53) terminales du 24-43.

Des LcT anti- Sm28 GST sont incubés *in vitro* avec ces 3 peptides, le peptide 10-36 induit la prolifération maximale comme dans le cas de la souris (Article 1). Des sérums spécifiques de Sm28 GST ou de 24-43 reconnaissent le 24-43 et le 29-53 mais pas le 10-36. L'épitope T du 24-43 est donc situé dans la partie N- terminale alors que l'épitope B est dans la partie C- terminale.

-- Rôle fonctionnel des LcT spécifiques du 24-43.

Des lignées lymphocytaires ont été dérivées *in vitro*, elles sont restimulables par Sm28 GST et les Ag de stade de développement du parasite: l'Ag d'adulte induisant la restimulation la plus forte.

Le transfert passif des lignées T anti-24-43, avant l'immunisation par la molécule recombinante Sm28 GST, conduit à une augmentation du taux d'IgE spécifiques de Sm28 GST, le taux d' IgG restant inchangé.

En conclusion, le peptide 24-43 contient à la fois un épitope B (dans sa région C- terminale) et un épitope T (dans sa région N- terminale).

Des anticorps IgG2a spécifiques du peptide 24-43 sont fonctionnels puisqu' ils participent à des mécanismes d'ADCC impliquant les éosinophiles comme cellules effectrices.

Les lymphocytes T spécifiques du 24-43 ont un rôle "helper" dans la production d'IgE spécifiques de Sm28 GST.

Le peptide 115-131 contient également des épitopes T et B mais l'approche était compliquée par sa faible immunogénicité. Ainsi que nous le verrons dans l'Article 4, ce problème a été résolu par l'utilisation de constructions multiples du peptide 115-131.

ANALYSIS OF T AND B CELL EPITOPES OF THE *Schistosoma mansoni* P28 ANTIGEN IN THE RAT MODEL BY USING SYNTHETIC PEPTIDES¹

CLAUDE AURIAULT,^{2*} HÉLÈNE GRAS-MASSE,[†] ISABELLE WOLOWCZUK,^{*}
 RAYMOND J. PIERCE,^{*} JEAN-MARC BALLOUL,^{*} JEAN-LOUP NEYRINCK,^{*} HERVÉ DROBECQ,[†]
 ANDRÉ TARTAR,[†] and ANDRÉ CAPRON^{*}

From the ^{*}Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France, and [†]Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France

The *Schistosoma mansoni* P28 molecule is an Ag inducing protective immunity in various experimental models. Three synthetic peptides, derived from the primary sequence of the recombinant P28 and comprising amino acids 24-43, 115-131, and 140-153, respectively, were synthesized according to their hydrophilicity, mobility, and accessibility profiles. The presence of B and T lymphocyte epitopes in these peptides has been examined in the rat model. The results showed that the 24-43 and the 115-131 peptides contained major epitopes for IgG but not for IgE. Moreover, the 24-43 peptide-specific IgG produced after injecting either the recombinant P28 Ag or the 24-43 peptide coupled to tetanus toxoid was essentially of the IgG2a subclass and to a lesser extent of the IgG1 subclass, whereas no IgG2c was detected. These 24-43 peptide-specific antibodies were cytotoxic in vitro for schistosomula in the presence of eosinophils as effector cells. The 24-43 and the 140-153 peptides contained major targets of T lymphocytes specific for the recombinant P28 Ag. T cell lines specific for the 24-43 peptide have been prepared. These cells proliferated in vitro when stimulated with various *S. mansoni* crude antigenic preparations or with the recombinant P28 Ag. Moreover, their passive transfer to rats immunized with the P28 Ag led to a significant increase in specific IgE without modifying the IgG response.

The P28 of *Schistosoma mansoni* has been recently shown to be a potential vaccinating molecule against schistosomiasis (1). Indeed, the native molecule as well as the recombinant protein obtained after molecular cloning were able to induce a strong protective immunity in the rat, mouse, hamster (1, 2), and baboon (3). In the rat model, much work has been devoted to the antibody response and the protective effects of P28 Ag-specific IgG and IgE in vitro in the presence of eosinophils as effector cells or in vivo after passive transfer to infected animals. The thymodependency of the defense against *S. mansoni*

infection led us to study the role of the 28-kDa Ag-specific T lymphocytes (4) in the protective effects observed. T cell lines and clones were prepared and examined for their helper and protective capacities. The passive transfer of these cells to infected rats led to a significant protection correlated with an increase in the production of 28-kDa Ag-specific antibodies. This suggested that epitopes of the 28-kDa molecules elicit Th cells essential in stimulating prophylactic immunity in which cytotoxic antibodies represent a major component. Moreover, although numerous experiments clearly indicated the prominent role of humoral immunity in the rat model, the role of T lymphocytes cannot be restricted only to the amplification of antibody production. Indeed in the mouse model the induction of T lymphocyte reactivity toward schistosomula leads to the activation of macrophages inducing a partial resistance to schistosome infection without involving antibodies (5). Antibody-dependent and -independent protective mechanisms are probably involved together in human schistosomiasis and both require antigen-specific T lymphocyte reactivity.

An ideal vaccine against schistosomiasis has to be highly immunogenic and able to induce both T and B cell schistosome-specific immunity. For these reasons, the identification of the major epitopes of the 28-kDa Ag has been undertaken by using synthetic peptides deduced from the primary structure of the molecule.

MATERIALS AND METHODS

Media and reagents. RPMI 1640 (GIBCO, United Kingdom), containing 20 mM HEPES, 100 U penicillin/ml, and 100 µg streptomycin/ml was usually supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M mercaptoethanol and 1 mM sodium pyruvate and contained inactivated FCS (Florio, United Kingdom).

Anti-rat IgG subclass antisera. Sheep anti-subclass IgG1 and goat anti-subclasses IgG2a and IgG2c antisera were obtained from Miles (Rehovot, Israel).

Parasite life cycle. A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was used throughout the study (6). Schistosomula were obtained in vitro from cercariae by a mechanical procedure (7) or after skin penetration by the method of Clegg and Smithers (8). Adult worms were collected by perfusion of the liver and the mesenteric vein 40 days after the infection of hamsters (1000 cercariae/animal) (9). *Schistosoma* egg extract was prepared according to the method of Boros and Warren (10).

Rats. Male inbred Fischer/ICO F 344 rats expressing the RT1^M haplotype were used throughout the experiments. The animals were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur.

Immunization procedures. Fischer rats were immunized either once or several times at the base of the tail with either the recombinant P28 (250 µg) molecule or the peptides with CFA. The peptides (100 µg) were injected coupled to tetanus toxoid as a carrier for the first injection and without carrier and adjuvant for a second and a

Received for publication March 9, 1988.

Accepted for publication June 6, 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 This investigation received financial assistance from UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and training in tropical diseases.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

third injection at 1-wk intervals.

Synthetic peptides. The determination of the primary structure of P28 by sequencing of the cDNA clone (2) allowed the prediction of exposed sequences according to their hydrophilicity using Hopp and Woods's (11) method, or according to their mobility or accessibility (Fig. 1), by using unpublished methods based, respectively, on statistical data derived from displacement values (12) or partition coefficients of amino acids between the interior and exterior of globular proteins (13).

Peptides synthesized by solid phase synthesis (14) on chloromethyl-resin were protected as follows: Arg (Tos), Cys (acm), Asp and Glu (OBzl), Ser and Thr (Bzl), Lys (ClCbz), Tyr (2-6 diCbzl). After high frequency cleavage, the crude peptides were purified by gel filtration on Fractogel TSK-HW40-S (Merck) in aqueous HCl (pH 2) and lyophilized. They were checked for homogeneity by TLC and reverse-phase-HPLC, and for identity by amino acid analysis after total acid hydrolysis.

Conjugation of synthetic peptides with carrier proteins. Peptides 24-43 and 140-153 were conjugated to tetanus toxoid or to OVA with glutaraldehyde. Peptide (1.5 μ mol) was dissolved with the carrier protein (2 mg) in 100 mM sodium phosphate (pH 7) and the pH was then adjusted to 8 with sodium hydrogenocarbonate. A solution of 20 μ l of 2.5% glutaraldehyde was then added daily for 3 days with continuous stirring. After 4 days, the resulting mixture was dialyzed exhaustively against 0.15 M NaCl. Peptide 115-131 was conjugated through its thiol group to tetanus toxoid or to OVA with 6-maleimidocaproic acyl *N*-hydroxysuccinimide as the heterobifunctional cross-linking agent (15). The conjugates were sterilized by filtration on 0.22 μ m nitrocellulose filters (GV Milllex).

Peptide polymerization. Peptide (hydrochloride) (5 μ mol) was dissolved in 200 μ l of water and the pH was adjusted to 8 with sodium bicarbonate. Benzotriazolyl-oxo (trisdimethylamino-phosphonium-hexafluorophosphate) (5 μ mol) dissolved in 50 μ l of water was added with continuous stirring. After 12 h at room temperature, the resulting polymer was dialyzed against 0.15 M NaCl on a YM2 (Amicon).

Radioiodination. The 24-43 peptide was radioiodinated by the chloramine T procedure. Briefly, 100 μ g of peptide in 100 μ l were mixed with 3.7 MBq 125 I-Na (0.1 mCi) (Radiochemical Centre, Amersham, UK) and 100 μ l fresh chloramine T (1 mg/ml in 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) were added drop by drop. After gently mixing for 1 min, sodium metabisulfite (200 μ g/200 μ l in 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7.4) was added to stop the reaction.

Separation of free iodine and the labeled fraction was carried out

by gel filtration through a Sephadex G-25 column (PD 10; Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated with 25 ml of PBS supplemented with 10% FCS (GIBCO Ltd., Paisley, UK).

The iodination yield was estimated as the ratio of the activity in the protein fraction to the total radioactivity eluted, and the sp. act. was calculated. Labeled protein fractions were collected, diluted 1/2 by volume with 2% FCS, and frozen in several aliquots in order to minimize radiolysis.

Solid phase immunoassay procedure. 1) Anti-peptide 24-43 IgG subclass determination: Microtiter plate wells (Falcon, microtest flexible assay plate) were coated for 36 to 48 h at room temperature with 0.1 ml/1 μ g of the different anti-rat subclass antisera in 0.1 M Na₂CO₃ (pH 9.5) buffer. A 2-h saturation at room temperature was then carried out by addition of 0.1 ml 10% FCS.

The plates were then washed three times in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS/Tween; Sigma, St. Louis, MO) before the addition of 0.1 ml of appropriate dilutions of the sera to be tested.

All the plates were then incubated at room temperature for an 18- to 24-h period, then washed five times in PBS/Tween. A final 12- to 18-h incubation was carried out to detect the presence of specific isotypes in sera by addition of 0.1 ml (10⁵ cpm) of the radiolabeled 24-43 peptide. After three further washes, as described above, the wells were cut out and counted in a gamma counter (LKB, Sweden) with a counting efficiency of 60%.

2) Determination of IgG and gE antibodies in anti-P28 sera: Microtiter plates were coated for 36 to 48 h at room temperature with 0.1 ml/1 μ g of recombinant P28, adult-worm Ag, or 0.1 ml/5 μ g of peptides (24-43 and 115-131) at room temperature in 0.1 M Na₂CO₃ (pH 9.5) buffer. After washing in PBS/Tween, 0.1 ml of anti-P28 rat sera at 1/5, 1/10, and 1/50 dilutions was added. After incubation at room temperature for 18 to 24 h and five washes in PBS/Tween, radiolabeled anti-IgG or IgE (10⁵ cpm) (MIAB Uppsala, Sweden) was added. At the end of the incubation three further washings were carried out. The wells were then cut out and counted as described above.

The increased bound radioactivity in the presence of positive sera (B_x) vs a negative control (B_0) was calculated according to the formula:

$$\Delta \% = \frac{B_x - B_0}{B_0} \times 100.$$

Antigen preparation. Adult worms were homogenized in PBS by using a Potter-Elvehjem homogenizer and the homogenate was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 20 min.

Western blotting of SDS-PAGE. SDS-PAGE was carried out on slab gels according to the Laemmli method (16) by using an LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden). Gels were composed of a 5% acrylamide stacking gel and a homogeneous 13% acrylamide separating gel. Samples were dissolved in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% sucrose, and 0.005% bromophenol blue (sample buffer) and heated at 100°C for 3 min before loading on gels. A mixture of m.w. marker proteins (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) was run in parallel.

Whole adult worm Ag polypeptides were transferred from the separating gel to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schüll, Dassel, FRG) by using procedures based on those of Towbin et al. (17) and exactly as previously described (18). Fixed IgG from rats immunized with the 24-43 peptide was revealed by incubation with peroxidase labeled anti-rat IgG and stained after enzymatic reaction.

Dot blot immunobinding assay. Several dilutions (1 to 1/16 in PBS) of antigenic solutions of 1 mg/ml were dot-blotted on nitrocellulose paper (1 μ l/spot). The saturation was carried out for 1 h in PBS containing 18 g/liter NaCl and 1.5% casein. Samples were then reacted for 2 h with 1/50 dilutions of sera under agitation. After washing, anti-Rat Ig peroxidase (1/500) in PBS-casein buffer was added and incubated for 2 h and developed after washing in the development buffer containing 30 mg horseradish peroxidase (color development reagent) (Biorad Munchen, West Germany) in 10 ml methanol, 40 ml PBS, and 30 μ l H₂O₂ for 10 to 20 min. The reading of each spot was carried out by using a densitometer (D142-1 Gretag, Switzerland). The results were expressed as OD.

Eosinophil cytotoxicity assay. Rat eosinophils were prepared as already described (19). Fifty skin-prepared schistosomula were dispensed into each well of a flat-bottomed microtiter plate (Nunc/Roskilde, Denmark) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in Eagle's MEM (Difco, Detroit, MI) containing immune or normal rat sera. After overnight incubation, 100 μ l of the mast cell depleted eosinophil population (6000 effector cells to 1 target) were added to each well of the cytotoxicity assay. The percentage of cytotoxicity was measured after 48-h contact between effector cells and targets by microscopical examination. Schistosomula were counted as dead if they were immobile, granular, and opaque and were surrounded

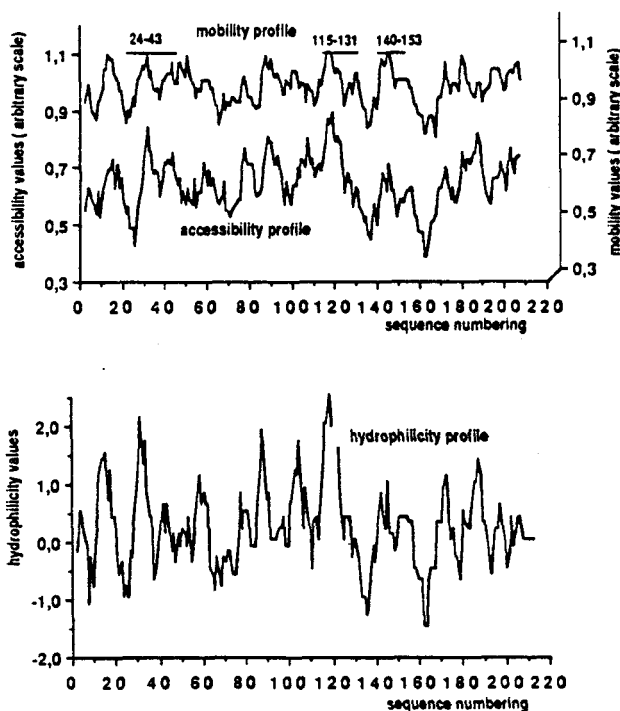


Figure 1. Analysis of the recombinant P28 Ag sequence according to the mobility and hydrophilicity (11) profiles. Mobility values (12) and accessibility values (13) were used in algorithms similar to the methods proposed by Hopp and Woods (11) for calculating local hydrophilicity. Accessibility values take into account the m.w. of the studied protein (12). Arbitrary scales were used.

by one or several layers of cells.

Preparation of specific T lymphocytes. Inguinal lymph node T lymphocytes were harvested aseptically and cell suspensions were prepared. T lymphocytes were then separated by passage through a nylon wool column (20) and maintained at 37°C in a 5 to 7% CO₂-atmosphere in RPMI with 5% FCS, the various antigenic preparations, IL-2 and irradiated (2000 rad) thymic APC in 96- or 24-well plates (Falcon 3072 and 3047). T lymphoblasts were prepared 5 days after the last antigenic stimulation and purified on a Percoll discontinuous density gradient (21). IL-2 containing medium was obtained by stimulation of murine EL-4 tumor cells with PMA. IL-2 activity of the conditioned medium was tested by its ability to allow the growth of a long term cytotoxic T cell population.

Proliferation assay. Cultures incubated for various periods with or without Ag were pulsed with 0.5 μCi of [³H]thymidine (sp. act. 1 Ci/mmol, TMN-79 A, CEA, France) usually for the last 16 h of incubation. Cells were harvested by filtration on fiberglass disks by using a multiharvester (Skatron, Norway) and the amount of incorporated [³H]thymidine was measured in a liquid scintillation counter.

In vivo transfer of 24-43 peptide-specific T cell lines. One day before immunization with the recombinant P28 Ag, 15 × 10⁶ 24-43 peptide specific T lymphoblasts (propagated in in vitro culture for 1 mo) were injected i.v. into each rat. Control rats were injected intravenously with 15 × 10⁶ tetanus toxoid specific T lymphocytes. P28-specific IgG and IgE responses were estimated by the solid phase immunoassay procedure described above.

RESULTS

Determination of B cell epitopes by using the 24-43 and 115-131 peptides. A pool of sera from normal rats, an immune rat serum recovered 42 days after infection and sera of three rats immunized with the recombinant P28 Ag and a pool of sera from five rats immunized with the peptide 24-43 were tested in a dot blot immunoblotting assay by using the 24-43 peptide as target (Fig. 2). The peptide was coupled to OVA to improve the presentation of epitopes to antibodies. Peptide-specific IgG were detected by using an anti-rat IgG and the results obtained demonstrated that anti-24-43 peptide sera, immune rat

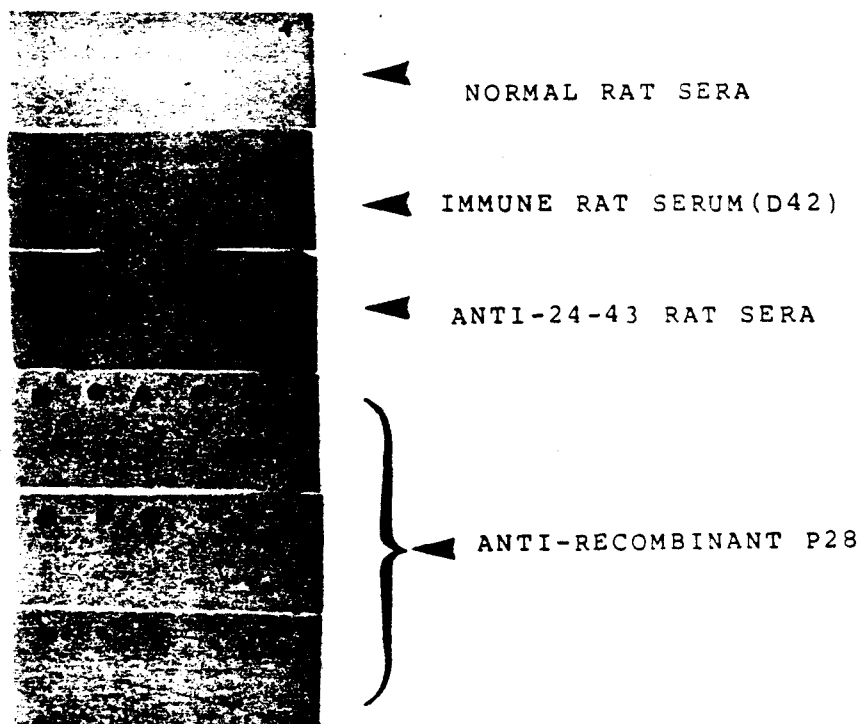
serum, and two of the three anti-recombinant P28 Ag sera contained IgG able to bind the 24-43 peptide. In contrast no spots were observed when a normal rat serum was used and no cross-reactivity was observed toward OVA alone with any of the sera tested.

These preliminary results suggested that the 24-43 peptide contained an epitope for IgG specific for the 28-kDa Ag. In order to test this hypothesis, adult worm Ag were separated by SDS-PAGE, followed by Western blotting (Fig. 3). Development with peroxidase-labeled anti-rat IgG showed a unique band at the M_r of 28-kDa, thus demonstrating that anti-24-43 peptide serum was specific for the native Ag.

IgG and IgE responses of Fischer rats immunized once i.p. with 100 μg of recombinant P28 Ag in the presence of CFA were analyzed by a solid phase immunoassay procedure. Figure 4 shows that, in these experimental conditions, specific IgG and IgE against adult worm Ag or recombinant P28 Ag were detected. In contrast, despite the presence of anti-P28 Ag IgE in the sera, only an IgG response toward the 24-43 and the 115-131 peptides was evidenced. This suggested that these peptides contained epitopes for IgG and not for IgE. Nevertheless after several immunizations without adjuvants, 24-43 and 115-131 peptide specific IgE were detected (data not shown). With 115-131 peptide, although sera of P28 Ag immunized rat detected this peptide, the Western blotting analysis using anti-115-131 sera never revealed any antigenic material in an adult worm homogenate.

Eosinophil-dependent cytotoxicity of anti-24-43 peptide IgG. Rat IgG have been demonstrated to be cytotoxic antibodies in the presence of eosinophils. In fact, only the anaphylactic subclass of IgG, namely IgG2a was cytotoxic. In contrast, IgG2c exerted a blocking effect (22).

Figure 2. Dot blot immunobinding assay of antibody responses toward the 24-43 peptide with normal and infected rat sera (day 42 post-infection), anti-24-43 peptide rat (pool of five rats) or sera of three rats immunized with the recombinant P28 Ag. All the sera were used at the dilution of 1/50. Several dilutions of the 24-43 peptide (1 to 1/16 of a solution of 1 mg/ml) were tested.



ANTIGEN DILUTIONS (1 TO 1/16)

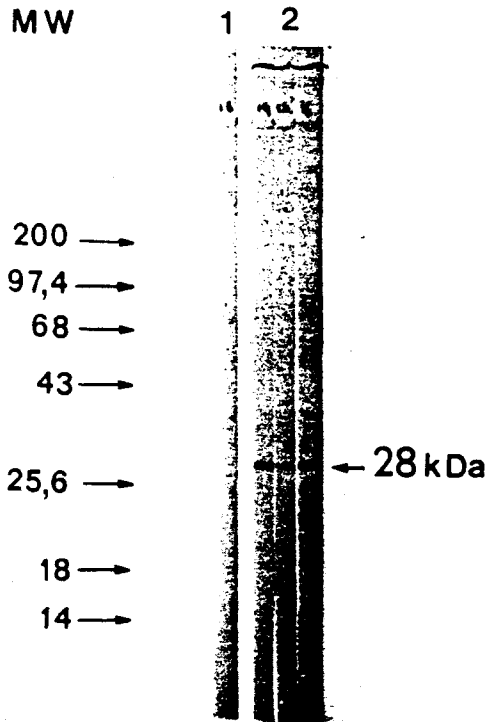


Figure 3. SDS-PAGE followed by Western blotting of adult worm Ag revealed by (1) a normal rat serum, (2) sera of three rats immunized with the 24-43 peptide. Prestained M_r standards (GIBCO-BRL, Cergy-Pontoise, France) were used.

For this reason the analysis of the main IgG subclasses specific for the 24-43 peptide present in either Fischer or brown Norway immune rat sera recovered 42 days after infection, or in anti-recombinant P28 Ag sera was undertaken. Brown Norway rat immune sera were used to be compared with Fischer rat immune sera, because during infection this strain produces a high level of specific antibodies. Figure 5 shows that with both the immune Fischer and brown Norway rat sera and the anti-

P28 sera, the IgG response toward the 24-43 peptide concerned essentially IgG antibodies of the IgG2a subclass. In contrast, no IgG2c were produced. A slight IgG1 response was observed essentially in the sera from infected Fischer rats. These results suggested that the 24-43 peptide could contain a target epitope of cytotoxic antibodies in antibody dependent cellular cytotoxicity mechanisms when eosinophils are effector cells. To test this hypothesis an antibody-dependent cytotoxicity assay was carried out by using sera prepared against the 24-43 peptide. Figure 6 shows that although a normal rat serum induced 17% cytotoxicity toward schistosomula, an anti-24-43 serum reached 39% ($p < 0.05$ when compared with normal rat serum) and an immune rat serum 57%. The sera themselves tested without cells were not toxic. Thus the cytotoxicity observed was due to the interaction of eosinophils and IgG2a through the IgG FcR and the 24-43 peptide was probably a major target inducing the eosinophil-killing mechanism. Anti-115-131 peptide sera were also able to induce an eosinophil-dependent cytotoxicity. The percentage of larval killing was equivalent to that obtained with anti-24-43 sera ($40 \pm 3\%$). This suggested that 115-131 peptide contained a B cell epitope despite the fact that an anti-115-131 peptide serum did not recognize the native P28 Ag (see above) in Western blotting analysis.

Stimulation of T lymphocytes with P28 Ag-derived peptides. Evidence for a 24-43 peptide-specific response of lymphocytes was determined by incubating nylon wool separated inguinal T lymphocytes of infected (D42) Fischer rats with 1, 5, 10, or 20 μg of 24-43 peptide either coupled to OVA or not (Fig. 7A). The results demonstrate that at these concentrations only 24-43 OVA induced a proliferative response, whereas OVA alone did not. Inguinal T lymphocyte blastogenesis from rats immunized with the recombinant P28 Ag was estimated in the presence of 24-43, 140-153, and 115-131 peptides coupled or not to OVA. Figure 7B shows that as observed

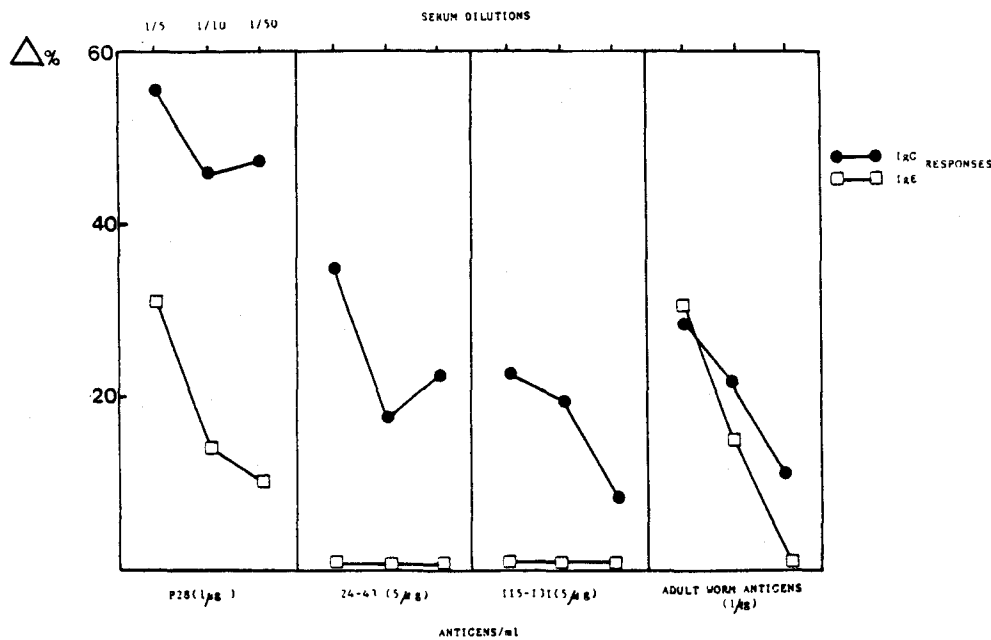


Figure 4. Determination of specific IgG and IgE in sera of rats immunized with the recombinant P28 Ag toward the P28 molecule, adult worm Ag or the 24-43 and 115-131 peptides in a solid phase immunoassay. Microplates were coated with the various Ag before the successive addition of anti-P28 rat sera and radiolabeled anti-IgG or anti-IgE.

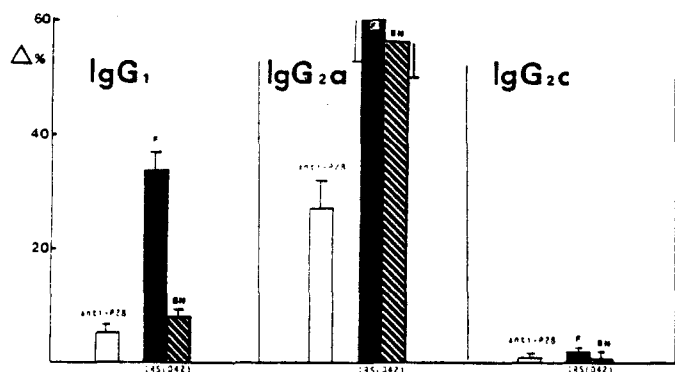


Figure 5. Analysis of the IgG subclasses (IgG1, IgG2a, and IgG2c) toward the 24-43 peptide by using the serum of rats immunized with the recombinant P28 Ag (open bars) or sera of infected Fischer (F) rats (solid bars) and infected Brown Norway (BN) rats (hatched bars) in a solid-phase immunoassay. Microplates were coated with goat anti-rat subclass before the successive addition of sera to be tested and radiolabeled 24-43 peptide.

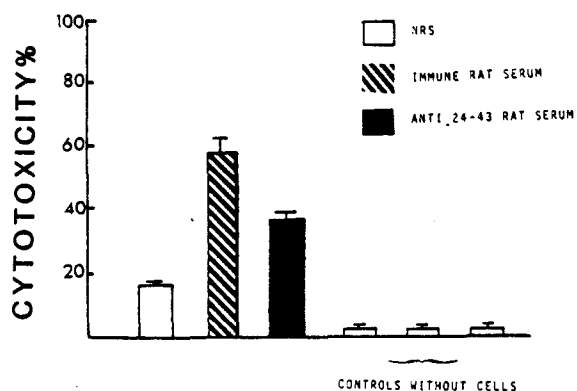


Figure 6. Eosinophil-dependent cytotoxicity toward schistosomula by using a normal rat serum (NRS), serum of infected rats recovered 42 days after infection, or serum of rats immunized with the 24-43 peptide. The cytotoxicity was appreciated as the percentage of dead larvae.

with T lymphocytes from infected rats, 24-43 peptide stimulates the P28 Ag specific T cells when coupled to OVA. The same results were obtained when the peptide was coupled to another carrier (tetanus toxoid) (data not shown) although stimulation was never observed with the carrier alone. Peptide 140-153-OVA also induced a strong proliferative response, whereas peptide 115-131-OVA did not. These results suggested that peptides 24-43 and 140-153 contained a molecular structure recognized by the receptor of T cell subsets specific for the P28 Ag. The necessary association of the peptide with a carrier raised the question of the presence of the functional epitope in the peptide sequence. The 24-43 and 140-153 peptides were homopolymerized (mean M_r , 15 kDa) and used to test the lymphoblastic transformation of P28 Ag specific lymph node T lymphocytes (Fig. 8). This series of experiments showed that used at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a slight proliferation of the T cells was observed with the 24-43 peptide but the stimulation was increased four-fold when the peptide was polymerized and reached the level of proliferation observed by using the recombinant P28 Ag as immunogen. The proliferative response was not due to a mitogenic effect of the polymerized 24-43 peptide since no response was observed with nonimmune T cells.

In contrast, the 140-153 peptide whether homopolymerized or not did not induce T cell activation, because

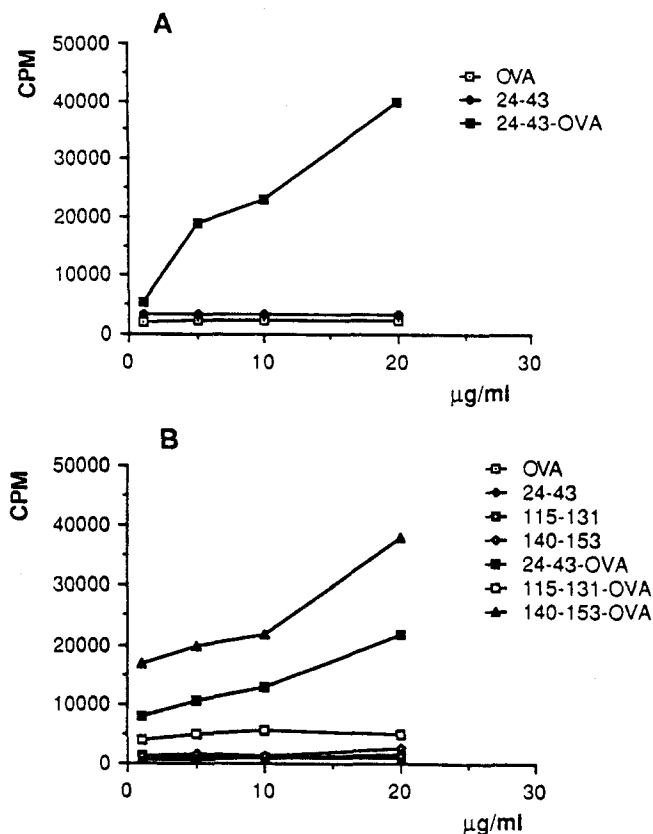


Figure 7. Proliferative response of T lymphocytes from infected rats after stimulation with the 24-43 peptide coupled or not to OVA (A) and from rats immunized with the recombinant P28 Ag after stimulation with the 24-43, 115-131, and 140-153 peptides coupled or not to OVA (B).

the [^3H]thymidine uptake was comparable to that observed with the control without Ag (T + APC).

These results demonstrate that even in the absence of carrier the 24-43 peptide was able to restimulate 28-kDa T lymphocytes, and suggest that this peptide probably contains a potent T cell epitope.

Determination of the T and B cell epitopes in the 24-43 peptide. The synthesis of peptides framing the amino (peptide 10-36) or the carboxyl (peptide 29-53) termini of the 24-43 peptide were carried out. T cells from animals immunized with the recombinant P28 Ag were restimulated with the three peptides (10-36, 24-43, and 29-53). The results presented in Figure 9A show that the proliferation observed with the peptide 10-36 was higher than that observed with the two other peptides (reproduced in six experiments). Indeed when the peptides were used at the concentration of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ the proliferative response observed was twofold superior when the peptide 10-36 was used as immunogen ($p < 0.05$ when compared with 29-53 peptide-induced proliferations at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In contrast, the stimulation induced by the two other peptides was similar suggesting that probably two T cell epitopes were located in the 24-43 peptide, one at the NH_2 terminus and the other at the carboxyl end. All the peptides were used coupled with OVA and no stimulation with OVA alone was observed.

The same peptides were used as targets of normal rat serum, anti-recombinant P28 Ag serum or anti-24-43 peptide serum in a dot-blot immunobinding assay. The results were quantified by reading the spots with a densitometer (see *Materials and Methods*) and Figure 9B

EPITOPES OF P28 ANTIGEN

1692

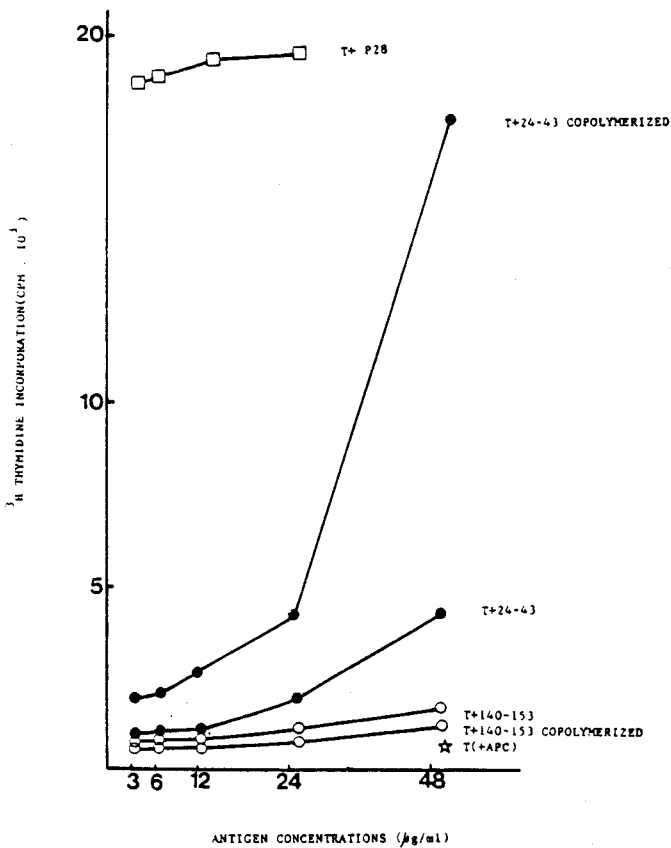


Figure 8. Proliferative response of T lymphocytes from rats immunized with the recombinant P28 Ag after stimulation with monomeric or homopolymerized peptides by the recombinant P28 Ag.

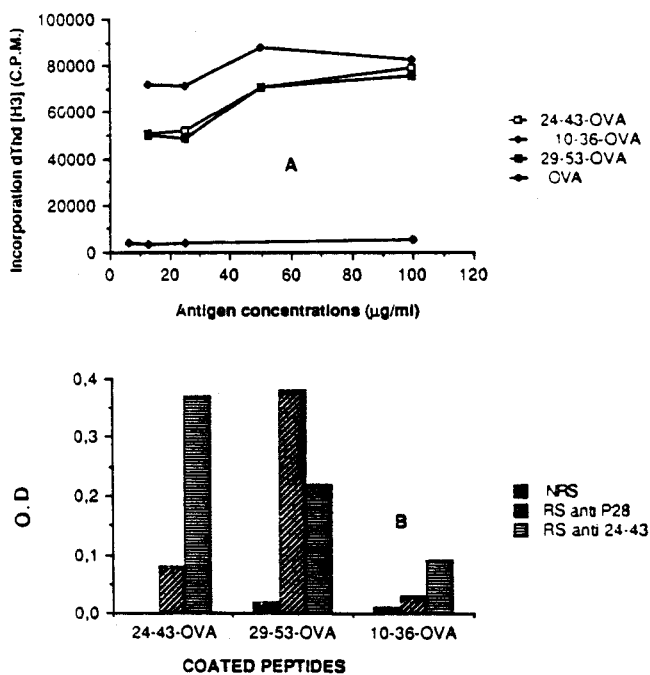


Figure 9. Proliferative response of T lymphocytes from rats immunized with the recombinant P28 Ag after stimulation with the 24-43, 10-36, and 29-53 peptides coupled to OVA (A). At the concentrations 25 µg/ml and 50 µg/ml the proliferative responses obtained after peptide 29-53-OVA and peptide 10-36-OVA stimulations were significantly different ($p < 0.05$). Quantitative dot blot immunobinding assay toward the 24-43, 10-36, and 29-53 peptides with sera from recombinant P28 Ag and 24-43 peptide (B).

clearly shows that the maximum response was obtained with the 29-53 peptide when using either anti-P28 serum (0.38) or anti-24-43 serum (0.22). The response toward the 24-43 peptide was less marked with the anti-P28 Ag serum (0.08) than with the anti-24-43 serum (0.36). In contrast with both sera only a very low level of binding was detected when the 10-36 peptide was used as a target. In all cases no binding was observed with the normal rat sera used as controls. This strongly suggests that the B cell epitope is located at the carboxylic end of the 24-43 peptide.

Preparation of 24-43 peptide specific T cell lines. T cell lines specific for the 24-43 peptide were established by incubating nylon wool separated 24-43 peptide primed inguinal T lymphocytes with the 24-43 peptide coupled to OVA, in a medium containing IL-2, for 3 to 4 wk in vitro. After this period, the proliferation of the lymphoblasts in response to various antigenic preparations corresponding to several developmental stages of the parasite or the recombinant P28 molecule was tested (Table I). Even after several weeks of culture, 24-43 peptide primed T lymphocytes were still stimulated with schistosome extracts. The maximum response was obtained with the adult worm Ag. Under the same conditions the 24-43 peptide specific T cells exhibited a weaker but significant proliferative response when challenged in vitro with eggs and schistosoma extracts. A strong proliferative response was obtained when the recombinant P28 Ag was used as immunogen. An irrelevant Ag such as OVA was unable to stimulate 24-43 peptide specific T cells.

Passive transfer of 24-43 peptide T specific cell T lines to rats immunized with the recombinant P28 Ag. Continuing from the previous in vitro results showing the proliferation of specific T cells propagated several weeks in vitro in response to antigenic stimulation, the in vivo effect of these cells was tested by injecting them i.v. into syngeneic rats (15×10^6 lymphoblasts/rat) 1 day

TABLE I

In vitro proliferative response of 24-43 peptide primed Fischer rat inguinal lymph node cells cultured for 3 wk in vitro and restimulated by various S. mansoni Ag preparations

Ag Source ^a	Concentration (µg/ml)	[³ H]Thymidine Incorporation (cpm ± SD)	<i>p</i> ^b
Adult worms	5	11.241 ± 273	<0.005
	10	13.109 ± 704	
	20	15.006 ± 662	
	40	21.111 ± 943	
Eggs	5	10.080 ± 766	<0.05
	10	10.160 ± 654	
	20	12.706 ± 463	
	40	17.864 ± 1162	
Schistosoma	5	7.662 ± 422	<0.05
	10	8.913 ± 213	
	20	10.143 ± 702	
	40	13.701 ± 664	
Recombinant P28	5	40.112 ± 1472	<0.005
	10	46.260 ± 2024	
	20	52.413 ± 1962	
OVA medium	20	450 ± 25	
		320 ± 32	

^a Source of Ag added to IL-2-containing medium in the presence of syngeneic APC.

^b After 5 days of culture (16-h pulse, 0.5 µCi/well) results are expressed as the mean of two triplicate cultures. Student's *t*-test was used for the comparison of means between nonstimulated cells and cells stimulated with 20 µg/ml of schistosome extracts or 20 µg/ml of recombinant P28.

before immunization with 100 μg of recombinant P28 Ag. After immunization the animals were bled every 4 to 5 days and the level of circulating P28 Ag-specific IgE and IgG antibodies was identified by a solid phase immunoassay procedure. The results presented in Figure 10 show that the passive transfer did not modify the level of anti-P28 IgG (Fig. 10B) but in contrast strongly increased the production of P28-specific IgE (Fig. 10A) when compared with sera of rats receiving 15×10^6 T cells specific for tetanus toxoid (used as carrier for the original immunization with the 24-43 peptide). In the Fischer rat a single immunization routinely induces only a weak anti-P28 response. The passive transfer of T cells specific for a peptide containing a natural T cell epitope led to a production of IgE usually detected after challenge, whereas the peptide itself was not demonstrated as being a major IgE epitope.

DISCUSSION

The ability of recombinant proteins or synthetic peptides to induce immune mechanisms toward a secondary stimulus with whole infections agent is of great interest in vaccination. Indeed, during *S. mansoni* infection antibodies which are formed against the native P28 Ag most probably have various specificities, only a part of them being involved efficiently in the protective mechanisms. Moreover, if a constant high level of protective antibodies are required for protection, the response to P28 encoded Th cell epitopes is necessary to induce antibody dependent immunity. The purpose of this work was the determination of B and T cell epitopes by using synthetic peptides derived from the sequence of the recombinant molecule that has been previously demonstrated to protect experimental animals after active immunization (1).

The results obtained can be summarized as follows: 1)

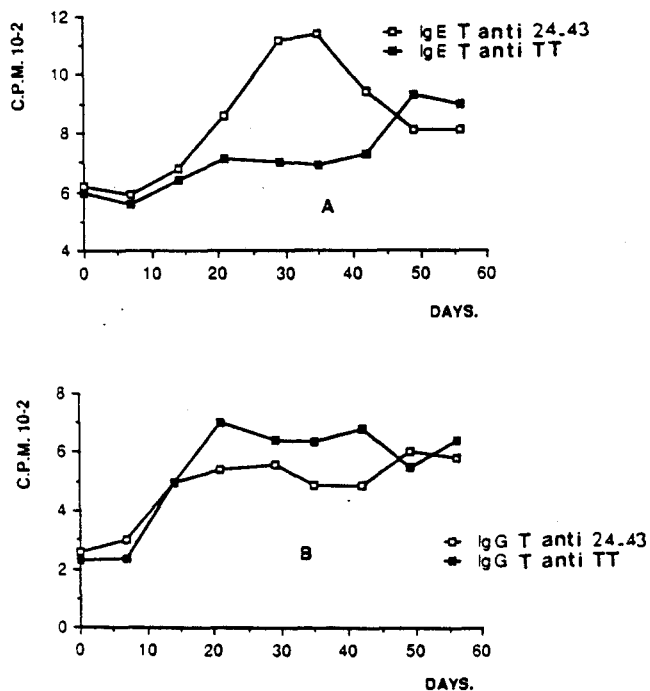


Figure 10. IgE (A) and IgG (B) levels in the sera of animals receiving 15×10^6 24-43 peptide-specific T cells (\square) or 15×10^6 tetanus toxoid-specific T cells as controls (\blacksquare). One day after T lymphocyte transfers, the animals were immunized with recombinant P28. The evaluation was carried out with a solid phase immunoassay procedure.

Two of the synthetic peptides tested, the 24-43 peptide and the 115-131 peptide, contain targets of IgG. Moreover, one of them, the 24-43 peptide, is a target of the IgG2a subclass involved in eosinophil dependent cytotoxicity; 2) two synthetic peptides, 24-43 and 140-153, are major targets of T cells derived either from infected rats for the 24-43 peptide or from rats immunized with the recombinant P28 Ag; 3) T cell lines specific for the 24-43 peptide when transferred to rats immunized with recombinant P28 exhibit a helper activity by increasing the production of P28 specific IgE; 4) the 24-43 peptide contain epitopes for both T and B cells but these epitopes seem located at distinct areas of the peptide since the stimulation of T cells required the NH_2 - and COOH -terminal portions of the peptide, whereas the P28 Ag-specific IgG bound to the carboxyl-terminal of the peptide.

With regard to the first point the induction of IgG2a (which is the anaphylactic IgG subclass in the rat) is of particular interest because, in this model, the balance between IgG2a and IgG2c determines the efficiency of the IgG-dependent protective mechanisms involving eosinophils as effector cells. Indeed, Grzych and colleagues (22) have demonstrated that during *S. mansoni* infection not only protective IgG represented by the IgG2a subclass are produced but also blocking antibodies of the IgG2c subclass which compete with IgG2a and annihilate the protective effect. One of the main questions asked, is: "Is it possible to induce IgG2a production without inducing IgG2c?" These results provide the first example of this possibility although, to be confirmed this hypothesis would necessitate the testing of several other peptides not only derived from the P28 Ag but also from other protective Ag. We now have to show that other epitopes are only recognized by IgG2c or the corresponding blocking antibodies in man. With regard to the second and the third points, two of the peptides tested are able to induce P28-specific T cell proliferation. Indeed, the 24-43 and 140-153 peptides are able to elicit strong T cell proliferative responses but only when coupled to a carrier protein which does not exhibit any stimulating effect by itself. Nevertheless, polymerization of the 24-43 peptide enabled T cell proliferation in the absence of carrier molecules.

The simplest explanation could be that either the structure binding of TCR is present in the synthetic peptide but that the epitope lacks the residues allowing interaction with MHC molecules or that the processing of the peptide alone by the APC, prevents the presentation of the required structure except when it is associated with another protein or is polymerized. Although this work clearly demonstrates that 24-43 peptide contains major T and B cell epitope(s), it would be imprudent to maintain that it represents the immunodominant epitope of the P28 Ag. A study, presently underway utilizing these three peptides and other new peptides from the P28 molecule determined according to different physicochemical properties, i.e., amphipathicity and α -helicity, will probably answer this important question in the context of the development of an efficient vaccine.

The helper activity of 24-43 peptide-specific T cells has been demonstrated after their passive transfer to rats immunized with the recombinant P28 Ag. Interestingly the helper effect concerns the P28-specific IgE production without modifying the production of IgG. Al-

though it could be speculated that the T cell epitope present in the 24-43 peptide could select T cells involved in the regulation of IgE synthesis, we have to take into account the fact that the 24-43 specific T lymphocytes have been expanded *in vitro* before their transfer. The culture conditions could maintain preferentially Th cells producing lymphokines such as IL-4 (23) demonstrated to be implicated in the regulation of the IgE response in the mouse. This hypothesis is supported by the fact that anti-P28 T cell lines were maintained in PMA-stimulated EL4 conditioned medium which is a rich source of IL-2 but also in IL-4. The presence of IL-4 could enable long term survival and expansion of Th2 cells (24). However, we have to take into account the fact that mouse IL-4 does not necessarily react with rat T cells. T cell clones specific for the 24-43 peptide now in preparation will perhaps provide a response to this question. Nevertheless although the 24-43 peptide is not a major IgE epitope, the T lymphocytes specific for this peptide are able to induce IgE production and this is of particular interest in the perspective of vaccination against schistosomiasis, because IgE has been demonstrated to be involved in protective immunity against schistosomes (25). Does this mean that 24-43 peptide specific T cell lines can confer a significant protection through the B cell maturation switch leading to the production of cytotoxic IgE? Moreover do distinct epitopes located within peptide 24-43 activate either IgG- or IgE-producing B cells? The present results cannot answer these questions. Nevertheless the T cell reactivity toward a 24-43 peptide containing epitope does not necessarily imply an anti-28 molecule IgE response against epitopes located in the same area of the molecule. In contrast these observations suggest that the 24-43 peptide could amplify the generation of T_H memory cells specific for immunogenic structures (localized in this epitope) allowing a higher IgE response soon after infection. Although the P28 Ag appears to contain epitopes such as the 24-43 peptide capable of stimulating T cells to help the B cell response, it is necessary to evaluate T cell epitopes implicated in antibody-independent cellular mechanisms also shown to be implicated in protection (26, 27). This study is at present underway with the mouse as a model inasmuch as, in contrast to the rat, T cell-dependent cellular immunity against schistosomes seems to play a preponderant role. Moreover, this model offers the possibility of estimating not only the repertoire of P28 Ag-specific T cells involved in granuloma formation and consequently pathologic disorders, but likewise the determination of immunodominant epitopes by using P28 Ag high and low responder strains already identified. The approach outlined here should be useful to increase the immunogenicity of synthetic or recombinant fragment vaccines against schistosomiasis.

Acknowledgments. The authors would like to thank Catherine Vendeville for expert technical assistance and Claudine Colson and Marie-France Massard for their help in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- Balloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* worms protects rat and mice against experimental *S. mansoni*. *J. Immunol.* 138:3448.
- Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen against schistosomiasis. *Nature* 326:149.
- Balloul, J. M., D. Boulanger, P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq, and A. Capron. 1987. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In *Molecular Paradigms for Eradicating Helminth Parasites*. Alan R. Liss, New York, pp. 77-84.
- Auriault, C., J. M. Balloul, R. J. Pierce, M. Damonville, P. Sondermeyer, and A. Capron. 1987. Helper T cells induced by a purified 28 kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. *Infect. Immun.* 55:1163.
- James, S. L., J. K. Lazdin, M. S. Meitzer, and A. Sher. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 57:255.
- Capron, A., M. Capron, H. Dupas, D. Bout, and A. Petitprez. 1974. Etude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 4:613.
- Ramalho-Pinto, G., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 36:360.
- Clegg, J. A., and S. R. Smithers. 1972. The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2:79.
- Doughty, B. L., and S. M. Phillips. 1982. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. *J. Immunol.* 128:30.
- Boros, D. L., and K. S. Warren. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132:488.
- Hopp, T. P., and K. R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824.
- Ponnuswamy, P. K., and R. Bhaskaran. 1984. Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 24:168.
- Janin, J. 1979. Surface and inside volume in globular protein. *Nature* 277:491.
- Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149.
- Lee, A. C., J. E. Powell, G. W. Tregear, H. D. Niall, and V. C. Stevens. 1980. A method for preparing beta-HCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. *Mol. Immunol.* 17:749.
- Laemmli, U. K. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350.
- Pierce, R. J., and A. Capron. 1987. Western blot: principes et méthodologie. Techniques biochimiques d'analyse des antigènes de membrane. D. Charron, ed. Société Française d'Immunologie. INSERM, Paris.
- Capron, M., H. Bazin, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126:1764.
- Greaves, M. F., G. Sanossy, and P. Curtis. 1976. *In vitro* methods in cell-mediated and tumor immunity. *Fed. Proc.* 39:1054.
- Louis, J., R. H. Zubler, S. G. Coutinho, R. Lima, R. Behin, J. Manuel, and H. D. Engers. 1982. The *in vivo* generation and functional analysis of murine T cell populations and clones specific for a protozoan parasite, *Leishmania tropica*. *Immunol. Rev.* 61:1215.
- Grzych, J. M., M. Capron, C. Dissous, and A. Capron. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133:998.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clones: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348.
- Swain, S. L., D. T. McKenzie, R. W. Dutton, S. L. Ton Ko Nogy, and M. English. 1988. The role of IL4 and IL5: characterization of a distinct helper T cell subset that makes IL4 and IL5 (TH2) and requires priming before induction of lymphokine secretion. *Immunol. Rev.* 102:77.
- Capron, A., and J. P. Dessaint. 1985. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annu. Rev. Immunol.* 3:455.
- James, S. L., J. K. Lazdin, M. S. Meitzer, and A. Sher. 1982. Macrophage as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 67:255.
- James, S. L., R. Correa-Oliveira, and E. J. Leonard. 1984. Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular response. *J. Immunol.* 133:1587.

ARTICLE 3

*

**Réponses lymphocytaires T vis-à-vis des peptides synthétiques
de l'antigène P28 au cours de l'infection par *Schistosoma
mansoni*, chez le rat et la souris.**

*

Ainsi que le rapportent les articles 1 et 2, la détermination des épitopes T et B de Sm28 GST chez le rat ou la souris immunisés par cette molécule recombinante, nous a conduit à la sélection de 3 peptides particulièrement intéressants: le 24-43, le 115-131 et le 140-153.

Le propos de ce 3^{ième} article était de vérifier que ces structures synthétiques sont également reconnues dans le contexte de l'infection par le parasite ou dans celui de l'immunisation par les antigènes extraits des différents stades de développement du parasite: Ag SM, Ag S. ^{ula} et Ag SEA. En d'autres termes, la question que nous nous posions était: est-ce que le système immunitaire d'un hôte permissif (la souris) ou d'un hôte semi-permissif (le rat) reconnaît les mêmes déterminants antigéniques lorsque l'Ag Sm28 GST est présenté "libre" (la molécule recombinante) ou associé à tout un environnement parasitaire (dans le cas de l'infection donc du développement du parasite dans l'organisme hôte, ou de l'immunisation par des extraits antigéniques des différents stades)?

C'est ainsi que nous avons:

-- infesté par *S. mansoni* des rats Fischer (1000 cercaires par rat) et des souris Balb/c (60 cercaires par souris) et récupéré les ganglions mésentériques et périaortiques à différents temps après l'infection (0, 7, 20, 35, 48 et 65 jours, pour le rat; 8, 35 et 63 jours pour la souris).

-- immunisé par les antigènes extraits du ver adulte, de la larve ou de l'oeuf, des rats ou des souris.

La réactivité cellulaire a été suivie par des tests de lymphoprolifération *in vitro*.

Les informations qu'apporte ce travail, sont les suivantes:

* immunisation par les formes natives de Sm28 GST.

-- chez le rat, la réponse 24-43 prédomine.

-- chez la souris, la réponse 115-131 prédomine.

* infections par le parasite *S. mansoni*.

Les peptides synthétiques sont reconnus au cours de l'infection d'un hôte permissif comme d'un hôte non-permissif, ce qui signifie que des LcT sont éduqués contre ces structures.

-- chez le rat, la réponse 24-43 est maximale 20 à 35 jours après l'infection. Le peptide 115-131 induit une prolifération constante, plus faible mais tout-à-fait significative.

-- chez la souris, les 2 peptides sont reconnus au début de l'infection (jour 8) ainsi que 35 jours après. Par contre, 63 jours après l'exposition au parasite, alors que les Ag parasitaires (notamment l'Ag SEA) induisent des restimulations importantes, aucun des 2 peptides n'est reconnu.

En conclusion, le message principal de ce travail est que les peptides 24-43 et 115-131 sont reconnus au cours de l'infection expérimentale d'hôtes permissif (la souris) et non-permissif (le rat). Il était important de vérifier que des LcT sont éduqués vis-à-vis de ces structures lors de l'infection, cela signifie que:

* si l'immunisation par Sm28 GST (seule ou associée à d'autres molécules aux propriétés protectrices) se fait après l'exposition au parasite (en même temps que le traitement, par exemple), elle réactivera des cellules préalablement éduquées.

* si l'immunisation se fait avant toute infection (chez de très jeunes enfants), elle induira des LcT qui pourront être réactivés lors du contact avec le parasite accélérant ainsi le déclenchement des réponses immunes protectrices.

De plus, si l'on fait l'analyse comparée des réponses cellulaires lors de l'infection ou après immunisation par les extraits antigéniques de stade, l'on est frappé par les différences de réponses. Par exemple, lorsque les souris sont immunisées par l'Ag SEA, il y a génération de LcT spécifiques du 24-43 et du 115-131, par contre, 63 jours après l'infection, alors que la réponse anti-SEA est très importante (le système immunitaire étant, à ce stade de l'infection, "inondé" par des antigènes libérés par l'oeuf) aucun de ces peptides n'est reconnu.

Cela confirme la complexité de ce modèle pour lequel le développement du parasite dans l'organisme-hôte est un phénomène dynamique faisant intervenir des régulations et modulations du parasite sur l'hôte et vice-versa.

T cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection.

Isabelle Wolowczuk*, Claude Auriault*, Hélène Gras-Masse\$, Christine Mazingue*, Catherine Vendeville*, André Tartar\$ and André Capron*.

* Centre d' Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM 167- CNRS 624

Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

\$ Laboratoire de Chimie des Biomolécules

CNRS- URA 1309

Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

SHORT TITLE

P28-synthetic peptides in rat and mouse models.

SUMMARY

It has been recently demonstrated that the *Schistosoma mansoni* P28 antigen can induce a strong protective immunity after direct immunization in various experimental models.

T lymphocytes from Fischer rats immunized with the recombinant P28 antigen were cultured *in vitro* in the presence of seven synthetic peptides derived from the aminacid sequence of the P28. The most significant and reproducible proliferation was obtained with the 24-43 and 115-131 synthetic peptides.

In order to analyze if these located determinants were also exposed to the host's immune system during the natural *S. mansoni* infection or after immunization with crude antigenic extracts of various development stages of the parasite, the T cell responsiveness of infected or immunized Fischer rats and Balb/c mice was tested towards these synthetic peptides.

The results showed that both in permissive (mouse) and nonpermissive (rat) hosts, 24-43 and 115-131 synthetic peptides are recognized during the course of infection and there is a dynamic variation of this recognition. These peptides are also recognized by T cells educated against crude antigenic extracts of different developmental stages of the parasite which contained the native form of the P28 molecule.

Taken together, the results indicated that these synthetic peptides deriving from the recombinant P28 antigen can activate T lymphocytes educated against the native P28 molecule during the development and maturation of the parasite in their hosts. So, they might be useful for the construction of synthetic vaccines against schistosomiasis.

INTRODUCTION

Among the human parasitic infections, schistosomiasis is one of the most widespread in rural areas of a great number of developing countries (1). That is the reason why during the last decade, many investigators have shown an increasing interest in the study of the immune mechanisms of defence against the parasite *Schistosoma mansoni*.

All these studies have revealed a wide species variation in host response to schistosome infection. The mouse is a "permissive" host, allowing the development of worms to maturity and the deposition of eggs which subsequently elicit strong immunopathologic reactions (2, 3). The rat is described as a "non-permissive" host, rejecting worms during the fourth or fifth week of infection resulting in spontaneous cure (4, 5). Both these experimental models have some characteristics in common with human infection and complementary approaches in "permissive" and "non-permissive" hosts will be useful to enlarge our knowledge of the immune response towards any protective antigen.

So, with the aim of identifying vaccinating antigens, many analyses were conducted in mouse and rat experimental models and several candidates have now been described (6). Among them, the P28 antigen, one of the major antigens of the parasite *S. mansoni*, led to promising approaches to vaccine development. Indeed, the native molecule as well as the recombinant purified protein obtained after molecular cloning, induced a strong protective immunity in mouse, rat, hamster (7, 8) and monkey models (9). Moreover, these experiments have shown, in P28-immunized rats, the production of cytotoxic antibodies resulting in the destruction of the parasite (10).

The thymodependency of some essential components of the immune defence against *S. mansoni* led us to study the role of P28-specific T lymphocytes in the protective effects observed in rat (11) and mouse (12) models. In the rat model, as antibody-dependent cytotoxic effector mechanisms seem to be prevalent (13), the role of T helper cells involved in antibody production was analyzed. In contrast, in the murine schistosomiasis, the protective immunity essentially involved antibody-independent cellular mechanisms (14, 15). Therefore, the study of the immune response to P28 in mouse, including cellular-mediated cytotoxic mechanisms, immunopathologic and immunogenetical analyses, has been undertaken and the evaluation of the major T cell sites of this protective Ag has been carried out in P28-vaccinated mice (12). This approach is of first importance for the determination of the fine cellular specificity (epitope recognition) and functionality (lymphokine production) of the T lymphocyte sub-populations involved not only in protective immunity but also those controlling the granuloma formation around schistosome eggs (16, 17).

Thus, synthetic peptides based on the aminoacid sequence deduced from the cloned gene have been used to determine the immunogenic moieties of the P28-Ag. In both rat and mouse models, some of these peptides were able to stimulate the lymphocyte proliferation of P28-immunized animals. Moreover, T cells from animals immunized with the same peptides proliferated *in vitro* in the presence of P28 antigen. Here we focused our studies on the cellular responsiveness to these P28-derived synthetic peptides after immunization with parasite extracts of different developmental stages, or in the context of the natural infection where the host immune system is exposed to an array of antigenic moieties.

MATERIALS AND METHODS

Animals.

All the experiments used adult (5 to 6 wks of age) BALB/c (H-2^d) syngeneic mice or male inbred Fischer / ICO F 344 rats (6 to 8 wks of age) expressing the RT1^{lv1} haplotype. The animals were bred in the animal facilities of the Institut Pasteur de Lille.

Parasite life cycle.

A Puerto-Rican strain of *Schistosoma mansoni* was maintained in our laboratory using the albino strain *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters as life cycle host supports.

Crude antigenic preparations.

Adult worm antigen was prepared by homogenizing adult worms in Phosphate Buffered Saline (PBS: 0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.4) using a Potter- Elvehjem, followed by centrifugation of the homogenate at 10,000 x g for 20 min.

Schistosomulum antigen was prepared by sonication of frozen thawed mechanical schistosomula (19, 20).

Soluble egg antigen (S.E.A.) was prepared according to the method of Boros and Warren (21).

Recombinant P28 antigen.

A full length cDNA encoding for the P28 antigen of *S. mansoni* was expressed in *Escherichia Coli* using a PL- expression vector (22). This construction directed the synthesis of a cII fusion protein containing 172 aminoacids of the C- terminal end of the native P28 antigen. The "recombinant P28 protein" (r-P28) was prepared by Dr E. Keppi from Transgène S. A. (Strasbourg, France). Protein titrations were performed by the method of Lowry *et al.* (23) .

Preparation of synthetic peptides (Figure 1).

The prediction of exposed sequences on the primary structure of P28 was done according to their hydrophobicity using the Hopp and Woods 's method (24), or according to their mobility or accessibility (H. Gras-Masse, A. Tartar, unpublished methods) based respectively, on statistical data derived from displacement values (25) or partition coefficients of aminoacids between the interior and exterior of globular proteins (26). Peptides synthesized by solid phase synthesis (27) on chloromethyl- resin were protected as follows: Arg (Tos), Cys (Acm), Asp and Glu (OCHex), Ser and Thr (Bzl) , Lys (ClCbz), Tyr (2-6 diClBzl), His (Dnp), Trp (CHO), Met (SO). The Histidin containing peptide resins were reacted with 15 % mercaptoethanol, 2 % DIEA in DMF to remove the Dnp groups prior HF cleavage. The peptide resins were dried, cleaved and deprotected by the low/high HF procedure. The crude peptides were purified by gel filtration on fractogel TSK HW40-S (Merck, Darmstadt, FRG) in aqueous HCl pH 2, and

- 24-43 NH₂-Leu-Val-Ala-Ala-Gly-Val-Asp-Tyr-Glu-Asp-Glu-
Arg-Ile-Ser-Phe-Gln-Asp-Trp-Pro-Lys-COOH
- 65-86 NH₂-Val-Lys-Trp-Met-Leu-Glu-Ser-Leu-Ala-Ile-Ala-
Arg-Tyr-Met-Ala-Lys-Lys-His-His-Met-Met-Gly-COOH
- 87-111 NH₂-Glu-Thr-Asp-Glu-Glu-Tyr-Tyr-Ser-Val-Glu-Lys-Leu-
Ile-Gly-Gln-Ala-Glu-Asp-Val-Glu-His-Glu-Tyr-His-Lys-
-COOH
- 115-131 NH₂-Lys-Pro-Gln-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys-Ile-Thr-Lys-Glu-
Ile-Leu-Asn-Gly-Lys-COOH
- 140-153 NH₂-Cys-Glu-Ser-Leu-Lys-Gly-Ser-Thr-Gly-Lys-Leu-Ala-
Val-Gly-COOH
- 158-175 NH₂-Leu-Ala-Asp-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Val-Ile-Asp-His-
Val-Thr-Asp-Leu-Asp-Lys-COOH
- 190-211 NH₂-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Ser-Ser-Pro-Arg-Leu-Ala-
Lys-Tyr-Leu-Ser-Asn-Arg-Pro-Ala-Thr-Pro-Phe-COOH

FIGURE 1. Aminoacid sequences of the P28- derived synthetic peptides.

lyophilized. Peptides were checked for homogeneity by Thin Layer Chromatography (TLC) and reverse phase HPLC, and for identity by aminoacid analysis after total acid hydrolysis.

Conjugation of synthetic peptides to carrier proteins.

Peptides 24-43, 65-86, 87-111, 140-153, 158-175 and C-Terminal i. e. : 190-211 were conjugated to tetanus toxoid (T. T. , kindly given by Institut Mérieux, Lyon, France) or to ovalbumin (OVA, Miles Research, Elkhart, IN) with glutaraldehyde. The peptide (1.5 μ mole) was dissolved with the carrier protein (2 mg) in 100 mM sodium phosphate pH 7, and pH was then adjusted to pH 8 with sodium hydrogenocarbonate. 2.5 % glutaraldehyde solution (20 μ l) was then added daily during 3 days with continuous stirring. After 4 days, the resulting mixture was dialyzed exhaustively against 0.15 M NaCl. Peptide 115-131 was conjugated through its thiol group to T.T. or to OVA using 6-maleimidocaproic acyl-N-hydroxysuccinimide as heterobifunctional cross-linking agent (28). The conjugates were sterilized by filtration on 0.22 μ m filters (Sartorius, Göttingen, Germany).

Immunization procedures.

Antigenic preparations of different developmental stages of *S. mansoni* (200 μ g protein for rats, 100 μ g protein for mice) were mixed 1:1 (volume:volume) with Complete Freund Adjuvant (CFA) and injected subcutaneously at the base of the tail according to the method of Corradin *et al.* (29). Inguinal and periaortic lymph nodes were removed on day 10 after immunization.

Infection protocols.

Animals were exposed percutaneously to *S. mansoni* cercariae (1,000 cercariae for rats, 60 cercariae for mice) (30) and mesenteric + periaortic lymph nodes were removed at different periods post infection.

Lymphocyte culture medium.

For all cultures, RPMI-1640 (Gibco, Courbevoie, France) was supplemented with 5×10^{-5} M 2β mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG), 2 mM L-glutamine (Merck), 1mM sodium pyruvate (Gibco), antibiotics (100 IU/ ml penicillin, 100 μ g/ ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 20 mM HEPES (N-2 hydroxyethylpiperazine- N'-2 ethane sulfonic acid) (Sigma, St-Louis, MO) and 10 % heat inactivated foetal calf serum (FCS) (Gibco).

Lymphocyte proliferation assay.

Draining lymph nodes were harvested aseptically and cell suspensions were prepared. T lymphocytes were then separated by passage through a nylon wool column (31) and maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere in lymphocyte culture medium. For the assays, 5×10^5 T cells and 10^6 syngeneic irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 Al, 100 Ku, 8 mA) splenic (in murine model) or thymic (in rat model) APC were cultured for 5 days with Ag in a total volume of 0.2 ml in flat bottomed 96 well plates (Nunclon, Roskilde, Denmark). During the last 16 to 18 hrs of culture, the wells were pulsed with 18.5 kBq of [³H] TdR (sp. ac. 37 GBq/ mmol, CEA, Gif-sur-Yvette, France). Then the cells were harvested by filtration on fibreglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and

the amount of incorporated [^3H] TdR was measured in a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as the arithmetic mean of counts per minute (cpm) of triplicate cultures.

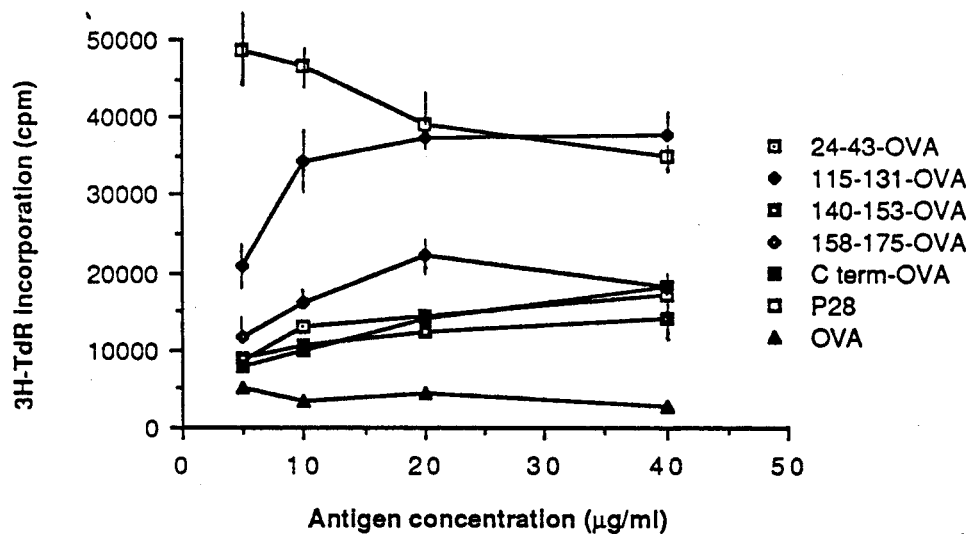
RESULTS

r-P28 Ag-primed rat T lymphocyte responsiveness towards seven P28-derived synthetic peptides.

A panel of seven P28 derived synthetic peptides whose sequences cover approximately the whole sequence of P28 protein were tested for their stimulatory activity on r-P28 Ag specific T cells. Our results clearly indicate, in Figure 2, that some P28 peptides stimulated the *in vitro* proliferation of r-P28 Ag specific T cells. As shown in Figure 2-A, T lymphocytes from Fischer rats immunized with the r-P28 Ag exhibited a significant proliferative response after an *in vitro* incubation with five peptides tested (24-43, 115-131, 140-153, 158-175, 190-211), on condition that these peptides were covalently coupled to a protein carrier (OVA). On the contrary, as represented in Figure 2-B, no proliferation was obtained with the other OVA-coupled peptides of the r-P28 molecule (87-111, 65-86). In addition, no proliferation enhancement was observed when uncoupled synthetic peptides (data not shown) or the carrier protein (OVA) alone were presented to T cells.

Present studies have concerned a great number of animals (rats or mice) and various batches of recombinant P28 and synthetic peptides. We have to mention the variability in the intensity of the proliferative response between different experiments, explaining why in a previous study using three of these peptides, 140-153 and 24-43 peptides were shown to be very potent while 115-131 peptide was not (13). However, considering the whole experiments, it appeared that in most of the cases and in both rat and mouse models, 24-43 and 115-131 peptides were able

2-A



2-B

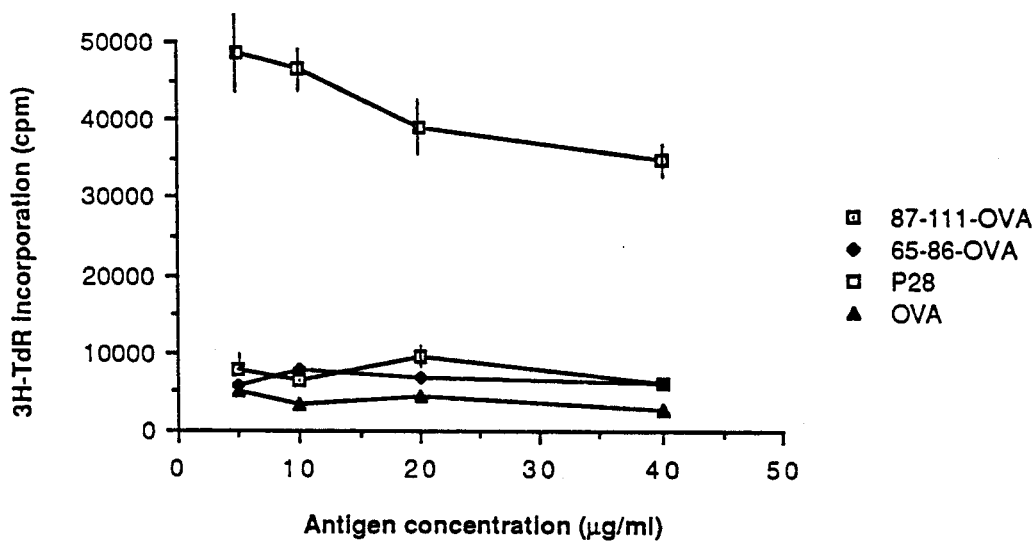


FIGURE 2. *In vitro* proliferative response of T lymphocytes from Fischer rats immunized with the recombinant P28 antigen after stimulation with seven P28-derived synthetic peptides (24-43, 115-131, 140-153, 158-175 and C-Terminal= 190-211: 2-A), (87-111 and 65-86: 2-B) linked to a carrier protein (OVA). For conjugated peptides, antigen concentration represents the concentration of peptide alone.

to induce the proliferation of anti-P28 T cells. Moreover, the 24-43 synthetic peptide has already been identified as a helper T cell site for anti-P28 IgE production (13). So, we focused our studies on 24-43 and 115-131 peptides and more precisely on their recognition during rat or murine schistosomiasis or after immunization trials with parasite antigenic extracts of various developmental stages.

In vitro stimulation of schistosome antigenic extract-primed T lymphocytes by r-P28 Ag and its derived synthetic peptides.

The aim of this analysis was to determine the specificities of the T cell populations generated after direct immunizations with schistosome antigens of different development stages containing the native form of the P28 molecule and apart from a general infection by the parasite.

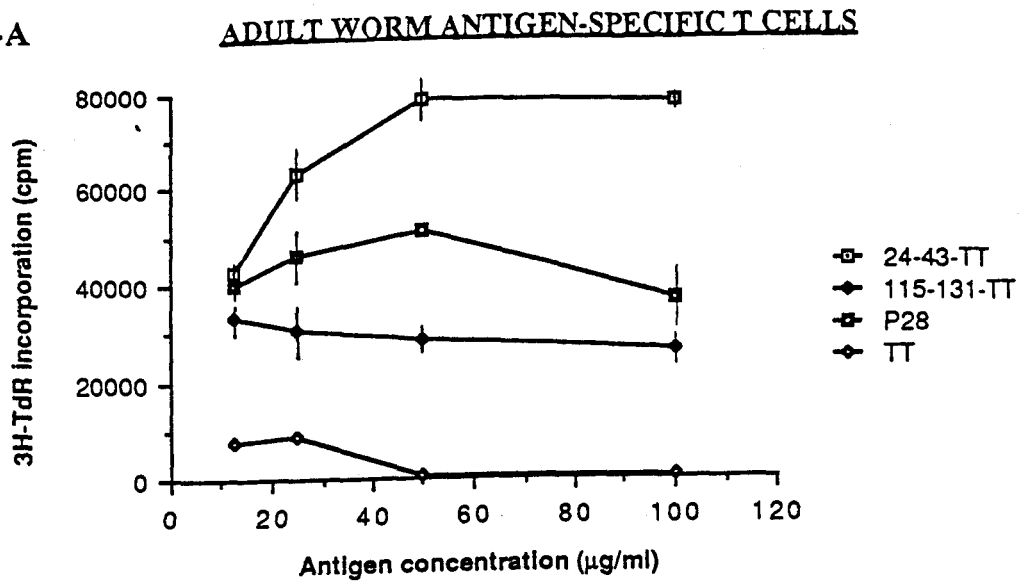
In the rat model.

Sensitized T lymphocytes from animals immunized with adult worm (3-A), schistosomulum (3-B) and egg (3-C) antigenic extracts were able to proliferate *in vitro* in the presence of the recombinant P28 and also mainly the 24-43 peptide. The 115-131 peptide allowed a weaker but significant response.

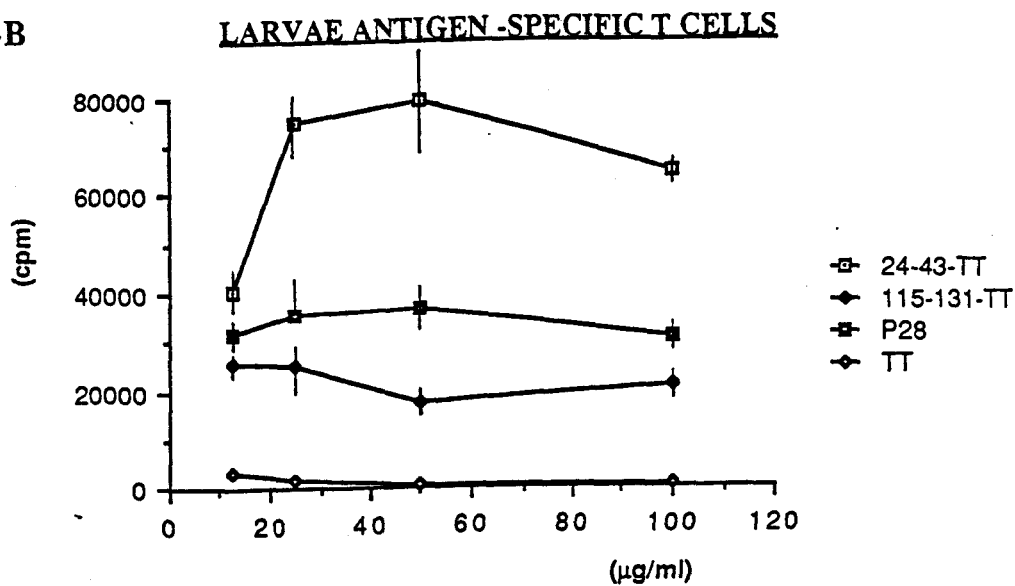
In the murine model.

A high proliferative response to 115-131 peptide (coupled to T.T.) was obtained with schistosome antigenic extract primed T lymphocytes. Opposite to what was observed in the rat model, the effect of 24-43 coupled peptide on T lymphocyte proliferation was quite moderate (Fig. 4).

3-A



3-B



3-C

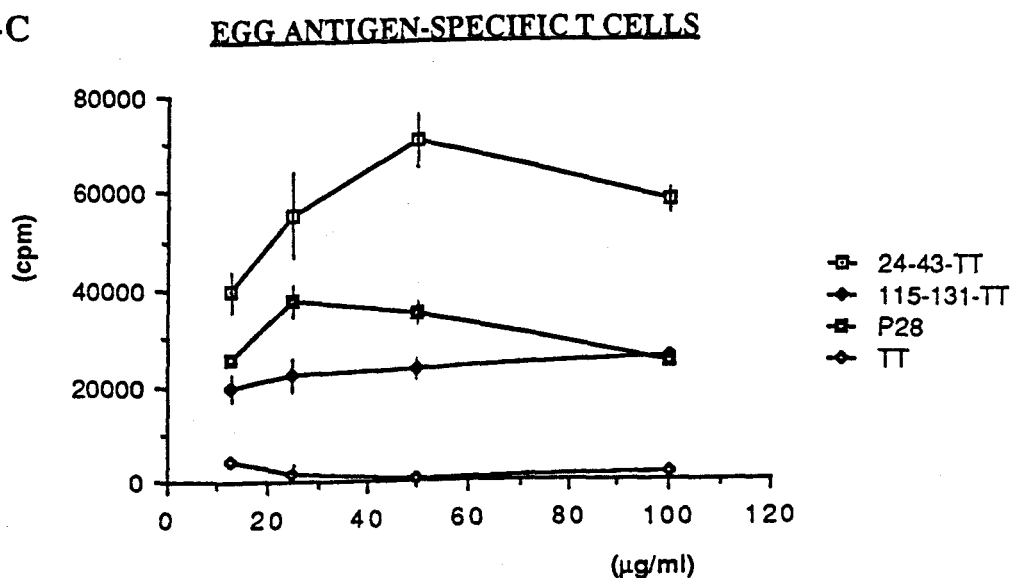
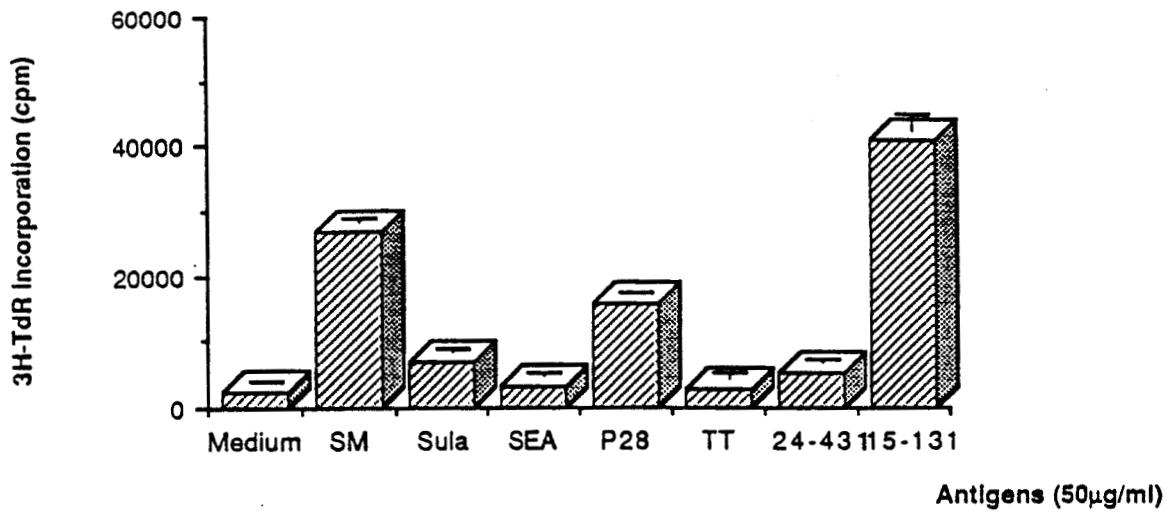
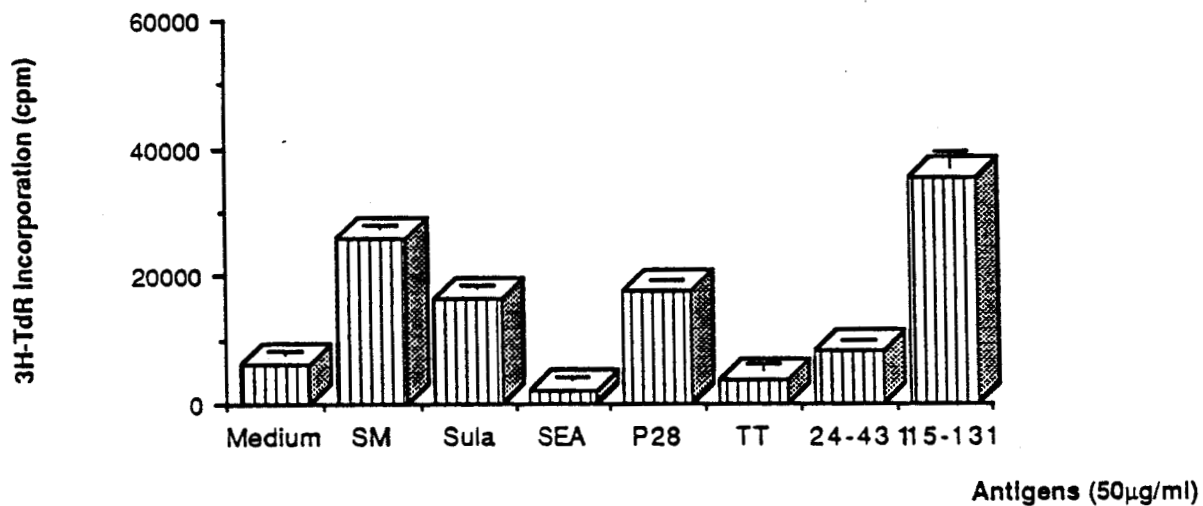


FIGURE 3. Activation of lymph node T cells from Fischer rats immunized with *S. mansoni* crude antigenic extracts (Adult worm antigenic extract in 3-A, Schistosomula antigenic extract in 3-B and Egg antigenic extract in 3-C) after incubation with either the recombinant P28 molecule or with the 24-43 and 115-131 synthetic peptides coupled on TT. The irrelevant antigen used in these experiments was TT. After 5 days of culture (16-H pulse, 0.5 μ Ci/well), results are expressed as the mean of two triplicate cultures.



4-B

LARVAE ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS



4-C

EGG ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS

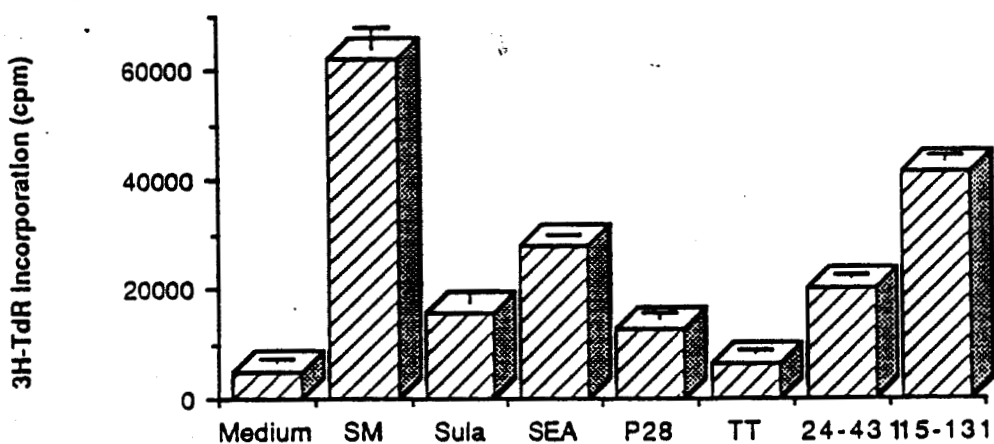


FIGURE 4. BALB/c mice immunized with various *S. mansoni* antigenic preparations: T cell reactivity to Adult Worm (SM), Schistosomula (*S.*^{ula}), Egg (SEA) antigens, r-P28 and 24-43, 115-131 synthetic peptides coupled on T.T. T.T. was used as an irrelevant antigen. Proliferations obtained were dose-dependent and reached a plateau at the dose of 50 μ g of peptide per ml. Results are expressed at the mean of two experiments in triplicate and for antigenic concentrations of 50 μ g/ml.

Analysis of the T cell reactivity to P28-synthetic peptides during *Schistosoma mansoni* experimental infection.

In the rat model.

To investigate the dynamic sight of the fine cellular specificities during the course of *S. mansoni* infection, the T cell response towards P28 Ag derived synthetic peptides has been carried out first in a non-permissive species, namely the rat. Figure 5 showed the results obtained with lymph node T cells from normal (day 0) or infected (days 7, 20, 35, 48 and 65) Fischer rats.

The synthetic peptides 24-43 and 115-131 linked to T. T. were tested in this analysis, using T. T. as an irrelevant antigen. These data showed that T cells from normal rats (Day 0) did not proliferate in the presence of these antigens. As soon as 7 days after infection, a significant proliferation was obtained with the two peptides tested. Following up the course of infection, the T cell responsiveness towards 24-43 and 115-131 peptides appeared to be different: while the maximal activation with the 24-43 peptide was observed at days 20 and 35, the 115-131 peptide induced throughout the infection a weaker but always significant proliferative response of T lymphocytes from infected Fischer rats.

In the murine model.

Among *Schistosoma mansoni* permissive hosts, the mouse model is one of the most widely used, allowing the parasite to reach sexual maturation and oviposition (2, 3) which will provoke a granulomatous inflammatory response. We thus compared the responsiveness of T lymphocytes from infected donor mice towards schistosome antigenic extracts of different development stages (adult worm antigen, schistosomulum antigen, and egg antigenic extract), to the proliferation obtained with the r-P28 derived synthetic peptides.

The analysis of Figure 6 showed that, at the beginning of the

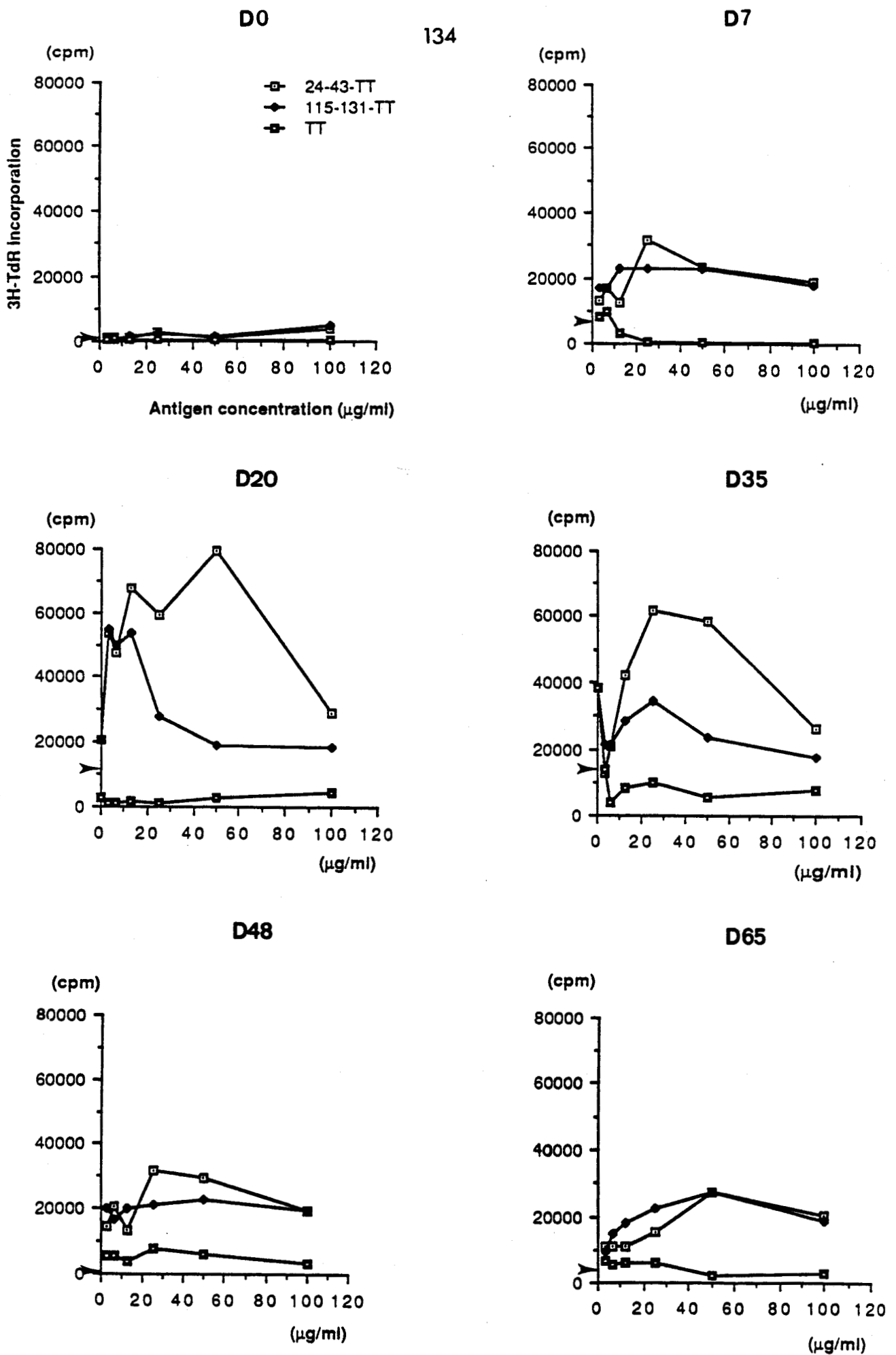
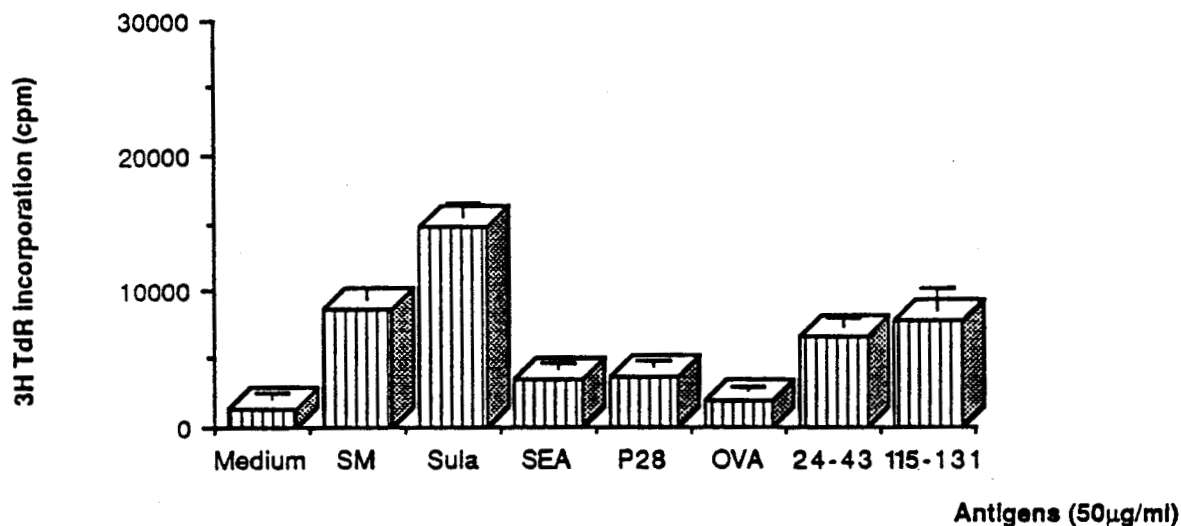
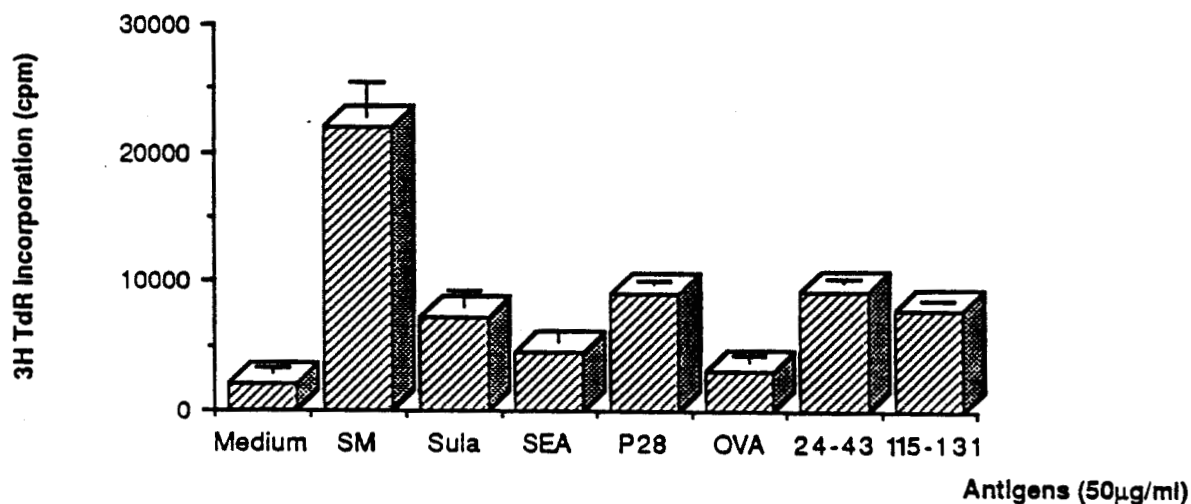


FIGURE 5. Proliferation of T lymphocytes from infected Fischer rats after *in vitro* stimulation with the 24-43 and 115-131 peptides coupled to TT, at days 0 (D0), 7 (D7), 20 (D20), 35 (D35), 48 (D48) and 65 (D65) post-cercariae infection. Arrows (\blacktriangleright) represent the cpm obtained with cells

6-A

DAY 8 POST-INFECTION

6-B

DAY 35 POST-INFECTION

6-C

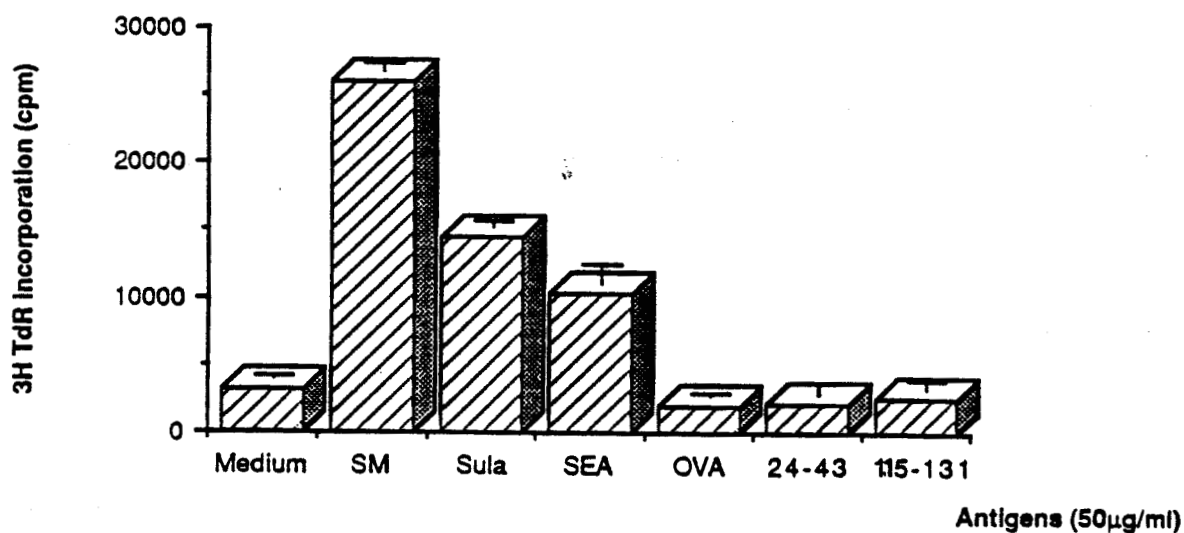
DAY 63 POST-INFECTION

FIGURE 6. T lymphocyte responsiveness during BALB/c mice experimental schistosomiasis.

At days 8, 35, 63 after cercariae exposure, T cells were incubated *in vitro* with APC and Adult Worm (SM), Schistosomula (*S.ula*), Egg (SEA) antigens, r-P28 and 24-43, 115-131 synthetic peptides coupled on OVA. The irrelevant antigen used in this series of experiments was OVA. This representation concerned the peptidic concentration of 50 μ g/ml which corresponded to the plateau of proliferation.

infection (Day 8) schistosomulum antigenic preparation allowed the maximal proliferation, while adult worm antigen also induced a high response. T cells did not proliferate either with the egg antigenic extract or OVA used as an irrelevant antigen. By comparison, 24-43 and 115-131 peptides coupled to OVA induced a significant proliferation of this population. At day 35 post infection, while schistosomulum antigen still activated the T lymphocytes, the maximal response was obtained with the adult worm extract. OVA as well as egg antigenic extract did not induce proliferation. The 24-43 and 115-131 synthetic peptides both stimulated *in vitro* proliferation of this "day 35 population". The cellular responsiveness towards both peptides strongly decreased with the time of infection. Indeed, T lymphocytes from day 63 infected BALB/ c mice did not proliferate with 24-43 and 115-131 coupled peptides while at the same time the egg antigenic extract induced a high response. This last observation might be compared with the T cell reactivity of lymphocytes deriving from SEA- immunized mice (Fig. 4-C) which proliferated with both these synthetic peptides.

DISCUSSION

There are now clear evidences that the induction of protective immunity against the parasite *Schistosoma mansoni* will involve mechanisms dependent on both B and T lymphocytes. Consequently, much attention has focused on the determination of defined antigens and their epitopes inducing an optimal combination of cellular and humoral immune responses.

The glutathione-S-transferase P28 appears to be very promising since either the native or the recombinant molecule protects several laboratory species against a *Schistosoma mansoni* challenge infection (7, 8, 9).

Considering that the helper T cell is at the hub of any immune response necessary for antibody production and for some non-specific effector mechanisms such as macrophage-mediated killing and lymphokine-dependent reactions, the determination of the major T cell sites of the protective P28 Ag that elicited B and T cell long lasting memories was of first importance.

In the rat model, as previously described (13), a first approach led to the identification of the 24-43 peptide which contains both B and T cell determinants. In the mouse model (12) two sites were identified: one in the 24-43 and one other in the 115-131 synthetic peptides derived from the sequence of the recombinant P28 molecule.

The purpose of the studies detailed in this paper, was to consider the recognition of these synthetic peptides by T lymphocytes

educated against the native P28 molecule either after immunization with crude parasite extracts or during *S. mansoni* infection. Indeed, since the parasite life cycle in the host is of great complexity, the mechanisms of immunity would probably be different according to the developmental stages of the parasite all over the course of infection. Moreover, parasites are not only a "set of distinct antigens" but, as living organisms, they are able to exert a deep modification of the host's immune system, so the recognition of such located sites in the context of the all "parasitic background" was important to verify.

Epitope-containing peptides tested in our experiments required to be coupled to a carrier protein to stimulate the proliferation of specific T cells. Several hypothesis could be considered such as protection from excessive peptide processing by addition of a linker protein, or absence of agretope in the unconjugated peptide. This as well as the physico-chemical criterias used for the selection of peptides will be discussed in detail in a later paper (C. Auriault *et al.*, in preparation).

Analyzing this series of results, it appears that T lymphocytes from rats or mice immunized with crude *S. mansoni* antigenic preparations (from Adult worm, Larvae or Egg stages) can be stimulated by the r-P28-derived synthetic peptides. Moreover, these data indicated different fine epitopic specificities of such educated populations according to the experimental species. The 24-43-epitope containing peptide allowed a better proliferative response than the 115-131 synthetic peptide in the rat model while the opposite result was obtained in the murine model.

In addition, T lymphocytes elicited during the experimental infection of rat (non permissive host) or mouse (permissive host) also recognized the defined T cell sites of the P28 antigen, namely the 24-43 and 115-131 synthetic peptides.

The most characteristic observation is that T lymphocytes from

Egg Ag- immunized mice recognized both 24-43 and 115-131 synthetic peptides. On the contrary at day 63 of infection, when the proliferative response of infected mouse T cells to SEA was optimal, no response was observed neither with 24-43 nor with 115-131 synthetic preparations. However, this cannot exclude a participation of T lymphocytes specific for 24-43 and 115-131 in the granuloma formation since only the mesenteric and periaortic lymph node T cells were assayed. Indeed, cellular responses are anatomically compartmentalized and related to the parasite migratory routes, so one could envisage that the 24-43 or 115-131-sensitized lymphocytes had less access to lymph nodes, as they were trapped in granulomas in different tissues. As the main pathological reactions in *S. mansoni* schistosomiasis are linked with the granuloma formation, the analysis of the epitopic specificity of T lymphocytes directly surrounding the eggs in the liver of infected mice is of crucial interest and would be considered in a next future.

Nevertheless, many questions are still opened and many studies have still to be done for the identification of the "ideal T cell sites". The pursuit is widely encouraged by the now clear evidence that the r-P28 Ag so as its 24-43 and 115-131 determinants would be able to boost T cellular populations already activated during a natural infection. Moreover, recent experiments carried out in Kenya in collaboration with Dr. A. E. Butterworth have revealed that T lymphocytes from a great number of infected children (I. Wolowczuk, manuscript in preparation) or from experimentally infected baboons (D. Boulanger, manuscript in preparation) are able to recognize the recombinant P28 Ag and its synthetic peptides particularly the 24-43 and 115-131 peptides. This point was important to verify since the immune response elicited by immunization with recombinant proteins or synthetic peptides has to be boosted by a challenge with the whole infectious agent in order to be protective (32, 33, 34).

In conclusion, much still remains to be learnt about the role of T cells in the protective immunity to schistosomiasis:

(a) using various laboratory animals (mice, rats, monkeys) which have different "immune behaviours" towards the parasite.

(b) analyzing human and animal T cell clones of precised specificities (epitope recognition) and functionalities (lymphokine production) that are currently derived.

(c) immunizing different experimental models with various synthetic constructions of P28- derived peptides.

The approaches outlined here will be useful for a better understanding of the induction of protective immunity against this very complex and well adapted parasite and for an increase of the immunogenicity of any anti-*Schistosoma mansoni* synthetic vaccine.

REFERENCES

- 1 Doumenge J.P., Mott K.E., Cheung C., Villenave D., Chapuis O., Perrin M.F., Reaud-Thomas G: Atlas of the global distribution of schistosomiasis, CEGET-CNRS/OMS-WHO. P. U. de Bordeaux, 1987.
- 2 Smithers M.A., Doenhoff M.S: In Blackwell (Ed): Immunology of Parasitic Infections. Oxford, 1982, pp 527-530.
- 3 Ritchie L.S., Garzon S., Knight, W.B: The biology of *Schistosoma mansoni* in laboratory hosts. J. Parasitol. 1963;49:571-574.
- 4 Cioli D., Knopf P. M., Senft A.W: A study of *Schistosoma mansoni* transferred into permissive and nonpermissive hosts. Int. J. Parasitol. 1977;7:293-297.
- 5 Cioli D., Blum K., Ruppel, A: *Schistosoma mansoni* : Relationship between parasite age and time of spontaneous elimination from the rat. Exp. Parasitol. 1978;45:74-80.
- 6 Mc Laren D., Terry R.J: Anti-parasite vaccines. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 1989;83:145-146.

- 7 Balloul J.M., Grzych J.M., Pierce R.J., Capron A:
A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. J. Immunol. 1987;138:3448-3453.
- 8 Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvalho D., Lecocq J.P., Capron A: Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. Nature 1987;326:149-153.
- 9 Balloul J.M., Boulanger D., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvalho D., Lecocq J.P., Capron A: Vaccination of baboons with a P28 antigen of *Schistosoma mansoni* expressed in *E. Coli*. Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites , Alan R. Liss, Inc. , New- York , 1987; p. 77-84.
- 10 Balloul J.M., Pierce R.J., Grzych J.M., Capron A:
In vitro synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 1985;17:105-114.
- 11 Auriault C., Balloul J.M., Pierce R.J., Damonville M., Sondermeyer P., Capron, A: Helper T cells induced by a purified 28-kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. Infect. Imm. 1987;55: 1163-1169.

- 12 Wolowczuk I., Auriault C., Gras-Masse H., Vendeville C., Balloul J.M., Tartar A., Capron A: Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28-1 antigen. J. Immunol. 1989; 142:1342-1350.
- 13 Auriault C., Gras-Masse H., Wolowczuk I., Pierce R.J., Balloul J.M., Neyrinck J.L., Drobecq H., Tartar A., Capron A: Analysis of T and B cell epitopes of the *S. mansoni* P28 antigen in the rat model using synthetic peptides. J. Immunol. 1988;141:1687-1694.
- 14 James S.L., Lazdins J.K., Meltzer M.S., Sher A: Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis. I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. Cell. Immunol. 1982;67:255-266.
- 15 Sher A., Hieny S., James S.L., Asofsky R: Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. J. Immunol. 1982;28:1880-1886.
- 16 Chensue S.W., Boros D.L: Modulation of granulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in *Schistosoma mansoni* infected mice. J. Immunol. 1979;123:1409-1414.

- 17 Cheever A.W., Byram J.E., Von Lichtenberg F:
Immunopathology of *Schistosoma japonicum* infection in
athymic mice. Parasite Immunol. 1985;7:387-398.
- 18 Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Joseph M.,
Torpier, G: Effector mechanisms of immunity to
schistosomes and their regulation. Immunological Rev. 1982;61:
41-66.
- 19 Ramalho-Pinto G., Gazzinelli G., Howells R.E., Mota-
Santos T.A., Figueiredo E.A., Pellegrino A:
Schistosoma mansoni: defined system for stepwise
transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*.
J. Exp. Parasitol. 1974;36:360-368.
- 20 Capron A., Capron M., Dupas H., Bout D., Petitprez, A. Etude *in vitro*
des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase
humaine et expérimentale. I. Etude comparative *in vitro* de l'
activité létale d'immunsérums sur les formes immatures et sur
les adultes de *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol.
1974;4:613-623.
- 21 Boros D.L., Warren K.S: Delayed hypersensitivity-type
granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by
a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J. Exp.
Med. 1970;132:488-507.

- 22 Courtney M., Buchwalder A., Tessier L.H., Jaye M., Benavente A., Balland A., Kolhi V., Lathe R., Tolstoshev P., Lecocq J.P: High level production of biologically active human α -antitrypsin in *Escherichia Coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984; 81:669-673.
- 23 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randall R.J: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951;193:265-275.
- 24 Hopp T.P., Woods K.R: Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981;78:3824-3828.
- 25 Ponnuswamy P.K., Bhaskaran R: Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. Int. J. Protein Res. 1984;24:168-174.
- 26 Janin J: Surface and inside volumes in globular proteins. Nature. 1979;277:491-492.
- 27 Merrifield R.B: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 1963;85:2149-2153.
- 28 Lee A.C., Powell J.E., Tregaer G.W., Niall H.D., Stevens V.C.: A method for preparing beta-HCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. Mol. Immunol. 1980;17:749-756.

- 29 Corradin G., Etlinger H.M., Chiller J.M: Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen-induced *in vitro* T cell dependent proliferative response with lymph nodes from primed mice. J. Immunol. Rev. 1977;54:81-85.
- 30 Smithers S.R., Terry R.J: The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology. 1969;55:695-706.
- 31 Julius M.H., Simpson E., Herzenberg L.A: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1973;3:645-649.
- 32 Francis M.J., Fry C.M., Rowlands D.J., Brown F., Bittle J.L., Houghten R.A., Lerner R.A: Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. J. Gen.Virol. 1985;66:2347-2351.
- 33 Milich D.R., Mc Lachlan A., Chisari F.V., Thornton G.B: Nonoverlapping T and B cell determinants on an hepatitis B surface antigen pre-S(2) region synthetic peptide. J. Exp. Med. 1986;164:532-547.
- 34 Good M.F., Maloy W.L., Lunde M.N., Margalit, H., Cornette J.L., Smith G.L., Moss B., Miller L.H., Berzofsky, J.A: Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on Malaria circumsporozoite protein. Science. 1987;235:1059-1062.

ACKNOWLEDGEMENT

This investigation received financial assistance from UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.

CORRESPONDENCE

Isabelle WOLOWCZUK
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex
FRANCE

ABBREVIATIONS

APC: Antigen Presenting Cells; CFA: Complete Freund Adjuvant; FCS: Foetal Calf Serum; OVA: Ovalbumin; SEA: Soluble Egg Antigen; SM: Adult Worm Antigen; S.^{ula}: Schistosomula antigenic extract; TT: Tetanus Toxoid.

ARTICLE 4

*

Antigénicité et immunogénicité d'une construction multipeptidique de l'antigène Sm28 GST de *Schistosoma mansoni*, chez le rat, la souris et le babouin:

1. Protection partielle des rats Fischer après immunisation active.

*

Le peptide synthétique 115-131 dérivant de la séquence de la molécule recombinante Sm28 GST, ayant été démontré comme étant:

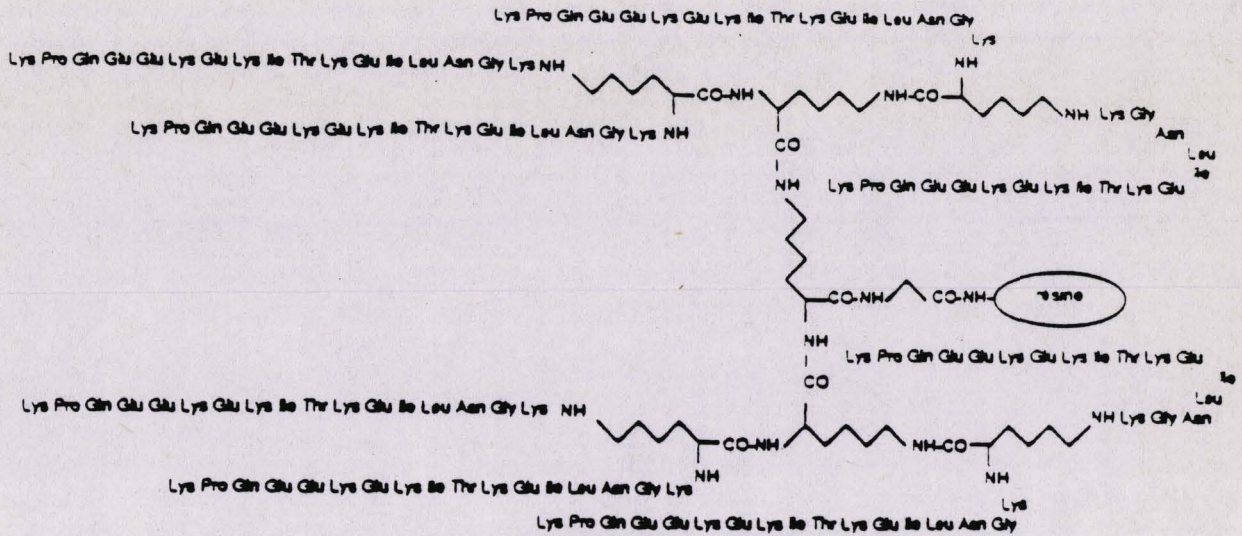
-- reconnu par les LcT spécifiques de Sm28 GST, de souris (Article 1) et de rat (Article 2),

-- reconnu par les LcT de souris et de rats infectés par *Schistosoma mansoni* ou immunisés par les antigènes de différents stades de développement du parasite (Article 3),

l'analyse plus fine et précise de la réponse immune dirigée contre ce peptide a été entreprise dans ce 4^{ième} article.

Le problème que nous avions était d'augmenter l'immunogénicité du peptide tout en évitant l'utilisation d'une molécule porteuse. La collaboration étroite avec le groupe du Professeur A. Tartar, et plus précisément avec M. Bossus et H. Gras-Masse, a permis de résoudre ces deux problèmes. En effet, la synthèse de constructions artificielles contenant 1 ou plusieurs copies du 115-131 a été réalisée et les résultats présentés dans cet article concernent l'étude de l'une de ces constructions: l'octopus 115-131.

L'octopus contient 8 copies du peptide 115-131 branchées sur un corps inerte de polylysine:



- Octopus 115-131-

Nous avons immunisé des rats Fischer, des souris Balb/ c et des babouins olive (*Papio anubis*) par l' octopus 115-131 et testé son antigénicité et son immunogénicité.

Ce travail peut se résumer ainsi:

-- L' octopus 115-131 est antigénique puisque: 1) reconnu par les Ac anti- Sm28 GST et 2) capable de restimuler *in vitro* des LcT spécifiques de Sm28 GST.

-- L' octopus est immunogène puisque l' immunisation de rat, souris (en adjuvant complet de Freund) ou babouin (en BCG), donne lieu à des réponses immunes cellulaire et humorale spécifiques.

Les LcT spécifiques de l' octopus 115-131 sont restimulables par l' Ag correspondant, par le peptide 115-131 couplé à l' ovalbumine, par Sm28 GST et par les Ag de stade du parasite.

L' immunogénicité de l' octopus 115-131 est particulièrement importante chez le babouin, pour lequel les index de restimulation sont très élevés. La nature des LcT et des cellules présentatrice d' antigène (APC) peut expliquer cette différence d' immunogénicité dans les 3 modèles: en effet, pour le rat et la souris, nous avons étudié la réactivité des LcT

ganglionnaires, les APC étant des cellules thymiques irradiées, tandis que l'analyse chez le babouin a été réalisée à partir de lymphocytes du sang circulant, les APC étant essentiellement constituées par les cellules B.

-- L'analyse de la réponse humorale spécifique de l'octopus 115-131 nous a montré que les Ac spécifiques de cette construction reconnaissent Sm28 GST native et recombinante (ce qui a été démontré par des techniques d'immuno-empreinte et d'ELISA).

Par ailleurs, les sérums anti- octopus sont capables de rendre les plaquettes, les macrophages et, dans une moindre mesure, les éosinophiles cytotoxiques vis-à-vis du schistosomule.

-- Enfin, des rats Fischer immunisés par l'octopus 115-131 avant d'être infectés par *S. mansoni*, présentent une réponse Ac anti- Sm28 GST (IgG et surtout IgE) plus élevée que les animaux "contrôles". Par ailleurs ces animaux sont protégés (réduction de 40 à 50 % de la charge parasitaire) contre l'infection.

En conclusion, ce travail a permis de démontrer que la forme octamérique du 115-131 est immunogène dans 3 modèles expérimentaux différents: le rat, la souris et le babouin. Cette construction chimique artificielle permet la conservation des épitopes T et B contenus dans le peptide 115-131 puisque l'octopus est reconnu par des Ac anti- Sm28 GST et déclenche des réponses immunes humorale et cellulaire restimulables par les formes native et recombinante de la molécule Sm28 GST. Le maintien de l'intégrité de l'épitope dans cette structure était essentiel à contrôler.

Le rôle fonctionnel, démontré *in vitro*, des Ac spécifiques de l'octopus, dans les mécanismes de cytotoxicité cellulaire impliquant les plaquettes, les macrophages et les éosinophiles est également très intéressant. Enfin, l'octopus peut protéger

des rats d'une infection par *Schistosoma mansoni*.

Encore plus récemment, Auriault *et al.* (1990) ont corrélés la susceptibilité à l'infection avec la présence d'anticorps bloquants d'isotypes IgG₄ spécifiques du 115-131.

Ce travail laisse envisager comme possible l'utilisation de telles constructions chimiques associant des épitopes T et B de différentes molécules protectrices, dans le développement d'un vaccin synthétique contre le parasite *Schistosoma mansoni*.

FULL TITLE

Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse and monkey:

1: Partial protection of Fischer rat after active immunization

AUTHORS

Isabelle Wolowczuk*, Claude Auriault*, Marc Bossus§, Denis Boulanger*,
Hélène Gras-Masse§, Christine Mazingue*, Raymond J. Pierce*, Delphine
Grezel*, Graham D. Reid°, André Tartar§, and André Capron*.

* Centre d' Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167- CNRS 624
Institut Pasteur, 59019, LILLE cédex (FRANCE).

§ Laboratoire de Chimie des Biomolécules
CNRS- URA 1309
Institut Pasteur, 59019, LILLE cédex (FRANCE).

° Institute of Primate Research
Karen, P. O. BOX. 24481
NAIROBI (KENYA).

RUNNING TITLE

Multiple antigenic construction of *S. mansoni* Sm-28-GST in various experimental models.

FOOTNOTES

1 This work was supported by INSERM U167, CNRS 624 and received financial assistance from UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases and from Edna McConnell Clark Foundation.

2 Address correspondence to: Isabelle Wolowczuk, Centre d' Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019, Lille cédex (France).

3 Abbreviations: ADCC, Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity; APC, Antigen Presenting Cells; BCG, Bacille Calmette Guérin vaccine; MO, Macrophage; SEA, Soluble Egg Antigen; Sm Ag, Adult Worm Antigen; S. ula, Schistosomulum Antigen.

SUMMARY

Among the schistosome proteins characterized as vaccine candidates, an antigen of 28 kilodaltons (Sm-28-GST) has received considerable attention. It was shown to be antigenic in humans and protective in mice, rats, hamsters and baboons. Synthetic peptides derived from its sequence have been used to characterize the immune response to the molecule and one of these, comprising aminoacids 115-131 has been shown to incorporate both T and B cell recognition sites in a variety of experimental models. An octameric ("octopus") construction of the 115-131 peptide has been synthesized and its antigenicity and immunogenicity have been examined. The octopus construct is immunogenic in rats, mice and baboons in the presence of CFA (for rodents) and Bacille Calmette Guérin vaccine (for primates) as adjuvants. This clearly indicates that the construction allowed the conservation of the immune sites of the cognate protein. Moreover, anti-octopus sera from immunized Fischer rats were able to mediate platelet, macrophage and eosinophil dependent cytotoxicity towards schistosomula. Rats immunized with the 115-131 octopus were partially protected against a challenge infection with *Schistosoma mansoni* cercariae and this was paralleled by an increased level of IgG and more importantly, of IgE Sm-28-GST specific antibodies.

INTRODUCTION

New approaches to vaccine development using protein subunits or synthetic polypeptides must consider the problem of elaborating vaccines in such a way that optimal T and B cell activities are obtained. Among the several potential vaccine antigens of *Schistosoma mansoni* that have been characterized, a 28 kDa antigen (referred to as Sm-28-GST) appears to be very promising. This molecule was first isolated from *S. mansoni* adult worms (1) and recent studies have demonstrated that Sm-28-GST is an excretory/secretory molecule with glutathione transferase activity. It is mainly synthesized in the protonephridial cells before being expressed at the surface of the parasite (2, 3). Since its identification and characterization, the protein has been cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli* (4).

The effectiveness of Sm-28-GST as a vaccinating molecule was tested in various laboratory models and both the native form and the recombinant molecule can induce a high degree of protection after direct immunization of permissive hosts such as mice, hamsters (1, 4), baboons (5) or semi-permissive hosts such as rats (1). Moreover, the response to Sm-28-GST in rats and baboons generated a strong production of IgE antibodies, which could induce *in vitro* cytotoxicity towards the *S. mansoni* larvae, mediated by platelets, macrophages and eosinophils. In the mouse model, on the other hand, the protective immunity essentially involved antibody independent cellular mechanisms in which lymphokines such as IFN-gamma (6), TNF (7) and IL-6 (8) are implied in the cytotoxic mechanisms against schistosomula. An ideal vaccine towards schistosomiasis would therefore have to be highly immunogenic and able to induce an optimal combination of both T and B cellular anti-schistosome

immunity.

The recent use of synthetic peptides constructed from the Sm-28-GST sequence allowed the identification of the major epitopes eliciting T and B cell responses in mice and rats (6, 9). This analysis concerned T cell populations of various origins: from Sm-28-GST-immunized animals, from experimentally infected rats, mice and baboons (I. Wolowczuk, submitted for publication) and more recently, from naturally infected humans (I. Wolowczuk, manuscript in preparation).

The mere presence of T cell epitopes did not suggest that these peptides were essential immunogens for the induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection. Nevertheless in the Fischer rat model, the passive transfer of T lymphocytes specific for the 24-43 synthetic peptide prior to Sm-28-GST immunization, led to a significant increase in the IgE response to Sm-28-GST without modifying IgG production (9). This initial observation of a potential and favourable modification of the response to Sm-28-GST by a synthetic peptide was important since IgE has been demonstrated to play a major part in the protective immunity against schistosomes (10).

Among the other Sm-28-GST-derived synthetic peptides tested, the 115-131 peptide, when linked to a carrier protein (OVA) was able to induce the proliferation of T lymphocytes from either Sm-28-GST-immunized, or *S. mansoni* infected animals. More recently, we evaluated the humoral responses of Kenyan school children previously classified as susceptible or resistant to reinfection after chemotherapy (11). In these studies it was established that the 115-131 peptide can be used to detect anti-Sm-28-GST specific IgG, IgE and IgA antibodies. In addition, the IgG₄ response to Sm-28-GST and more precisely to the 115-131 peptide, was significantly greater in the susceptible population than in the resistant group.

Taken together this information led to the conclusion of the existence of both T and B cell sites in the 115-131 synthetic peptide. Thus, the 115-131 peptide was used as an immunogen to elicit B and T cellular responsiveness that could be boosted by immunization with the cognate protein or by the parasitic infection (12, 13, 14). The possible use of synthetic peptides as vaccines against viral, bacterial and even parasitic diseases, has now been widely reported (15, 16). As a rule, however, these small molecules, even while providing specific and appropriate epitopes that can serve as targets for recognition by the immune system, are poorly immunogenic by themselves.

In order to bypass the requirement of a linker protein and to increase the immunogenicity of the 115-131 peptide, various multiple antigenic constructions of two, three or eight copies of this peptide were investigated (M. Marguerite, manuscript in preparation). The results presented in this paper concern the most interesting of these multiple constructions, namely the "115-131 octopus", consisting of an octameric branching lysine core with eight dendritic arms (17). We tested the immunogenicity of this construct in various experimental models that present differing immunological behaviour towards a *S. mansoni* infection (i.e. the rat, the mouse and the baboon).

MATERIALS AND METHODS

Parasite life cycle and crude antigenic preparations.

A Puerto-Rican strain of *Schistosoma mansoni* was maintained in our laboratory using albino strain *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters as life cycle supports. Adult worm antigen (Sm Ag) was prepared by homogenizing adult worms in PBS 0.01M using a Potter-Elvehjem homogenizer, followed by a centrifugation of the homogenate at 10,000 x g for 20 min. Schistosomulum antigen (S.^{ula}) was prepared by sonication of frozen-thawed mechanically-prepared schistosomula (18). Soluble Egg Antigen (SEA) was prepared according to the method of Boros and Warren (19).

Animals.

Balb/c syngeneic mice (5 to 7 wks of age) (H-2^d haplotype) and male inbred Fischer/ICO F344 rats (6 to 8 wks of age) (RTL^{ivl} haplotype) were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur de Lille.

The baboons (*Papio anubis*) were captured in a schistosome-free area (Narok, Kenya). Their approximate age was 4 to 8 years with weights ranging from 6 to 16 kgs. They were maintained in the animal facilities of the Institute of Primate Research (IPR), Nairobi, Kenya. Prior to the experiments, each animal was individually screened during a two month quarantine for possible *S. mansoni* infection by fecal examination for eggs over a 3 day period (20).

Recombinant Sm-28-GST antigen.

A full length copy of the complementary DNA encoding the Sm-28-GST was expressed in *Escherichia Coli* using a PL- expression vector (21). The "recombinant Sm-28-GST protein" (r-Sm-28-GST) purified (95 % purity) by

passage through a glutathione-sepharose column (3) was provided by Dr E. Keppi from Transgène S. A. (Strasbourg, France).

Peptide synthesis.

115-131 synthetic peptide (Figure 1-A)

Peptide 115-131 was synthesized by solid phase synthesis according to Merrifield's method (22). It was protected as follows: Glu (N-BOC-L-glutamic acid- γ -cyclohexyl ester), Thr (N-BOC-L-threonine benzylester) and Lys (N- α -BOC-N- ϵ -(2-chlorobenzylloxycarbonyl) L-Lysine). The peptide resins were dried, cleaved and deprotected by the low/high HF procedure. The crude 115-131 peptide was purified by gel filtration on fractogel TSK HW 40-S (Merck, Darmstadt, FRG) in aqueous HCl pH 2, and lyophilized. Peptides were checked for homogeneity by thin layer chromatography and reverse phase-HPLC, and for identity by aminoacid analysis after total hydrolysis.

Conjugation of the 115-131 synthetic peptide with a carrier protein.

The Peptide 115-131 was conjugated to OVA (Miles Research, Elkhart, IN.) using glutaraldehyde (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) as previously described (23).

Multiple antigenic preparation of the 115-131 peptide: the octopus (Figure 1-B).

The synthesis of an eight-fold branched core (17) attached to eight 115-131 peptide residues, was accomplished manually by a stepwise solid phase procedure on BOC- β Ala-paramethylbenzylamine resin with a load of 0.28 mmol./g. The three lysine level of the core was achieved using 2.5 M excess of N- α BOC, N- ϵ BOC L-Lysine Dicyclohexylamine salt and benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (24) as a coupling agent. The coupling of the BOC-amino acids was performed in N-methyl-pyrrolidinone using the

A:Aminoacid sequence of the 115-131 synthetic peptide

NH₂-LYS-PRO-GLN-GLU-GLU-LYS-GLU-LYS-ILE-THR-LYS-GLU-ILE-LEU
 -ASN-GLY-LYS-COOH

Aminoacid sequence of the irrelevant peptide (used for the
 irrelevant octopus construction)

NH₂-VAL-GLU-PRO-ASP-LYS-VAL-GLU-GLU-ALA-ASN-LYS-GLY-GLU
 -ASN-COOH

B:

Octameric structure of a 17-residue peptide (115-131) with
 branching polylysine core.

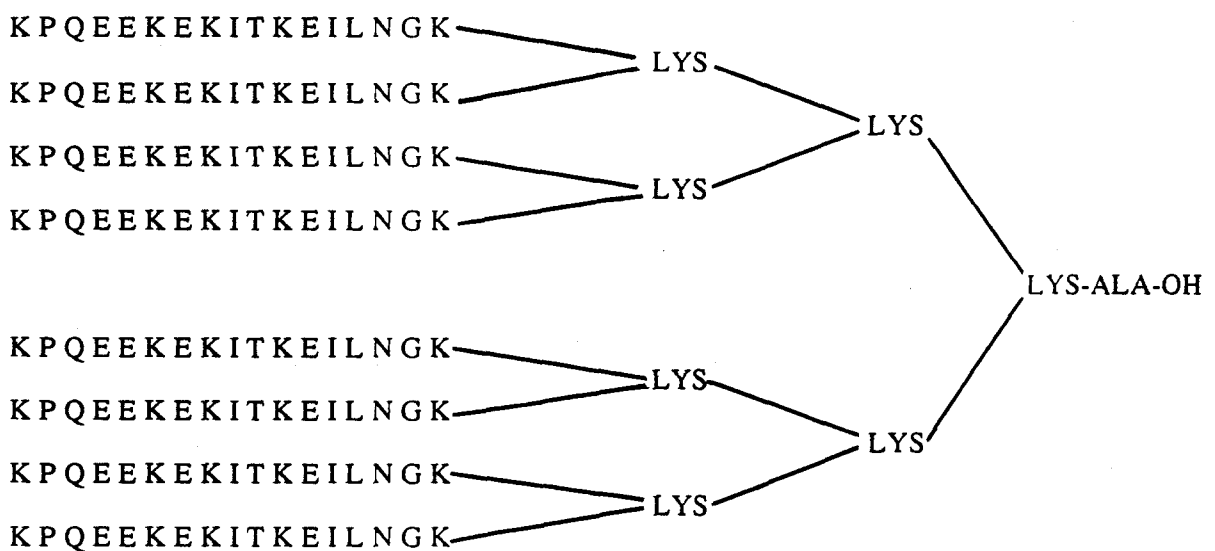


Figure 1 Amino acid sequence of the 115-131 synthetic peptide and of the peptide used for the irrelevant octopus construction (IRR. OCT.) (1-A).

Schematic representation of the octameric structure of the 115-131 peptide: the 115-131 octopus (1-B).

BOP/diisopropylethylamine procedure. The octopus was cleaved from the resin support by the low/high HF procedure to minimize side reactions. The final product was characterized by high performance gel chromatography. Aminoacid analysis gave results in agreement with the expected composition.

Immunization procedures.

For the rodent experimental models, the r-Sm-28-GST protein (200 µg for rats, 50 µg for mice) was mixed 1/1 with CFA and injected subcutaneously into the base of the tail on day 0. On day 10, animals were bled and draining lymph nodes were aseptically removed.

The octopus (100 µg for rats, 50 µg for mice), emulsified in CFA, was injected using the same route on day 0. On days 7, 14 and 24, animals were re-injected with the octopus (50 µg for rats, 25 µg for mice) in IFA. Rats or mice were bled before each re-injection and draining lymph nodes were harvested on day 30.

Baboons were immunized with 100 µg of octopus injected intradermally using BCG as adjuvant (one human dose per baboon. Institut Mérieux, Lyon, France). The animals were re-injected with 100 µg of octopus 11 days later and bled 3, 6 and 8 wks after the second injection.

Infection protocols.

Animals were exposed percutaneously (25) to 1,500 *S. mansoni* cercariae 6 days after the last immunization with the 115-131 octopus. Parasite burdens were evaluated by liver perfusion 21 days after cercarial exposure. The number of worms obtained from 115-131 experimental groups of 5 to 7 rats (B) were compared with those obtained from control groups of 5 to 6 rats (A). The percentage of protection was calculated by the formula: $(A-B/A) \times 100$. Another group of Fischer rats was simultaneously infected with 1,500 cercariae but instead of being perfused at day 21, they were bled weekly up to day 56 and sera were tested by ELISA towards the recombinant Sm-28-GST antigen.

Lymphocyte culture medium.

For all cultures, RPMI-1640 (Gibco, Courbevoie, France) was supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Merck), 2 mM L-glutamine (Merck), 1mM sodium pyruvate (Gibco), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 20 mM Hepes (Sigma, St Louis, MO.) and 10% heat inactivated FCS (Gibco).

Lymphocyte proliferation assay.

Draining lymph nodes from rodents were removed and cellular suspensions were prepared. T cell enriched preparations were then separated by passage through a nylon wool column (26) and maintained at 37 ° C in a 5 % CO₂ atmosphere in lymphocyte culture medium. For the *in vitro* assays, 5×10^5 T cells and 10^6 syngeneic irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 Al, 100 Ku, 8 mA) splenic (for mouse) or thymic (for rats) cells as APC were cultured with antigens in a total volume of 0.2 ml in flat-bottom microtiter tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). The cells were then exposed to 18.5 kBq of ³H TdR (37 GBq/mmol., CEA, Gif-sur-Yvette, France) for the last 18 h of a 5 day culture period. Finally, the cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the amount of incorporated ³H TdR was measured using a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as the arithmetic mean of counts per minute (cpm) of triplicate cultures.

For baboons, animals were bled from the femoral vein into a 20 ml syringe containing Alsevier' s solution (v/v). PBMC were obtained by a 400 x g centrifugation of blood at 18° C to 20° C for 30 min. over a lymphoprep-mixture (Flow Ltd, Rickmansworth, UK) and were subsequently washed in culture medium. For proliferation assays, triplicate cultures of 150,000 cells per well incubated in lymphocyte culture medium were used.

ELISA.

Microtiter plates (Dynatech, Denkendorf, FRG) were incubated overnight at 4° C with 5 µg/ml of r-Sm-28-GST in 100 µl of sodium carbonate buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6). The plates were then saturated for 1 h with PBS-BSA 3%. After careful washes, 100 µl of unknown sera diluted 1:50 in dilution buffer (0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, 10 mM PBS, pH 7.2) were dispensed in each well and incubated overnight at 4° C. After additional washes, peroxidase labelled anti-rat IgG (ICN, Lisle, IL) was added at a dilution of 1:10,000 in the same buffer for 1 h at room temperature. Specific IgE antibodies were detected using mouse anti-rat IgE (Biosys, Compiègne, France) added at a 1:1,000 dilution for 1 h. Then peroxidase labelled anti-mouse IgG (Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) was added (1:2,000) for 1 h at room temperature. After a final wash, 10 mg/ml substrate (Orthophenylenediamine, Sigma, St. Louis, MO) in sodium phosphate buffer 0.1 M, pH 5.5 containing H₂O₂ (1 ml/l) was then incubated for 15 minutes at room temperature and the reaction was stopped by the addition of 50 µl of HCl 1N. The optical density was measured through a multichannel spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC 1340) at 492 nm. Results are expressed as the mean of duplicate wells after subtraction of the background.

Dot Blot immunobinding assay.

Nitrocellulose sheets (Schleicher et Schuell, Dassel, FRG) were cut into 4 x30 mm strips. The antigens (115-131, 115-131-OVA, octopus, OVA and SM Ag) were dot-blotted on strips (1 µl of a 4 mg/ml solution per spot). The strips were then saturated for 1 h in PBS containing 18 g/l NaCl and 1.5 % (w/v) casein. Samples were then reacted for 2 h with 1/50 dilutions of sera under gentle agitation. After three washes, peroxidase conjugated anti-Rat Ig (Miles laboratories, Inc, Naperville, IL) (diluted 1/500 in PBS-casein buffer) was added and incubated for 2 h. The color reaction was

developed for 10 to 20 min. in a buffer containing 30 mg 4-chloro-1-naphthol (Biorad, Munich, FRG) in 10 ml cold methanol, 40 ml PBS and 30 μ l H₂O₂. The intensity of the spots was measured with a light reflecting densitometer (D142-1, Gretag, Regensdorf, Switzerland) and expressed as OD units.

Western blots.

Western blotting was carried out on adult worm antigen (Sm Ag) and on the r-Sm-28-GST molecule separated on 13 % SDS-PAGE (27) using an LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden), then transferred to a nitrocellulose sheet (Schleicher and Schuell) according to procedures based on those of Towbin *et al.* (28). Nitrocellulose strips were incubated with sera (diluted 1/100 for rat, 1/50 for mouse) and fixed antibodies were detected with anti-rat (or mouse) peroxidase-labeled serum (Miles laboratories) (1/500) and stained as previously described (29).

Cytotoxicity assays.

Macrophage - mediated Antibody - Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC).

Fischer rat peritoneal macrophages (MO) were purified after the removal of non-adherent cells after a 2 h culture. The adherent cell population (40% of the peritoneal cells) contained more than 95% MO and less than 0.5% mast cells. The cells were then incubated overnight at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere in Minimum Essential Medium (MEM) containing 10% normal heat-inactivated rat serum. Fifty skin-prepared schistosomula (30) were then added with 10% of the different sera (anti-octopus sera, 42 day *S. mansoni* immune sera (IRS) or normal rat sera (NRS) as control. After a 18 h incubation, the schistosomula were counted as dead if they were immobile, granular and opaque.

Eosinophil ADCC.

The method has been described in detail by M. Capron *et al.* (31).

Experiments were carried out in 96 flat-bottomed well plates (Nunclon). Skin-prepared schistosomula (50 per well) and sera were incubated overnight at 37° C in 5% CO₂. An eosinophil-rich population (90 to 95 % eosinophils) prepared according to the method previously described by Lynch *et al.* (32) was then added at an effector:target ratio 5,000:1. The percentage of cytotoxicity was measured after 48 h of contact between effector cells and targets by microscopical examination.

Platelet ADCC.

Platelets were prepared according to the method of Joseph *et al.* (33) from Fischer rat blood collected on calciparin. About 8×10^9 platelets were dispensed in each well of a flat-bottomed microtiter plate (Nunclon). A total of 50 skin-prepared schistosomula and sera were then added simultaneously and incubated for 24 h at 37° C and 5% CO₂. Living and dead larvae were counted as described above.

RESULTS

Activation of r-Sm-28-GST antigen-primed T lymphocytes by the 115-131 octopus.

Figure 2 shows a representative experiment demonstrating that T cells from animals immunized with the whole Sm-28-GST molecule exhibited a modest but always significant and highly reproducible proliferative response after *in vitro* incubation with the 115-131 octopus. These cells strongly proliferated *in vitro* when challenged with the synthetic peptide 115-131 coupled to a carrier protein (OVA) and also with the r-Sm-28-GST Ag. In contrast, no stimulation was observed with the unlinked peptide nor with native OVA used as a control antigen. The proliferative response detected with the 115-131 octopus was not due to a mitogenic effect of the octameric construction since no activation was observed with a control octopus construct (IRR. OCT.).

Cellular immunogenicity of the 115-131 octopus synthetic construction in experimental models.

The immunogenicity of the octameric construction of the 115-131 peptide was first tested in the rat. Figure 3-A shows the results obtained when T cells from Fischer rats immunized with the 115-131 octopus, were monitored in *in vitro* proliferative assays with r-Sm-28-GST, various synthetic forms of the 115-131 peptide (115-131 alone, 115-131-OVA and the octopus) and *S. mansoni* antigenic extracts (Sm Ag, S.^{ula}, SEA) containing the native form of Sm-28-GST. These results clearly demonstrated the immunogenicity of this synthetic construction. As expected, T cells specific for the 115-131 octopus were able to proliferate

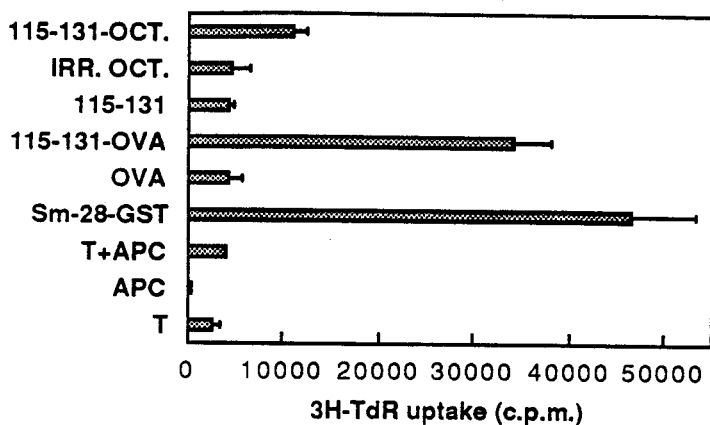


Figure 2 *In vitro* proliferative response of T lymphocytes from Fischer rats immunized with the recombinant Sm-28-GST antigen, after stimulation with r-Sm-28-GST, 115-131-OVA, 115-131 and 115-131 octopus. The control antigens used in these experiments were OVA and a control octopus construction (IRR. OCT.). Proliferations obtained were dose-dependent. Results are expressed as the mean of three experiments in triplicate and for antigen concentrations of 50 $\mu\text{g/ml}$.

T, APC and T+APC means the cpm obtained after *in vitro* incubation of, respectively, lymphocytes alone (T), antigen presenting cells alone (APC), and lymphocytes with antigen presenting cells (T+APC). It represent the background proliferation of the cells, one of our negative controls (the other one being the proliferative response obtained with OVA used as irrelevant antigen).

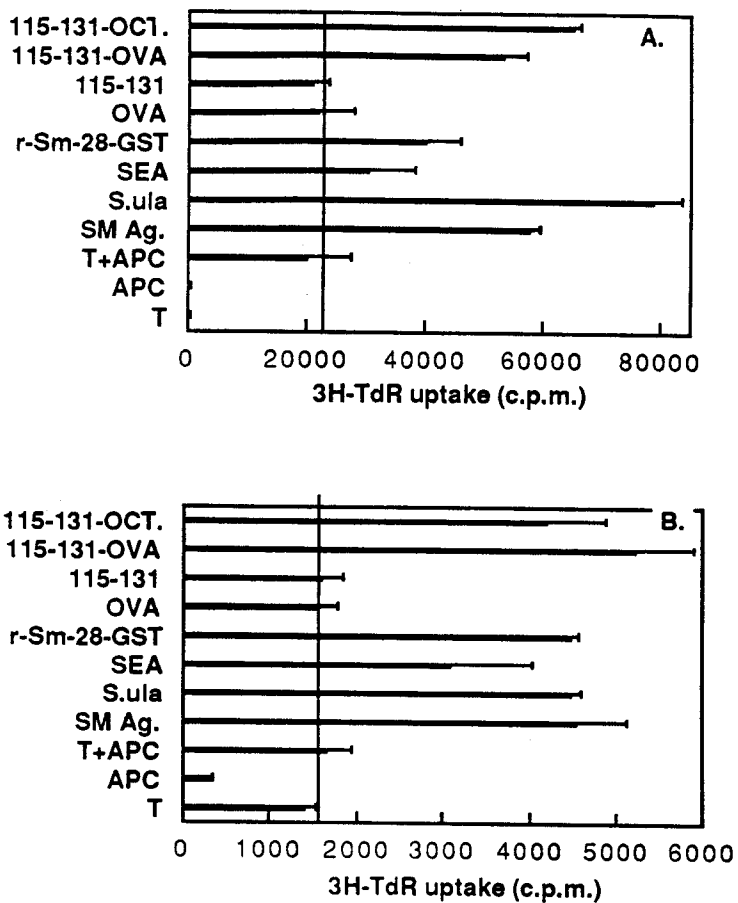


Figure 3 Proliferation of lymph node T cells from Fischer rats (3-A) and Balb/c mice (3-B) immunized with the 115-131 octopus after incubation with either *S. mansoni* crude antigenic extracts (SM Ag., *S. ula* and SEA) or with r-Sm-28-GST antigen and the 115-131 synthetic peptide (115-131 alone, 115-131-OVA and 115-131 octopus) (5 days of culture including 18-H $^3\text{H-TdR}$ pulse, 18.5 kBq per well). Results are expressed as the mean of two triplicate cultures.

with the immunizing antigen but also these lymphocytes recognized the epitope present both on the r-Sm-28-GST and the native Sm-28-GST contained in the antigenic extracts from different developmental stages (2,3). The highest level of stimulation was obtained using the schistosomulum extract, that obtained with Sm Ag being slightly lower but still elevated. In contrast the SEA preparation used produced a lower level of proliferation of octopus-primed T cells.

Similarly, T cells from Balb/c mice immunized with the 115-131 octopus also proliferated in the presence of both Sm-28-GST and the crude antigenic extracts whereas OVA and the 115-131 monomer failed to stimulate these cells (Figure 3-B).

The immunogenicity of the octopus construction was further tested in baboons. After injection with the 115-131 octopus, the PBMC reactivity was analyzed three (Figure 4-A), six (4-B) and eight (4-C) weeks after the second immunization. A delay of 6 weeks was observed between the boost injection of octopus and the detection of a cellular reactivity of PBMC in an *in vitro* blastogenesis assay. The cellular immune responses observed in the three baboons tested were variable since one animal (n° 1177) exhibited a low PBMC reactivity towards the immunogen (115-131 octopus) and the r-Sm-28-GST protein while PBMC of the other two animals were highly stimulated by these antigens. It should be noted that animal n° 1177 also gave a lower response than the others to BCG used as an adjuvant. An irrelevant multiple construction (IRR. OCT.) did not induce activation of these cells.

Thus, the injection of 115-131 octopus to rats, mice and baboons, generated lymphocytes recognizing an epitope present both in the 115-131-OVA and the r-Sm-28-GST antigen.

Antibody response to the 115-131 octopus.

Time course of the appearance of anti-peptide antibodies in rats and mice.

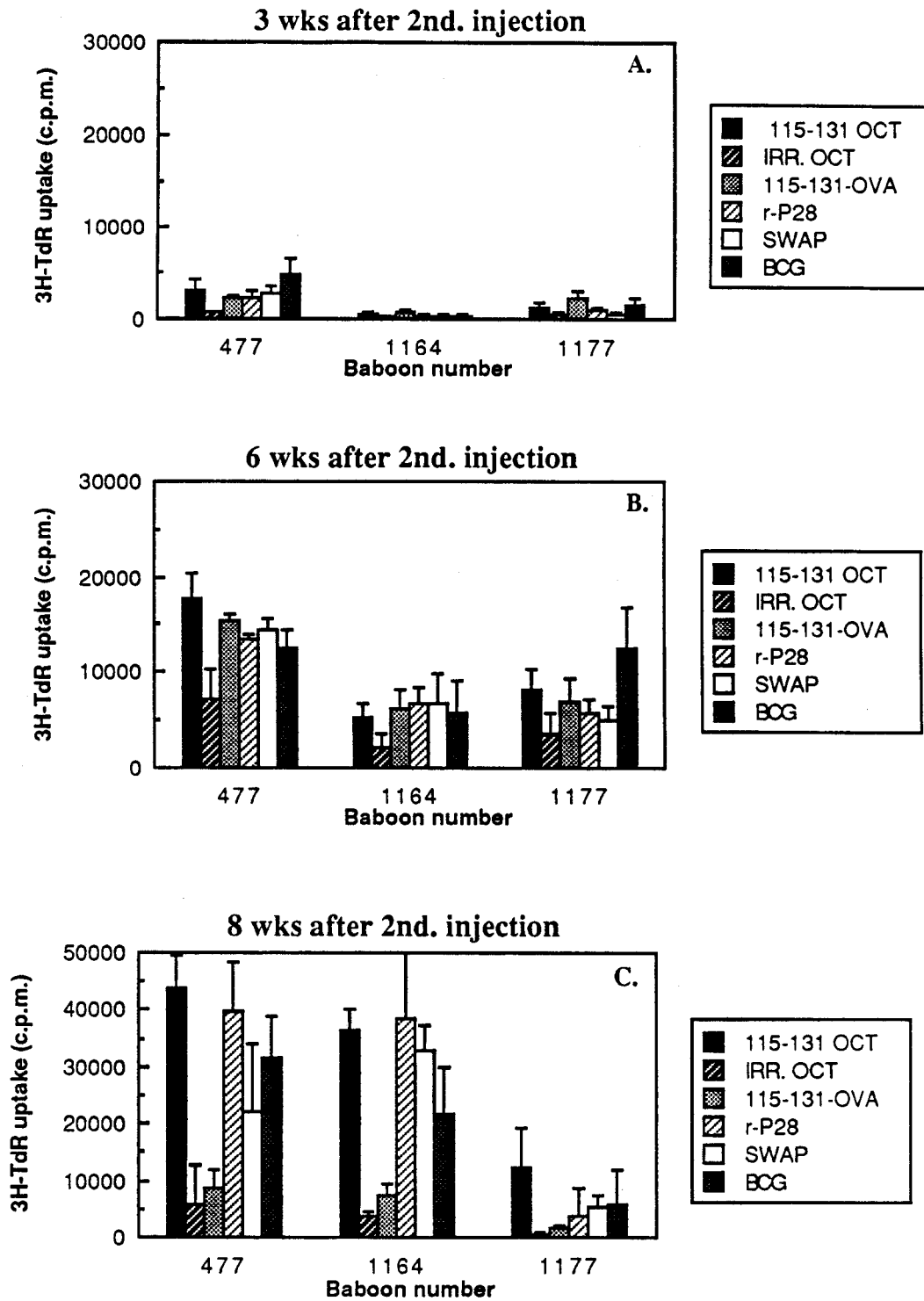


Figure 4 Three baboons were immunized with the 115-131 octopus and the PBMC reactivity was tested three weeks (4-A), six weeks (4-B) and eight weeks (4-C) after the last injection. The ^3H TdR incorporation of cells was measured 5 days after an *in vitro* incubation with 50 $\mu\text{g/ml}$ of 115-131 octopus (■), IRR. OCT. (▨), 115-131-OVA (▩), r-Sm-28-GST (▧), Sm Ag. (□) and BCG (■).

Animals immunized (at days 0, 7, 14 and 24) with the 115-131 octopus were bled at days 13, 23 (i.e. before the second and third re-injections) and 30. The production of IgG antibodies was investigated by dot-immunoassay. The 115-131 octopus, Sm Ag and OVA were dot-blotted onto nitrocellulose and specific IgG were detected using an anti-rat (or mouse) IgG. Results presented in Figure 5 demonstrate that anti-octopus sera contained IgG able to bind to the immunogen (octopus) as well as to the native Sm-28-GST present in the adult worm antigenic extract. In contrast, no spots were observed when normal serum was used and no cross-reactivity was obtained with OVA alone with any of the sera tested.

Thus, whatever the experimental model (rat or mouse), Sm Ag and 115-131 octopus specific IgG were detectable in our experimental conditions, only at day 23 (i.e. after the second boost). Indeed, at day 13 the response detected was very low. Secondly, after the last injection (day 30) the sera were able to bind to r-Sm-28-GST dot-blotted onto nitrocellulose sheets. This response was more marked in the Fischer rat than in mice.

These results show that the B cell epitope present in the peptide 115-131 is conserved in the octopus construct.

In order to confirm, using another technique, the result obtained by dot-immunoassay, adult worm antigen (Sm Ag) and r-Sm-28-GST Ag were subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting (Figure 6-A for Sm Ag and Figure 6-B for r-Sm-28-GST). Development with peroxidase-labeled anti-rat or anti-mouse IgG showed a band at the Mr of 28 kDa.

Analyzing Figure 6, two observations can be made. Firstly, the existence of a certain variability in the humoral response to the Octopus 115-131, even in syngeneic animals (only 2 of the 3 rat sera tested recognize the Sm-28-GST) it always exists differences between responses after immunization or whole infection. Secondly, a high molecular weight antigen is detected by anti-octopus sera. This is likely due to association of GST with themselves or with other molecule which is a particularity of this category of molecule.

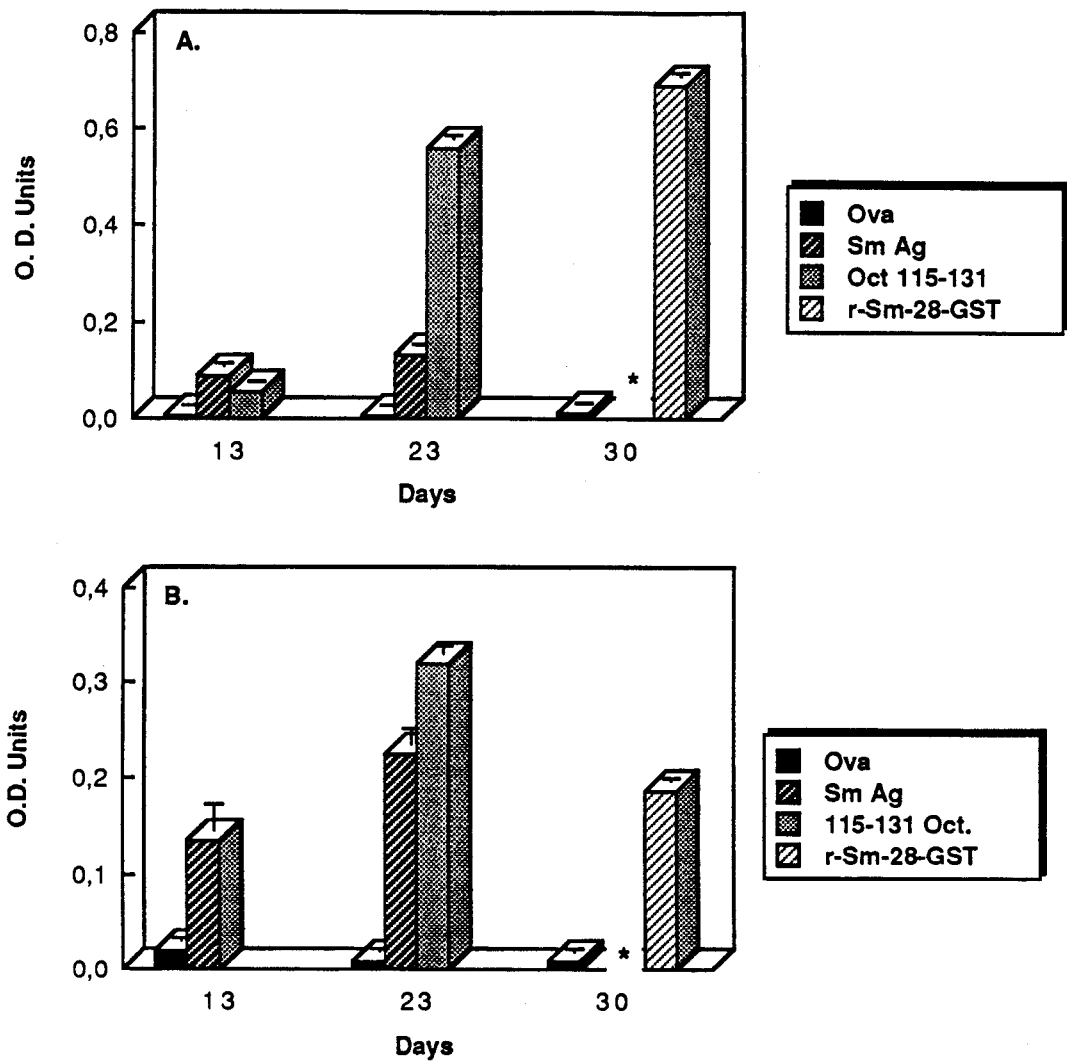


Figure 5 Time course of the appearance of specific IgG antibodies in the sera of 115-131 octopus-immunized Fischer rats (A) or Balb/c mice. Animals were injected at days 0, 7, 14 and 24 and bled at days 13, 23 and 30. The specific IgG response was detected by dot-immunoassay using nitrocellulose sheets coated with 115-131 octopus (■), Sm Ag (▨) and OVA (■) (days 0, 13 and 23) or r-Sm-28-GST (▨) and OVA (■) (day 30).

*: N.D.

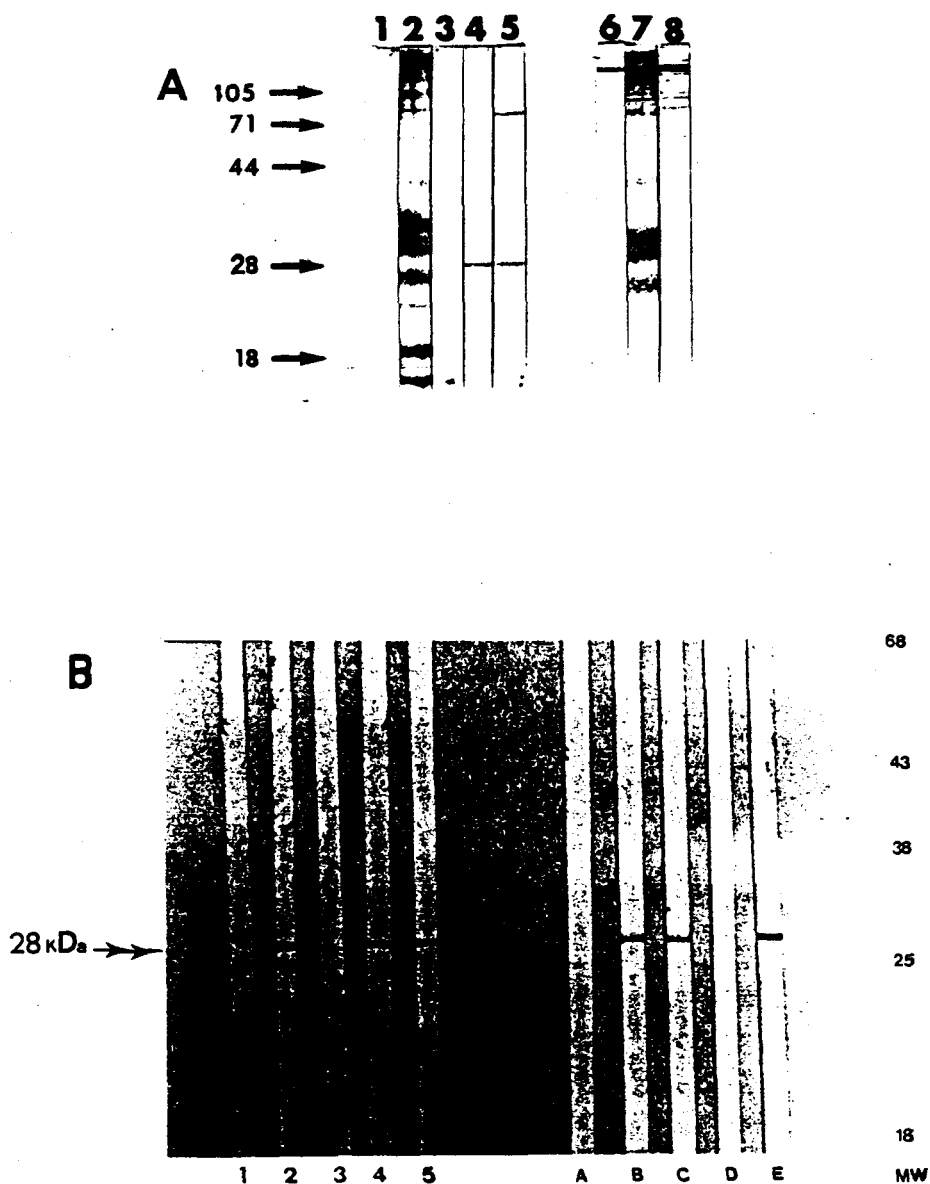


Figure 6 Recognition of Sm-28-GST by rat and mouse anti-octopus sera in Western blotting.

SDS-PAGE followed by Western blotting of Sm Ag (6-A) or r-Sm-28-GST (6-B). Prestained Mr standards were used.

6-A: Strips 1: Normal rat serum; 2: Day 42-infected rat serum; 3, 4, 5: Anti-115-131 octopus rat sera; 6: Normal mouse serum; 7: Day 35-infected mouse serum; 8: Anti-115-131 octopus mouse serum.

6-B: Strips 1: Normal rat serum; 2: Anti-rSm-28-GST rat serum; 3, 4, 5: Anti-115-131 octopus rat sera; A: Normal mouse serum; B: Anti-rSm-28-GST mouse serum; C, D, E: Anti-115-131 octopus mouse sera.

ADCC with anti-115-131 octopus rat sera.

Having demonstrated the presence of Ab specific for SM-28-GST in the sera of the 115-131 octopus- immunized rats, the next step was to approach the functionality of these antibodies. It is now well- admitted that antibody- dependent- cytotoxicity mechanisms play an essential role during infection, in the destruction of the *S. mansoni* larvae in rat (34), non-human primate (30), and man (35). Moreover, the *in vivo* relevance of the key role played by these mechanisms is evidenced by the presence of the antibodies on the membrane of the effector cells and the successful significant level of protection induced by passive transfer experiments (33, 36). A significant induction of cytotoxicity towards schistosomula was observed when macrophages (Figure 7-A) or platelets (Figure 7-B) were incubated in the presence of anti-octopus sera. As shown in Figure 7-C, eosinophils also became killer cells when targets were previously incubated with the anti-octopus sera, but this cytotoxicity was observed with only one of three serums tested and was not very efficient (30%) compared to those mediated by either macrophages or platelets.

So, this study demonstrate the functionality of the anti- 115-131 octopus antibodies and their ability to recognize the SM-28-GST at the level of the larval stage of the parasite.

Fischer rats immunized with the 115-131 octopus are partially protected against *S. mansoni* challenge infection.

The protective effect of immunization by the 115-131 octopus was investigated in the Fischer rat. Indeed, the comparative analysis of the immunogenicity of various synthetic constructions of the 115-131 peptide, led to the conclusion that the octopus was the better one (the monomeric form did not induce a humoral response and allowed a very reduced cellular response, M. Marguerite; manuscript in preparation). The animals were immunized with the 115-131 octopus or OVA as a control and

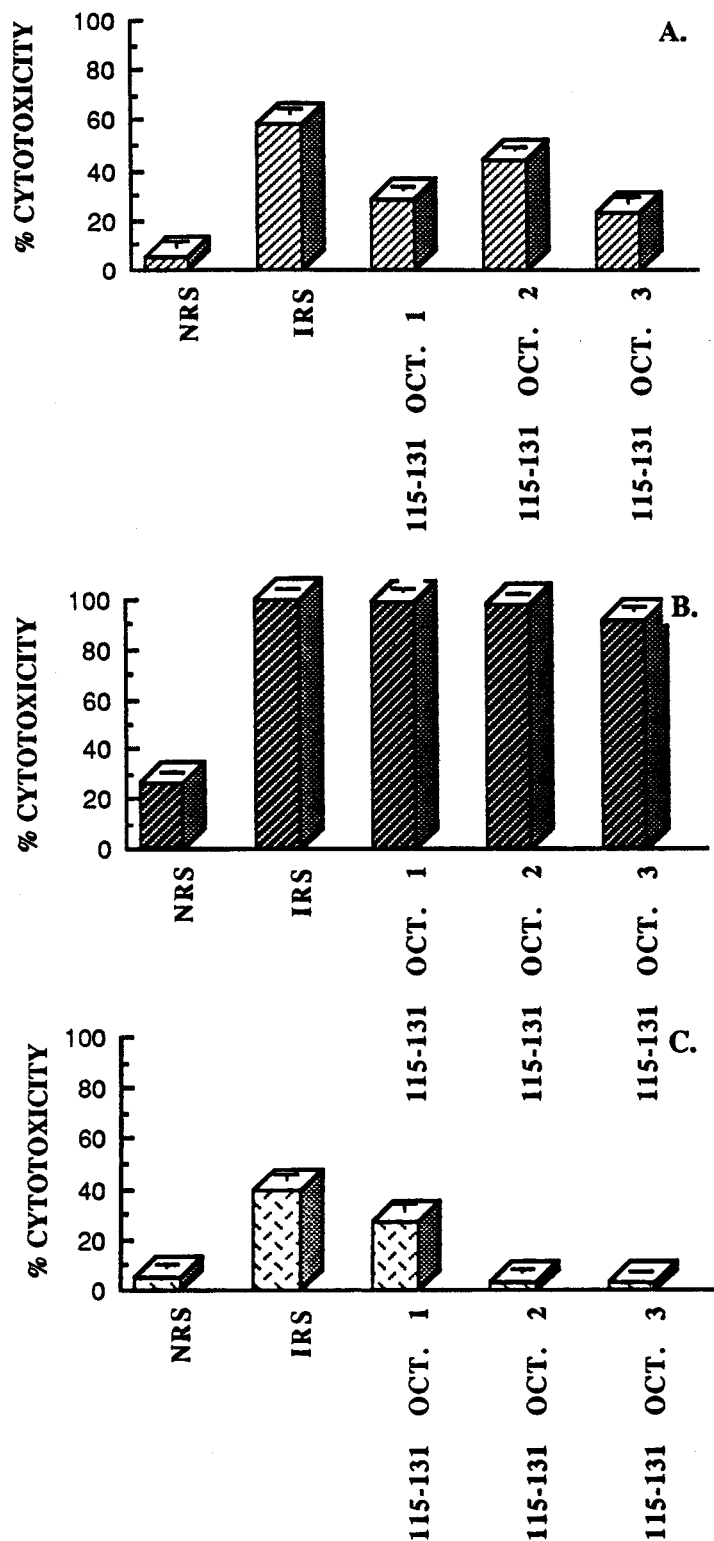


Figure 7 Macrophage (7 - A), platelet (7 - B) and eosinophil (7 - C) dependent cytotoxicities were assessed by measuring the percentage of dead schistosomula after incubation of the effector cells with normal rat serum (NRS), serum of infected rats recovered 42 days after infection (IRS), or sera of three rats immunized with the 115-131 octopus. Motionless and dark dead larvae were easily distinguished from mobile and refringent living schistosomula by optical microscopy. Each experiment was done in triplicate and results are expressed as the mean \pm S.D. of dead larvae.

infected with *S. mansoni* cercariae six days after the last injection of antigen. The worm burden was evaluated by liver perfusion 21 days after the infection.

Table I represented the results of three experiments and shows that the immunization with the 115-131 octopus was responsible for a level of protection ranging between 40 and 50 %. The last experiment used the IRR-OCT as a control antigen. In this experiment the immunization with 115-131 octopus led to a reduction in worm burden of 44 %. The comparison of the two octameric constructions (115-131 octopus and IRR. OCT.) demonstrates the specificity of the protective effect and that it is unlikely that artefacts were introduced by the type of construction used.

The specific anti-Sm-28-GST antibody response was followed during the course of infection in rats preimmunized with the 115-131 octopus. No anti-Sm-28-GST IgG or IgE antibodies were detected in control infected animals throughout the infection. In contrast, in preimmunized animals, anti-Sm-28-GST IgG were detectable at day 0 (the day of infection) and their production increased after *S. mansoni* infection despite a high degree of individual variability (Figure 8-A). Anti-Sm-28-GST IgE antibodies were also present after octopus immunization but their level remained stable throughout the infection (Figure 8-B).

TABLE I

Protection observed in Fischer rats after immunization with the 115-131

octopus construction.

		Experiments		
		1	2	3
	OVA	250±20 ^a	182±27 ^a	ND
Immunization with	IRR. OCT.	ND	ND	165±43 ^a
	115-131 Oct.	126±42 ^a	109±25 ^a	92±55 ^a
	% protection	49.6%	40.1%	44.2%
	p values ^b	p<0.0005	p<0.005	p<0.05

a: worms recovered 21 days post-infection after liver perfusion of immunized rats.

b: Student's t test for paired observations was used. p was calculated, comparing the number of worms recovered in the control group to that obtained in the 115-131 octopus group in each experiment.

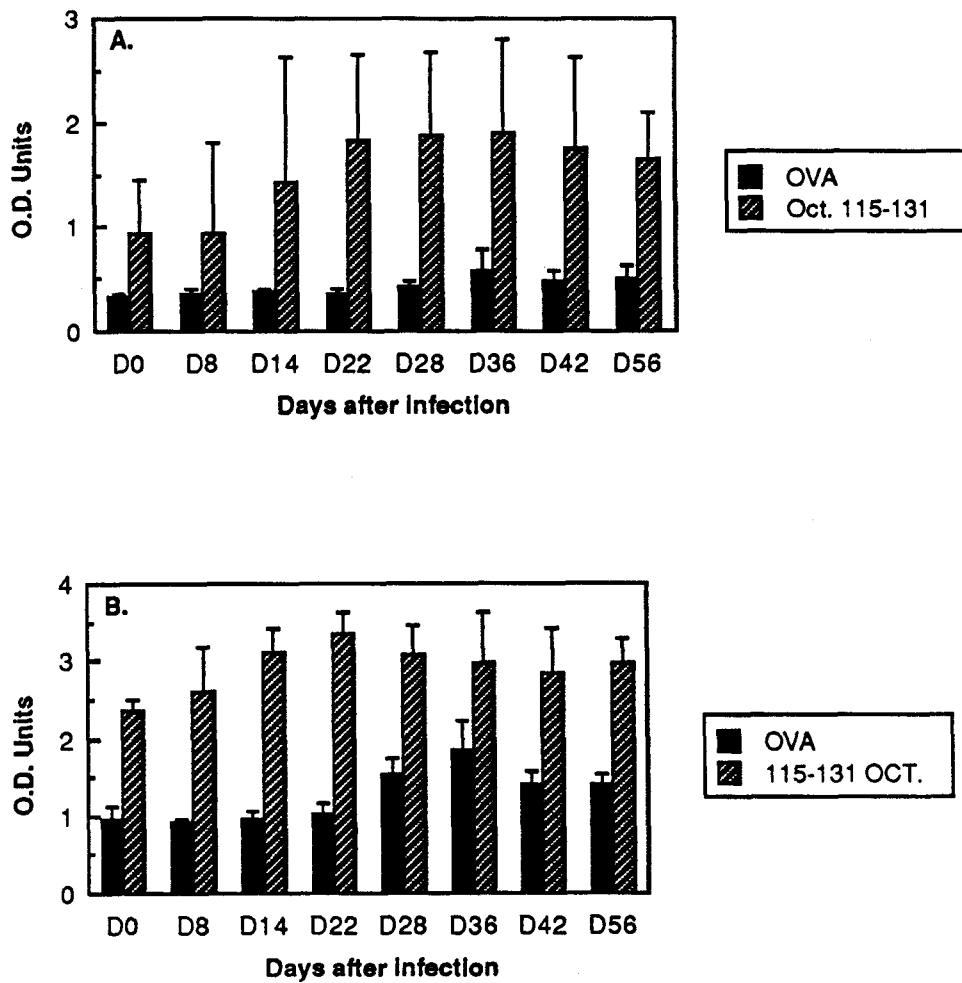


Figure 8 Sm-28-GST-specific IgG (8-A) and IgE (8-B) levels in the sera of Fischer rats immunized with OVA (■) or 115-131 octopus (▨) prior to *S. mansoni* infection. The specific IgG and IgE responses were measured by ELISA test using microtiter plates coated with r-Sm-28-GST antigen. Results are expressed as the mean of five individual responses for each group.

DISCUSSION

We have previously shown that the Sm-28-GST antigen of *Schistosoma mansoni* is a potential vaccinating molecule against schistosomiasis (1). Among the synthetic peptides of Sm-28-GST used to determine epitopes inducing T helper lymphocyte reactivities and that were recognized by antibodies in protective sera (9), the 115-131 peptide deserves particular attention since it contained both T and B cell sites.

We thus conjectured that this peptide might be able to induce specific humoral and cellular responses cross-reacting with the whole native protein and also the whole invading parasite. One of the major obstacles of this approach was the need for a foreign carrier protein to ensure a reasonable level of immunogenicity of this peptide. In order to avoid the use of a carrier molecule and to increase the immunogenicity of the 115-131 peptide, various multiple antigenic peptide constructions were compared for their ability to induce both B and T cellular responsiveness (M. Marguerite, manuscript in preparation). The present paper detailed the experimental data concerning the study of one of these synthetic constructions containing 8 copies of the 115-131: the octopus.

These studies provide evidence that such an artificial construction is antigenic, since it was recognized by anti-Sm-28-GST antibodies and activated T lymphocytes specific for Sm-28-GST. Even if this activation of T cells was lower than with the 115-131-OVA, it was always significant and highly reproducible. This indicated that the organization of the 115-131 peptide in the octopus could by-pass the need for a carrier protein in *in vitro* proliferative tests. Several reasons for this can be given:

First: this organization of the 115-131 peptide on a polylysine core

may stabilize a proper conformation of the peptide, a conformation it is incapable of maintaining free in solution.

Second: the branching lysine core might provide appropriate additional aminoacids facilitating epitope binding to the T cell receptor. The peptide alone may lack suitable agretopes for association with the MHC class II molecules of APC.

Third, this construction might protect the 115-131 containing T cell sites from excessive processing by APC.

Moreover, these results demonstrated that the octopus construction is immunogenic in three different experimental models (mice, rats and baboons). It is worth noticing that the 115-131 octopus induced a greater T cell response in the primate model, the proliferative indices being higher than those obtained in the rodent models. However, it must be pointed out that the experiments dealing with baboons were carried out with peripheral blood lymphocytes while in the rodent models, they concerned T cells from lymph nodes. In addition, the nature of APC was different. For rodents these accessory cells were obtained from the thymus (rat) or the spleen (mouse) of naive syngeneic animals while for baboons these cells were mainly monocytes and B lymphocytes previously educated against the octopus since they were derived from the immunized animals.

According to these observations, we can conclude that the octopus construction did not modify T and B cell epitopes contained in the 115-131 peptide. The conservation of these immune sites between the cognate protein (Sm-28-GST), the derived 115-131 peptide and the 115-131 octopus was important to verify. It is now assumed that the key to insure the efficient immunogenicity of a construct depends on the peptide conformation. The effectiveness of any synthetic peptide used as a vaccine constituent is very likely to be dependent on the conformational similarities between the synthetic construction and the native protein (37).

We were also interested in the functional properties of the anti-octopus humoral response. We observed that sera from Fischer rats immunized with the 115-131 octopus were able to induce platelet,

macrophage and, to a lesser extent, eosinophil dependent cytotoxicity towards *S. mansoni* larvae in an *in vitro* test. This was of first interest since it is now well- admitted that ADCC mechanisms demonstrated *in vitro*, may play a role in the destruction of the parasite *in vivo* in various models (34,30).

The *in vivo* relevance of this schistosomicidal activity was tested by immunizing rats with the 115-131 octopus before *S. mansoni* infection. A higher production of Sm-28-GST-specific IgG and IgE antibodies was observed in animals immunized with octopus compared to the control group. Not only did this artificial construction elicit proliferating T lymphocytes but it also gave rise to helper T cells for a subsequent antibody response to the whole protein during infection.

The most striking fact of these experiments was the partial protection of these animals against infection. In comparison with the protection obtained after immunization with either the native Sm-28-GST or the recombinant antigen (up to 70 %), one could emphasize the relatively good level of protection (40-50 %) obtained with this construction. Of course, this kind of comparison cannot conclude on the contribution of the 115-131 peptide to the protective capacity of Sm-28-GST. Indeed, the immune responses against the Sm-28-GST or its derived synthetic construction will not be the same as the 115-131 -contained epitope will be presented to the immune system in a different context (will it concerned the same APC, the same anatomical compartment?). Tolerization experiments of new born rats with the octopus 115-131 will be done, before Sm-28- GST immunization and infection to define the involvement of this epitope in the protection obtained with Sm-28- GST.

Moreover we cannot conclude that these animals were protected because of the increased humoral response. This question will be approached by the passive transfer of 115-131 octopus specific antibodies of one or another isotype. In addition the transfer of anti-octopus T cells of various subsets will be performed at different critical periods of

infection. The same approach is already under investigation in the murine model with particular emphasis on the pathological aspects (egg laying, egg hatching in octopus-immunized animals) and on the detection of lymphokines in supernatants of 115-131 octopus-specific T cells of either Th1 or Th2 subsets. These complementary studies using experimental models which have some characteristics in common with human infection, will enlarge our knowledge of the immune response against the 115-131 octopus.

From this work many questions arise: What is the most adequate presentation to induce the most efficient immune response? What other peptides would be expected to confer immunity against infection? Could synthetic preparations using several peptides corresponding to different regions of the same protein or to different proteins be envisaged? How could the host's immune response be orientated with these synthetic preparations?

In conclusion, advances in our understanding of the immune response to *S. mansoni*, associated with the molecular cloning of genes encoding potentially protective proteins and with subsequent chemical synthesis of peptides containing T and B epitopes, should provide fascinating insights and may preclude some difficulties in the development of a synthetic vaccine against *Schistosoma mansoni* schistosomiasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Catherine Vendeville for expert technical assistance and Martine Damonville and Jérôme Estaquier for very kind and helpful discussions.

REFERENCES

1. Balloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, A. Capron. 1987. A purified 28,000 daltons protein from *S. mansoni* worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 138: 3448.
2. Balloul, J. M., R. J. Pierce, J. M. Grzych and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28 kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *S. mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17: 105.
3. Taylor, J. B., A. Vidal, G. Torpier, D. J. Meyer, C. Roitsch, J. M. Balloul, C. Southan, P. Sondermeyer, S. Pemble, J. P. Lecocq, A. Capron, and B. Ketterer. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO. J.* 7: 465.
4. Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* 326: 149.
5. Balloul, J. M., D. Boulanger, P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq and A. Capron. 1987. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. Coli*. *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasite*, Alan R. Liss, Inc, New- York, pp.77.

6. Wolowczuk, I., C. Auriault, H. Gras-Masse, C. Vendeville, J. M. Balloul, A. Tartar and A. Capron. 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *S. mansoni* P28-1 antigen. *J. Immunol.* 142: 1342.
7. Damonville, M., J. Wiezerbin, V. Pancré, M. Joseph, A. Delanoye, A. Capron and C. Auriault. 1988. Recombinant tumor necrosis factor mediates platelet cytotoxicity to *S. mansoni* larvae. *J. immunol.* 140: 3962.
8. Pancré, V., D. Monté, A. Delanoye, A. Capron and C. Auriault. 1990. Interleukin- 6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *S. mansoni*. *Eur. Cytokine Net. Vol. n°1.* pp. 15.
9. Auriault, C., H. Gras-Masse, I. Wolowczuk, R. J. Pierce, J. M. Balloul, J. L. Neyrinck, H. Drobecq, A. Tartar and A. Capron. 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *S. mansoni* P28 antigen in the rat model using synthetic peptides. *J. Immunol.* 141: 1687.
10. Capron, A. and J. P. Dessaint. 1985. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Ann. Rev. Immunol.* 3: 455.
11. Auriault, C., H. Gras-Masse, R. J. Pierce, A. E. Butterworth, I. Wolowczuk, M. Capron, J. H. Ouma, J. M. Balloul, J. Khakife, J. L. Neyrinck, A. Tartar, D. Koech and A. Capron. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected humans subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiology.* In press.

12. Francis, M. J., C. M. Fry, D. J. Rowlands, F. Brown, J. L. Bittle, R. A. Houghten and R. A. Lerner. 1985. Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 66: 2347.
13. Milich, D. R., A. Mac Lachlan, F. V. Chisari and G. B. Thornton. 1986. Nonoverlapping T and B cell determinants on an hepatitis B surface antigen pre-S(2) region synthetic peptide. *J. Exp. Med.* 164: 532.
14. Good, M. F., W. L. Maloy, M. N. Lunde, H. Margalit, J. L. Cornette, G. L. Smith, B. Moss, L. H. Miller, and J. A. Berzofsky. 1982. Construction of synthetic immunogen: use of new T- helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science.* 235: 1059.
15. Bittle, J., R. Houghton, H. Alexander, T. Shinnick, J. G. Sutcliffe, R. Lerner, D. Rowlands, and F. Brown. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature.* 298: 30.
16. Patarroyo, M., R. Amador, P. Clavijo, A. Moreno, F. Murillo, G. Ponton, and G. Trujillo. 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 332: 158.
17. Posnett, D. N., H. McGrath, and J. P. Tam. 1988. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor β chain. *J. Biol. Chem.* 263: 17179.

18. Ramalho-Pinto, G., G. Gazzinelli, R. E. Howells, T. A. Mota-Santos, E. A. Figueiredo, and J. Pellegrino. 1974. *Schistosoma mansoni*; defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *J. Exp. Parasitol.* 36: 360.

19. Boros, D. L. and K. S. Warren. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132 : 488.

20. Martin, L. K. and P. C. Beaver. 1968. Evaluation of Kato Thick-Smear technique for quantitative diagnosis of Helminth infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 17 (3) 382.

21. Courtney, M., A. Buchwalder, L. H. Tessier, M. Jaye, A. Benavente, A. Balland, V. Kolhi, R. Lathe, P. Tolstoshev, and J. P. Lecocq. 1984. High level production of biologically active human -antitrypsin in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 : 669.

22. Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85 : 2149.

23. Schutze, M.P., C. Leclerc, M. Jolivet, F. Audibert, and L. Chedid. 1985. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 135: 2319.

24. Castro, B., J. R. Dormoy, G. Evin, and C. Selve. 1975. BOP, hexafluorophosphate de benzotriazol N-oxytrisdimethylaminphosphonium. *Tetrahedron Letters.* 14: 1219.

25. Smithers, S. R. and R. J. Terry. 1969. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*. 55 : 695.

26. Julius, M. H., E. Simpson, and L. A. Herzenberg. 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3: 645.

27. Laemmli, U. K. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680.

28. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4350.

29. Pierce, R. J. and A. Capron. 1987. Western blot: Principes et méthodologies. *In: Techniques biochimiques d'analyse des antigènes de membranes. D. Charon. ed. INSERM, Paris, p. 43.*

30. Clegg, J.A. and S.R. Smithers. 1972. The effect of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 2: 79.

31. Capron, M., H. Bazin, M. Joseph, and A. Capron. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126: 1764.

32. Lynch, S. M., K. F. Austen, and S. L. Wasserman. 1972. Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by noncytolytic secretory stimuli. *J. Immunol.* 121: 1394.

33. Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*. 3003: 5920.

34. Capron, A., and Dessaint, J. P. 1987. "Immunology of Schistosomiasis" *in* Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. Vol. II. Trematodes and Cestodes. Soulsby E. J. L. ed. CRC Press, 1-33.

35. Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, V., and Rees, P. H. 1975. Antibody- dependent cell- mediated damage to *Schistosomula in vitro*. *Nature*. 252: 503.

36. Capron, M., Nogueira- Quieroz, J. A., Papin, J. P., Capron, A. 1984. Interaction between eosinophils and antibodies: *in vivo* protective role against rat schistosmiasis. *Cell. Immunol.* 83: 60.

37. Satterthwait, A. C., T. Arrhenius, R. A. Hagopian, F. Zavala, V. Nussenzweig and R. A. Lerner. 1988. Conformational restriction of peptidyl immunogens with covalent replacements for the hydrogen bond. *Vaccine*. 6: 99.

ARTICLE 5

*

**Etude des réponses lymphocytaires vis-à-vis de l'antigène
protecteur de *S. mansoni*: Sm28 GST et des peptides dérivés, chez
l'homme et le primate.**

*

Lorsque nous avons entrepris cette analyse l'objectif était simple: vérifier que les peptides sélectionnés dans différents modèles expérimentaux (l'immunisation et l'infection de rat ou de souris) étaient également reconnus lors de l'infection humaine ou lors de celle d'un primate très utile à l'étude de la schistosomiase humaine: le babouin.

Cette étude a été réalisée au Kenya:

- au centre de Recherches sur les Primates de Karen, en collaboration avec D. Boulanger, sur des babouins olive (*Papio anubis*) chroniquement infectés. La réactivité des lymphocytes du sang circulant, de la rate et des ganglions mésentériques a été analysé.

- au centre de Recherches Médicales de Nairobi où nous avons rejoint l'équipe de G. Kimani, dans le cadre d'une collaboration entre notre Institut, le laboratoire d'A. E. Butterworth à Cambridge et le centre de Nairobi.

Au Kenya, l'incidence de l'infection par *S. mansoni* est très élevée, les données les plus récentes estimant à 2 millions le nombre de personnes infectées (soit 10% de la population).

Les enfants (moyenne d'âge 13 ans) venaient d'une région au Sud-Ouest de Nairobi, dans le district de Machakos. Ils avaient été préalablement sélectionnés sur la base d'une morbidité élevée. Trois groupes ont été examinés: le groupe A de 22 enfants non traités, le groupe B de 20 enfants traités par le praziquantel 6 mois plus tôt et enfin le groupe C comprenant

20 écoliers traités il y a un an.

Cette étude représente la première analyse des réponses lymphocytaires T vis-à-vis de molécule recombinante potentiellement vaccinnante et de peptides synthétiques, dans une population humaine infectée par *S. mansoni*.

Les conclusions que nous pouvons tirer de cette analyse sont de 2 ordres:

- La majorité des enfants infectés font une réponse T vis-à-vis de Sm28 GST. Les peptides 24-43, 115-131 et 140-153 identifiés chez le rat et la souris, sont également reconnus chez l'homme. De plus, le peptide représentant la partie C-terminale de la molécule (190-211), est majoritairement reconnu dans la population non traitée, alors qu'il l'était faiblement dans les modèles rongeurs. Les enfants présentant la réactivité cellulaire la plus élevée vis-à-vis de Sm28 GST, reconnaissent le 190-211 à l'exclusion de tout autre peptide.

- L'approche primate est également très intéressante puisqu'elle nous a permis de faire une étude de la réactivité cellulaire en fonction de l'origine (sang, rate ou ganglion mésentérique) des cellules. L'on constate des variations considérables de réponses associées à des spécificités épitopiques parfois très différentes en fonction de la localisation anatomique des lymphocytes.

TITLE

A study of human and primate lymphocyte responses to synthetic peptides of the Sm28GST protective antigen of *Schistosoma mansoni*.

AUTHORS

Isabelle Wolowczuk¹, Gachuhi Kimani³, Denis Boulanger¹, Anthony E. Butterworth⁴, Hélène Gras-Masse², André Tartar², John H. Ouma⁵, Ross Tarara⁶, Graham D. Reid⁶, Davy Koech³, Claude Auriault¹, and André Capron¹.

- 1 Centre d' Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167- CNRS 624
Institut PASTEUR, 59019 LILLE cédex (FRANCE)
- 2 Structures peptidiques naturelles et modifi es
Unité CNRS- URA 1309
Institut PASTEUR, 59019 LILLE cédex (FRANCE)
- 3 Kenya Medical Research Institute
PO. BOX 54840
NAIROBI (KENYA)
- 4 Department of Pathology
University of CAMBRIDGE (U. K.)
- 5 Division of Vector Borne Diseases
Ministry of Health
NAIROBI (KENYA)
- 6 Institute of Primate Research
Karen, PO. BOX 24481
NAIROBI (KENYA)

RUNNING TITLE

Sm28GST and peptides in baboon and human schistosomiasis.

CORRESPONDENCE

Isabelle Wolowczuk¹

FOOTNOTES

This investigation received financial assistance from: the UNDP/World Bank/WHO Special Programm for Research and Training in Tropical Diseases, within the framework of a Joint Funding Venture with the Rockefeller Foundation; the Edna McConnell Clark Foundation; the European Commission; and the U.K. Medical Research Council.

Abbreviations: PBMN: peripheral blood mononuclear cells, pzq: Praziquantel, SEA: soluble egg antigen, SWAP: soluble adult schistosome antigen preparation.

SUMMARY

Cellular immune responsiveness during human schistosomiasis *mansoni* was studied using peripheral blood mononuclear cells obtained from 62 patients living in areas endemic for *Schistosoma mansoni* in Machakos District, Kenya.

There were three different sets of patients : one of 22 untreated individuals, a second of 20 children treated with praziquantel six months earlier and a third of 20 children treated one year earlier.

Responsiveness was assayed with respect to schistosome-derived antigen preparations from eggs (SEA) and adult worms (SWAP), as well as concanavalin A (ConA) and Sm28GST, a molecule previously implicated as vaccine immunogen from studies in laboratory hosts. Seven synthetic peptides derived from the primary sequence of the recombinant Sm28GST were also used as antigens in these experiments.

All the patients strongly responded to ConA and exhibited a good response to SEA without any marked differences between the groups tested. The SWAP-induced responses were generally higher in the group of children who had been treated six months earlier. Cells from a majority of untreated patients were activated after *in vitro* incubation with Sm28GST. The 190-211 peptide induced the highest and most frequent responses in this group. The mean response to Sm28GST was lower in the group of patients examined one year after treatment.

Finally, lymphocytes of various anatomical origins (spleen, mesenteric lymph node and peripheral blood) from chronically infected baboons, were tested for their reactivities towards Sm28GST and derived peptides. The profiles of peptide recognition were different depending on the origin of the cells.

INTRODUCTION

Recent years have witnessed a rapid progress in understanding the nature of acquired immunity in schistosomiasis mansoni both under experimental conditions and in human infections.

The development of protective immunity in rodent models involves effector mechanisms dependent on antibody of the IgG and IgE isotypes (1) as well as T cell-dependent cellular reactions (2). Among primates, the olive baboon (*Papio anubis*) is certainly the most documented species, and perhaps the most useful for human schistosomiasis research, since its immunological behaviour may in some respects resemble that of man (3,4).

In contrast to progress achieved in laboratory models, less is known about human immunity to *Schistosoma mansoni*. Although the existence of resistance to reinfection has long been suspected to occur in humans living in areas endemic for schistosomiasis (5), it has only been recently confirmed by epidemiological studies on natural reinfection following treatment (6,7). These led to the identification of groups failing to become reinfected despite evidence of continued water contact. This provided the first evidence for a role of immunity in limiting reinfection after chemotherapy.

Although several correlations between immune measurements- both at humoral (6,8) and cellular (9) levels- and resistance to reinfection have been reported, the actual mechanisms of protection in man have still to be determined.

In the meantime, several potentially vaccinating antigens have been identified and prepared using molecular cloning and chemical synthesis (10). Among them, a member of the glutathione-S-transferase family, namely the Sm28GST, has been shown to induce a protective

immunity in rats, mice, hamsters (11,12) and baboons (13). The protection obtained in Sm28GST-vaccinated rats is mediated through antibody-dependent mechanisms (14) while in the murine model the cellular-dependent immunity predominates (15).

The identification of T and B cell epitopes of Sm28GST, and their relevance to immunity, have been performed in both rats and mouse models. As reported in previous papers, this analysis in *S. mansoni* infected animals and Sm28GST-immunized rats or mice has led to the identification of two interesting peptides, namely the 24-43 (helper T cell site of an anti-Sm28GST IgE response) and the 115-131 peptides (16). More recently, immunity to reinfection of Kenyan infected children has been inversely correlated with the presence of IgG4 specific for Sm28GST or for the 115-131 peptide (17).

The present study was designed to analyse the T cell response of individuals in an endemic area to Sm28GST and to derived synthetic peptides. It represents the first survey of cellular responsiveness to a recombinant antigen of vaccinating potentialities, in a *S. mansoni* infected human population. In addition, a similar analysis was also performed in chronically infected baboons using T lymphocytes of various anatomical origins (peripheral blood, spleen, and mesenteric lymph nodes).

MATERIALS AND METHODS

1. Patients.

Patients were recruited from two separate areas (Kangundo and Kambu) in Machakos District, southeast of Nairobi, as described elsewhere (.,). These two areas have a similar pattern of prevalence and intensity of infection but a markedly different prevalence of severe morbidity. In Kangundo, the prevalence of severe hepatosplenomegaly among children is less than 0.5%, in contrast to 16% among schoolchildren in Kambu. Three groups of children, aged 8 to 18 years, were examined at different times : Group A, comprising 22 untreated children, of whom 16 came from Kitengei Primary School in the high morbidity area, and 6 from Miu Primary School in the low morbidity area; Group B, comprising 20 children from Kitengei Primary School in the high morbidity area, examined six months after treatment with praziquantel; and Group C, comprising 20 children from Matithini Primary School in the low morbidity area, examined one year after treatment with praziquantel. Results for the three groups are presented separately, but no substantive differences between the groups is implied. Informed consent was obtained before the inclusion of each subject in the study. After the investigations had been performed, all patients received anti-helminthic treatment with praziquantel at a dose of 40 mg/kg.

2. Experimental infections of baboons with *Schistosoma mansoni*.

Baboons (*Papio anubis*) used in these experiments were locally captured in a schistosome-free area (Narok, Kenya). Their approximate age was 4 to 8 years with weights ranging from 6 to 16 kgs. They were

maintained in the animal facilities of the Institute of Primate Research (IPR), Nairobi, Kenya. Prior to these experiments, during a two month quarantine period, each animal was individually screened for possible *S. mansoni* infection by faecal examination for eggs over a 3 day period (18).

For the infection of baboons, eggs collected from human stools in an area endemic for *S. mansoni* (Machakos District, Kenya) provided miracidia utilized to infect *Biomphalaria pfeifferi* snails routinely maintained in the IPR laboratory. Baboons were infected by percutaneous exposure to 1,000 cercariae of *S. mansoni* according to the method of Smithers and Terry (19). The duration of infection was one year.

3. Media and Reagents.

For blastogenic assays of human PBMN, Dulbecco's medium (Gibco, Paisley, Scotland) was supplemented with 2 mM L-glutamine (Merck, Darmstadt, FRG), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) (Specia, Paris, France) and 5% heat-inactivated (56°C for 30 min.) human AB⁺ serum.

For baboon assays, RPMI 1640 medium (Gibco, Courbevoie, France) supplemented with 5×10^{-5} M 2β mercaptoethanol (Merck), gentamycin (100µg/ml) (Specia) and 5% decompemented foetal calf serum (Gibco, Courbevoie, France), was used throughout the experiments. Cells were washed using minimum essential (MEM) (Gibco).

Ficoll-Hypaque mixture (Lymphoprep) (Flow, LTD, Rickmanworth, UK) was used for PBMN cells isolation.

Tritiated thymidine ((³H)-TdR) was purchased from Amersham International (Buckinghamshire, UK).

4. Crude antigenic preparations and mitogen.

The soluble adult schistosome antigen preparation (SWAP) was the supernatant obtained after centrifugation at 10,000 x g for 20 min. of a

198

homogenate of adult worms in Phosphate Buffered Saline (PBS : 0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.4).

Soluble egg antigen (SEA) was prepared according to the method of Boros and Warren (20).

Concanavalin A (ConA), (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) was used at final concentrations of 0.1 and 1 μ g/ml of culture fluid.

5. Recombinant Sm28GST antigen

A full length cDNA encoding the Sm28GST antigen of *S. mansoni* was expressed in *E. coli* using a PL-expression vector (12). This construct directed the synthesis of a cII fusion protein containing 172 aminoacids of the C-terminal end of the native P28 antigen. The recombinant Sm28GST antigen was prepared by Dr. E. Keppi from Transgène S. A. (France).

6. Preparation of synthetic peptides

Determination of the primary structure of Sm28GST by sequencing the cDNA clone (12) allowed the prediction of exposed sequences according to their hydrophilicity by the method of Hopp and Woods (21). As described elsewhere (16), seven peptides were synthesized namely the 24-43, 65-86, 87-111, 115-131, 140-153, 158-175 and 190-211.

The crude peptides were purified by gel filtration on Fractogel TSK Hw40-S (Merck, Darmstadt, FRG) in aqueous HCl pH 2, and lyophilized. Peptides were checked for homogeneity by thin-layer chromatography and reverse phase-HPLC, and for identity by aminoacid analysis after total acid hydrolysis.

7. Conjugation of synthetic peptides with carrier protein.

Synthetic peptides were linked to a carrier protein (OVA, Miles Research, Elkhart, IN) as previously reported (16). The conjugates were

sterilized by filtration through 0.22 μ m filters (Sartorius, Göttingen, Germany).



8. Lymphocyte proliferation assays.

8-a: Human peripheral blood mononuclear cells (PBMN).

PBMN were obtained by centrifugation of whole heparinized blood at 400 x g, at 18° C to 20° C for 30 min. over a Ficoll-hypaque mixture (Flow) and were subsequently washed twice in MEM.

For blastogenesis assays, 150,000 cells were incubated in triplicate cultures in complete medium (see .3.).

Antigens were added at concentrations determined to be generally optimal in this system (1 μ g/ml and 10 μ g/ml). Cultures were in 0.2 ml volumes, in flat-bottomed microtiter tissue culture plates (Linbro, Mac Lean, VA) and were maintained at 37 °C in a humid 5 % CO₂, 95 % air environment.

Cells were exposed to 1 μ Ci/well of (³H-TdR) for the last 18 hr of a 6 day culture period. Then the cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the amount of incorporated ³H-TdR was measured using a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland).

8-b: Baboon lymphocyte suspensions from different tissues: blood, lymph nodes and spleen.

Animals were bled from the femoral vein into a 20 ml syringe containing Alsevier' s solution (1:1) and PBMN cells populations were prepared using the same protocol as for human samples.

One mesenteric lymph node and a small fragment of the spleen (5 % of the whole organ) were harvested aseptically, without affecting the monkey survival. Cells suspensions were obtained after mechanical disaggregation.

For the *in vitro* assays, the culture conditions were the same as described in 8-a for human samples.

RESULTS

.1. Peripheral mononuclear cell responsiveness to mitogen (ConA) and to *Schistosoma mansoni* adult worm (SWAP) and egg (SEA) - derived antigens.

The initial assessment of PBMN responses was performed for each patient in each group. As shown in Figure 1, there were vigorous cell responses both to the mitogen ConA and to the antigenic extracts. There were no statistical differences in blastogenic responses to SEA between the groups of untreated (A) and treated (B, C) children.

The proliferative response to SEA was generally lower than to SWAP.

Concerning the reactivity to SWAP, the proliferation observed was higher in the group of children treated six months earlier (B).

.2. Analysis of the T cell reactivity to Sm28 GST and derived synthetic peptides.

2.a. Group A of untreated children :

Twenty-two children coming from two primary schools (Miu and Kitengei) constituted the group A of untreated children. The mean age of these patients was 13 (range 8 to 18).

Figure 2 shows the proliferation observed after incubation with the recombinant Sm28GST antigen and the derived synthetic peptides. Most of the patients (17/22) showed a marked T cell response to the recombinant protein (1×10^3 cpm to 30×10^3 cpm). The donors who failed to respond to Sm28 GST also failed to respond to synthetic peptide(s).

In addition, a positive response to Sm28GST was in each case associated with recognition of one or more peptides.

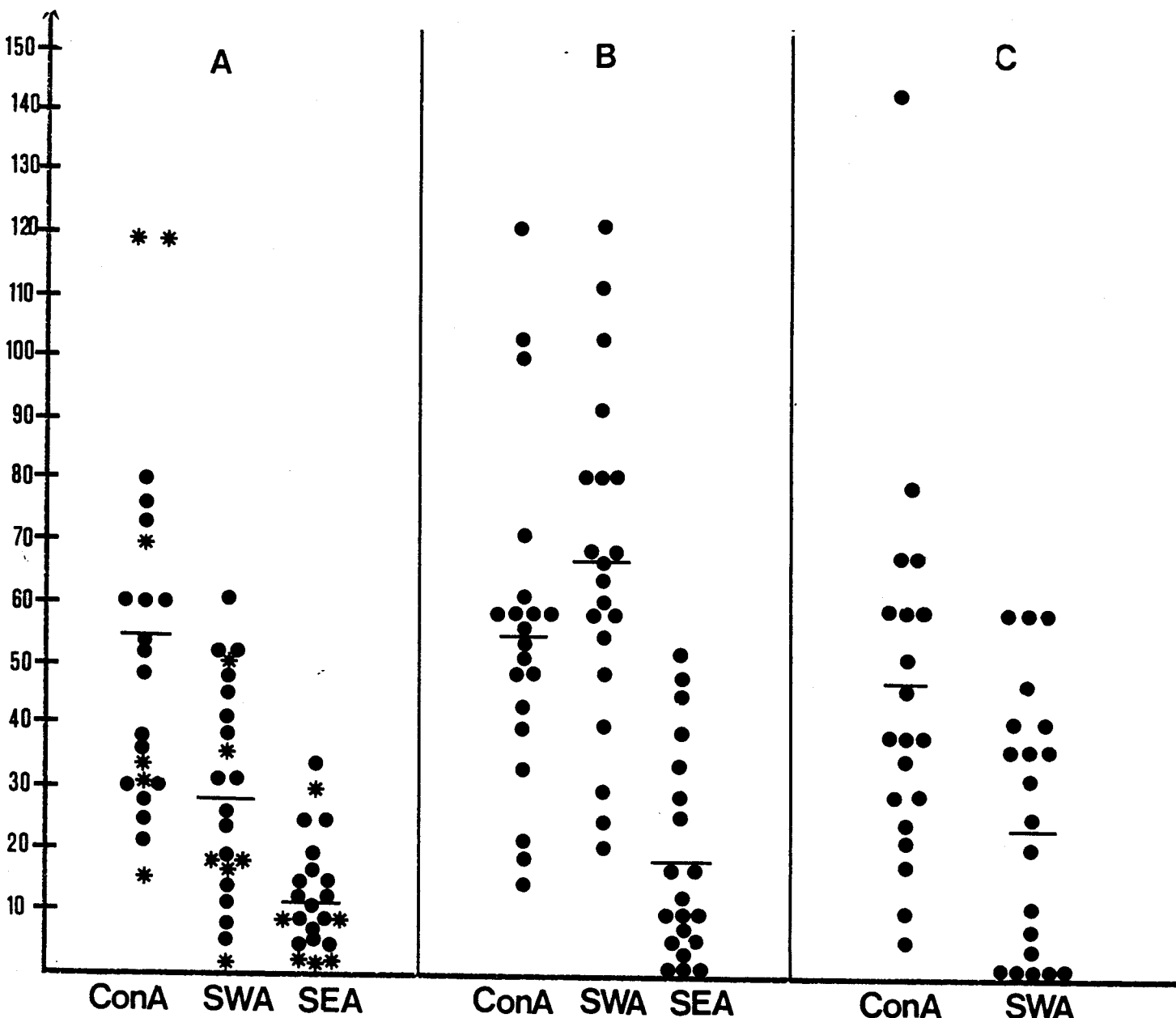


Figure 1

Individual responses to ConA, SWAP and SEA.

A : group A of 22 untreated children.

(● : coming from the high morbidity area, * : coming from the low morbidity area).

B : group B of 20 children six months post-pzq treatment.

C : group C of 20 children one year post-treatment.

Data are given as mean cpm of triplicate cultures, and represented as : experimental cpm - control cpm : (E-C) values.

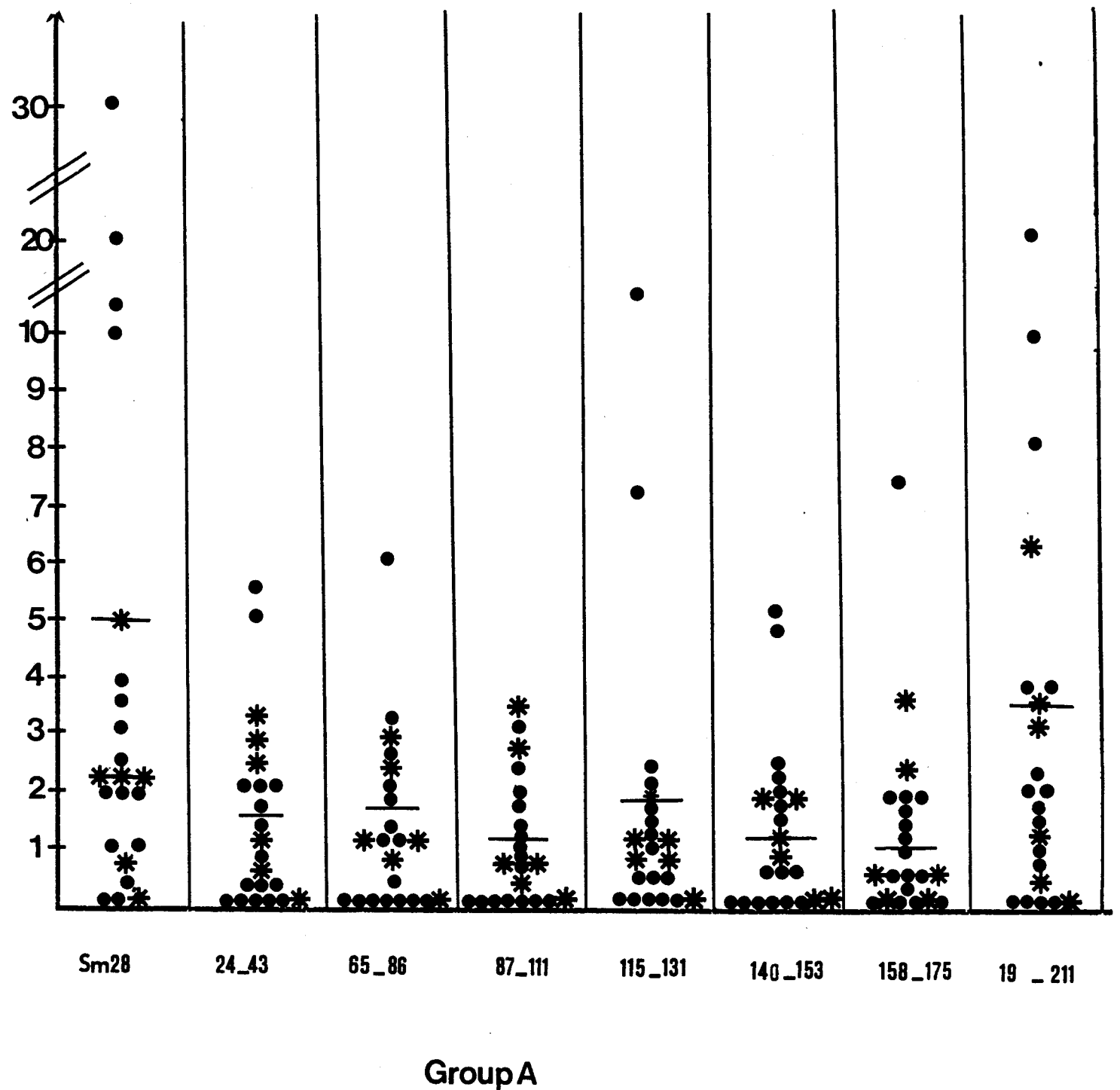


Figure 2 Individual responses to Sm28GST and its seven synthetic peptides of PBMN from 22 untreated schoolchildren : group A.
 (● : coming from the high morbidity area, * : coming from the low morbidity area).
 Data are given as (E-C) values.

The highest levels of proliferation (up to 20×10^3 cpm) were obtained with the 190-211 peptide which corresponds to the C-terminal end of Sm28GST. Moreover, the four patients that exhibited the highest responses to Sm28GST (from 5 to 30×10^3 cpm) recognized the 190-211 peptide to the exclusion of any other peptide (Figure 3).

Although this limited number could not allow any generalization, had a very special profile of peptide recognition : a very strong response to Sm28GST, even higher than to SEA, associated with a recognition focused on the C-terminal end of the antigen (the 190-211 peptide).

2.b. Groups B and C of treated children.

Data shown in Figure 4 concern the individual responses to Sm28GST and peptides of 20 children (different from group A) six months post- Pzq treatment : group B.

The mean proliferation with Sm28GST was similar to that of untreated patients. In contrast, the profile of peptide recognition was quite different, and indeed some positive responses to the Sm28GST were not associated with activation by any of the seven peptides tested. Moreover, the 190-211 peptide was not recognized as strongly and as frequently as in the group A of untreated patients.

The same observations can be drawn from Figure 5, which corresponded to the group C of 20 other schoolchildren treated one year earlier. The mean proliferation to Sm28GST was lower in this population.

.3. Analysis of the cellular recognition of recombinant Sm28GST and its seven derived synthetic peptides in a chronically infected baboon : PBMN, mesenteric lymph node and spleen cellular reactivities.

The main purpose of this set of experiments was to analyse the

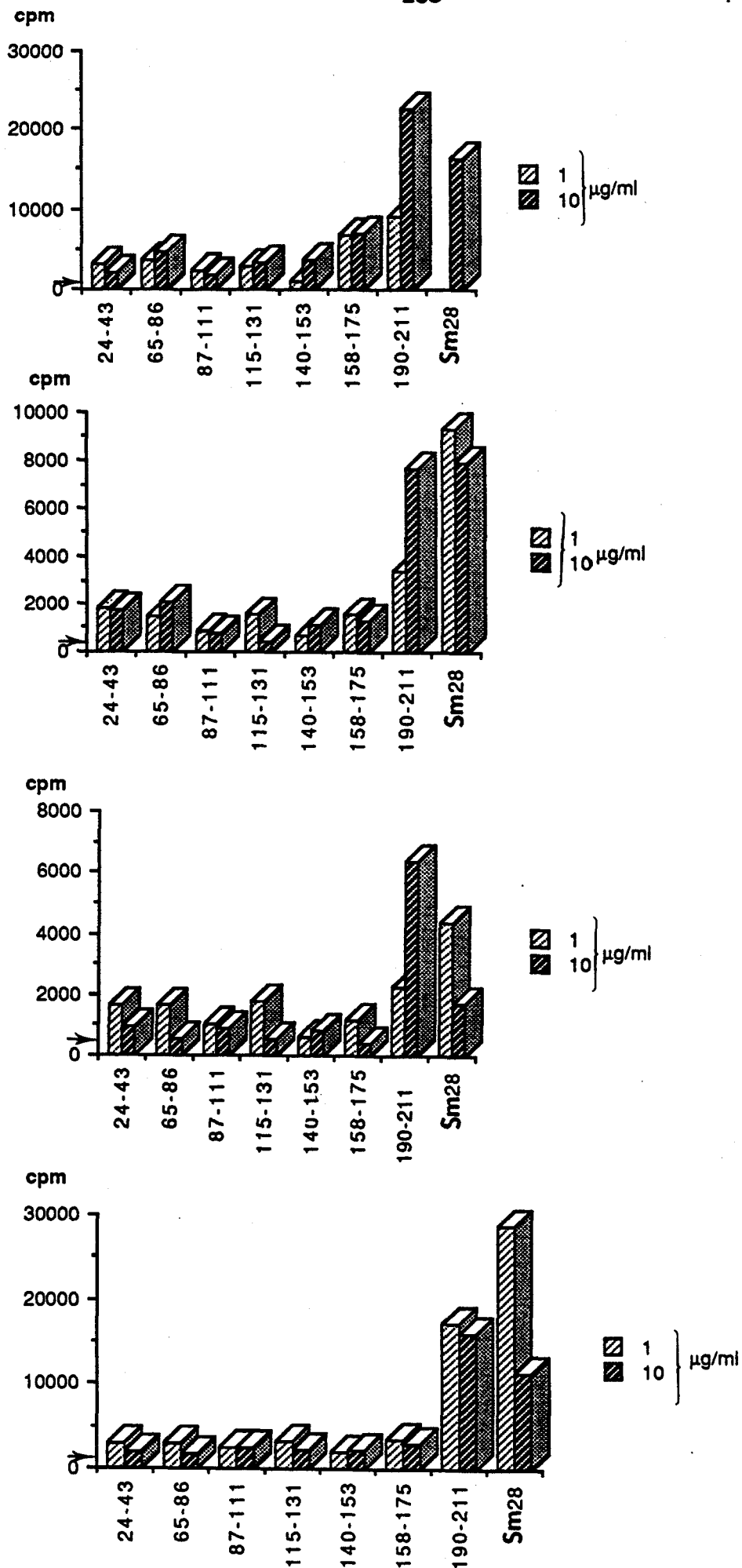


Figure 3 *In vitro* proliferative response of PBMN cells from 4 patients of group A who exhibited the highest responses to Sm28GST. Arrows (→) represent the cpm obtained with cells alone.

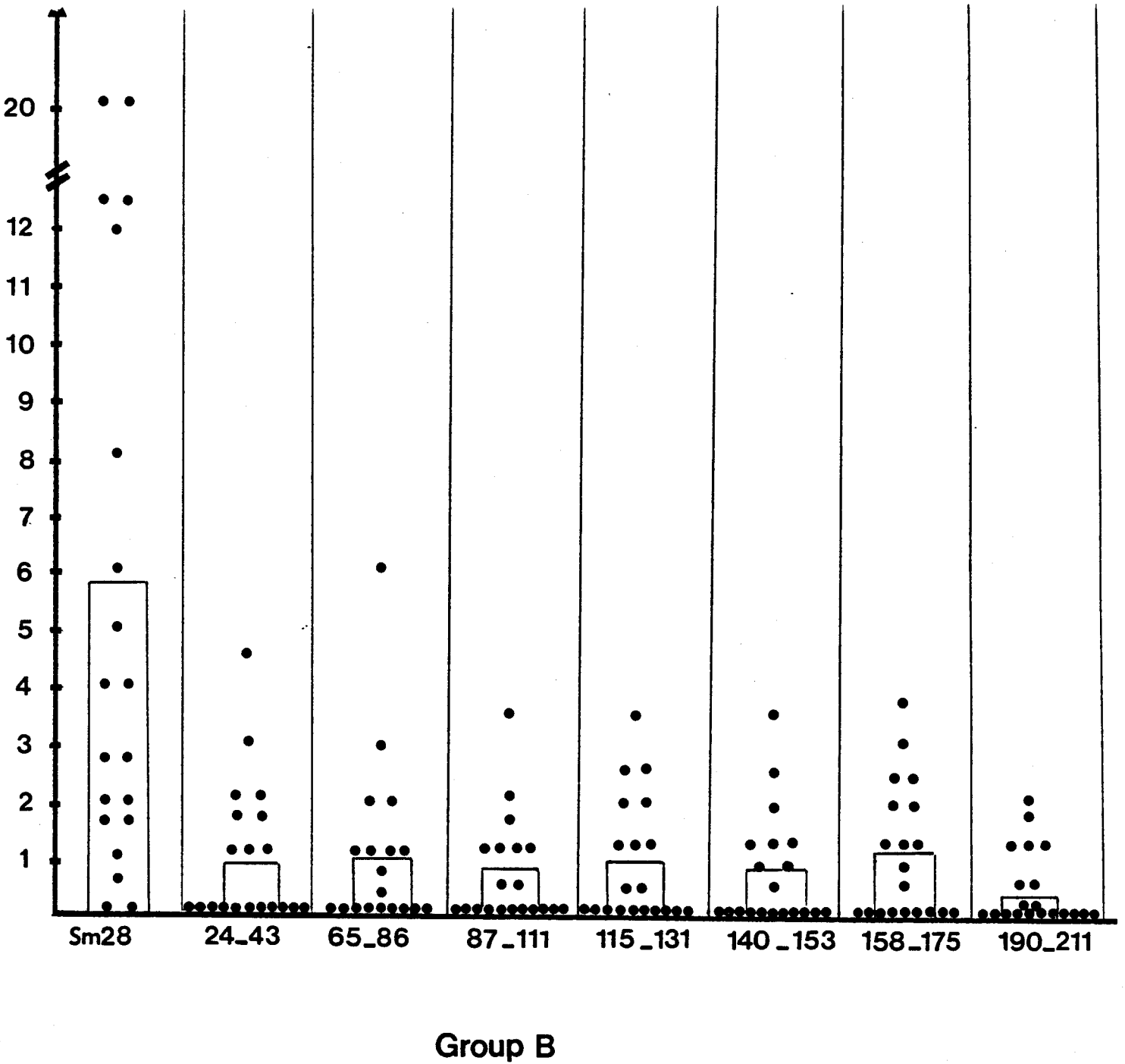


Figure 4 Proliferation of PBMN cells from 20 children six months following-pzq treatment : group B.

represented individuals responses to Sm28GST and peptides.

Histograms figured the mean responses towards each antigen.

Data are given as (E-C) cpm.

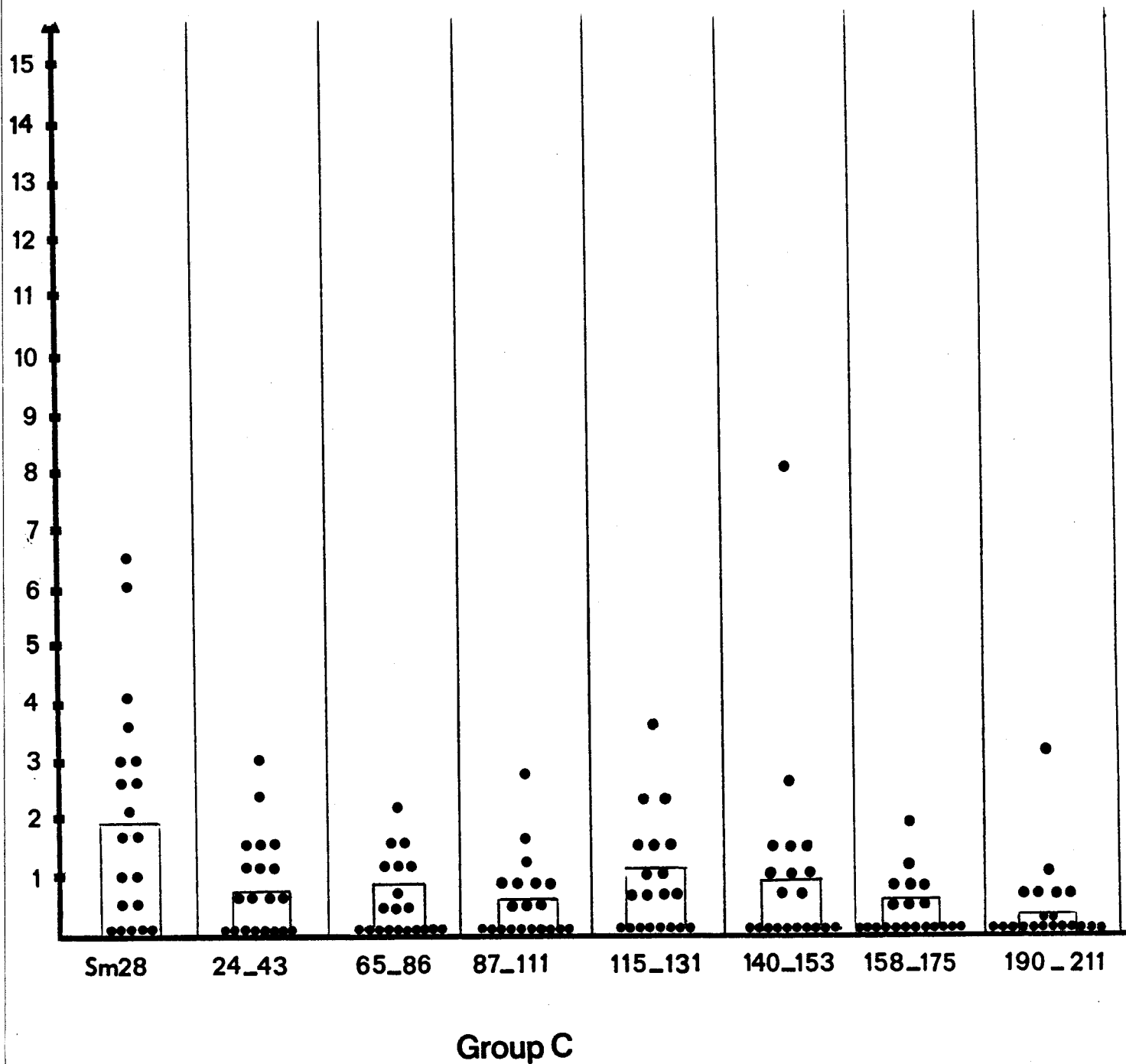


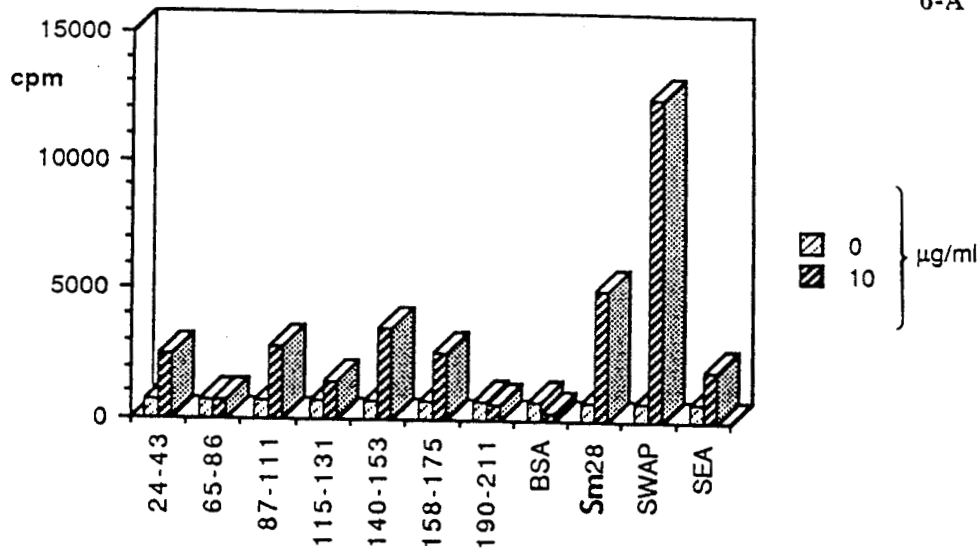
Figure 5 Recognition of Sm28GST and peptides by PBMN cells from 20 schoolchildren who were treated one year before : group C.

represented individual responses and histograms figured the mean responses towards Sm28 GST and peptides. Data are given as (E-C) cpm.

lymphocyte responsiveness of *S. mansoni* chronically infected baboon to Sm28GST and peptides. The study was undertaken using lymphocytes taken simultaneously from peripheral blood (Figure 6-A), mesenteric lymph node (Figure 6-B) and spleen (Figure 6-C).

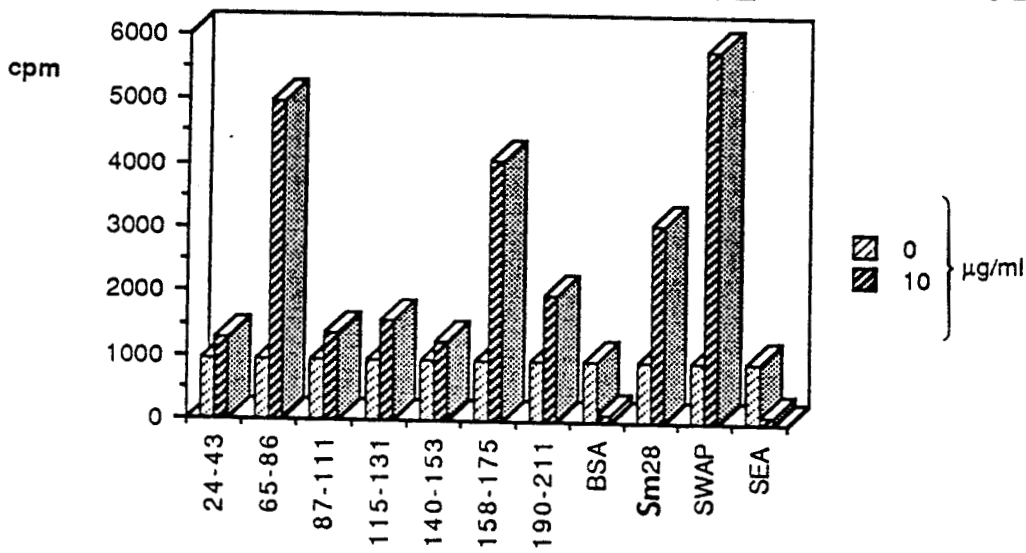
As represented in Figure 6, the results were different according to the anatomical origin of the cells. Lymphocytes specific for the recombinant Sm28GST, for SWAP and SEA, were detected in blood and mesenteric lymph node tissues but not within the splenic population. The profiles obtained with PBMN and lymph node cells of infected baboons, were comparable to those obtained with human PBMN. The most striking observation was that the fine epitopic specificities were not the same, depending their origin in the body. The 65-86 synthetic peptide, for example, which was not recognized by PBMN, was able to induce a strong proliferation of mesenteric cells. A high background level of activation was observed (10×10^3) with splenic lymphocytes. These cells were particularly reactive, since an irrelevant protein (BSA) led to 20×10^3 c.p.m. of ^3H -TdR incorporation. Moreover, for this population, the standard deviation for each set of triplicate cultures was high, compared to those of PBMN or lymph node assays.

6-A



MESENTERIC LYMPH NODE

6-B



SPLEEN

6-C

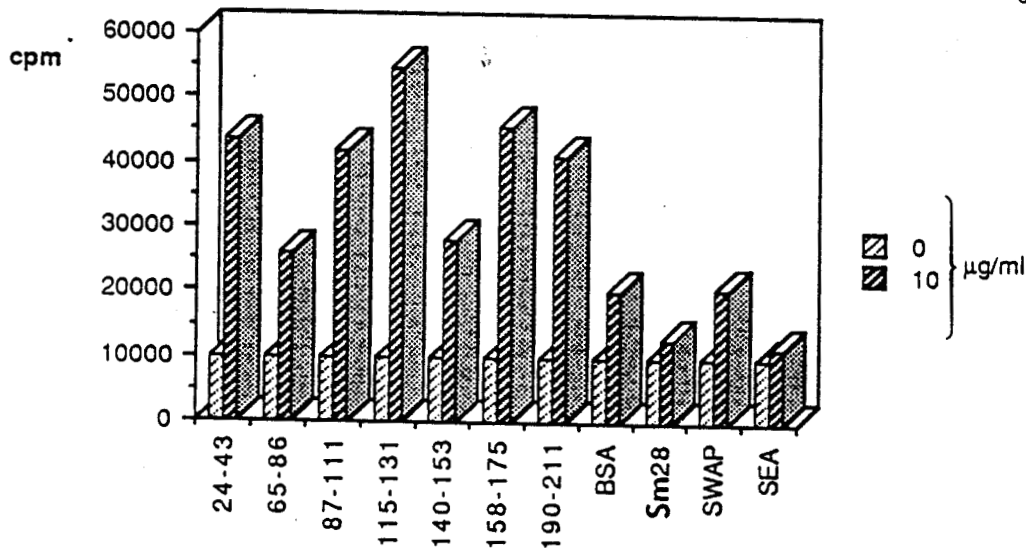


Figure 6 Lymphocyte reactivities of peripheral blood (6-A), mesenteric lymph node (6-B) and spleen (6-C) of chronically *S. mansoni* infected baboon.

The ³H TdR incorporation of cells was measured 6 days after *in vitro* incubation with Sm28GST and peptides. Results are expressed as the mean of triplicate culture and for antigens concentrations of 0 (cells alone) and 10µg/ml.

DISCUSSION

The 28kDa antigen (Sm28GST), present in adult worms and on the schistosomular surface of *S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*, has been reported to induce a protective immunity in mice, rats and baboons (12,13). The identification of T and B cell epitopes of Sm28GST in rat and mouse experimental *S. mansoni* infections has focused on two peptides, 24-43 and 115-131 (16).

In this study, we analyzed the lymphocyte reactivity to Sm28GST and its peptides, of different infected children examined either before chemotherapy (group A), or six months (group B) or one year (group C) following treatment. It should be emphasised that the children were not the same in the three groups : no conclusions are therefore drawn concerning the effects of treatment itself.

All the patients responded to ConA as well as to SEA without major differences between the groups. A higher reactivity to SWAP was observed in the group of children treated by praziquantel six months before. Similar findings have been reported in the literature (22). Praziquantel treatment led to great tegumental damage preceding the destruction of the parasites and consequently the release of parasitic antigens in the circulation which could stimulate the immune system (23).

The higher response to SWAP than to SEA could be linked with the sequestration of SEA-sensitized lymphocytes in granulomas of different organs.

A majority of patients' PBMN were restimulated by recombinant Sm28GST, suggesting that during *S. mansoni* infection some lymphocytes were educated against Sm28GST. The profile of peptide recognition was specific and different for each patient, which makes difficult any

generalization of the results. However, the 24-43, 115-131 and 140-153, which have been demonstrated as functional peptides in animal models, were able to induce the proliferation of PBMN from infected patients.

In addition, the peptide 190-211, corresponding to the C-terminal end of Sm28GST, appeared to be a strong stimulus for PBMN of numerous patients, especially in the untreated group (14 children among 22 tested in group A exhibited a response to 190-211 ranging from 1×10^3 to 22×10^3 cpm). Moreover, four patients for whom the response to Sm28GST was stronger than to SEA recognized this peptide exclusively. This result strengthens the interest of such studies, since this peptide, which was not previously identified in experimental models, appeared as a major epitope for human lymphocytes. The anatomical origin of cells used in these experiments (peripheral blood for humans, spleen or lymph node cells for rodents) could also explain such differences. This was confirmed using cells from spleen, mesenteric lymph node and peripheral blood of a chronically infected baboon. The proliferative responses to Sm28GST and its peptides were quite variable depending on the origin of lymphocytes. This demonstrated that cellular responsiveness is anatomically compartmentalized and related to the parasite migratory route as well as to its development and maturation within its host. The type of APC involved in the different organs could also participate in this selection.

The response of untreated patients to Sm28GST or its peptides appeared to be higher and involved more patients than in other groups, but we have to be careful since our study involved three different sets of patients. Moreover, the analysis of the response of ten patients before and one year after pzq treatment does not allow to define a particular effect (negative or positive) of chemotherapy on lymphocyte reactivity to Sm28GST and its peptides (data not shown).

It would be of interest to pursue this analysis of cellular reactivities towards Sm28GST and derived peptides within the framework of a reinfection study, in order to correlate cellular responses to the rate of reinfection under conditions of carefully monitored water contacts. Such

studies are planned.

Several groups have reported correlations between particular humoral and cellular responsiveness and the intensity of infection, but we still do not understand the real mechanisms of protective immunity in man. The resistance to reinfection in human populations has been related to the presence or the lack of antibodies of particular specificity (24,25) or particular isotype (26). In a recent study, the immunity to reinfection was inversely correlated with the presence of IgG4 antibodies specific for the 115-131 peptide (17).

The isotype selection of antibodies being under the control of T cell derived lymphokines, it should be of a major interest to analyse not only proliferative responses but also lymphokine production of T cells specific for Sm28GST. In this respect, recent studies allowed us to derive human T cell lines specific for Sm28GST. The stimulation of these cells with the 24-43 peptide led to a strong release of IL-4. It was previously shown that in the rat model, the transfer of anti-24-43 helper T cell lines before Sm28GST immunization increased the specific IgE response (27).

In contrast to experimental data concerning humoral responses in human populations, there is a relative scarcity of cellular investigations. The majority of studies have utilized *in vitro* PBMN or whole blood blastogenesis assays against SEA, SWAP and cercariae antigenic extract. Lymphocyte responsiveness of *S. mansoni* infected subjects in Egypt demonstrated that individuals who were reinfected after treatment had lower responses to crude parasitic antigens than individuals who remained uninfected (28). No analysis of T cell responses of putatively immune individuals to specific schistosome antigens have yet been reported.

In the meantime, our results do not provide informations on the relationship between the immunity to reinfection and cellular reactivity to Sm28GST. However, the fact that a majority of lymphocytes from infected individuals were restimulated by Sm28GST confirmed the interest of using this recombinant antigen in a vaccine construct.

Sm28GST epitopes defined previously in rodents were also identified within human populations, and an additional peptide 190-211 emerged from the present study. The role of these epitopes in the induction of protective immunity has now to be determined for further use in order to orientate the immune response towards potent effector mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors would like to thank Christine Mazingue and Monique Marguerite for very kind and helpful discussions.

This paper is published with the kind permission of the Director of Medical Services of the Government of Kenya.

REFERENCES

1. Capron, A. , Dessaint, J. P. , Capron, M. , Joseph, M. and Pestel, J. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980. 29 : 849.
2. Sher, A. , Hieny, S. , James, S. L. , Asofsky, R. J. *Immunol.* 1982. 128 : 1880.
3. Harvey, J. S. Jr. , Felsburg, P. J. , Heberling, R. L. , Kniker, W. T. and Kalter, S. S. *Clin. Exp. Immunol.* 1974. 16 : 267.
4. Damian, R T. , Greene, N. D. , Meyer, K. F. , Cheever, A. W. , Hubbard, W. J. , Harves, M. E. and Clark, J. D. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1976. 25(2) : 299.
5. Kloetzel, K. and Da Silva, J. R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1967. 16(2) : 167.
6. Butterworth, A. E. , Dalton, P. R. , Dunne, D. W. , Mugambi, M. , Ouma, J. H. , Richardson, B. A. , arap Siongok, T. K. and Sturrock, R. F. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984. 78 : 108.
7. Hagan, P. , Blumenthal, U. J. , Chaudi, M. , Greenwood, B. M. , Hayes, J. , Hodgson, J. , Kelly, C. , Knight, M. , Simpson, A. J. G. , Smithers, S. R. and Wilkins, H. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987. 81 : 938.
8. Dessenin, A. , Begley, M. , Demeure, C. , Caillol, D. , Fueri, J. , Dos Reis, M. G. , Andrade, Z. A. , Prata, A. and Bina, J. C. *J. Immunol.* 1988. 140 : 2727.

9. Colley, D. G. , Barsoum, I. S. , Dahawi, H. S. S. , Gamil, F. , Habib, M. and El Alamy, M. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986. 80 : 952.
10. Pierce, R. J. , Auriault, C. , Boulanger, D. , Capron, M. , Grezel, D. , Grzych, J. M. , Velge-Roussel, F. , Verwaerde, C. , Wolowczuk, I. and Capron, A. *In: Van der Ploeg, L. H. T. , Cantor, C. R. and Vogel, H. J. (Eds), Immune recognition and evasion : molecular aspects of host - parasite interaction.* Academic Press, Inc. 1990, p105.
11. Balloul, J. M. , Grzych, J. M. , Pierce, R. J. and Capron, A. *J. Immunol.* 1987. 138 : 3448.
12. Balloul, J. M. , Sondermeyer, P. , Dreyer, D. , Capron, M. , Grzych, J. M. , Pierce, R. J. , Carvallo, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. *Nature.* 1987. 326 : 149.
13. Balloul, J. M. , Boulanger, D. , Sondermeyer, P. , Dreyer, D. , Capron, M. , Grzych, J. M. , Pierce, R. J., Carvallo, D. , Lecocq, J. P. and Capron, A. *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthics Parasites,* Alan, R. Liss, Inc., New York. 1987, p77.
14. Balloul, J. M. , Pierce, R. J. , Grzych, J. M. and Capron, A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985. 17 : 105.
15. Wolowczuk, I. , Auriault, C. , Gras-Masse, H. , Vendeville, C. , Balloul, J. M. , Tartar, A. and Capron, A. *J. Immunol.* 1989. 142 : 1342.

16. Wolowczuk, I. , Auriault, C. , Gras-Masse, H. , Mazingue, C. , Vendeville, C. , Tartar, A. and Capron, A. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 1991. In press.
17. Auriault, C. , Gras-Masse, H. , Pierce, R. J. , Butterworth, A. E. , Wolowczuk, I. , Capron, M. , Ouma, J. H. , Balloul, J. M. , Khalife, J. , Neyrinck, J. L. , Tartar, A. , Koech, D. and Capron, A. *J. Clin. Microbiol.* 1990. 28(9) : 1918.
18. Martin, L. K. and Beaver, P. C. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1968. 17 (3) : 382.
19. Smithers, S. R. and Terry, R. J. *Parasitology.* 1969. 55 : 695.
20. Boros, D. L. and Warren, K. S. *J. Exp. Med.* 1970. 132 : 488.
21. Hopp, T. P. and Woods, K. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981. 78 : 3824.
22. Barsoum, I. S. , Gamil, F. M. , Al- Khafif, M. A. , Ramzy, R. M. , El Alamy, M. A. and Colley, D. G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982. 31 : 1181.
23. Becker, B. , Melhorn, H. , Andrews, P. , Thomas, H. and Eckert, J. *Zeitschrift für Parasitenkunde.* 1980. 63 : 113.
24. Butterworth, A. E. , Capron, M. , Cordingley, J. S. , Dalton, P. R. , Dunne, D. W. , Kariuki, H. C. , Kimani, G. , Koech, D. , Mugambi, M. , Ouma, J. H. , Prentice, M. A. , Richardson, B. A. , Arap Siongok, T. K. , Sturrock, R. F. and Taylor, D. W. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985. 79 : 393

25. Correa-Oliveira, R. , Pearce, E. J. , Oliveira, G. C. , Golgher, D. B. , Katz, N. , Batua, L. G. , Carvalho, O. S. , Gazzinelli, G. and Sher, A. 1990. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83 : 798.
26. Dunne, D. W. , Bickle, Q. D. , Butterworth, A. E. and Richardson, B. A. *Parasitology.* 1987. 94 : 269.
27. Auriault, C. , Gras-Masse, H. , Wolowczuk, I. , Pierce, R. J. , Balloul, J. M. , Neyrinck, J. L. , Drobecq, H. , Tartar, A. and Capron, A. J. *Immunol.* 1988. 141 : 1687.
28. Colley, D. G. , Barsoum, I. S. , Dahawi, H. S. S. , Hamil, F. , Habib, M. and Alamy, M. A. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986. 80 : 952.

DISCUSSION-CONCLUSION

Dès les débuts de la recherche sur l'Immunologie de la schistosomiase, l'un des principaux objectifs a été le développement d'un vaccin sûr et efficace, permettant d'améliorer durablement la santé des populations vivant sous les tropiques. La stratégie de mise au point de ce vaccin est basée sur les résultats d'études fondamentales de mécanismes propres au parasite et à l'hôte, en particulier la biochimie du premier et l'immunité du second.

Cependant, et en dépit de progrès considérables réalisés dans des domaines de recherche très spécialisés et aussi divers que la biologie moléculaire, la génétique et l'immunologie, l'élaboration d'un vaccin contre la schistosomiase (comme contre toute autre parasitose humaine) constitue encore un processus laborieux nécessitant de nombreux efforts.

Les raisons des difficultés rencontrées viennent de la nature même de cette parasitose. En effet, ainsi que nous l'avons évoqué dans l'**Introduction**, les schistosomes sont des organismes complexes, doués de facultés d'adaptation remarquables :

_ complexes, par leur cycle de vie qui nécessite l'intervention de plusieurs hôtes et un environnement écologique parfois difficile à apprécier et donc à contrôler. De plus, le développement et la maturation du parasite depuis le stade larvaire jusqu'aux stades adulte puis oeuf, expose le système immunitaire de l'hôte à de nombreux antigènes "de stade" qui, bien que partageant certains déterminants seront responsables de réponses immunes pouvant être très différentes.

Ainsi, la capacité d'induire une réponse immune ou la susceptibilité à cette réponse varie considérablement durant le cycle évolutif : le ver adulte constitue le stimulus majeur de l'immunité mais celle-ci, une fois établie, est active sur les formes larvaires d'une nouvelle infection.

Cet aspect dynamique de l'infection par *S. mansoni* rend plus difficile encore l'identification puis la caractérisation des mécanismes bénéfiques, ou au contraire néfastes, pour l'organisme hôte.

- la chronicité de l'infection par schistosomes est l'une des caractéristiques majeures des relations que le parasite entretient avec son hôte définitif. Les moyens biologiques originaux développés par les schistosomes pour s'adapter et survivre chez leur hôte immuno-compétent, rendent compte des particularités de l'immunologie parasitaire.

L'acquisition d'Ag d'hôte à la surface du parasite ou la libération de facteurs immuno-régulateurs (le SDIF, le SRP), expliquent en partie la survie du parasite et donc la persistance de l'infection. De plus, un même antigène parasitaire pourra être à l'origine de réponses effectrices protectrices ou au contraire de réponses bloquant la protection, selon l'isotype d'anticorps produit. Cela sera indispensable à prendre en compte dans l'analyse des propriétés vaccinales d'une molécule. La vaccination devra orienter, par le choix judicieux de protocoles d'administration et/ou l'utilisation d'adjuvant, la réponse immune vers la production d'anticorps d'isotypes protecteurs et non bloquants.

Les recherches menées chez l'animal (essentiellement le rat et la souris) ont permis l'identification de nombreux mécanismes effecteurs impliqués dans la résistance. Toutefois, il est bien souvent difficile d'évaluer l'importance relative d'un mécanisme donné dans la protection et il existe dans la littérature de nombreuses contradictions entre la démonstration de l'efficacité d'un mécanisme *in vitro* et sa pertinence *in vivo*.

Tout cela complique singulièrement les stratégies de recherche en vue d'une vaccination contre la schistosomiase.

La caractérisation puis la production par des méthodes de génie génétique ou de synthèse peptidique, d'antigènes ou de fragments antigéniques, permettant d'orienter sélectivement la réponse immune de l'hôte vers les mécanismes protecteurs, représente un avantage considérable.

Les travaux faisant l'objet de ce mémoire s'inscrivent dans cette démarche expérimentale visant à identifier, au niveau de la molécule Sm28 GST, par ailleurs démontrée comme étant protectrice dans différents modèles animaux, les sites épitopiques impliqués dans la protection, la régulation de la réponse immune ou la pathologie.

Les lymphocytes T occupent une place centrale dans l'immunité anti-parasitaire. Le développement d'une réponse cellulaire T est nécessaire non seulement dans le cas où la protection fait intervenir des mécanismes à médiation cellulaire, mais également dans le cas d'une protection impliquant des mécanismes dépendants d'anticorps. C'est pourquoi toute construction vaccinale synthétique devra contenir des déterminants déclenchant la production d'anticorps ainsi que des épitopes activant une réponse T.

1. Sélectionner les épitopes:

Pour cela, plusieurs techniques ont été décrites:

- La molécule antigénique peut être "découpée".

Dans le cas du virus de la mosaïque du tabac (Spitler, L. *et al.*, 1970) ou

de la myoglobine du cachalot (Atassi, M. Z. 1975), il a été démontré que les fragments naturels issus de ce "découpage" sont antigéniques. Cette méthode de fragmentation permet de localiser les épitopes protecteurs pour ensuite en déterminer la séquence (Van Regenmortel, M. H. V. 1985).

- De nombreuses méthodes prédictives ont été utilisées pour identifier, à partir de la séquence en acides aminés de la protéine, les sites antigéniques T et B potentiels.

La plupart des déterminants antigéniques reconnus par les cellules B sont conformationnels. Des critères tels que l'hydrophilie (Westhof, E. *et al.*, 1984), la mobilité (Tainer, J. A. *et al.*, 1984) ou la disponibilité à la surface de la molécule native, sont employés pour identifier les épitopes B potentiels. C'est ainsi qu'il a pu être montré que des peptides synthétiques dérivant des séquences de plusieurs protéines, peuvent induire la production d'Ac reconnaissant la protéine native (revue par Lerner, R. A. 1982; Sutcliffe, J. G. *et al.*, 1983)

Par ailleurs, le groupe de Berzofsky définit un site immuno-dominant T comme une structure α -hélicoïdale amphiphile (Berkower, I. *et al.*, 1986; Spouge, J. *et al.*, 1987) avec des résidus hydrophobes et hydrophiles repartis sur les faces opposées de l'hélice.

Rothbard *et al.* (1988) identifient une séquence consensus présente au niveau d'un grand nombre d'antigènes.

Il faut cependant remarquer que la définition des critères chimiques ou physico-chimiques caractérisant les épitopes T au sein d'une protéine reste encore très discutée. Récemment, les valeurs prédictives de différents algorithmes ont été déterminées pour 4 protéines parfaitement connues (Van Regenmortel, M. H. V. *et al.*, 1988). Aucune de ces méthodes n'a donné de prédiction totalement correcte de la localisation des épitopes T de ces protéines. Il y a de plus en plus d'exemples dans la littérature de

peptides "fonctionnels" ne répondant pas aux critères définis par tel ou tel modèle prédictif.

Dans le cas de la sélection des déterminants majeurs de Sm28GST, des critères de mobilité, accessibilité et hydrophilie, ont été employés. Là encore, ce ne sont pas des critères d'épitopes T "classiques".

Cette analyse est le fruit de la collaboration étroite qui existe entre notre laboratoire et le groupe que dirige le Professeur A. Tartar à l'Institut Pasteur. Sept peptides ont été sélectionnés et testés dans différents modèles expérimentaux.

Sans chercher à discuter à nouveau des résultats présentés dans ce mémoire, nous pouvons toutefois en faire la synthèse et tenter d'en analyser les informations principales qu'ils apportent, les questions qu'ils soulèvent ainsi que les perspectives qu'ils ouvrent.

2: Détermination des épitopes majeurs de Sm28 GST:

- Les lymphocytes T de souris (Article 1) ou de rat (Article 2) immunisés par la molécule recombinante Sm28 GST, reconnaissent majoritairement 3 peptides synthétiques correspondant aux acides aminés 24-43, 115-131 et 140-153.
- Ces mêmes peptides sont également "reconnus" par les LcT d'animaux immunisés par les extraits antigéniques de ver adulte, de schistosomule ou d'oeuf (Article 3).
- L'infection par *S. mansoni* conduit à la sélection de LcT capables de reconnaître ces peptides. Ceci a été vérifié dans différents modèles expérimentaux (le rat et la souris: Article 3, le babouin: Article 5) mais également chez l'homme (Article 5). L'analyse des réponses humaines démontre une reconnaissance importante de Sm28 GST associée dans la

majorité des cas à une spécificité épitopique dirigée vers la partie C-terminale de la molécule: le peptide 190-211.

Ces résultats amènent une première information essentielle qui est la conservation des déterminants entre la molécule native (présente au niveau du ver adulte, de la larve et de l'oeuf), la molécule recombinante et les peptides de synthèse.

Si l'on se place dans l'objectif d'une vaccination par Sm28GST, cela signifie que l'immunisation de sujets non infectés activera des LcT qui pourront être réactivés lors du contact avec le parasite. Si, par contre l'immunisation a lieu après infection (associée au Pzq, par exemple) elle réactivera des LcT éduqués lors de l'infection. Dans les 2 cas, l'injection de Sm28GST permettra le déclenchement d'une réponse de type secondaire accélérant l'apparition des réponses immunes protectrices ainsi que l'établissement d'une mémoire immunitaire.

3. Rôle fonctionnel des épitopes identifiés:

Nous l'avons vu, l'intérêt d'utiliser des peptides synthétiques dérivant d'un antigène potentiellement vaccinant, est de pouvoir orienter la réponse vers les mécanismes bénéfiques pour l'hôte.

Le peptide 190-211 et la pathologie.

Les résultats rapportés dans l'article 1, montrent que les LcT spécifiques de Sm 28GST participent à la fois à la réduction de la charge parasitaire et à la diminution de la pathologie. Cet effet de Sm28GST sur la ponte est évidemment du plus grand intérêt puisqu'il se traduira indirectement par une diminution de la morbidité et de la transmission de la maladie.

Des études réalisées dans notre laboratoire, montrent que des sérums spécifiques de Sm28GST réduisent la ponte de couples de *S. mansoni* maintenus *in vitro* (Boulanger, D. MS. soumis pour publication). D. Grezel montre la participation des IgA dans ce mécanisme (communication personnelle).

Plus récemment encore, l'utilisation d'un Ac monoclonal spécifique de Sm28GST et dirigé contre le site actif de la molécule, a montré très clairement la participation de l'activité GST de Sm28GST dans ces observations. En effet, l'inhibition de l'activité GST de la molécule par administration de cet Ac, conduit à une réduction très nette de la ponte, *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* (Xu, C. B., MS soumis pour publication). Des expériences sont actuellement en cours utilisant les peptides synthétiques pour identifier le site actif de Sm28GST. Les résultats préliminaires montrent que le peptide 190-211, représentant la partie C-terminale de la molécule, participerait à ce site (Xu, C. B., communication personnelle).

La connaissance du site actif de l'enzyme est très importante car l'on peut imaginer que des Ac anti-Sm28GST, spécifiques du 190-211 (d'isotype IgA?) pourraient être impliqués dans la réduction de la ponte.

Il serait intéressant de déterminer plus précisément la participation du peptide 190-211 dans ce mécanisme. L'on peut imaginer des protocoles expérimentaux favorisant la production d'Ac spécifiques de ce peptide, d'isotype particulier (IgA): si l'hypothèse est exacte, l'on doit s'attendre à une réduction de la pathologie chez ces animaux.

L'obtention de clones cellulaires murins T "helper", spécifiques du peptide 190-211, permettrait d'analyser le type de sécrétions de LK associées à une fonction donnée : en particulier les sécrétions d'IL-5 et IL-6 impliquées dans l'orientation vers une réponse IgA.

Enfin, nous avons vu que le peptide 190-211 est fortement reconnu par les PBMN des patients infectés (Article 5). Dans la plupart des cas, cette réponse est associée à la reconnaissance d'un ou plusieurs autres peptides. Toutefois, les 4 enfants (sur 62 examinés) présentant les réponses

anti-Sm28GST les plus fortes, supérieures à celle vis-à-vis de l'Ag d'oeuf, reconnaissent le peptide 190-211 à l'exclusion de tout autre peptide. Le petit nombre de sujets ainsi que le fait que nous ne connaissons pas le statut clinique de ces patients (notamment concernant la pathologie) ne permet aucune généralisation ni conclusion quant à cette observation. Toutefois, il serait peut-être intéressant de reprendre ce type d'analyse en regardant la corrélation : forte réponse (T et/ou B) anti-190-211 et statut clinique des sujets (nombre d'oeufs dans les selles, manifestations cliniques de la maladie par les mesures des tailles de la rate et du foie ou la détection de fibroses). Le suivi de ces patients après traitement par Pzq permettrait de savoir si ce type de réponse anti-Sm28GST très focalisée leur confère une immunité efficace à la réinfection.

Le peptide 24-43 et l'induction d'une réponse IgE anti-Sm28 GST.

Le transfert de LcT "helper" spécifiques du peptide 24-43 à des rats Fischer avant immunisation par la Sm28GST, conduit à une augmentation du taux d'IgE spécifiques de la molécule Sm28GST. Le peptide 24-43 est donc inducteur d'une réponse IgE, même s'il n'est pas lui-même cible des IgE anti-Sm28GST (Article 2).

Des expériences réalisées récemment et qui ne sont pas décrites dans ce mémoire, nous ont permis de sélectionner des lignées humaines spécifiques de Sm28GST sécrétant de l'IL-4 (impliquée dans une réponse de type IgE) après activation par le peptide 24-43. Ces cellules ont été clonées, l'analyse des clones (production de LK, détection des ARN messagers correspondant aux LK) sera réalisée et permettra de savoir s'il existe une corrélation entre une spécificité donnée (reconnaissance du 24-43) et une fonction donnée (rôle "helper" d'une réponse IgE).

Dans notre laboratoire, N. Ivanoff étudie dans le modèle du rat Fischer les protocoles expérimentaux (constructions synthétiques du peptide 24-43, voies et modes d'administration) permettant de favoriser l'induction d'une réponse IgE.

le peptide 115-131, cible des mécanismes de protection.

De par leur taille, les peptides de synthèse injectés seuls chez l'animal sont souvent pas ou peu immunogènes et nécessitent, pour le devenir, d'être greffés à une molécule porteuse.

L'analyse de l'antigénicité et de l'immunogénicité du peptide 115-131 a été réalisée dans notre laboratoire par M. Marguerite (MS. en préparation). Le peptide seul est faiblement immunogène, en particulier aucune réponse Ac n'est détectable par les techniques utilisées (Article 2) après immunisation par le peptide non couplé. Différentes constructions artificielles utilisant plusieurs copies du 115-131 (de 2 à 8) ont été synthétisées par M. Bossus, dans le laboratoire du Professeur A. Tartar. L'étude comparée de ces structures a montrée que la forme 8 copies (dénommée "Octopus") est la plus immunogène et la plus antigénique.

L'Article 4 décrit les résultats obtenus chez le rat, la souris et le babouin immunisés avec l'octopus 115-131. L'octopus est fortement immunogène dans 3 espèces animales et protège le rat Fischer d'une infection par *S. mansoni*.

Ces résultats signifient tout d'abord que la construction octopus de ce peptide permet le maintien de l'intégrité des déterminants T et B qu'il renferme. Ceci était important à vérifier car des expériences préalables (non décrites dans ce mémoire) que nous avons réalisées utilisant des associations du 115-131 à d'autres peptides nous avaient donné des résultats négatifs. En effet, ces premières constructions, bien qu'immunogènes et antigéniques avaient créé de nouveaux déterminants différents de ceux présents au niveau de la molécule Sm28 GST.

De plus, l'utilisation de l'octopus 115-131 nous a permis de démontrer la participation de ce peptide dans l'immunité protectrice dirigée contre le stade larvaire du parasite.

Il serait intéressant de regarder quelle est la participation de ce peptide dans la protection conférée par l'immunisation par Sm28 GST. Il faudrait pour cela tolérer des animaux (par des injections néo-natales de peptide),

supprimant ainsi leur réponse vis-à-vis de cet épitope et regarder ensuite le comportement des rats tolérés, immunisés par Sm28 GST, face à l'infection par *S. mansoni*.

En conclusion, ces travaux laissent envisager comme possible l'utilisation de ces constructions synthétiques fortement immunogènes sur lesquelles seraient branchés des épitopes "cibles" (115-131), "inducteurs" (24-43) ou encore impliqués dans la modulation de la pathologie (190-211).

L'utilisation des peptides synthétiques dans différents modèles d'infections virale, bactérienne ou parasitaire a apporté des résultats très prometteurs. Dans le cas de la protéine du circumsporozoïte (CSP) du parasite *Plasmodium falciparum*, les épitopes T et B majeurs de la protéine ont été déterminés. Cependant, les essais de vaccination ont montré une reconnaissance des peptides restreinte à un seul antigène de classe II du CMH (I-A^b). Cet exemple illustre les limites de l'utilisation des peptides et la nécessité de réaliser des constructions permettant à la fois de favoriser les réponses bénéfiques pour l'organisme hôte tout en conservant la possibilité d'être reconnu par le plus grand nombre d'individus dans les populations humaines de constitution génétique très large. Des études utilisant des lignées murines d'haplotypes différents trouvent ici tout leur intérêt, puisqu'elle permettront de tester l'immunogénicité et l'antigénicité des préparations synthétiques à la fois chez des individus bons et mauvais répondeurs.

Malgré le développement considérable des techniques de biologie moléculaire (permettant l'identification puis le clonage et l'expression de nombreuses molécules protectrices), de même que

l'apparition d'outils très performants permettant d'identifier les cellules et de caractériser leur fonction (marquage phénotypique des sous-populations lymphocytaires, dosage des lymphokines), ou les techniques chimiques donnant de nombreuses informations sur la structure tri-dimensionnelle des protéines ou des peptides dérivés, il reste que la compréhension des mécanismes immunitaires développés lors de l'infection par *Schistosoma mansoni*, la manière dont il s'en protège ainsi que la façon d'orienter sélectivement la réponse vers les mécanismes protecteurs, nécessitent encore de nombreuses recherches dans tous les domaines de la Biologie et notamment de l'Immunologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Salem, E., Ishaac, S. and Mahmoud, A. A. F. 1979. Histocompatibility - linked susceptibility for hepatosplenomegaly in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 123. 1829.
- Abdel-Salem, E., Higashi, G. I., Kamal, K. A. and Ishaac, S. 1981. Cell- mediated immune assay in children with *Schistosoma haematobium* infection and the effect of niridazole therapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75. 207.
- Abe, T., Forbes, J. T. and Colley, D. G. 1983. Natural killer cell activity during murine schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* 69. 1001.
- Ackert, J. E. 1942. Natural resistance to helminthic infections. *J. Parasitol.* 28. 1.
- Anderson, R. M. and Medley, G. F. 1985. Community control of helminth infections of man by mass and selective chemotherapy. *Parasitology.* 90. 629.
- Anderson, R. M. and May, R. M. 1985^a. Helminth infections of humans : mathematical models, population dynamics and control. *Adv. Parasitol.* 24. 1.
- Anderson, R. M. and May, R. M. 1985^b. Herd immunity to helminth infection : implications for parasite control. *Nature(London)*. 315. 493.
- Anwar, A. R. E., and Kay, A. B. 1977. Membrane receptors for IgG and complement (C4, C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia. *J. Immunol.* 119. 976.
- Anwar, A. R. E. Smithers, S. R. and Kay, A. B. 1979. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leukocytes *in vitro* : requirement for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.* 122. 628.
- Atassi, M. Z. 1975. Antigenic structure of myoglobin : the complete immunological anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins. *Immunochem.* 12. 423.
- Attalah, A. M., Lewis, F. A., Urritia- haw, A., Folks, T. and Yeatman, T. J. 1980. Natural killer cells (NK) and Antibody - Dependent Cell- mediated Cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 13. 351.
- Auriault, C., Joseph, M., Dessaint, J. P. and Capron, A. 1980. Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosoma* larvae protease. *Immun. Lett.* 2. 135.
- Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J. P. and Capron, A. 1981. Interaction between macrophages and *S. mansoni* schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β - glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62. 15.
- Auriault, C., Capron, M., Cesari, I. M. and Capron, A. 1983. Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by *S. mansoni* : role of proteases. *J. Immunol.* 131 : 464.

- Auriault, C., Dessaint, J. P., Mazingue, C., Loyens, A. and Capron, A. 1984^a. Non-specific potentiation of T and B lymphocyte proliferation at the early stage of infection by *Schistosoma mansoni* : role of factors secreted by the larvae. *Parasite Immunol.* 6. 119.
- Auriault, C., Damonville, M., Verwaerde, C., Pierce, R. J., Joseph, M., Capron, M. and Capron, A. 1984^b. Rat IgE directed against schistosomula-released products is cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomula *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14. 132.
- Auriault, C., Balloul, J. M., Pierce, R. J., Damonville, M., Sondermeyer, P. and Capron, A. 1987. Helper T cells induced by a purified 28- kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. *Infect. Immun.* 55. 1163.
- Balloul, J. M., Pierce, R. J., Grzych, J. M. and Capron, A. 1985. *In vitro* synthesis of a 28- kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17. 105.
- Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature(London)*. 326. 149.
- Barsoum, I. S., Freeman, G. L. Jr., Habib, M., El Alamy, M. A., Rocha, R. S., Katz, N., Gazzinelli, G. and Colley, D. G. 1984. Evaluation of natural killer activity in human schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33. 451.
- Bazin, H., Capron, A., Capron, M., Joseph, M., Dessaint, J. P. and Pauwels, R. 1980. Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies on immunity to schistosomes (*Schistosoma mansoni*) in the rat. *J. Immunol.* 124. 2373.
- Benacerraf, B. and McDevitt, H. O. 1972. The histocompatibility - linked immune response genes. *Science*. 175.
- Berkower, I., Buckenmeyer, G. and Berzofsky, J. 1986. Molecular mapping of a histocompatibility restricted immunodominant T cell epitope with synthetic and natural peptides : Implication for T cell antigenicity. *J. Immunol.* 136. 2498.
- Bickle, Q. D., Long, E., James, S. and Doenhoff, M. 1980. *Schistosoma mansoni* : influence of the mouse host' s sex, age and strain on resistance to reinfection. *Exp. Parasitol.* 50. 222.
- Bickle, Q. D., Andrews, B. J., Doenhoff, M. J., Ford, M. J. and Taylor, M. G. 1985. Resistance against *Schistosoma mansoni* induced by highly irradiated infections : studies on species specificity of immunization and attempts to transfer resistance. *Parasitology.* 90. 301.
- Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, B., Bouthillier, Y. and Decreusefond, C. 1972. Cytodynamics of the immune response in two lines of mice selected for "high" and "low" antibody synthesis. *J. Exp. Med.* 135. 1071.
- Biozzi, G., Mouton, D., Siqueira, M. and Stiffel, C. 1985. Effect of genetic modification of immune responsiveness on anti-infection and anti-tumor resistance. *Progress in Leukocyte Biology.* 3. 3.

- Blum, K. and Cioli, D. 1978. Paradoxical behaviour of Biozzi high and low responder mice upon infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 8. 52.
- Boltz- Nitulescu, G. and Spiegelberg, H. L. 1981. Receptors specific for IgE on rat alveolar and peritoneal macrophages. *Cell. Immunol.* 59. 106.
- Boros, D. L. and Warren, K. S. 1970. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132. 488.
- Bottomly, K. 1988. A functional dichotomy in CD4 T lymphocytes. *Immunol. Today.* 9. 268.
- Bout, D., Joseph, M., David, J. R. and Capron, A. 1981. *In vitro* killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *J. Immunol.* 127. 1.
- Bout, D., Joseph, M., Pontet, M., Vorng, H., Deslée, D. and Capron, A. 1986. Rat resistance to schistosomiasis : platelet - mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science.* 231. 153.
- Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, C. and Rees, P. H. 1974. Antibody - dependent cell- mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature (London)*. 252. 503.
- Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Houba, C. and Rees, P. M. 1975. Eosinophils as mediators of antibody - dependent damage to schistosomula. *Nature (London)*. 256. 727.
- Butterworth, A. E., Sturrock, R.F., Houba, C. and Taylor, R. 1976^a. *Schistosoma mansoni* in baboons: Antibody - dependent cell - mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.* 25. 95.
- Butterworth, A. E., Coombs, R. R. A., Gurner, B W. and Wilson, A. B. 1976^b. Receptors for antibody- opsonic adherence on the eosinophils of guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 51. 368.
- Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Martz, E. and Sher, A. 1979^a. Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *J. Immunol.* 122. 1314.
- Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Wassom, D. L., Dessein, A., Hogan, M., Sherry, B., Gleich, G. J. and David, J. R. 1979^b. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. ii. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.* 150. 1456.
- Butterworth, A. E., Taylor, D. W., Veith, M. C., Vadas, M. A., Dessein, A., Sturrock, R. F. and Wells, E. 1982. Studies on the mechanisms of immunity in human schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 61. 5.
- Butterworth, A. E., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Mugambi, M., Ouma, J. H., Richardson, B. A., Arap Siongok, T. K. and Sturrock, R. F. 1984. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. i. Study design, pretreatment observations and results of treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78. 108.

- Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Prentice, M. A., Richardson, B. A., Arap Siogok, T. K., Sturrock, R. F. and Taylor, D. W. 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. ii. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79. 393.
- Butterworth, A. E., Bensted-Smith, R., Capron, A., Capron, M., Dalton, P.R., Dunne, D. W., Grzych, J. M., Kariuki, H. C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Arap Siogok, T. K. and Sturrock, R. F. 1987. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology.* 94. 269.
- Byram, J. E. and von Lichtenberg, F. 1977. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26. 944.
- Cantor, H. and Boyse, E. A. 1975. Functional subclasses of T- lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T- cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J. Exp. Med.* 141. 1376.
- Capron, A., Deblock, S., Biguet, J., Clay, A., Adenis, L., and Vernes, A. 1965. Contribution à l'étude expérimentale de la bilharziose à *Schistosoma haematobium*. *Bull. OMS.* 32. 755.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. and Bazin, H. 1975^a. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophage to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature(London)*. 253. 474.
- Capron, A., Bazin, H., Dessaint, J. P. and Capron, M. 1975^b. Rôle des anticorps IgE spécifiques dans l'adhérence immune de macrophages normaux aux schistosomules de *Schistosoma mansoni*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. D.* 280. 927.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Joseph, M., Rousseaux, R., Capron, M. and Bazin, H. 1977. Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat : a new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.* 7. 315.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M. and Pestel, J. 1980^a. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29. 849.
- Capron, A., Capron, M. and Dessaint, J. P. 1980^b. ADCC as primary mechanisms of defence against metazoan parasites. In "Immunology 80. Progress in Immunology", Vol 4. Fougereau, M. and Dousset, J. Eds. Academic press, New-York. 782.
- Capron, A., and Dessaint, J. P. 1987^a. Immunology of schistosomiasis. Trematodes and cestodes. Soulsby, E. J. L. Eds. CRC Press 2. 1.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Ouma, J. H. and A. E. Butterworth. 1987^b. Immunity to schistosomes : progress toward vaccine. *Science.* 23. 1065.

- Capron, M., Camus, D., Carlier, Y., Figueiredo, J. F. M. and Capron, A. 1977. Immunological studies in human schistosomiasis. ii. Antibodies cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26. 248.
- Capron, M., Capron, A., Torpier, G., Bazin, H., Bout, D. and Joseph, M. 1978. Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8. 127.
- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A. 1981^a. Evidence for IgE- dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* 126. 1764.
- Capron, M., Capron, A., Goetzl, E. J. and Austen, K. F. 1981^b. Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF- A) enhance eosinophil Fc receptor. *Nature(London)*. 289. 71.
- Capron, M., Capron, A., Dessaint, J. P., Torpier, G., Johansson, S. G. O. and Prin, L. 1981^c. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126. 2087.
- Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S. K., Bazin, H., Joseph, M. and Phillips, S. M. 1983. Immunological response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. *J. Immunol.* 131. 1475.
- Capron, M., Benveniste, J., Braquet, P. and Capron, A. 1988. Role of PAF- Acether in IgE- dependent activation of eosinophils. *New Trends in Lipid Mediators Research.* 2. 10.
- Cheever, A. W., Dewitt, W. B. and Warren, K. S. 1965. Repeated infection and treatment of mice with *Schistosoma mansoni* : functional, anatomic and immunologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14. 239.
- Cheever, A. W. 1968. A quantitative *post-mortem* study of schistosomiasis mansoni in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17. 38.
- Cheever, A. W., Byram, J. E., Hieny, S., von Lichtenberg, F., Lunde, M. N and Sher, A. 1985. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* infection in B- cell depleted mice. *Parasit. Immunol.* 7. 399.
- Chernin, E. and Dunavan, C. A. 1962. The influence of host parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* II. 455.
- Coffman, R. L. and Carty, J. 1986. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- gamma. *J. Immunol.* 136. 949.
- Colley, D. G., Cook, J. A., Freeman, G. L. Jr., Bartholomew, R. K. and Jordan, P. 1977. Immune responses during schistosomiasis mansoni. ii. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterogenous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int. Arch. of Allergy and Applied Immunol.* 53. 420.
- Colley, D. G. and James, S. L. 1979. Participation of eosinophils in immunological systems. In "Cellular and Clinical Aspects of Allergic Disorders". (Gupta, S. and Good, R. A. eds.). Ch 2, p. 55-86. Plenum Press, New-York.

- Colley, D. G., Barsoum, I. S., Dahawi, H. S. S., Gamil, F., Habib, M. and El Alamy, M. A. 1986. Immune responses and immunoregulation in relation to human schistosomiasis in Egypt. iii. Immunity and longitudinal studies of *in vitro* responsiveness after treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**. 952.
- Correa- Oliveira, R., Pearce, E. J., Oliveira, G. C., Golgher, D. B., Katz, N., Bahia, L. G., Carvalho, O. S., Gazzinelli, G. and Sher, A. 1990. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni* : I. Elevated antibody levels to paramyosin in endemic/ stool negative individuals. *Trans. R. Soc. Prop. Med. Hyg.* **83**. 798.
- Cottrell, B., Pye, C. and Butterworth, A. E. 1989. Cytotoxic effects *in vitro* of human monocytes and macrophages on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.* **11**. 91.
- Cousin, C. E., Stirewalt, M. A. and Dorsey, C. H. 1981. *Schistosoma mansoni* : Ultrastructure of early transformation of skin - and shear - pressure derived schistosomules. *Exp. Parasitol.* **51**. 341.
- Crombie, J. A. and Anderson, R. M. 1985. Population dynamics of *Schistosoma mansoni* in mice repeatedly exposed to infection. *Nature(London)*. **315**. 491.
- Crowle, A. J. and Hu, C. C. 1966. Split tolerance affecting delayed hypersensitivity and induced in mice by preimmunization with protein antigens in solution. *Clin. Exp. Immunol.* **1**. 323.
- Damonville, M., Auriault, C., Verwaerde, C., Delanoye, A., Pierce, R. J. and Capron, A. 1986^a. 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.
- Damonville, M., Auriault, C., Thorel, T., Verwaerde, C., Pierce, A., Strecker, G. and Capron, A. 1986^b. Induction of protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum- released products : immunochemical properties of the target antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **79**. 320.
- Damonville, M., Velge, F., Verwaerde, C., Pestel, J., Auriault, C. and Capron, A. 1987. Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula- released products (SRP- A). *Clin. Exp. Immunol.* **69**. 299.
- Damonville, M., Wietzerbin, J., Pancré, V., Joseph, M., Delanoye, A., Capron, A., and Auriault, C. 1988. Recombinant tumor necrosis factor mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J. Immunol.* **140**. 3962.
- David, J. R., Vadas, M. A., Butterworth, A. E., de Brito, P. A., Carvalho, E. M., David, R. A., Bina, J. C. and Andrade, Z. A. 1980. Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* **303**. 1147.
- Dean, D. A., Bukowski, M. A. and Cheever, A. W. 1981. Relationship between acquired resistance, portal hypertension, and lung granulomas in ten strains of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**. 806.

- Dean, D. A. 1983. *Schistosoma* and related genera acquired resistance in mice. *Exp. Parasitol.* 55. 1.
- Dessaint, J. P., Camus, D., Fischer, E. and Capron, A. 1977. Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 7. 624.
- Dessaint, J. P., Torpier, G., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. 1979. Cytophilic binding of IgE to the macrophage. I. Binding characteristics of IgE on the surface of macrophages in the rat. *Cell. Immunol.* 46. 12.
- Dessein, A., Samuelson, J. C., Butterworth, A. E., Hogan, M., Sherky, B. A., Vadas, M. A. and David, J. R. 1981. Immune evasion by *Schistosoma mansoni*: loss of susceptibility to antibody or complement - dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules. *Parasitology.* 82. 357.
- Dessein, A., Begley, M., Demeure, C., Caillol, D., Fueri, J., dos Reis, M. G., Andrade, Z. A., Prata, A. and Bina, J. C. 1988. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37 kDa larval surface antigen. *J. Immunol.* 140. 2727.
- Dissous, C., Dissous, C. and Capron, A. 1981. Isolation and characterisation of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3. 215.
- Dissous, C., Grzych, J. M., and Capron, A. 1985. Biochemical studies on the 30-40 kDa *Schistosoma mansoni* surface antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16. 277.
- Dissous, C., Balloul, J. M., Pierce, R. J. and Capron, A. 1987. Protective antigens of schistosomes. *Baillieres's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases.* 2.
- Doughty, B. L. and Phillips, S. M. 1982. Delayed hypersensitivity and granuloma formation and modulation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. II. Regulatory T- cell subsets. *J. Immunol.* 128. 37.
- Doumenge, J. P., Mott, K. E., Cheung, C., Villenave, D., Chapuis, O., Perrin, M. F. and Reaud-Thomas, G. 1987. Atlas de la répartition mondiale des Schistosomiases. C.N.R.S.
- Dunne, D. W. and Bickle, Q. D. 1987^a. Identification and characterization of a polysaccharide containing antigen from *Schistosoma mansoni* eggs which cross-react with the surface of schistosomula. *Parasitology.* 94. 255.
- Dunne, D. W. Bickle, Q. D., Butterworth, A. E. and Richardson, B. A. 1987^b. The blocking of human antibody- dependent, eosinophil- mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by monoclonal antibodies which cross-react with a polysaccharide containing egg antigen. *Parasitology.* 94. 269.
- Ellner, J. J. and Mahmoud, A. A. F. 1979. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by normal human monocytes. *J. Immunol.* 123. 949.
- Ellner, J. J., Olds, G. R., Lee, C. W., Kleinhenz, M. E. and Edmonds, K. L. 1982. Destruction of the multicellular parasite *Schistosoma mansoni* by T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 70. 369.

- Evengard, B., Hammarström, L., Smith, C. I. E., Johansson, S. G. O. and Linder, E. 1988. Subclass distribution and IgE responses after treatment in human schistosomiasis. *Clin. Exp. Immunol.* 73. 383.
- Faeron, D. T. 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of human erythrocytes, polynuclear leucocyte, B lymphocyte and monocyte. *J. Exp. Med.* 152. 20.
- Fanning, M. M., Peters, P. A., Davis, R. S., Kazura, J. W. and Mahmoud, A. A. F. 1981. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni* : relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. *J. Infect. Dis.* 144. 148.
- Fanning, M. M. and Kazura, J. W. 1984. Genetic - linked variation in susceptibility of mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.* 6. 95.
- Fanning, M. M., and Kazura, J. W. 1985. Further studies on genetic variation of hepatosplenic disease and modulation in murine schistosomiasis mansoni. *Parasit. Immunol.* 7. 213.
- Faust, E. C., Jones, C. A. and Hoffman, W. A. 1934. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 2. The mammalian phase of the life-cycle. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine.* 10. 133.
- Fernandez- Botran, R., Sanders, V. M., Mosmann, T. R. and Vitetta, E. S. 1988. Lymphokine- mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168. 543.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170. 2081.
- Fischer, A. C. 1934. A study of schistosomiasis in the Stanleyville district of the Belgian Congo. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 28. 277.
- Fletcher, M., Loverde, P. T. and Woodruff, D. S. 1981. Genetic variation in *Schistosoma mansoni* : Enzyme polymorphisms in populations from Africa, Southwest Asia, South America and the West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30. 406.
- Gajewski, T. F. and Fitch, F. W. 1988. Anti- proliferative effect of IFN- gamma in immune regulation. I. IFN- gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140. 4245.
- Gallatin, W., St John, T. P., Siegelman, M., Reichart, R., Butcher, E. C. and Weissman, I. L. 1986. Lymphocyte homing receptors. *Cell.* 44. 673.
- Gentilini, M. and Duflo, B. 1982. Médecine tropicale, Eds Flammarion Médecine Sciences.
- Gerber, J. H. 1952. Bilharzioses in Boajibu. *J. Trop. Med. Hyg.* 55. 52.
- Gowen, J. W. 1960. Genetic effects in non - specific resistance to infectious diseases. *Bacteriol. Rev.* 24. 192.
- Grimaud, J. A. 1990. VII Congrès International de Parasitologie. Paris, Août 1990.

- Grossman, A. I., Cain, G. D. and Liang, S. Y. 1980. Karyotype and karyosystematics of *Schistosoma mekongi*. In : " The mekong Schistosoma ". (Bruce, J. I., Sornmani, S., Asch, H. L. and Crawford, K. A., eds.). *Malacological Review*. Suppl. 2, 105.
- Grossman, A. I., Short, R. B. and Kuntz, R. E., 1981. Somatic chromosomes of *Schistosoma rodhaini*, *Schistosoma mattheei* and *Schistosoma intercalatum*. *J. parasitol.* 67. 41.
- Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129. 2739.
- Grzych, J. M., Capron, M., Dissous, C. and Capron, A. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133. 998.
- Grzych, J. M., Capron, M., Lambert, P. H., Dissous, C., Torrès, S. and Capron, A. 1985. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature (London)*. 316. 69.
- Grzych, J. M., Dissous, C., Capron, M., Torrès, S., Lambert, P. H. and Capron, A. 1987. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* 165. 865.
- Haas, W. and Schmidt, R. 1982. Characterisation of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. I. Effective substances, host specificity. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 66. 293.
- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. and Greenwood, B. M. 1985. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasit. Immunol.* 7. 625.
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L. and Locksley, R. M. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T- cell subsets. *J. Exp. Med.* 169. 59.
- Himmi, E. H., Auriault, C., Pierce, R. J., Joseph, M., Tartar, A. and Capron, A. 1985. Regulatory role of a peptide from the second constant domain of immunoglobulin G. II. *In vitro* effect on granuloma formation around *S. mansoni* eggs. *Int. J. Immunopharmacol.* 7. 231.
- Horowitz, J. B. Kaye, J., Conrad, P. J., Katz, M. E. and Janeway, C. A. Jr. 1986. Autocrine growth inhibition of a cloned line of helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83. 1886.
- Iida, K. and Nussenzweig, V. 1981. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J. Exp. Med.* 153. 1138.
- James, S. L. and Colley, D. G. 1978. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. III. Lymphokine involvement in the induction of eosinophil functional abilities. *Cell. Immunol.* 38. 48.

- James, S. L., Labine, M. and Sher, A. 1981. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. I. Analysis of antibody and T- lymphocyte responses in mouse strains developing different levels of immunity. *Cell. Immunol.* 65. 75.
- James, S. L., Lazdin, J. K., Meltzer, M. S. and Sher, A. 1982. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis: I. Activation of peritoneal macrophages during natural infection. *Cell. Immunol.* 67. 255.
- James, S. L. and Sher, A. 1983. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. III. Identification of a mouse strain; P/N, that fails to respond to vaccination. *Parasit. Immunol.* 5. 567.
- James, S. L. 1984^a. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine is dependent upon the method of antigen presentation. *J. Immunol.* 134. 1956.
- James, S. L. Natovitz, P. C., Farrar, W. L. and Leonard, E. J. 1984^b. Macrophages as effector cells of protective immunity in murine schistosomiasis: macrophage activation in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae. *Infect. Immun.* 44. 569.
- James, S. L. and Cheever, A. W. 1985. Comparison of immune responses between high and low responder mice in the concomitant immunity and vaccine models of resistance to *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 91. 301.
- James, S. L. 1985. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated macrophages. *J. Immunol.* 136. 3872.
- James, S. L. 1986. Activated macrophages as effector cells of protective immunity to schistosomiasis. *Immunol. Res.* 5. 139.
- James, S. L. and Sher, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Eds. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 155. 21.
- Janeway, C. A. Jr., Murgita, R. A., Weinbaum, F. I., Asofsky, R. and Wigzell, H. 1977. Evidence for an immunoglobulin -dependent antigen-specific helper T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74. 4582.
- Janeway, C. A. Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Kaizawa, K., West, J. and Bottomly, K. 1988. CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* 101. 39.
- Jordan, P. 1972. Epidemiology and control of schistosomiasis. *Br. Med. Bull.* 28. 55.
- Joseph, M., Capron, A., Butterworth, A. E., Sturrock, R. F. and Houba, V. 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro* : induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 33. 48.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. and Viens, P. 1983. A role for platelet in IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature (London).* 303. 810.

- Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J. C., Capron, M., Vorng, H., Pancré, V., Kusnierz, J. P. and Auriault, C. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16. 306.
- Kagan, I. G. 1958. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice Inst. Pamph.* 45. 151.
- Kassis, A., I. Aikawa, M. and Mahmoud, A. A. F. 1979. Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 122. 398.
- Katz, N. and Brener, Z. 1966. Evolução clinica de 112 casos de esquistossomose mansoni observados apos 10 anos de permanência em focos endemicos de Minas Gerais. *Revista de Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 8. 139.
- Kee, K. C., Taylor, D. W., Cordingley, J. S., Butterworth, A. E. and Munro, A. J. 1986. Genetic influence on the antibody response to antigens of *Schistosoma mansoni* in chronically infected mice. *Parasit. Immunol.* 8. 565.
- Kelly, E. A. B. and Colley, D. G. 1988. *In vivo* effects of monoclonal anti-L3T4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Reduction of irradiated cercariae induced resistance. *J. Immunol.* 140. 2737.
- Kelso, A. and Glasebrook, A. L. 1984. Secretion of interleukin-2, macrophage activating factor, interferon and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocytes clones. *J. Immunol.* 132. 2924.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. W. and Ouma, J. H. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni : regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164. 1626.
- Kloetzel, K. 1964. Natural history and prognosis of splenomegaly in schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13. 541.
- Knight, M., Simpson, A.J.G., Payares, G., Chaudri, M. and Smithers, S. R. 1984. Cell free synthesis of *Schistosoma mansoni* surface antigens : stage specificity of their expression. *EMBO J.* 3. 213.
- Kunkel, S. L., Chensue, S. W., Mouton, C. and Higashi, G. I. 1984. Role of lipoxigenase products in murine pulmonary granuloma formation. *J. Clin. Invest.* 74. 514.
- Kusel, J. R. 1970. Studies on the structure and hatching of the eggs of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 60. 79.
- Landsperger, W. J., Stirewalt, M. A. and Dresden, M. H. 1982. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* 201. 137.
- Lanar, D. E., Pearce, E. J., James, S. L. and Sher, A. 1986. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science.* 234. 593.

- Lawson, J. R. and Wilson, R. A. 1980. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilisation. *Parasitology*. 81. 337.
- Lerner, R. A. 1982. *Nature (London)*. 299. 592.
- Loker, E. S. 1983. A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*. 87. 343.
- Machado, A. J., Gazzinelli, G., Pellegrino, J. and Dias Da Silva, W. 1975. *Schistosoma mansoni* : The role of the complement C3 activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp. Parasitol.* 38. 20.
- Maddison, S. E., Norman, L., Geiger, S. J. and Kagan, I. G. 1970. *Schistosoma mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed, and antigen sensitized animals. *J. Parasitol.* 56. 1058.
- Mahmoud, A. A. F., Peters, P. A. S., Civil, R. H. and Remington, J. S. 1979. *In vitro* killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by BCG and *C. parvum*-activated macrophages. *J. Immunol.* 122. 1655.
- Martinez, A. C., Pereira, P., Toribio, M. L., Marcos, M. A. R., Bandeira, A., De la Hera, A., Marquez, C., Cazenave, P. A. and Coutinho, A. 1988. The participation of B cells and antibodies in the selection and maintenance of T cell repertoires. *Immunol. Rev.* 101. 191.
- Mathew, R. C. and Boros, D. L. 1986. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. III. Recruitment of antigen-specific I-J+ T suppressor cells of the granulomatous response by an I-J+ soluble suppressor factor. *J. Immunol.* 136. 1093.
- Mc Kean, J. R. and Answar, A. R. E. 1981. *Schistosoma mansoni* : complement and antibody damage mediated by eosinophils and neutrophils, in killing schistosomula *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 51. 307.
- Mc Kenzie, C. D., Ramalho- Pinto, F. J., Mc Laren, D. J. and Smithers, S. R. 1977. Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *Schistosoma mansoni in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 30. 97.
- Mc Laren, D. J., Ramalho- Pinto, F. J. and Smithers, S. R. 1978. Ultrastructural evidence for complement and antibody - dependent damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophil *in vitro*. *Parasitology*. 77. 313.
- Mc Laren, D. J., 1980. *Schistosoma mansoni* : the parasite surface in relation to host immunity. John Wiley, Chichester.
- Mc Laren, D. J., Mc Kean, J. R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A. B. 1981. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasit. Immunol.* 3. 359.
- Mc Laren, D. J., Peterson, C. G. B. and Venge, P. 1984^a. *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins *in vitro*. *Parasitology*. 88. 491.

- Mc Laren, D. J. 1984^b. Disguise as an evasive stratagem of parasitic organisms. *Parasitology*. 88. 597.
- Mc Laren, D. J. and James, S. L. 1985. Ultrastructural studies of the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by activated macrophages *in vitro*. *Parasit. Immunol.* 7. 315.
- Mc Laren, D. J., Strath, M. and Smithers, S. R. 1987. *Schistosoma mansoni*: evidence that immunity in vaccinated and chronically infected CBA/Ca mice is sensitive to treatment with a monoclonal antibody that depletes cutaneous effector cells. *Parasit. Immunol.* 9. 667.
- Mc Laren, D. J. and Smithers, S. R. Ramalho- Pinto, F. J. 1987. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophil *in vitro*. *J. Exp. Med.* 147. 147.
- Medley, G. and Anderson, R. N. 1985. Density dependent fecundity in *Schistosoma mansoni* infections in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79. 532.
- Melchers, F. and Anderson, J. 1986. Factors controlling the B-cell cycle. *Ann. Rev. Immunol.* 4. 13.
- Mendès, E. and Mendès, N. F. 1982. High levels of IgE in patients with schistosomiasis mansoni. Quantitation of total and specific IgE and IgG. *Trop. Geogr. Med.* 34. 133.
- Miller, K. J., Kennedy, E. P. and Reinhold, V. N. 1986. Osmotic adaptation by gram negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharids. *Science*. 231. 48.
- Mitchell, G. F. and Miller, J. F. A. P. 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice give bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128. 821.
- Mitchell, G. F. 1989. Glutathione-S-transferases. Potential components of anti-schistosome vaccine? *Parasitol. Today*. 5. 34.
- Moloney, N. A. and Webbe, G. 1987. The induction of species specific immunity against *Schistosoma japonicum* by exposure of rats to ultra-violet-attenuated cercariae. *Parasitology*. 94. 49.
- Mond, J. M., Finkelman, F. D., Sarma, C., Ohara, J. and Serrate, S. 1985. Recombinant interferon gamma inhibits the B-cell proliferative response stimulated by soluble but not by sepharose-bound anti-immunoglobulin antibody. *J. Immunol.* 135. 2513.
- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. and Mosmann, T. R. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 248. 1230.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136. 2348.
- Murray, P. D., Swain, S. L. and Kagnoff, M. F. 1985. Regulation of the IgM and IgA antidextran B1355 response : synergy between gamma interferon, BCGF II and interleukin- 2. *J. Immunol.* 135. 4015.

- Murray, P. D., Mc Kenzie, D. T., Swain, S. L. and Kagnoff, M. F. 1987. IL-5 and IL-4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance IgA expression. *J. Immunol.* 138. 2669.
- Nadler, S. A. 1987. Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitol. Today.* 3. 126.
- Nogueira-Machado, J. A., Gontijo, C. M., Gazzinelli, G. and Katz, N. 1983. *Schistosoma mansoni* : inhibition *in vitro* of granulocyte cytotoxicity against schistosomula by autologous mononuclear cells from patients. *Exp. Parasitol.* 56. 180.
- Nojima, H. and Sato, A. 1982. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. *Exp. Parasitol.* 53. 189.
- Norden, A. P. and Strand, M. 1984. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*: identification of genus-, species- and gender- specific antigenic worm glycoproteins. *Exp. Parasitol.* 57. 110.
- O' Garra, A., Stapleton, G., Dhar, V., Pearce, M., Schumacher, J., Hugo, H., Barbis, D., Stall, A., Cupp, J. and Moore, K. 1990. Production of cytokines by mouse B cells : B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.* 2. 821.
- Olds, G. R. and Mahmoud, A. A. F. 1980. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni: eosinophil-mediated destruction of eggs. *J. Clin. Invest.* 66. 1191.
- Olds, G. R., Ellner, J. J., EL Kholy, A. and Mahmoud, A. A. F. 1981. Monocyte - mediated killing of schistosomule of *Schistosoma mansoni*:alterations in human schistosomiasis mansoni and tuberculosis. *J. Immunol.* 127. 1538.
- Ottesen, E. A., Stanley, A. M., Gelfand, J. A. Gadek, J. E., Frank, M. M., Nash, T. E. and Cheever, A. W. 1977. Immunoglobulin and complement receptors on human eosinophils and their role in cellular adherence to schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26. 134.
- Ottesen, E. A., Hiatt, R. A., Cheever, A. W., Sotomayor, Z. R. and Neva, F. A. 1978. The acquisition and loss of antigenic - specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. *Clin. Exp. Immunol.* 33. 38.
- Ouaissi, A., Santoro, F. and Capron, A. 1980. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system : receptors for C3b on cercariae and schistosómula. *Immunol. Lett.* 1. 197.
- Ouaissi, A., Auriault, C., Santoro, F. and Capron, A. 1981. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system : role of IgG peptides in the activation of the classical pathway by schistosomula. *J. Immunol.* 127. 1555.
- Ottesen, E. A. and Poindexter, R. W. 1980. Modulation of the host response in human schistosomiasis. ii. Humoral factors which inhibit proliferative responses to parasite antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29. 592.
- Pancré, V., Joseph, M., Mazingue, C., Wietzerbin, J., Capron, A. and Auriault, C. 1987. Induction of platelet cytotoxicity functions by lymphokines: role of Interferon gamma. *J. Immunol.* 138. 4490.

- Pancré, V., Joseph, M., Capron, A., Wietzerbin, J., Kusnierz, J. P., Vorng, H. and Auriault, C. 1988. Recombinant human interferon gamma induces increased IgE receptor expression on human platelets. *Eur. J. Immunol.* 18. 829.
- Pancré, V., Schellekens, H., Van der Meide, F., Vorng, H., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. 1989. Biological effect of gamma interferon during the course of experimental infection of rat by *Schistosoma mansoni*. *Cell. Immunol.* 125. 58.
- Pancré, V., Monté, D., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. 1990. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur. Cytokine Net.* 1. 15.
- Parish, C. R. 1972. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant. Rev.* 13. 35.
- Pearce, E. J. and Mc Laren, D. J. 1983. Reappraisal of the guinea pig as an experimental host for schistosomiasis mansoni. *Parasitology.* 87. 455.
- Pearce, E. J. and James, S. L. 1986. Post-lung stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* exhibit transient susceptibility to macrophage-mediated cytotoxicity *in vitro* that may relate to late phase killing *in vivo*. *Parasit. Immunol.* 8. 513.
- Pearce, E. J. James, S. L., Hieny, S., Lanar, D. E. and Sher, A. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm-97), a non surface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85. 5678.
- Phillips, S. M., Reid, W. A., Doughty, B. L. and Bentley, A. G. 1980. The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis. Studies in athymic mice and *in vitro* granuloma formation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29. 820.
- Phillips, S. M., Bentley, A. G., Linette, G., Doughty, B. L. and Capron, M. 1983. The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance. *J. Immunol.* 131. 1466.
- Pitchford, R. J., Meyling, A. H., Meyling, J. and Du Toit, J. F. 1969. Cercarial shedding patterns of various schistosome species under outdoor conditions in the Transvaal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63. 359.
- Powell, M. R. and Colley, D. G. 1985. Demonstration of splenic auto-antiidiotypic plaque forming cells in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 134. 4140.
- Prah, S. K. and James, C. 1977. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. I. Effect of temperature and U.V. light. *J. Helminthol.* 51. 73.
- Przystowsky, M. B., Ely, J. M., Beller, L. E., Goldman, J., Goldman, M., Goldwasser, E., Ihle, J., Quintans, J., Remold, H., Vogel, S. N. and Fitch, F. W. 1982. Alloreactive cloned T cell lines. Multiple lymphokine activities secreted by helper and cytolytic lymphocytes. *J. Immunol.* 129. 2337.
- Rabellino, E. M. and Metcalf, D. 1975. Receptors for C3b and IgG on macrophage, neutrophil and eosinophil colony cells grown *in vitro*. *J. Immunol.* 115. 688.

- Raff, M. C. and Cantor, H. 1971. Subpopulations of thymus cells and thymus-derived lymphocytes. In: Proc. First Int. Congr. Immunol., Washington, DC, New-York: Academic.
- Ramalho-Pinto, F. J., Mc Laren, D. J. and Smithers, S. R. 1978. Complement-mediated killing of schistosomula of *S. mansoni* by rat eosinophil *in vitro*. *J. Exp. Med.* 147. 147.
- Rogers, M. V. 1986. *Schistosoma mansoni* : Studies of antigen recognition and immune expression in chronically infected and vaccinated guinea pigs. Ph. D. Thesis, Brunel University, Uxbridge Middlesex, U. K.
- Rollinson, D. 1984. Recent advances in the characterisation of Schistosomes and their intermediate hosts. *Tropical Disease Series.* 5. 401.
- Rollinson, D. and Southgate, V. R. 1985. Schistosome and snail populations genetic variability and parasite transmission. In "Ecology and Genetics of Host - Parasite Interactions " (Rollinson, D. and Anderson, R. M., eds. Limnean Society Symposium Series. Vol. pp. 11. 91.
- Rollinson, D. and Simpson, A. J. G. eds. 1987. The Biology of Schistosomes: From genes to latrines. Academic Press eds.
- Rothbard, J. and Taylor, W. 1988. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO. J.* 7. 93.
- Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H., and Capron, A. 1978. IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *Schistosoma mansoni* : a follow-up study of two strains of infected rats. *Immunology.* 35. 33.
- Ruppel, A., Rother, U. and Diesfeld, H. J. 1982. *Schistotoma mansoni* : development of primary infections in mice genetically deficient or intact in the fifth component of complement. *Parasitology.* 85. 315.
- Sadun, E. H. Von Lichtenberg, F. and Bruce, J. I. 1966. Susceptibility and comparative pathology of ten species of primates exposed to infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15. 705.
- Sadun, E. H. and Gore, R. W. 1970. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* : homocytotropic reagin-like antibodies in infections of man and experimental animals. *Exp. Parasitol.* 28. 435.
- Samuelson, J. C., Sher, A. and Caulfield, J. P. 1980. Newly transformed schistosomula spontaneously lose surface antigens and C3 receptors sites during culture. *J. Immunol.* 124. 2055.
- Samuelson, J. C. and Caulfield, J.P. 1982. Loss of covalently labelled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*.
- Santoro, F., Capron, M., Joseph, M., Rousseaux-Prévost, R. and Capron, A. 1978. Circulating antigens and immune complexes in *Schistosoma mansoni*-infected rats. Characterization by radio-immunoprecipitation-PEG assay (RIPEGA). *Clin. Exp. Immunol.* 32. 435.

- Santoro, F., Lachmann, P. J., Capron, A. and Capron, M. 1979. Activation of the complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula : killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. *J. Immunol.* 123. 1551.
- Santoro, F., Ouaisi, A., Pestel, J. and Capron, A. 1980. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: binding of C1q to schistosomula. *J. Immunol.* 124. 2886.
- Santoro, F., Vandemeulebroucke, B., Liebart, M. C. and Capron, A. 1982. *Schistosoma mansoni* : the role *in vivo* of complement in primary infection in mice. *Exp. Parasitol.* 54. 40.
- Sher, A. 1976. Complement-dependent adherence of schistosomula to mast cells. *Nature(London)*. 263. 334.
- Sher, A., Hieny, S., James, S. L. and Asofsky, R. 1982. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. II. Analysis of immunity in hosts deficient in T lymphocytes, B lymphocytes or complement. *J. Immunol.* 128. 1880.
- Sher, A., Hieny, S. and James, S. L. 1984. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. VI. Influence of the major histocompatibility complex. *Parasit. Immunol.* 6. 319.
- Short, R. B. and Grossman, A. I., 1981. Conventional Giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma rodhaini*. *J. parasitol.* 67. 661.
- Silberstein, D. S., David, J. R. 1986. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83. 1055.
- Simpson, A. J. G., Sher, A. and Mc Cutchan, T. F. 1982. The genome of *Schistosoma mansoni*: Isolation of DNA, its size bases and repetitive sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6. 125.
- Simpson, A. J. G., James, S. L. and Sher, A. 1983. Identification of surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni* recognised by antibodies from mice immunised by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae. *Inf. Immun.* 41. 591.
- Simpson, A. J. G., Hackett, F., Kelly, C., Knight, M., Payares, G., Omer-Ali, P., Lillywhite, J. Fleck, S. L. and Smithers, S. R. 1986. The recognition of *Schistosoma mansoni* surface antigens by antibodies from patients infected with *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 80. 261.
- Smith, D. B., Davern, K. M., Board, P. G., Tiu, W.U., Garcia, E. G. and Mitchell, G. F. 1986. Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83. 8703.
- Smith, G. 1987. The regulation of trematode populations by density-dependent processes. *Int. J. Parasitol.* 17. 541.
- Smith, M. A. and Clegg, J. A. 1985. Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigen. *Science.* 227. 535.

- Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1965^a. Acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the albinos rat. *Parasitology*. 55. 711.
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1965^b. Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Parasitology*. 55. 701.
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1967. Resistance to experimental infection by *Schistosoma mansoni* in Rhesus monkeys induced by the transfert of adult worms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61. 517.
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. 1969. Immunity in schistosomiasis. *Ann. NY Acad. Sci.* 160. 826.
- Smithers, S. R. and Doenhoff, M. J. 1982. Schistosomiasis. In: Immunology of Parasitic Infections. (Cohen, S. and Warren, K. S., Eds.). Blackwell Scientific, Oxford. - 527.
- Snapper, C. M. and Paul, W. E. 1987. Interferon-gamma and B-cell stimulatory factor 1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*. 263. 44.
- Spitler, L., Benjamini, E., Young, J. D., Kaplan, H. and Fudenberg, H. H. 1970. Studies on the immune response to a characterized antigenic determinant of the tobacco mosaic virus protein. *J. Exp. Med.* 131. 133.
- Spouge, J., Guy, R., Cornette, J., Margalit, M., Cease, K. Berzofsky, J. and Delisi, C. 1987. Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. *J. Immunol.* 138. 204.
- Stevens, W. J., Felmeir, H., Bridts, C. H. and Daffalla, A. A. 1983. IgG and IgE circulating immune complexes, total serum IgE and parasite related IgE in patients with mono- or mixed infection with *Schistosoma mansoni* and/or *S. haematobium*. Influence of therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 52. 142.
- Stirewalt, M. A., Kuntz, R. E. and Evans, A. S. 1951. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory animals to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31. 57.
- Stirewalt, M. A. 1974. *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomula. *Adv. Parasitol.* 12. 115.
- Sturrock, R. F., Kimani, R., Cottrell, B. J., Butterworth, A. E., Seitz, M. M., Siongok, T. K. and Houba, V. 1983. Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchilren after treatment for *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77. 363.
- Stutman, O. 1983. Role of thymic hormones in T cell differentiation. *Clin. Immunol. Allergy.* 3. 9.
- Suda, T. O' Garra, A., Mc Neil, I., Fischer, M., Bond, M. W. and Slonik, A. 1990. Identification of a novel thymocyte growth- promoting factor derived from B cell lymphomas. *Cell. Immunol.* 129. 228.
- Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. and Lerner, R. A. 1983. *Science*. 219. 660.

- Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nonaka, M. and Tokuhisa, T. 1978. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J. Exp. Med.* 147. 446.
- Tai, P. C. and Spry, C. J. F. 1976. Studies on blood eosinophils. I. Patients with a transient eosinophilia. *Clin. Exp. Immunol.* 24. 415.
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D. and Alexander, H. 1984. *Nature (London)*. 312. 127.
- Tarrab-Hazdai, R., Levi-Schaffer, F., Brenner, V., Horowitz, S., Eshhar, Z. and Arnon, R. 1985. Protective monoclonal antibody against *Schistosoma mansoni*: antigen isolation, characterization and suitability for active immunization. *J. Immunol.* 135. 2772.
- Tavarès, C. A. P., Cordeiro, M. N., Mota-Santos, T. A. and Gazzinelli, G. 1980. Artificially transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mechanism of acquisition of protection against antibody-mediated killing. *Parasitology*. 80. 95.
- Taylor, D. W., Hayunga, E. G., and Vannier, W. E. 1981. Surface antigens of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3. 157.
- Taylor, D. W. and Butterworth, A. E. 1982. Monoclonal antibodies against surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 84. 65.
- Taylor, D. W., Cordingley, J. S., and Butterworth, A. E. 1984. Immunoprecipitation of surface antigens precursors from *Schistosoma mansoni* messenger RNA *in vitro* translation products. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10. 305.
- Taylor, J. B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J. M., Southan, C., Sondermeyer, J. P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Capron, A. and Ketterer, B. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 KDa protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7. 465.
- Todd, C. W., Goodgame, R. W. and Colley, D. G. 1979. Immune response using human schistosomiasis mansoni. V. Suppression of schistosome antigen. Specific lymphocyte blastogenesis by adherent, phagocytic cells. *J. Immunol.* 122. 1440.
- Trottein, F., Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. 1990. Molecular cloning of a 26 kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione-S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41. 35.
- Van Regenmortel, M. V. H. 1985. Operational aspects of the definition of epitopes in peptides and proteins. In "Synthetic peptides in biology and medicine" (Alitalo, K., Partanen, P. and Vaheri, A.) (P 67-74). Elsevier Biochemical Press, Amsterdam.
- Velge- Roussel, F., Verwaerde, C., Grzych, J. M., Auriault, C. and Capron, A. 1989. Protective effects of anti- antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26- kilodalton *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol.* 142. 2527.

- Vermund, S. H., Bradley, D. J. and Ruiz-Tiben, E. 1983. Survival of *Schistosoma mansoni* in the human host : estimates from a community-based prospective study in Puerto Rico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32. 1040.
- Verwaerde, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R. J., Damonville, M., Velge, F., Auriault, C. and Capron, A. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138. 4441.
- Waldman, H., Lefkovits, I. and Feinstein, A. 1976. Restriction in the functions of single helper T cells. *Immunology.* 31. 353.
- Walker, A. R. P. 1970. Resistance or immunity to schistosomal infection (letter). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64. 192.
- Ward, R. E. M. and Mc Laren, D. J. 1988. *Schistosoma mansoni* : evidence that eosinophils and/or macrophages contribute to skin phase challenge attrition in the vaccinated CBA/ mouse. *Parasitology.* 96. 63.
- Warren, K. S. 1973. Regulation of the prevalence and intensity of shistosomiasis in man, immunology or ecology ?. *J. Infect. Dis.* 127. 595.
- Warren, K. S. 1982. Immunology in "Schistosomiasis, epidemiology, treatment and control" (Jordan, P. and Webbe, G. eds). Ch. 7. 150.
- Wassom, D. L., David, C. S. and Gleich, G. J. 1979. Genes within the major histocompatibility complexe influence susceptibility to *Trichinella spiralis* in the mouse. *Immunogenetics.* 2. 491.
- Westhof, E., Altshuh, D. and Moras, D. 1984. *Nature (London).* 311. 123.
- Wilkins, H. A. and Scott, A. 1978. Variation and stability in *Schistosoma haematobium* egg counts : a four year study in Gambian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72. 397.
- Wilkins, H. A., Goll, P. H., Marshall, J. F. de C. and Moore, J. P. 1984^a. *Schistosoma haematobium* in a Gambian community. The pattern of infection in the study area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78. 216.
- Wilkins, H. A., Goll, P. H., Marshall, T. F. de C. and Moore, J. P. 1984^b. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian Community. iii. The acquisition and loss of infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78. 227.
- Wyler, D. J., Wahl, S. M. and Wahl, L. M. 1978. Hepatic fibrosis in schistosomiasis : egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor *in vitro*. *Science.* 202. 438.
- Yi, X., Omer-Ali, P., Kelly, C., Simpson, A. J. G. and Smithers, S. R. 1986. IgM antibodies recognising carbohydrates epitopes shared between schistosomula and miracidia of *Schistosoma mansoni* block *in vitro* killing. *J. Immunol.* 137. 3946.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	12
RESUME.....	13
INTRODUCTION.....	15
I.PREFACE.....	16
II.GENERALITES.....	18
II.1. Qu'est-ce que la bilharziose?.....	19
II.2. Distribution géographique.....	20
II.3. Le genre <i>Schistosoma</i> : approche taxonomique.....	22
II.4. Le cycle biologique.....	26
II.5. Les conséquences de l'infection par <i>S.mansoni</i>	32
III. LA REPONSE IMMUNE CONTRE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> DANS LES MODELES ANIMAUX.....	34
III.1. Les modèles animaux.....	35
III.1.a. La spécificité d'espèce.....	35
III.1.b. Le choix du modèle animal.....	37
III.2. Les caractères généraux de la réponse immune vis-à-vis des schistosomes.....	38
III.2.a. L'immunité concomitante.....	39
III.2.b. Les composantes de la réponse immune vis-à-vis de <i>Schistosoma mansoni</i>	39
III.3. Les mécanismes de l'immunité non spécifique.....	41
III. 3.a. Le complément.....	41
III.3.b. Les cellules "Natural killer" (NK).....	42
III.3.c. Les macrophages.....	43
III.3.d. La réaction inflammatoire.....	43

III. 4. Les mécanismes de l'immunité spécifique.....	44
III.4.a. Immunité spécifique dépendante d'anticorps : mécanismes et cellules effectrices.....	44
III.4.a.1. Les macrophages.....	46
III.4.a.2. Les plaquettes.....	47
III.4.a.3. Les éosinophiles.....	47
III.4.b. L'immunité spécifique dépendante de lymphokines.....	49
III.4.b.1. Les macrophages.....	51
III.4.b.2. Les plaquettes.....	52
III.4.b.3. Les éosinophiles.....	53
 III.5. Régulation de la réponse immune vis-à-vis de <i>S. mansoni</i> : la réaction granulomateuse.....	54
III.5.a. L'hôte contrôle l'invasion par <i>S. mansoni</i>	54
III.5.b. Le parasite contrôle et régule la réponse immune de l'hôte.....	61
 III.6. Approche génétique de l'immunité vis-à-vis de <i>S.mansoni</i>	64
III.6.a. Influences génétiques sur la résistance ou la susceptibilité à l'infection par <i>S. mansoni</i>	64
III.6.a.1. Résistance naturelle.....	64
III.6.a.2. Résistance acquise.....	65
III.6.b. Analyses expérimentales de l'influence génétique sur la résistance ou la susceptibilité à l'infection par <i>S.mansoni</i>	69
 IV. LA REPOSE IMMUNE CONTRE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> CHEZ L'HOMME.....	70
IV.1. Quelques définitions et caractéristiques de l'épidémiologie de la schistosomiase humaine.....	70
IV.2. Preuves épidémiologiques de l'immunité chez l'Homme.....	74
IV.3. Réponses humorales lors de l'infection humaine.....	76
IV.4. Réponses lymphocytaires lors de l'infection humaine....	80
 V. LES ANTIGENES PROTECTEURS	82

TRAVAUX PERSONNELS	88
<u>ARTICLE 1</u> : Immunité protectrice induite par l'antigène P28 de <i>Schistosoma mansoni</i> , dans le modèle murin.....	91
<u>ARTICLE 2</u> : Analyse des épitopes T et B de l'antigène P28 de <i>Schistosoma mansoni</i> par l'utilisation de peptides synthétiques dans le modèle expérimental du rat.....	104
<u>ARTICLE 3</u> : Réponses lymphocytaires T vis-à-vis des peptides synthétiques de l'antigène P28 au cours de l'infection par <i>Schistosoma mansoni</i> , chez le rat et la souris.....	115
<u>ARTICLE 4</u> : Antigénicité et immunogénicité d'une construction multipeptidique de l'antigène Sm28GST de <i>Schistosoma mansoni</i> , chez le rat, la souris et le babouin : 1. <i>Protection partielle des rats Fischer après immunisation active</i>	148
<u>ARTICLE 5</u> : Etude des réponses lymphocytaires vis-à-vis de l'antigène protecteur de <i>S. mansoni</i> : Sm28GST et des peptides dérivés, chez l'homme et le primate.....	190
DISCUSSION-CONCLUSION	218
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230

