

50376  
1994  
137

GEN 20 102 415

N° d'ordre : 1305

1  
50376  
1994  
137

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES-ARTOIS



THESE DE DOCTORAT  
présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du titre de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
par  
Monique MARGUERITE

\*  
**Immunogénicité de constructions peptidiques  
dérivées de l'antigène Sm28GST de *Schistosoma  
mansoni***  
\*

Présentée le 15 avril 1994 devant la commission d'examen :

Membres du Jury :

<b>Président :</b>	Professeur A. DHAINAUT
<b>Rapporteurs :</b>	Professeur H. GRAS-MASSE Docteur J.M. GRZYCH
<b>Examineurs :</b>	Professeur A. CAPRON Docteur C. AURIAULT



Ce travail a été réalisé au

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

sous la direction de Monsieur le Professeur A. CAPRON.

Il a fait l'objet d'une collaboration avec le

Laboratoire de Chimie des Biomolécules  
dirigé par Monsieur le Professeur A. TARTAR.  
CNRS URA 1309  
Institut Pasteur de Lille

**Je tiens à remercier très vivement :**

**Monsieur le Professeur A. CAPRON** qui m'a accueillie avec beaucoup de bienveillance au sein de son laboratoire. Que ce travail soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

**Monsieur le Professeur A. DHAINAUT** qui me fait l'honneur de présider le jury de la soutenance de ma thèse.

**Monsieur le Docteur C. AURIAULT** pour sa disponibilité de chaque instant et pour ses judicieux conseils.

**Madame le Professeur H. GRAS-MASSE** et **Monsieur le Docteur J.M. Grzych** qui ont accepté de juger ce travail.

**Madame le Docteur C. MAZINGUE** qui m'a dirigée avec beaucoup d'attention et a assuré la lecture critique de cette thèse.

**Je remercie également :**

Monsieur M. Bossus pour sa précieuse participation à ce travail.

Les membres du groupe ICCRI pour leurs conseils et leur soutien. Un Grand Merci en particulier à Isabelle Wolowczuk, Sandra Giannini et Dominique Zelus.

Mesdames Ivanoff, Schacht, Lafitte, Gaubert, Fontaine, Vermesch et Verwaerde pour leurs précieux conseils et pour leur disponibilité.

Madame la bibliothécaire J. Derick.

Les membres du secrétariat pour leur gentillesse et leur efficacité.

ainsi que tout le personnel de l'animalerie.

Nos travaux ont donné lieu aux publications (\*) et aux communications suivantes (\*\*):

\* **Marguerite, M.**, Bossus, M., Mazingue, C., Wolowczuk, Gras-Masse, H., Tartar, A., Capron, A. and Auriault, C. 1992. Analysis of antigenicity and immunogenicity of five different chemically defined constructs of a peptide. *Mol. Immunol.* 29. 793.

\* Estaquier, J., **Marguerite, M.**, Auriault, C., Mazingue, M., Capron, A. and Ameisen, J. C. *Schistosoma mansoni* parasite infection is associated to a programmed cell death. Manuscript en preparation.

\* Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., **Marguerite, M.**, Boulanger, D., Capron, A. and Tartar, A. 1991. Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST). *Pept. Research.* 4. 6.

\* Estaquier, J., Wolowczuk, I., Boutillon, C., Gras-Masse, H., **Marguerite, M.**, Bossus, M., Tartar, A., Capron, A. and Auriault, C. 1993. Expected properties of synthetic peptide vaccines : Experimental approach with peptides derived from parasite (Sm28GST) and virus (nef) proteins. *Adv. Allergy. Immunol.* 2. 11.

\*\* **Marguerite, M.** and Auriault, C. 1992. Analysis of antigenicity and immunogenicity of five different chemically defined constructs of a peptide. Poster présenté au "1st La Grande Motte International Meeting. Peptide Models and Immunological Recognition" à La Grande Motte, France.

## SOMMAIRE

Résumé.....	7
Introduction.....	8
Résultats.....	47
Discussion.....	77
Annexe technique.....	94
Références bibliographiques.....	100
Table des matières.....	119

## RESUME

Nos travaux se sont inscrits dans la cadre d'une approche vaccinale peptidique contre la schistosomiase.

L'antigène Sm28GST a été choisi comme modèle antigénique pour les raisons suivantes :

- 1/ Cet antigène s'est montré protecteur dans différents modèles expérimentaux.
- 2/ Cette molécule avait été clonée ce qui permettait de connaître sa structure primaire.
- 3/ La cartographie épitopique de la molécule avait montré que les séquences 115-131 et 24-43 de la molécule renferment des épitopes T et B majeurs chez l'animal et chez l'homme. Toutefois, il avait aussi été mis en évidence que ces peptides n'étaient immunogènes qu'après couplage à une molécule porteuse. Ceci posait donc le problème de l'immunogénicité propre de ces molécules porteuses.

C'est pourquoi nous avons décidé de développer différentes stratégies de synthèse peptidique autres. Les constructions suivantes du peptide 115-131 ont été synthétisées :

- une construction faite de trois exemplaires de la même séquence peptidique.
- une construction faite de plusieurs copies du peptide polymérisées par leurs extrémités NH<sub>2</sub> grâce à la glutaraldéhyde.
- une construction faite de deux (MAP-2 115-131) ou huit (MAP-8 115-131) copies du peptide branchées sur un coeur immunologiquement neutre de résidus lysines via leur partie COOH terminale.

L'antigénicité et l'immunogénicité de ces constructions ont été comparées chez le rat et nous avons ainsi pu montrer que la construction MAP-8 115-131 s'avérait être la plus immunogène en terme d'induction d'une réponse humorale et cellulaire vis-à-vis de la Sm28GST .

Nous avons ensuite caractérisé la nature de la réponse immune induite par le MAP-8 115-131 et par une construction analogue du peptide 24-43 de la Sm28GST. Cette étude a été réalisée chez la souris. Elle nous a permis de montrer que ces deux MAP-8 induisent une réponse cellulaire de même nature avec production d'IL-2, d'IL-3 et d'IL-5. Nous n'avons pas détecté d'IL-4, d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-10.

Finalement, au cours de nos travaux, nous avons été amené à constater de façon fortuite, que, après la ponte des parasites, les splénocytes des animaux infectés par *S. mansoni* présentent *in vitro* face aux extraits totaux d'antigènes parasitaires une hyper-activité cellulaire qui est suivie de la mort de ces cellules par un mécanisme d'apoptose.

# INTRODUCTION

La schistosomiase est la seconde endémie parasitaire après le paludisme. La pathologie est essentiellement due à la fibrose qui accompagne la réaction inflammatoire développée par l'hôte autour des oeufs bloqués dans les tissus hépatiques et intestinaux. Ainsi, bien qu'il existe des médicaments capables de détruire les schistosomes et les miracidia contenus dans les oeufs, ceux-ci ne permettent pas de réparer les dommages accumulés. Par ailleurs, en raison de leur prix très élevé, et des réinfections continues auxquelles sont soumises les populations vivant en zone d'endémie, ces médicaments ne peuvent être que d'un faible secours.

Dans ce contexte, une stratégie vaccinale apparaît comme une nécessité.

Bien que l'immunisation d'animaux de laboratoire par des cercaires irradiées (Dean, D.A. 1983) ou par l'injection d'antigènes totaux extraits du schistosome (James, S.L. et coll. 1990) aboutisse à une réduction de la charge parasitaire de plus de 60 % et permette, étant donné que le schistosome ne se multiplie pas chez son hôte définitif, une réduction considérable de la pathologie (liée à la diminution du nombre d'oeufs), cette approche vaccinale n'est malheureusement pas envisageable chez l'homme en raison de la très grande difficulté voire de l'impossibilité de produire à grande échelle et de façon standardisable ces préparations.

C'est pourquoi, les travaux se sont orientés vers la définition de molécules à pouvoir protecteur susceptibles d'être produites en grande quantité et à bas prix grâce aux voies du génie génétique, ou plus récemment, vers la recherche des épitopes immunodominants des molécules protectrices en vue d'obtenir par des méthodes entièrement chimiques, des vaccins peptidiques hautement standardisés et remarquablement peu onéreux.

Suite, d'une part à la démonstration par Balloul, J. M. et coll. (1987a, 1987b et 1987c) qu'une molécule de 28 kDa extraite de *Schistosoma mansoni* pouvait protéger différents modèles expérimentaux contre une infection d'épreuve, et d'autre part au clonage de cet antigène (antigène nommé Sm28GST), la caractérisation des épitopes T et B de la molécule fut entreprise. Elle aboutit à définir les séquences 115-131 et 24-43 de la Sm28GST comme détentrices d'épitopes T et B majeurs chez l'animal mais révéla aussi que ces séquences ne sont antigéniques et immunogéniques que si elles sont couplées à une molécule porteuse.

Parce que la production des conjugués peptide-porteur est difficile à standardiser et que cette opération peut entraîner une suppression de la réponse immune anti-peptide, il était donc nécessaire de développer des stratégies de synthèse peptidique autres que le couplage.

C'est pourquoi notre travail a consisté à expertiser plusieurs constructions synthétiques élaborées par le groupe de recherche du Professeur A. Tartar. Nous avons par la suite caractérisé la nature de la réponse immune induite par la plus prometteuse d'entre elles.

## **GENERALITES**

---

Les bilharzioses ou schistosomiasés sont des infections parasitaires à transmission aquatique affectant l'homme et certains animaux.

Chez l'homme, on distingue deux formes principales de bilharzioses : intestinale et urogénitale, causées par différentes espèces de schistosomes. D'après un récent rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, ces maladies affectent 200 millions d'individus et sont ainsi considérées comme les plus répandues dans le monde après le paludisme. Elles sévissent surtout dans les régions tropicales et sub-tropicales du globe où elles causent 300000 décès par an.

De plus, sur le plan vétérinaire, les espèces zoophiles infectant le bétail sont responsables de graves pertes économiques.

### **I. Place des schistosomes dans le règne animal.**

Les schistosomes sont des vers appartenant à l'embranchement des plathelminthes (vers plats non segmentés), à la classe des trématodes (appareil digestif avec caecums), à la sous-classe des digènes (deux hôtes), à l'ordre des distomes (2 ventouses : buccale et ventrale), au sous-ordre des Schistosomoïdea (sexes séparés), à la famille des Schistosomatidae (furcocercaires libres) et au genre *Schistosoma* (hôte définitif mammifère) qui rassemble dix huit espèces (Short, R. B. 1983).

Deux types de regroupement des différentes espèces ont été établis, l'un reposant sur la morphologie des oeufs et l'autre sur le spectre d'infectivité du parasite.

Morphologie des oeufs : en particulier, on distingue (Fig1) :

- les oeufs ovales et munis d'un éperon latéral ( ex :*S. mansoni*).
- Les oeufs ovales et munis d'un éperon terminal (*S. haematobium* et *S. intercalatum*).
- les oeufs ronds et munis d'un éperon minuscule (*S. japonicum* et *S. mekongi*).

Spectre d'infectivité : Il permet de distinguer :

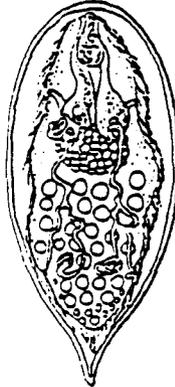
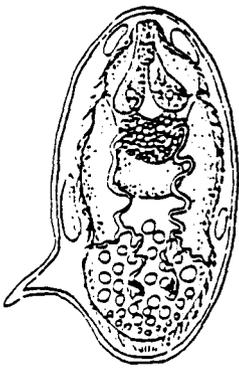
-les espèces anthropophiles (espèces uniquement capables d'infecter l'homme) : *S. mansoni* et *S. intercalatum* responsables d'une bilharziose dite intestinale et *S. haematobium* (bilharziose urogénitale).

-les espèces anthropo-zoophiles (espèces capables d'infecter à la fois l'homme et certains animaux) : *S. japonicum* et *S. mekongi* (bilharziose intestinale).

A

B

C



**Figure 1 : Morphologie des oeufs de schistosomes.**

**A :** Oeuf de *Schistosoma mansoni* : éperon latéral

**B :** Oeuf de *Schistosoma haematobium* : éperon terminal

**C :** Oeuf de *Schistosoma japonicum* : éperon minuscule

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



-les espèces zoophiles : *S. rodhaini* et *S. sinensium* (rongeurs et carnivores), *S. incognitum* (suidés) et *S. curassoni*, *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. leiperi*, *S. edwardiense*, *S. hippopotami*, *S. margrebowie*, *S. indicum*, *S. spindale* et *S. nasale* (porcins et ruminants).

La taxonomie des schistosomes n'est toutefois pas rigide car l'apparition d'hybrides naturels ainsi que des variations au sein d'une espèce peuvent engendrer des différences dans les capacités d'infectivité des mollusques et de développement chez l'hôte (Nadler, S. A. 1987). L'incidence de ces hétérogénéités inter et intra-spécifiques dans le cadre d'une stratégie de contrôle de la maladie est évidente.

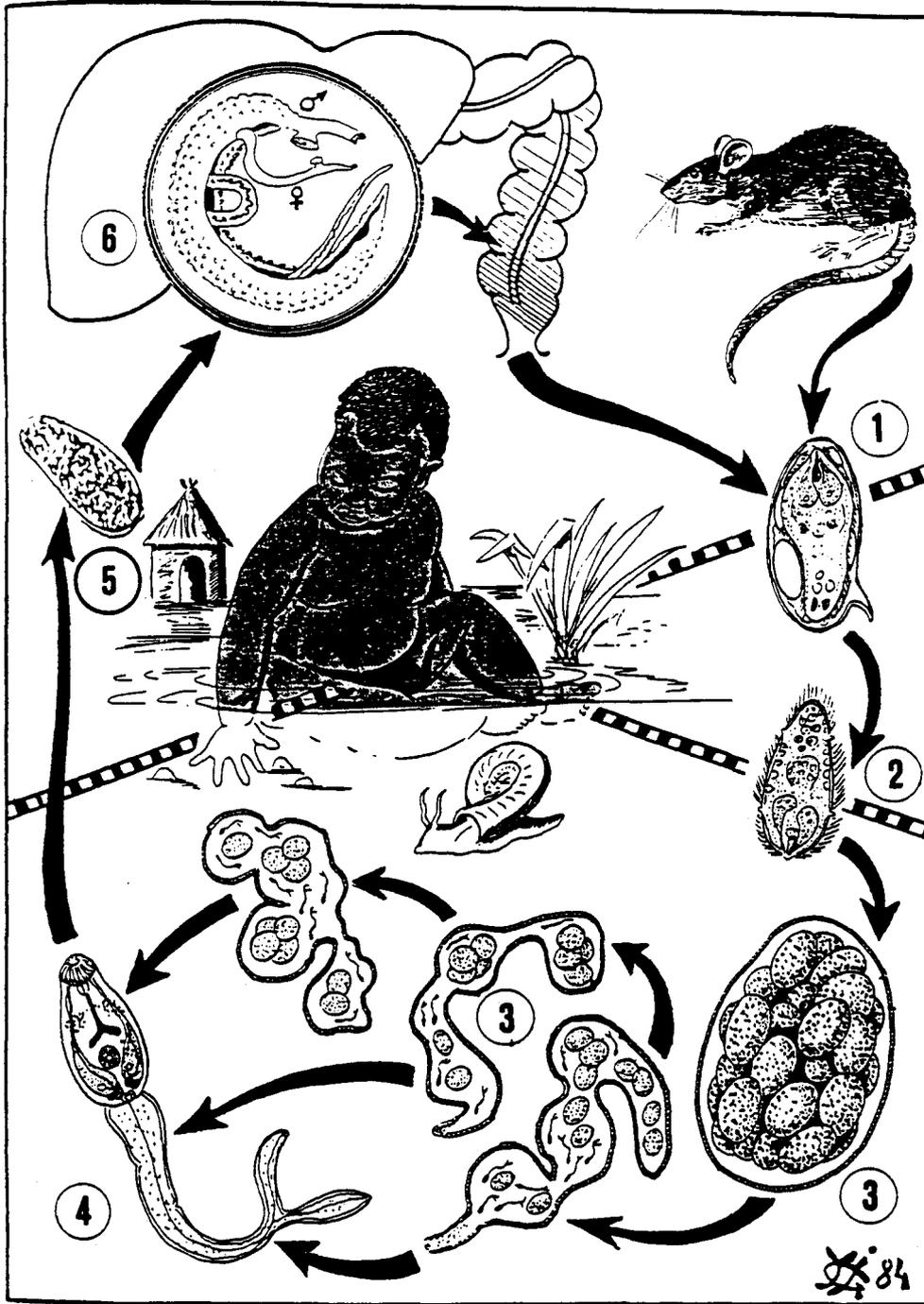
## II. Le cycle biologique (Fig. 2).

Le schistosome suit un cycle dixène dont l'hôte définitif est un vertébré mammifère et l'hôte intermédiaire un gastéropode d'eau douce. Pour les trois principales espèces infectant l'homme (*S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*), le mollusque est spécifique (respectivement : *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*). Les préférences climatiques et écologiques du mollusque conditionnent souvent la prévalence et l'intensité de l'infection.

Les oeufs (1) de schistosomes excrétés par l'organisme de l'hôte définitif éclosent lorsqu'ils atteignent l'eau, libérant une larve 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 d'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 à l'aide des 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 coll. 1962 - Prah, S. K. et coll. 1977).

A l'intérieur du mollusque, le miracidium bourgeonne, se transforme en sporocyste primaire qui va donner des sporocystes secondaires (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 (Pitchford, R. J. et coll. 1969 - Nojima, H. et coll. 1982).



**Figure 2 :** Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni* (d'après Golvan, Y.J., Ed. Flammarion, 1969)



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. Lawson, J. R. et coll.(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.

Les cercaires se fixent sur l'épiderme de leur hôte définitif grâce à leur ventouse antérieure munie d'épines. La pénétration à travers la peau fait intervenir une action mécanique et une action chimique (sécrétion d'enzymes protéolytiques : Landsperger, W. J. et coll. 1982). De fascinantes modifications s'opèrent alors permettant au parasite de s'adapter à son "nouveau mode de vie" : modifications de structure (Stirewalt, M. A. 1974; Mc Laren, D. J. 1980), de morphologie (en traversant la peau de leur hôte définitif, les cercaires perdent leur queue) et biochimiques comme l'apparition de nouvelles molécules. Les cercaires se transforment ainsi en schistosomules (5) capables de vivre dans un milieu où l'osmolarité est augmentée.

Par transport lymphatique ou veineux, les schistosomules arrivent aux poumons d'où ils gagnent ensuite le système porte intra-hépatique par voie circulatoire (cette phase migratoire dure 10 à 21 jours). Ils poursuivent alors leur développement jusqu'à la différenciation et la maturation sexuelle (en 3 semaines environ). Les vers adultes s'établissent alors définitivement dans le système porte hépatique ou mésentérique (*S.mansoni* et *S. japonicum*), ou dans le système urinaire (*S.haematobium*). Leur durée de vie est en moyenne de 3 à 5 ans. Toutefois, Vermund, S. H. et coll. (1983) ont rapporté des périodes pouvant atteindre 30 ans. Ils se nourrissent de globules rouges et la femelle (logée dans le canal gynécophore du male (6)) pond de nombreux oeufs embryonnés. Le nombre d'oeufs pondus dépend toutefois de l'espèce de schistosome. Pour *S.mansoni*, il est de 300 par jour (Loker, E.S. 1983). Ces oeufs pourront avoir 2 destinées :

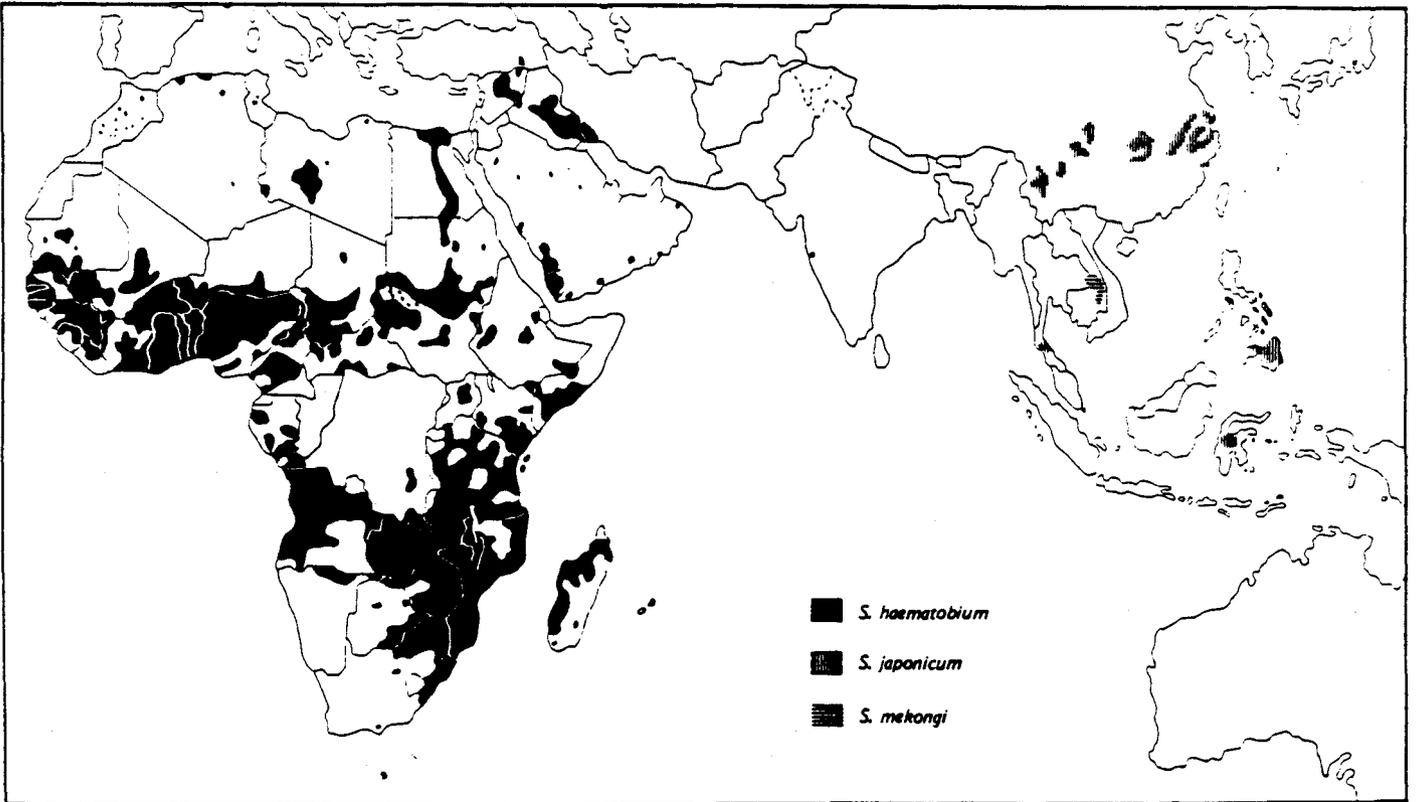
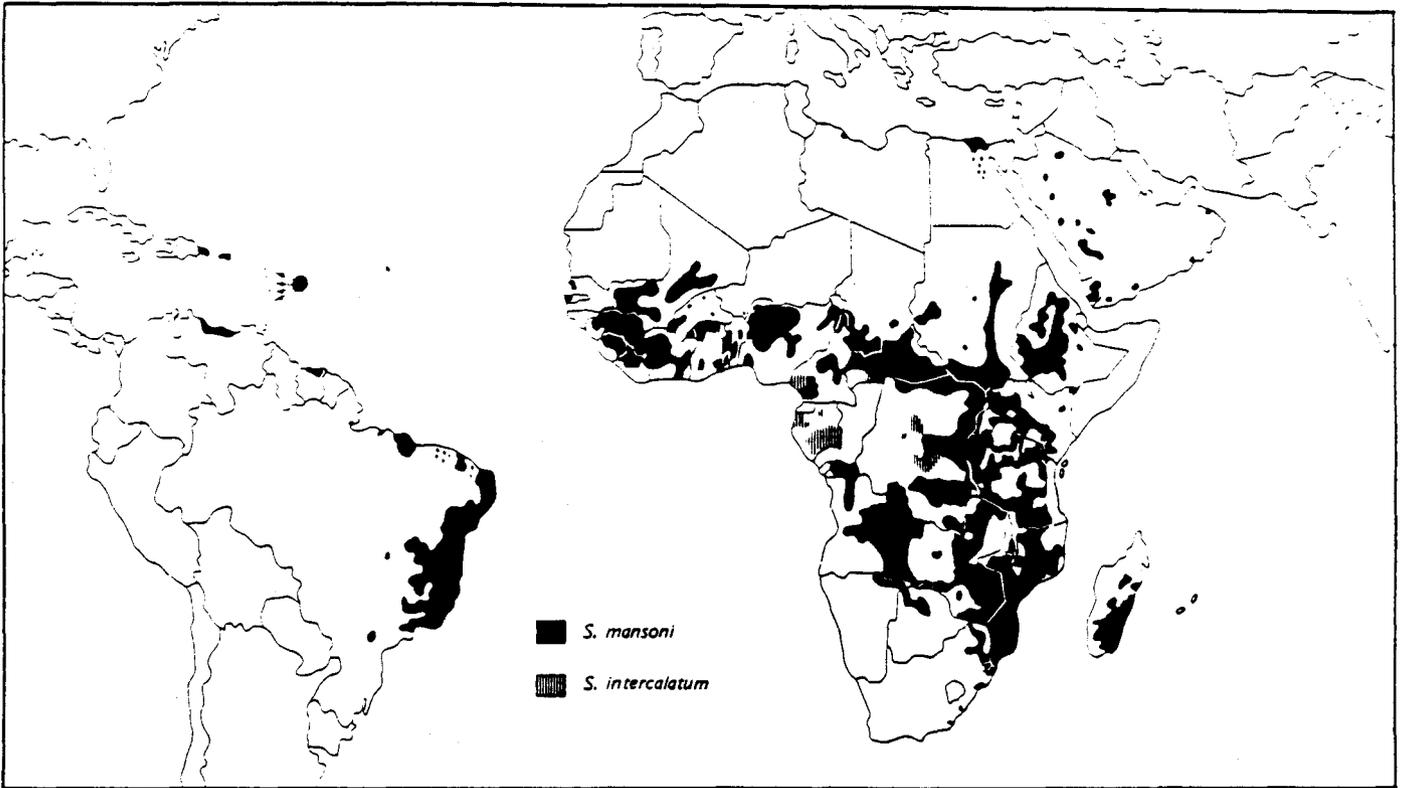
- ceux qui seront bloqués dans les tissus occasionneront la formation du granulome bilharzien que nous détaillerons ultérieurement.

- ceux (environ la moitié des oeufs pondus) qui traverseront la muqueuse et tomberont dans la lumière de la vessie (*S. haematobium*) ou de l'intestin (*S.mansoni*, *S. japonicum*) seront éliminés dans les excréments assurant ainsi la continuité du cycle.

### III Répartition géographique des schistosomiasis

Comme le montre la figure 3, les 3 espèces majeures de schistosomes infectant l'homme sont réparties comme suit :

- *S.mansoni* : Amérique du sud, Afrique et Caraïbes
- *S.haematobium* : Afrique et Proche Orient
- *S.japonicum* : Extrême Orient



**Figure 3 : Répartition géographique des schistosomoses humaines** (d'après "Atlas de la répartition mondiale des schistosomoses", O.M.S. 1987)

Les humains contractent la maladie par le contact répété avec une eau douce contaminée lorsqu'ils se livrent à l'agriculture, à la pêche et à des activités ménagères ou ludiques. La contamination de l'environnement se trouve maintenue par la pauvreté et par la rareté - sinon l'absence - d'installations sanitaires. D'autre part, l'accélération des programmes d'irrigation et d'aménagements des cours d'eau, ainsi que l'accroissement de la migration des populations, contribuent à l'extension des foyers infectieux. C'est ainsi que la création sur le fleuve Sénégal d'une retenue d'eau destinée à augmenter la surface des périmètres exploitables par l'agriculture a eu pour conséquence l'apparition d'un foyer explosif de bilharziose intestinale du à la multiplication exponentielle des mollusques vecteurs (Diaw, O. T. et coll. 1990).

#### **IV Pathologie associée aux bilharzioses.**

Dans leur majorité, les oeufs pondus par les couples de schistosomes sont entraînés par le courant sanguin vers les organes du tractus gastro-intestinal (*S. mansoni*) ou urogénital (*S. japonicum*) où ils vont s'enchâsser dans les ramifications vasculaires. Par l'intermédiaire de leurs sécrétions miracidiales antigéniques, ces oeufs provoquent une réaction inflammatoire encore appelée réaction granulomateuse qui endommage le parenchyme hépatique et est à l'origine d'une fibrose cicatricielle évoluant parfois vers des complications à pronostic fatal. En effet, l'oblitération des vaisseaux du système circulatoire par les nodules fibreux résultants peut aboutir à une hypertension portale dont les répercussions sont multiples : splénomégalie parfois considérable, créations de varices oesophagiennes dont la rupture peut aboutir à des hématomèses mortelles. Il peut aussi y avoir formation d'oedèmes voire même d'ascites. Ces formes sévères qui concernent environ 10% des malades en zone d'endémie ancienne (Gryseels, B. 1989) seraient liées à de fortes charges parasitaires et au statut génétique des patients (Dessein, A. et coll. 1992).

Les symptômes liés au parasitisme proprement dit sont en général mineurs. Toutefois, des phénomènes allergiques fébriles peuvent parfois prendre une grande ampleur. Ils sont connus sous le nom de fièvre de Katayama.

#### **V Les traitements.**

Il existe depuis quelques années de nombreux composés schistosomicides qui permettent d'enrayer l'infestation par des protocoles simples, une seule prise suffisant en général (Davis, 1986). Le traitement stoppe également les réactions inflammatoires péri-ovulaires (Davis, A. 1986). Néanmoins, cette chimiothérapie ne permet pas de réparer les dommages accumulés (troubles circulatoires dus aux lésions anciennes fibrosées) (Cheever, A. W. 1989). Par ailleurs, le traitement présente de nombreux inconvénients :

- Il peut, dans certains cas, aggraver le tableau clinique du patient par la libération

massive d'antigènes parasitaires et par l'apparition de complexes immuns.

- Il ne prévient pas les réinfections.
- Il est trop onéreux pour être régulièrement utilisé.
- Il peut parfois diminuer l'immunité à la réinfection : C'est le cas du Praziquantel (Moloney, N. A. et coll. 1987), médicament qui est malgré tout le plus utilisé en raison de sa grande efficacité contre les 3 espèces majeures de schistosomes infectant l'homme (Harnett, W. 1988).

## **VI Prophylaxie sanitaire des schistosomiasés.**

Basée sur l'interruption du cycle parasite, la prophylaxie sanitaire peut s'exercer à deux niveaux :

- d'une part, chercher à détruire les formes libres infestantes ou les mollusques vecteurs par l'usage de substances chimiques ou par introduction de prédateurs ou de mollusques non vecteurs compétiteurs. Des résultats intéressants ont ainsi pu être obtenus au Nord-Est du Brésil. Néanmoins, ceux-ci sont restés très ponctuels car la population de mollusques vecteurs s'est rapidement reconstituée (Dessein, A. et coll. 1992).
- d'autre part, viser à réduire la contamination des collections d'eau par les excréments humains et à diminuer la fréquence des contacts de l'hôte définitif avec le biotope infestant par développement de systèmes d'adduction d'eau.

La prophylaxie sanitaire devrait donc être intégrée dans de vastes programmes de développement économique du Tiers-Monde pour aboutir à un réel succès. Toutefois des problèmes sociaux, économiques et même parfois politiques semblent entraver cette méthode de lutte.

**La prophylaxie médicale paraît donc à grande échelle et à long terme être le seul recours de lutte efficace contre les bilharzioses.**

# PROPHYLAXIE MEDICALE DES SCHISTOSOMIASES

---

L'élucidation et la compréhension des mécanismes contrôlant la réponse immune dirigée contre les schistosomes et les subterfuges utilisés par ces parasites pour malgré tout aisément survivre chez leur hôte sont un préalable indispensable à la mise en place d'une stratégie vaccinale efficace contre la bilharziose. Grâce à l'utilisation d'animaux de laboratoire qui permettent de mener des études à la fois *in vitro* et *in vivo* et grâce au suivi immunologique des populations résidant en zone d'endémie, de très nombreuses informations ont été obtenues.

## I. La réponse immune dirigée contre *S.mansoni* dans les modèles animaux.

### A) le choix du modèle animal.

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

- Les hôtes résistants comme le pigeon (les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme).

- Les hôtes semi-permissifs qui rejettent les vers adultes avant la ponte comme le rat. En effet, bien que les schistosomules atteignent chez cet animal le stade de migration hépatique, il y a une chute brutale de la charge parasitaire à la quatrième semaine d'infection (Maddison, S. E. et coll. 1970).

- Les hôtes permissifs qui permettent la maturation complète des parasites et la ponte comme la souris, le hamster, le singe Rhésus et le babouin olive.

Dans notre laboratoire, le rat a fait l'objet de très nombreuses études car cet animal développe une forte immunité à la réinfection. De plus, les travaux se sont trouvés encouragés par l'observation parallèle que les mécanismes effecteurs mis en place par ce modèle (mécanismes d'ADCC que nous détaillerons ultérieurement) pouvaient aussi exister chez l'homme.

La souris (autre animal de laboratoire facilement manipulable) développe aussi une immunité à la réinfection mais cette résistance qui ne commence qu'avec le dépôt des oeufs (Dean, D. A. 1983) serait basée au moins en bonne partie sur des mécanismes non

spécifiques liés à la fibrose hépatique. En effet, Wilson, R. A. et coll (1983) constate que de nombreuses larves de réinfestation parvenues au foie n'y sont pas retenues en raison de la profonde perturbation du tissu hépatique après la ponte. Ces larves retournent ainsi dans la circulation où elles ne peuvent poursuivre leur développement et meurent. De façon intéressante, lorsque ces animaux sont infectés par des cercaires unisexuées, aucune immunité face à une infection d'épreuve n'est observée (Dean, D. A. 1983). Par contre, des niveaux de protection pouvant atteindre 65 % en terme de diminution de la charge parasitaire peuvent être obtenus par infection préalable des souris avec des cercaires irradiées dont la migration ralentie ne dépasse pas le stade pulmonaire et ne permet pas la maturation des parasites (Dean, D. A. 1983 - James, S. L. et coll. 1983 - Mangold, B. et coll. 1984). L'étude des mécanismes schistosomicides alors impliqués a ainsi révélé un mode de défense différent de celui du rat mais qui s'avèrera aussi être potentiellement utilisable par l'humain. Enfin, en raison de son côté "permissif", la souris a été très utilisée pour étudier les manifestations immunopathologiques liées au dépôt des oeufs dans les tissus.

Le singe est peu utilisé pour les études fondamentales. Toutefois, en raison de sa proche parenté avec l'humain, il sert souvent pour vérifier l'activité protectrice d'une préparation vaccinale.

## B) Les mécanismes de l'immunité protectrice.

### 1°) Préambule : l'immunité concomitante.

Bien qu'avec certains modes d'induction (infection par des cercaires normales ou atténuées) la plupart des espèces animales semblent capables de développer une immunité à la réinfection, Smithers, S. R. et coll. (1969) observent que celle-ci revêt un caractère très particulier puisqu'elle est efficace contre les formes larvaires de la nouvelle infection mais est inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme. Ces auteurs proposeront en 1969 le terme d'immunité concomitante 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 coll. 1967), montreront en fait 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-même déclenchée.

De façon intéressante, ce concept implique qu'il existe certaines communautés antigéniques entre le schistosome adulte et le schistosomule et que l'adulte vivant dans les vaisseaux stimule le système immunitaire de l'hôte via la libération de ses produits métaboliques de sécrétion.

## 2°) Mécanismes effecteurs chez le rat : Mécanismes d'ADCC.

Puisque l'infection du rat par *S.mansoni* conduit à une réponse humorale très importante avec une production remarquable d'anticorps anaphylactiques (IgE et IgG2a) aux périodes où l'immunité à la réinfection est maximale (Sadun, E. H. et coll. 1970 - Phillips, S. M. et coll. 1977 - Rousseaux-Prévost, R. et coll. 1978), il était légitime de s'intéresser aux rôles que pouvaient jouer ces immunoglobulines dans l'immunité anti-schistosome.

Grâce aux très nombreux travaux réalisés *in vitro* et *in vivo*, il a été montré que le rat met en place un ingénieux système de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity : ADCC) qui permet grâce à une étroite collaboration entre certaines cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes (macrophages, plaquettes et éosinophiles) et des anticorps spécifiques d'isotype IgE et IgG2a la lyse des larves de réinfestation.

### a) La coopération avec les macrophages.

Les tous premiers travaux réalisés par Capron, A. et coll. (1975) 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 laissent 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 coll. 1977).

La présence de récepteurs pour l'IgE à la surface des macrophages de rat a ensuite été démontrée (Dessaint, J. P. et coll. 1979).

### b) La coopération avec les plaquettes.

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

En 1986, Joseph, M. et coll. montreront de plus que les plaquettes possèdent bien un récepteur pour l'IgE.

### c) La coopération avec les éosinophiles.

Le mécanisme d'ADCC médié par l'éosinophile peut faire intervenir les IgE

(Capron, M. et coll. 1981a) mais aussi les IgG2a (Capron, M. et coll. 1978). Au cours de leurs travaux, Capron, M. et coll. (1981a, 1981b) montreront de plus que ce phénomène est grandement facilité par certains produits libérés par les mastocytes lorsque ceux-ci sont activés par pontage de leur Fc récepteurs par les complexes anticorps anaphylactiques-antigènes. L'histamine alors libérée est chimio-attractive pour les éosinophiles tandis que l'ECF-A (Eosinophil Factor of Anaphylaxis) s'avère être en plus capable d'augmenter l'expression membranaire des récepteurs pour les IgG2a et des récepteurs pour les IgE à la surface de l'éosinophile (récepteurs identifiés par Rabellino, E. M. et coll. (1975) et Capron, M. et coll. (1981c)).

Des études de microscopie électronique montrent qu'après interaction étroite de l'éosinophile avec la surface du parasite, la cellule libère le contenu de ses granules à la surface de la cible (Mc Laren, D.J. et coll. 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 coll. 1988), la MBP (Major Basic Protein) (Butterworth, A. E. et coll. 1979) ou l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) (Mc Laren, D. J. et coll. 1981).

Enfin, il semble que le parasite soit en mesure d'activer lui-même l'éosinophile par l'intermédiaire d'une protéase de type collagénase qui entraîne une augmentation de la synthèse des récepteurs pour la partie Fc des IgG sur l'éosinophile (Auriault, C. et coll. 1983).

#### d) Pertinence in vivo.

- Le transfert passif d'éosinophiles (Capron, M. et coll. 1984) ou de plaquettes (Joseph, M. et coll. 1983) prélevés sur des rats immuns confère une protection chez les animaux receveurs infestés ultérieurement.

- Le transfert passif, le jour de l'infestation, d'anticorps monoclonaux reconnaissant le schistosome, et d'isotypes IgG2a (Grzych, J. M. et coll. 1982) ou IgE (Verwaerde, C. et coll. 1987), cytotoxiques *in vitro*, entraîne une protection chez les animaux receveurs.

- Le transfert passif d'immun-sérums de rats déplétés en IgE et en IgG2a ne protège pas contre l'infection (Capron, A. et coll. 1980).

Toutefois, bien que les IgE semblent très efficaces pour détruire les schistosomules par le biais de ces mécanismes d'ADCC, elles ne semblent néanmoins pas absolument nécessaires au développement de l'immunité à la réinfection chez le rat : Phillips, S.M. et coll. (1991a) observent en effet que lorsque ces animaux sont soumis à un traitement par anticorps anti-IL-4 (cytokine principalement produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui est

nécessaire à la synthèse d'IgE (rôle dans la commutation isotypique) (Coffman, R. L. et coll. 1986)), aucune diminution de la résistance à la réinfection n'est observée. Il est donc envisageable que les mécanismes effecteurs dépendants d'IgG2a, qui ne sont pas inhibés par le traitement, soient suffisants pour assurer la protection ou que d'autres mécanismes non élucidés interviennent.

### 3°) Mécanismes effecteurs développés par la souris après une infection expérimentale par des cercaires irradiées.

Suite aux travaux de Bickle, Q. D. et coll. et de Phillips, S. M. et coll. montrant que le transfert de sérums de souris immunisées par une exposition à des cercaires irradiées et devenues résistantes à l'infection d'épreuve, à des souris normales n'entraînait aucune protection (Bickle, Q. D. et coll. 1985) et que la déplétion en lymphocytes T L3T4<sup>+</sup> (correspondant au cluster de différenciation CD4) supprimait la résistance acquise après une exposition à des cercaires irradiées (Phillips, S. M. et coll. 1991b), il apparaissait que les mécanismes effecteurs développés par l'animal grâce à ce système d'infection abortive devaient directement dépendre des cytokines produites par les cellules T CD4<sup>+</sup> sans intervention d'une composante humorale.

Les données de la littérature stipulant que les cellules T CD4<sup>+</sup> murines sont divisables en deux sous-populations sur la base de productions différentielles de cytokines : les cellules **Th1** productrices d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2, de TNF- $\beta$ , d'IL-3, de TNF- $\alpha$  et de GM-CSF mais pas d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 ou d'IL-13 et les cellules **Th2** productrices d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13, de TNF- $\alpha$ , de GM-CSF et d'IL-3 mais pas d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 ou de TNF- $\beta$  (Mosmann, T.R. et coll. 1986 - Cherwinski, H. M. et coll. 1987 - Fiorentino, D.F. et coll. 1989), Mountford, A. P. et coll. (1992) ainsi que Smythies, L. E. et coll. (1992a) décident donc de déterminer la nature de la réponse immune élicitée par ce type d'infection. Ils observent ainsi que les cercaires irradiées suscitent l'apparition d'une réponse immune de type Th1 puisque productrice d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  mais pas/peu d'IL-4 ni d'IL-5 et que cette réponse est anamnétique lors de la réinfection.

Par la suite, Smythies, L. E. et coll. (1992b) montreront que l'IFN- $\gamma$  produit est en fait un composant clef de l'immunité protectrice observée puisque celle-ci s'avèrera être très réduite chez les animaux ayant reçu des injections d'anticorps neutralisant l'activité biologique de cette cytokine. Par contre, les neutralisations des cytokines IL-4 et IL-5, bien qu'induisant respectivement une abrogation de la faible réponse IgE et une carence périphérique et tissulaire en éosinophiles, seront sans conséquences sur la résistance à l'infection (Sher, A. et coll. 1990a)

Deux mécanismes pourraient expliquer le rôle protecteur de l'IFN- $\gamma$ . Il s'agit :

-1) de la destruction des schistosomules par les macrophages ou/et par les cellules endothéliales : une telle hypothèse s'appuyant sur l'observation que ce type de cytotoxicité

cellulaire est inductible *in vitro* par l'IFN- $\gamma$  (James, S. L. et coll. 1984 - James, S.L. et coll. 1993 - Pearce, E. J. 1993).

-2) du blocage purement mécanique de la migration des larves de réinfestation hors du poumon : cette hypothèse s'appuyant sur l'observation que :

a) L'IFN- $\gamma$  est connu comme un médiateur de la réaction inflammatoire.

b) d'intenses réactions inflammatoires cellulaires sont mises en évidence autour des larves des stades peau (Ward, R. M. et coll. 1988) ou poumon (Smythies, L. E. et coll. 1992).

et que c) de nombreux schistosomes présents dans les poumons sont capables de poursuivre leur développement si on les extrait chirurgicalement de leur impasse (Coulson, P. S. et coll. 1988).

Remarque : De façon tout à fait intéressante, Caulada-Benedetti, Z. et coll. (1991) ont toutefois remarqué que lorsque les souris étaient exposées de façon répétée aux cercaires irradiées (3 à 4 expositions), la réponse immune qui se développait devenait à la fois Th1 et Th2 et se traduisait par une augmentation de la réponse humorale. La protection de ces animaux contre une infection d'épreuve (protection identique ou légèrement supérieure à celle des animaux n'ayant subi qu'une seule exposition) semblerait en fait dû à la fois à des mécanismes effecteurs dépendants d'IFN- $\gamma$  et à des mécanismes effecteurs dépendants d'anticorps (Caulada-Benedetti, Z. et coll. 1991 - Mangold, B. L. et coll. 1986). Les IgG1 seraient les seules immunoglobulines intervenantes (Delgado, V. et coll. 1990). Elles pourraient favoriser le recrutement des éosinophiles et des macrophages autour des schistosomules et par là même la séquestration et la destruction de ces larves (Ramalho-Pinto, F. J. et coll. 1979 - Delgado, V. et coll. 1990). Le potentiel de ces anticorps semble toutefois relativement faible puisque leur injection n'aboutit qu'à une réduction de la charge parasitaire de 30% (Delgado, V. et coll. 1990).

### C) Immunopathologie de la schistosomiase murine.

Comme nous l'avons précédemment décrit, le schistosome ne se multiplie pas chez son hôte et la pathologie de la bilharziose est en fait due à la fibrose (hépatique ou/et intestinale) qui accompagne la réaction granulomateuse développée par l'hôte autour des oeufs qui n'ont pu être évacués. Le nombre d'oeufs pondus étant en partie proportionnel au nombre de parasites infectants (Dessein, A. et coll. 1992), l'Organisation Mondiale de la Santé considère donc qu'une préparation vaccinale capable d'induire une réduction de la charge vermineuse de 50 à 60% permettrait d'alléger considérablement la souffrance des individus vivant en zone d'endémie à la seule condition qu'elle ne s'accompagne pas d'une exacerbation des réactions immunopathologiques liées aux oeufs pondus par les quelques couples survivants. De façon inverse, une stratégie vaccinale capable d'induire, outre une

diminution de la charge parasitaire, une réduction de ces manifestations pathologiques serait fortement sollicitée.

De nombreuses études ont donc été entreprises pour comprendre ce qu'était la réaction granulomateuse, pourquoi elle s'accompagnait d'une fibrose et comment ces 2 mécanismes étaient susceptibles d'être contrôlés.

### 1°) Qu'est-ce que la réaction granulomateuse ?

Grâce aux travaux des années 1960-1980, il a été montré que :

- La réaction granulomateuse est une réaction inflammatoire induite par les sécrétions antigéniques du miracidium au travers des micropores de la coquille de l'oeuf (Stenger, R. J. et coll. 1967) et qui se caractérise par une accumulation de macrophages, de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles (Moore, D. L. et coll. 1977) et n'involue qu'avec la mort de l'embryon (mort naturelle ou mort par action cytotoxique des éosinophiles par exemple (James, S. L. et coll. 1976)).

- Une telle réaction inflammatoire peut être reproduite artificiellement dans le poumon de souris saines par injection, par voie intra-veineuse, d'oeufs vivants de schistosomes (blocage mécanique des oeufs dans cet organe). Etant donné que la vitesse d'apparition de cette réaction ainsi que son intensité, sont augmentées si les animaux reçoivent en parallèle des cellules spléniques d'animaux syngéniques immunisés par l'antigène d'oeuf mais pas s'ils reçoivent le sérum de ces animaux, la réaction granulomateuse est considérée comme une réaction inflammatoire à médiation cellulaire ou réaction d'HyperSensibilité Retardée (HSR) (Warren, K. S. et coll. 1967).

- La réaction granulomateuse est, comme toutes les HSR, médiée par les cellules T. La preuve directe étant que les souris nues (souris dépourvues de cellules T matures) ne développent pas de granulomes lors de l'infection par *S.mansoni* (Byram, J. E. et coll. 1977).

- Le granulome permet la séquestration des toxines miracidiales et est en ce sens bénéfique pour l'hôte. En effet, les souris nues, mais pas les souris euthymiques, présentent de sévères nécroses du parenchyme hépatique dues à la diffusion des toxines sécrétées par le miracidium et leur taux de mortalité est plus élevé (Byram, J. E. et coll. 1977 - Phillips, S. M. et coll. 1986) . Un phénomène analogue se produit aussi chez les souris SCID (souris dépourvues de cellules T et B fonctionnelles) (Amiri, P. et coll. 1992).

### 2°) Pourquoi la réaction granulomateuse s'accompagne-t-elle d'une fibrose ?

La fibrose apparait actuellement comme un processus dépendant de la réaction granulomateuse pour la raison suivante : Les granulomes de souris euthymiques mais pas les

"abcess-like" (petits amas de monocytes immatures) des souris athymiques produisent spontanément des facteurs capables de stimuler la prolifération des fibroblastes ainsi que la synthèse de collagène *in vitro* (Prakash, S. et coll. 1990).

### 3°) Mécanismes contrôlant la réaction granulomateuse et la fibrose : Analyse des processus impliqués lors de l'infection.

#### a) Démonstration d'un phénomène d'immunomodulation spontanée.

En 1966, Warren, K.S. observe une amélioration de la physiopathologie des animaux lorsque l'infection devient chronique (16-20<sup>ème</sup> semaine d'infection).

Grâce aux travaux de Domingo, E. O. (1968) et de Boros, D. L. et coll. (1975), il sera en fait montré que l'intensité de la réaction granulomateuse induite par les oeufs pondus tardivement au cours de l'infection (phase chronique) est considérablement inférieure à celle induite par les premiers oeufs émis par les couples de vers (oeufs émis entre la 6<sup>ème</sup> (début de la ponte) et la 12<sup>ème</sup> semaine d'infection). El Meneza, S. et coll. (1989) qui étudieront la fibrose hépatique au cours de l'infection observeront de plus que la quantité de collagène est aussi très diminuée lors de la phase chronique de l'infection.

L'ensemble de ces résultats suggérait donc que la souris module spontanément l'ampleur de sa réaction inflammatoire et l'ampleur de la fibrogénèse et définissait ainsi la réaction granulomateuse comme un phénomène bénéfique si il est correctement régulé.

Les recherches qui furent entreprises par la suite eurent ainsi pour objectif de déterminer les modes d'induction et de modulation de la réaction granulomateuse et de la fibrose au cours de l'infection.

#### b) Mécanismes contrôlant l'induction de la réaction granulomateuse et de la fibrose : Rôle des lymphocytes T CD4+

En injectant à des souris infectées depuis 8 semaines soit des Ac anti-CD4<sup>+</sup> soit des Ac anti-CD8<sup>+</sup>, Mathew, R. C. et coll. (1986) observent que seul le premier traitement induit une réduction (réduction même impressionnante) de la taille des granulomes et de la quantité de collagène hépatique suggérant ainsi que seuls les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont impliqués dans le développement de la réaction granulomateuse et de la fibrose.

#### α) Sous-populations impliquées :

Afin de déterminer le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la pathologie associée à la bilharziose, il s'avérait tout d'abord essentiel de déterminer la nature de la réponse cellulaire

induite par l'infection.

Grâce aux travaux de Grzych, J. M. et coll. (1991) et de Sher, A. et coll. (1991), on saura ainsi que :

1/ Avant la ponte, la réponse immune (élicitée par les schistosomes) est de type Th1 puisque productrice d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  mais pas/peu d'IL-4, d'IL-5 ou d'IL-10.

2/ Après la ponte, cette réponse décline brutalement en raison de l'apparition d'une réponse immune anti-oeuf de phénotype Th2 sécrétrice d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 mais/peu d'IL-2 ni d'IFN- $\gamma$  (L'IL-10 serait la cytokine responsable de la diminution de la réponse Th1 anti-schistosome).

3/ La réponse Th2 anti-oeuf atteint un pic à la 8ème semaine d'infection (c'est-à-dire lorsque l'intensité de la réaction granulomateuse est maximale) puis diminue graduellement parallèlement à la diminution des symptômes immunopathologiques (Grzych, J. M. et coll 1991).

Ces résultats supposaient ainsi l'implication des lymphokines de type Th2 et la non implication des lymphokines de type Th1 dans le développement de la réaction granulomateuse. Toutefois, et comme nous allons le voir, la réaction granulomateuse ne semble pas aussi simple que cela.

#### *$\beta$ ) Cytokines nécessaires au développement de la réaction granulomateuse :*

Grâce à des expériences de neutralisation de cytokines par injection d'anticorps monoclonaux spécifiques, il sera en effet montré que la neutralisation de l'IL-2 (Cheever, A. W. et coll. 1992) ou de l'IL-4 (Yamashita, T. et coll. 1992 - Chensue, S. W. et coll. 1992) induit une très forte diminution de la taille des granulomes qui se traduit par une réduction du nombre d'éosinophiles, de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles autour des oeufs suggérant ainsi que ces 2 cytokines sont nécessaires au recrutement des différents types cellulaires composant le granulome. Etant donné que la neutralisation de l'IL-2 induit une forte diminution de la synthèse d'IL-4 par les cellules T des granulomes sans diminuer la production d'IL-2 ou d'IFN- $\gamma$ , il est actuellement suspecté que le rôle de l'IL-2 dans le développement de la réaction granulomateuse soit de permettre l'expression de la réponse Th2 ou tout au moins de certaines de ses composantes (Wynn, T. A et coll. 1993).

Notons que la neutralisation de l'IL-5 qui aboutit à une diminution de presque 100% de la quantité d'éosinophiles intra-granulomes, n'induit pas de diminution significative de la taille des granulomes (Sher, A. et coll. 1990b) et que la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  n'induit ni modification majeure de la composition ni modification de la taille des granulomes (Sher, A. et coll. 1990b - Chensue, S.W. et coll. 1992).

Enfin, soulignons aussi que, bien que des expériences de neutralisation du TNF- $\alpha$

(cytokine qui peut être produite par les lymphocytes Th1, Th2, et par les cellules B et les macrophages activés) n'aient pas encore été effectuées, les travaux de Amiri, P. et coll. (1992) suggèrent fortement que cette cytokine soit tout comme l'IL-2 et l'IL-4 un intervenant clef du développement de la réaction granulomateuse. En effet, ces auteurs montrent que l'injection de TNF- $\alpha$  à des souris SCID permet le développement d'une réaction inflammatoire qui se traduit par l'accumulation de macrophages et de neutrophiles autour des oeufs bloqués dans les tissus.

*$\gamma$  Cytokines nécessaires au développement de la fibrose :*

Toujours par système de neutralisation sélective de cytokines *in vivo*, il a pu être montré que :

1) L'IL-5 n'est pas nécessaire au développement de la fibrose (Sher, A. et coll. 1990b).

2) La neutralisation de l'IFN- $\gamma$  induit une augmentation de la quantité de collagène hépatique (Pancré, V. et coll. 1993) suggérant ainsi que cette cytokine freine la fibrogenèse au cours de la schistosomiase. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de la littérature stipulant que *in vitro* l'IFN- $\gamma$  inhibe la synthèse fibroblastique de collagène au niveau transcriptionnel (Czaja, M. J. et coll. 1987). Ainsi et étant donné que l'injection d'IFN- $\gamma$  recombinant à des souris en phase aiguë de schistosomiase induit une réduction considérable de la fibrogénèse (Czaja, M. J. et coll. 1989a), certains immunologistes pensent que la réponse Th2 anti-oeuf qui inhibe la production d'IFN- $\gamma$ , est négative pour l'hôte.

-3) La neutralisation de l'IL-2 induit une forte réduction de la fibrose (Cheever, A. W. et coll. 1992). Etant donné que l'IL-2 est en elle même incapable d'activer les fibroblastes *in vitro* (Kovacs, E. J. et coll. 1991), on pense que cette cytokine agit en stimulant la production de molécules à pouvoir fibrogénique comme le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou/et le PDGF. Les arguments supportant ces spéculations étant que :

- la production macrophagique de ces cytokines hautement fibrogéniques est induisible *in vitro* par l'IL-2 (Kovacs, E. J. 1991).

- la production de TGF- $\beta$  est fortement augmentée lors de la phase aiguë de la schistosomiase (Czaja, M. J. et coll. 1989b).

- l'injection de TNF- $\alpha$  recombinant à des souris SCID induit l'apparition d'une réponse granulomateuse avec dépôt de collagène (Amiri, P. et coll. 1992).

Toutefois, il apparait aussi possible que l'IL-2 stimule la production de F $\alpha$ F-1, molécule hautement fibrogénique produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des granulomes (Prakash, S. et coll. 1992).

**NB :** Le rôle de l'IL-4 sur la fibrose n'a pas, à notre connaissance, encore été

étudié.

c) Mécanismes contrôlant la modulation de la réaction granulomateuse.

Comme le montrent les résultats de Grzych, J. M. et coll. (1991) (voir paragraphe précédent (I.C.3.a)), et ceux de Henderson, G. S. et coll. (1992), de Flores Villaneuva, P. O. et coll. (1993), de Mathew, R. C. et coll. (1990), de Chensue, S. W. et coll. (1992) et de Lukacs, N. W. et coll. (1993), le passage de la phase aiguë de l'infection à celui de la phase chronique semble se traduire par une diminution de la synthèse de toutes les cytokines produites au cours de la réaction granulomateuse puisque parmi toutes celles dont l'intervention est connue (IL-4, IL-5, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1, MIP-1 $\alpha$  (cytokine produite par les macrophages activés, qui stimule aussi le recrutement cellulaire)), aucune n'échappe à cette observation.

Etant donné que d'une part, l'IL-2 apparaît être le chef d'orchestre de la cascade d'interactions cellules - cytokines qui caractérise la réaction granulomateuse et que d'autre part l'injection d'IL-2 recombinante à des souris en phase chronique de bilharziose induit la restauration du profil granulomateux caractéristique de la phase aiguë (Mathew, R. C. et coll. 1990), la diminution de la production de cette interleukine lors de la phase chronique pourrait être responsable de la suppression observée.

Bien que les mécanismes à l'origine de cette suppression restent remarquablement peu clairs, on sait toutefois que plusieurs populations cellulaires sont ou peuvent être impliquées.

*$\alpha$ ) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>:*

Il semble que les cellules T CD8<sup>+</sup> (ou tout au moins une de leur sous-population : les cellules T CD8<sup>+</sup> dites suppressives) soient capables de faire diminuer la production d'IL-2 (Chensue, S. W. et coll. 1993). Cette diminution pourrait donc expliquer pourquoi *in vivo*, lors de la phase chronique, la déplétion de ces cellules induit une augmentation de la taille des granulomes (Chensue, S. W. et coll. 1993 - Ragheb, S. et coll. 1989).

Toutefois, si aucun travail ne contredit ces résultats, il est intéressant de noter qu'une certaine confusion existe quant au moment où la fonction suppressive (impact sur l'intensité de la réaction granulomateuse) des cellules T CD8<sup>+</sup> prend place. En effet, pour Chensue, S. W. et coll. (1993) celle-ci semblerait s'opérer dès la phase aiguë tandis que pour Ragheb, S. et coll. (1989) et Mathew, R. C. et coll. (1986), elle ne démarrerait que lors de la phase chronique.

D'après Perrin, P. J. et coll. (1988, 1989a, 1989b), les cellules T CD8<sup>+</sup> des granulomes de phase chronique mais pas ceux de phase aiguë produiraient des facteurs suppresseurs portant une spécificité de reconnaissance pour l'antigène d'oeuf, pour le

récepteur T et pour l'haplotype de l'animal chez lequel ils ont été produits.

*β) Implication potentielle des cellules T CD4<sup>+</sup> :*

D'après Fidel, P. L. et coll. (1991), les cellules T CD4<sup>+</sup> pourraient aussi intervenir pour freiner la réaction granulomateuse. En effet, ces cellules produisent, après stimulation *in vitro* par l'antigène d'oeuf, des facteurs solubles capables d'inhiber la production d'IL-2. De façon intéressante, ces facteurs qui portent une spécificité pour l'antigène d'oeuf et pour des Ac anti-oeufs mais qui se sont génétiquement pas restreints seraient synthétisés dès la phase aiguë de la schistosomiase.

*γ) Implication des cellules B :*

Les cellules B semblent intervenir dans la régulation de la réaction granulomateuse lors de la phase chronique de la schistosomiase puisque chez les animaux dépourvus de cellules B par traitement avec des anticorps anti-μ à la naissance, il n'y a pas de modulation de l'intensité de cette réaction inflammatoire. La déplétion de ces cellules lors de la phase aiguë n'a par contre aucun impact (Cheever, A. W. et coll. 1985).

Etant donné que la synthèse d'anticorps par les plasmocytes des granulomes de phase aiguë est faible et limitée aux isotypes G1 et M tandis que lors de la phase aiguë cette production augmente fortement et que d'autres isotypes apparaissent (A, G2a, G2b et G3), il est suspecté que l'action suppressive des cellules B soit liée à leur aptitude à produire ces anticorps (Boros, D. L. et coll. 1982).

Aucune étude n'a par contre encore été réalisée pour définir si ces anticorps ou ces cellules pouvaient interférer avec la production d'IL-2.

*δ) L'anergie des lymphocytes Th1 :*

En cumulant les travaux réalisés par son équipe (Stadecker, M. J. et coll. 1990 - Stadecker, M. J. 1992 - Flores Villanueva, P. O. et coll. 1993) avec ceux d'équipes travaillant dans le domaine de l'immunologie fondamentale (Ding, L. et coll. 1992 - Harding, F. A. et coll. 1992 - Ding, L. et coll. 1993), le Professeur M. J. Stadecker formule actuellement l'hypothèse que la diminution de l'intensité de la réaction granulomateuse lors de la phase chronique pourrait être due, au moins en partie, à la mise en place lors de la phase aiguë de l'infection d'un système visant à anergiser les lymphocytes Th1 selon le schéma qui suit :

Lors de la phase aiguë :

1/ L'IL-10 produite par les lymphocytes Th2 induirait une diminution de l'expression de la molécule B7 à la surface des macrophages activés contenus dans les

granulomes.

2/ Etant donné que la molécule B7 est indispensable à l'activation spécifique des lymphocytes Th1 (cette molécule interagit avec une molécule transductrice de signaux sur la cellule T), la diminution de son expression, rendrait le macrophage incapable de stimuler correctement le lymphocyte Th1 du granulome qui deviendrait anergique. En d'autres termes, le lymphocyte serait alors incapable de proliférer spécifiquement face au macrophage présentateur de l'antigène et par la suite deviendrait aussi réfractaire à une stimulation classique (antigène + cellules présentatrices d'antigènes "normales" (B7<sup>+</sup>)).

Donc, lors de la phase chronique, les lymphocytes Th1 étant quasiment devenus incapables de proliférer et de produire des cytokines, il n'y aurait plus que très peu de recrutement de cellules autour des oeufs nouvellement pondus d'où la formation de granulomes bien plus petits qu'en phase aiguë.

Ce phénomène d'anergie permettrait d'expliquer pourquoi l'injection d'IL-2 en phase chronique de schistosomiase induit une augmentation de la taille des granulomes (en effet, on sait que l'IL-2 peut réverser l'anergie (Jenkins, M.K. et coll. 1987)).

#### d) Mécanismes contrôlant la modulation de la fibrose.

Etant donné que les surnageants de culture de granulomes issus de souris en phase chronique d'infection contiennent beaucoup moins de facteurs fibrogéniques que ceux de phase aiguë (Prakash, S. et coll. 1991), il apparaît probable que la réduction de la fibrose soit due à la modulation de la réaction granulomateuse. La diminution de la production d'IL-2 pourrait expliquer la diminution de la synthèse des protéines matricielles fibroblastiques.

Toutefois, on observe aussi une résorption de la fibrose par action de collagénases. Bien que celles-ci ne soient pas produites en plus forte quantités lors de la phase chronique de l'infection (Takahashi, S. et coll. 1980), elles pourraient être plus efficaces à cette période en raison d'une commutation dans la production des collagènes : il y a en effet passage de la synthèse d'un collagène de type I à celle d'un collagène de type III plus facilement dégradable (El Meneza, S. et coll. 1989).

## II. Mécanismes d'échappement du parasite.

Qu'ils soient décrits chez la souris, chez le rat ou même chez l'homme, les mécanismes d'échappement mis en place par le parasite pour échapper à la réponse immune de l'hôte apparaissent remarquablement ingénieux. Ils permettent sûrement d'expliquer pourquoi la schistosomiase persiste depuis au moins 1550 ans avant J.C. Ces mécanismes sont les suivants :

-1) Quelques jours après la pénétration cutanée, des modifications du tégument du schistosomule apparaissent : il y a remplacement de déterminants antigéniques par d'autres créant ainsi un leurre pour les mécanismes effecteurs spécifiques (Torpier, G. et coll. 1977). Par ailleurs, le parasite agglutine à sa surface des molécules de l'hôte (exemple : alpha 2-macroglobuline, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et des groupes sanguins ABO (Torpier, G. et coll. 1979) qui lui permettent de masquer ses antigènes de surface. L'hôte ne produit ainsi que peu d'anticorps contre la surface tégumentaire du schistosome (Lewis, S.A. et coll. 1991).

-2) Le parasite libère un facteur capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et B (Dessaint, J.P. et coll. 1977). Ce facteur appelé "Schistosome Derived Inhibitory Factor" ou "SDIF" peut aussi inhiber la réponse IgE et la dégranulation mastocytaire dont la conséquence est la diminution de l'activation des éosinophiles (Mazingue, C. et coll. 1980).

-3) Certaines enzymes parasitaires (sérine protéases et métalloprotéases) peuvent hydrolyser les IgG fixées à la surface du schistosomule (Auriault, C. et coll. 1981). De plus, les peptides résultant de ce "découpage" présentent une activité inhibitrice importante de l'activité des macrophages (Auriault, C. et coll. 1980). En effet, ils diminuent fortement la cytotoxicité dépendante d'IgE des macrophages 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 infectées par *S.mansoni* se traduit par une diminution importante de la formation des granulomes (Himmi, E. H. et coll. 1985).

-4) Le parasite induit la production d'anticorps bloquants. Ces anticorps sont d'isotype IgG2c chez le rat. Ils bloquent une des fonctions effectrices des éosinophiles (celle dépendante des IgG2a) en se fixant au récepteur pour le fragment Fc des IgG2a sur l'éosinophile ou en se fixant aux antigènes qui auraient pu être reconnus par les IgG2a (Grzych, J. M. et coll. 1984).

-5) Enfin, il est très intéressant de constater que :

a) le schistosome utilise une molécule du système immunitaire de l'hôte : le TNF- $\alpha$ , comme stimulus de reproduction et d'embryogénèse (Amiri, P. et coll. 1992).

b) Les souris qui ne développent pas de réaction granulomateuse (Souris nues et souris SCID) excrètent considérablement moins d'oeufs que les souris normales (Doenhoff, et coll. 1978 - Amiri, P. et coll. 1992). La réaction granulomateuse semble donc faciliter la migration des oeufs au travers des tissus dont la paroi intestinale. Elle apparaît donc comme une réponse immune suscitée par l'oeuf et bénéfique à la transmission du cycle parasitaire.

### **III. La réponse immune dirigée contre *S.mansoni* chez l'homme.**

#### **A) Mécanismes effecteurs potentiels.**

### 1°) Mécanismes dépendants d'anticorps.

Des macrophages, des plaquettes et des éosinophiles provenant du sang périphérique d'humains "sains" sont cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules *in vitro* s'ils sont incubés avec des anticorps spécifiques d'isotype IgE (anticorps provenant de patients infectés) (Joseph, M. et coll. 1978 - Capron, A. et coll. 1980 - Soussi Gounni, A. et coll. 1994). D'autre part, un mécanisme larvicide d'ADCC impliquant éosinophiles et anticorps d'isotypes IgG1 et IgG3 (Ac anaphylactiques) (Khalife, J. et coll. 1989) est aussi démontrable *in vitro*. Les mécanismes de cette cytotoxicité semblent identiques à ceux décrits chez le rat.

Des anticorps bloquants ont aussi été mis en évidence : Il s'agit des IgM, des IgG2 et des IgG4 (Khalife, J. et coll. 1986 - Khalife, J. et coll. 1989).

### 2°) Mécanismes dépendants de lymphokines.

Comme démontré chez la souris, l'IFN- $\gamma$  est capable d'induire la cytotoxicité des macrophages vis-à-vis des schistosomules *in vitro* (Cottrell, B. et coll. 1989).

- Les plaquettes sont cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules en présence d'IFN- $\gamma$ , d'IL-6, de TNF- $\beta$  ou de TNF- $\alpha$  (Pancré, V. et coll. 1987 - Damonville, M. et coll. 1988 - Pancré, V. et coll. 1990).

- L'activité ADCC de l'éosinophile est augmentée par le TNF- $\alpha$  (Silberteïn, D. S. et coll. 1986).

## B) Données épidémiologiques.

### 1°) L'immunité à la réinfection.

Au cours d'une étude réalisée au Kenya dans la région de Machakos (zone d'endémie à *S.mansoni*), Butterworth, A. E. et coll. (1985) montrent que, pour des fréquences égales d'exposition au parasite, les enfants âgés de plus de 13 ans sont beaucoup plus résistants à la réinfection après traitement chimiothérapeutique que les enfants plus jeunes. Ainsi, ces résultats suggèrent l'acquisition d'une résistance à l'infection avec l'âge. Des observations identiques seront obtenues en Gambie dans le cas de l'infection par *S.haematobium* (Hagan, P. 1985). Toutefois, comme ce phénomène a aussi été observé chez des adultes récemment installés en zone d'endémie (Kloetzl, K. 1967), il a été suggéré que l'acquisition de cette résistance ne dépendait pas de l'âge proprement dit mais nécessitait plutôt une exposition prolongée au parasite et de multiples réinfections. Une très récente étude épidémiologique menée dans une zone où la bilharziose vient de s'installer (région de St Louis au Sénégal) montre cependant que le nombre d'oeufs excrétés par grammes de

selles est plus élevé chez les enfants que les adultes (Renom, G. 1992). Etant donné que ces populations sont toutes non immunes au départ, ceci montre qu'une influence directe de l'âge sur l'immunité à la réinfection est quand même possible.

Deux autres paramètres semblent par ailleurs aussi profondément influencer l'acquisition de cette immunité. Il s'agit :

-1) du statut génétique du patient : Dessein, A. et coll.(1992) décrivent en effet que certaines familles développent aisément une immunité à la réinfection alors que d'autres non. Un gène à expression co-dominante serait responsable de cette dichotomie.

-2) de l'intensité de l'infection primaire. Plus celle-ci serait lourde, moins le patient deviendrait immun (Dessein, A. et coll. 1992).

## 2°) Corrélations entre l'immunité à la réinfection et la présence de certains isotypes d'anticorps.

### a) Isotypes effecteurs.

En Gambie, dans une population humaine infectée par *S.haematobium*, Hagan, P. et coll. (1991) ont démontré que l'acquisition de l'immunité à la réinfection est corrélée avec le développement d'une réponse IgE dirigée contre les antigènes du ver adulte. Des résultats similaires ont ensuite été obtenus sur des populations kenyanes (Dunne, D. W. et coll. 1992) et brésiliennes (Rihet, P. et coll. 1991) infectées par *S. mansoni*. Aucun autre isotype d'anticorps anti-extrait antigénique total de vers adulte ne permet d'établir de corrélations positives. Toutefois, les travaux de Grzych, J. M. et coll. (1993) montrent clairement que des anticorps d'isotype IgA spécifiques d'une glutathion-S-transférase de *S.mansoni* de 28kDa sont significativement plus élevés chez les individus immuns.

### b) Isotypes bloquants.

En 1986, Khalife, J. et coll. ont démontré qu'il existait une corrélation négative entre l'immunité à la réinfection et le taux d'IgM dirigés contre une glycoprotéine de *S.mansoni* de 38kDa. Par la suite, Butterworth, A. E. et coll. (1988) observeront que les jeunes enfants, mais pas les adolescents ni les adultes, produisent beaucoup d'anticorps d'isotypes IgG2 et IgM. Ces anticorps qui reconnaissent surtout des déterminants glycaniques communs aux stades oeuf et schistosomule du parasite seraient donc des marqueurs de susceptibilité à la réinfection. Des anticorps d'isotype IgG4 partageraient aussi cette propriété (Hagan, P. et coll. 1991). Ces anticorps, surtout dirigés contre des structures protéiques (Butterworth, A. E. 1988), entreraient en compétition directe avec les IgE au niveau du site de reconnaissance de l'Ag (Rihet, P. et coll. 1992).

### 3°) Corrélations entre la pathologie, la réponse cellulaire T et le statut génétique des patients.

De nombreuses études montrent actuellement que les patients qui développent de sévères manifestations pathologiques (hépatosplénomégalie, ...) (10 à 15 % des individus en zone d'endémie ancienne) sont ceux qui ne modulent pas l'intensité de leur réaction inflammatoire lorsque l'infection devient chronique. En effet, au cours de tests lymphoprolifératifs *in vitro*, les lymphocytes de ces patients présentent une très forte réactivité face aux antigènes parasitaires et plus particulièrement face à l'antigène d'oeuf tandis que cette réactivité est très réduite chez les individus ne présentant pas de signes morbides (Colley, D. G. et coll. 1981 - Tweardy, D. J. et coll. 1983 - Hafez, M. et coll. 1991 - Wyler, D.J. 1992). Cette absence de modulation pourrait être liée à certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (Salam, E. A. et coll. 1979 - Hafez, M. et coll. 1991).

## UN CANDIDAT VACCINAL PROMETTEUR : LA SM28GST

---

Comme nous l'avons précédemment décrit, le schistosome ne se multiplie pas chez son hôte et la pathologie de la bilharziose est en fait due à la réponse immune développée par l'hôte autour des oeufs qui n'ont pu être évacués.

Une approche vaccinale peut donc faire appel à 3 stratégies :

- Eliminer les vers infestants avant qu'ils n'atteignent le stade adulte.
- Empêcher la ponte des parasites adultes.
- Empêcher les manifestations pathologiques liées au dépôt des oeufs.

Conséquence probable de la remarquable adaptation des schistosomes à leurs hôtes, aucune méthode expérimentale de vaccination n'a encore permis l'élimination complète des vers infestants (Pierce, R. J. et coll. 1993). C'est pourquoi le candidat vaccinal Sm28GST qui s'avère capable après injection à l'animal d'induire le développement d'une réponse immune permettant de réduire 1) la charge parasitaire, 2) la ponte des schistosomes et 3) les manifestations pathologique liées au dépôt des oeufs s'avère d'un intérêt tout particulier. Par ailleurs cette réponse immune étant aussi capable de réduire la capacité d'éclosion des oeufs, il est envisageable qu'un tel vaccin permette à plus ou moins long terme l'éradication de la transmission du cycle parasitaire.

Enfin, en raison de son caractère holoprotéique et de son activité glutathion-S-transférase, la Sm28GST est une molécule facilement produisible à grande échelle grâce aux techniques du génie génétique et facilement purifiable par chromatographie sur colonne de glutathion. Elle constitue donc à l'heure actuelle le candidat vaccinal le plus prometteur (Pierce, R. J. et coll. 1993) .

### I. Découverte de la Sm28GST.

Après avoir démontré que les mécanismes effecteurs dirigés contre *S.mansoni* chez le rat sont des mécanismes dépendants d'anticorps induits par des antigènes communs aux stades larve et adulte, l'équipe du professeur Capron décida de fractionner sur gel de polyacrylamide les antigènes de vers adultes, de les purifier par électroélution et de les injecter au rat afin d'identifier les antisérums capables d'immunoprécipiter à la fois le produit de marquage de surface du schistosomule, le produit de marquage métabolique du ver adulte et les produits de traduction *in vitro* des ARN messagers du schistosomule et du ver adulte.

Un seul antisérum dirigé contre une fraction moléculaire de 28kDa fut capable

d'immunoprécipiter ces quatre préparations antigéniques. Celui-ci s'avérant par ailleurs être très cytotoxique contre les schistosomules en présence d'éosinophiles *in vitro*, des rats et des souris furent immunisés avec la fraction 28kDa puis infestés. Des taux de protection (réduction de la charge parasitaire) de 70 % chez le rat et de 45% chez la souris furent obtenus, confirmant ainsi l'intérêt de la molécule (Balloul, J. M. et coll. 1987a).

Un clonage moléculaire fut donc entrepris et la séquence complète de la molécule fut obtenue en 1987 (Balloul, J. M. et coll. 1987b). Elle permet de supposer la nature enzymatique de l'antigène par comparaison aux séquences déjà décrites des GST humaines. Cette hypothèse fut d'ailleurs confirmée sur le plan biochimique grâce à l'activité enzymatique de la protéine recombinante en présence de divers substrats typiques des GSTs (Taylor, J. B. et coll. 1988). Toutefois et heureusement, l'homologie avec les GSTs du rat et de l'homme est faible et ne semble pas permettre de réactivités croisées : les sérums de rats immunisés par la Sm28-GST ne reconnaissent pas les GST humaines et de rat (Taylor, J. B. et coll. 1988).

## **II. Rôle des GSTs.**

### **A) Rôle des GSTs chez les mammifères.**

Chez les mammifères, les GSTs représentent des familles multigéniques qui sont connues comme :

1) des ligands aspécifiques de nombreux composés hydrophobes. Elles permettent ainsi d'une part le transport et l'évacuation de composés hydrophobes toxiques issus du métabolisme cellulaire et d'autre part le transport ou/et le stockage de composés non toxiques comme les hormones stéroïdiennes (Ketterer, B. 1988).

2) des enzymes qui jouent un rôle précieux dans les multiples processus de détoxification visant à désactiver les composés souvent hautement électrophiles produits par le métabolisme cellulaire (Pickett, C. B. et coll. 1989).

### **B) Rôle des GSTs chez les schistosomes.**

Il existe chez *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* et *S. bovis* deux molécules à activité GST de poids moléculaire légèrement distinct : 26 et 28 kDa (Taylor, J. B. et coll. 1988 - Trottein, F. et coll. 1989 - Trottein, F. et coll. 1992a - Gorrillot, I. 1990 - Smith, D. B. et coll. 1986 - Mc Nair, A. et coll. 1993).

La proportion de ces deux formes dépend de l'espèce de schistosome. Chez le ver adulte de *S. mansoni*, la forme 28kDa est 20 fois plus abondante que la forme 26 kDa. Chez *S. japonicum*, ces formes seraient représentées en proportions équivalentes (Trottein, F. 1992b - Smith, D. B. et coll. 1986).

Le rôle de ces GSTs est encore incomplètement élucidé. Toutefois, outre des rôles probablement comparables aux GST des mammifères, ces enzymes pourraient constituer à côté des superoxyde-dismutases (Simurda, M. C. et coll. 1988) et des glutathion-peroxydases (Williams, D. L. et coll. 1992), les seuls moyens de défense du parasite contre l'attaque oxydative liée à la réponse immune de l'hôte : libération de radicaux libres ( $O_2^-$  et  $H_2O_2$ ) par les plaquettes, les macrophages et les éosinophiles activés qui engendre via la formation de radicaux OH. la peroxydation lipidique de la membrane du ver et la formation de dérivés secondaires cytotoxiques. Chez *S.mansoni*, la GST de 28kDa (Sm28GST) semble intervenir en neutralisant les hydroperoxydes lipidiques (Taylor, J. B. et coll. 1988 ; Boulanger, D. 1991b) tandis que la GST de 26kDa interviendrait plus tardivement en neutralisant les dérivés secondaires aldéhydiques cytotoxiques (Trottein, F. 1992b).

### **III. Localisation de l'antigène Sm28GST.**

La Sm28GST n'est pas une protéine intégrale de membrane mais c'est un antigène transitoirement exprimé à la surface du parasite quel que soit son stade de développement (schistosomule, ver adulte ou miracidium). Des études de microscopie électronique montrent que cette molécule est trouvée dans le tégument, dans des cellules du parenchyme sous-tégumentaire et dans le système d'excrétion protonéphridien bien que pas au niveau des cellules flammes (cellules en contact avec la lumière de la protonéphridie). Elle n'est pas non plus présente au niveau de l'épithélium caecal ou des organes reproducteurs. Il est suggéré que la Sm28GST est exprimée à la surface du parasite lors de la formation de la structure multilamellaire du tégument qui est constamment régénéré (Taylor, J. B. et coll. 1988 - Holy, J. M. et coll. 1989).

### **IV. Mécanismes effecteurs impliqués dans la protection.**

#### **A) Réduction de la charge parasitaire.**

##### **1°) Chez le rat.**

Des rats ayant reçu deux ou même une seule injection de Sm28GST recombinante en présence d'adjuvant de Freund, d'hydroxyde d'alumine ou de BCG (ces 2 derniers adjuvants étant autorisables chez l'humain) présentent plus de 50% de réduction de la charge parasitaire (Balloul, J. M. et coll. 1987b - Grezel, D. et coll. 1993). La participation des anticorps dans cette protection est suggérée par l'observation qu'un transfert passif de sérum anti-Sm28GST avant infestation reproduit cette protection (Balloul, J.M. et coll. 1987a). Cette réponse humorale serait au moins en bonne partie dépendante des lymphocytes T (Auriault, A. et coll. 1987) et son rôle ne se limiterait pas à neutraliser l'activité enzymatique

de la molécule puisque :

-1/ l'injection d'anticorps ne neutralisant pas cette activité GST induit aussi une forte protection (Xu, C. B. et coll. 1991)

-2/ Des mécanismes effecteurs de type ADCC dirigés contre les schistosomules et impliquant d'une part plaquettes et IgE spécifiques et d'autre part éosinophiles et IgE ou IgG2a ou encore IgA spécifiques sont clairement mis en évidence *in vitro*. (Balloul, J. M. et coll. 1987a - Balloul, J. M. et coll. 1987b - Grezel, D. et coll. 1993).

### 2°) Chez la souris.

Des souris ayant reçu deux injections de Sm28GST recombinante en présence d'hydroxyde d'alumine avant infection présentent une réduction de la charge parasitaire d'environ 30% comparée aux souris contrôles (Grezel, D. 1992). Par ailleurs, le transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> de souris immunisées par la Sm28GST en présence d'adjuvant de Freund à des souris saines ultérieurement infectées réduit de moitié le nombre de vers. Des mécanismes effecteurs impliquant plaquettes et macrophages en présence de cytokines dont l'IFN- $\gamma$  semblent être à l'origine de cette immunité. La réponse humorale n'interviendrait pas dans ce protocole d'immunisation (Wolowczuk, I. et coll. 1989).

### 3°) Chez le babouin.

L'immunisation de babouins avec la Sm28GST permet l'obtention d'une protection pouvant atteindre 80 %. Cependant d'importantes variations individuelles sont notées et une moyenne de 40% de réduction de la charge parasitaire est enregistrée.

La réponse IgG anti-Sm28GST qui est développée par ces primates ne corrèle pas avec leur degré d'immunité. Par contre des mécanismes d'ADCC impliquant plaquettes, éosinophiles et facteurs sériques thermolabiles sont mis en évidence *in vitro* (Balloul, J. M. et coll. 1987c - Boulanger, D. et coll. 1991a). La protection apparaît donc être dépendante d'IgE.

### B) Réduction de la ponte des parasites.

En 1989, Wolowczuk, I. et coll. observent que le transfert passif d'un mélange de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> provenant de souris immunisées par la Sm28GST recombinante à des souris saines ultérieurement infectées n'induit pas de réduction de la charge parasitaire mais induit une forte diminution du nombre des oeufs hépatiques.

En 1991, Boulanger, D. et coll. montrent que deux injections de Sm28GST en présence de *Bordetella pertusis* chez le babouin n'induisent pas de réduction de la charge parasitaire mais induisent une forte diminution du nombre des oeufs hépatiques.

Ces résultats démontreraient ainsi que la réduction du nombre d'oeufs n'était pas due à une diminution du nombre de vers mais était un processus actif d'inhibition de la ponte des parasites.

Grâce aux nombreux travaux qui seront effectués pour comprendre les mécanismes à l'origine de cet effet anti-fécondité, il sera montré que :

- 1/ les sérums des animaux immunisés par la Sm28GST sont capables d'inhiber *in vitro* à 30% la ponte des schistosomes sans intervention de cellules effectrices (Boulanger, D. et coll. 1991 - Grezel, D. 1992).

-2/ seuls les anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la molécule ont un effet anti-fécondité qui se manifeste à la fois *in vitro* et *in vivo* (Xu, C. B. et coll. 1991 - Grzych, J. M. et coll. 1993).

-3/ seule la fraction IgA des sérums d'individus infectés est capable de neutraliser *in vitro* l'activité enzymatique de la Sm28GST et d'inhiber *in vitro* la ponte des vers (Grzych, J. M. et coll. 1993).

L'ensemble de ces résultats permet ainsi d'établir que l'activité enzymatique de la Sm28GST est essentielle à la reproduction du ver et que seuls les anticorps d'isotype IgA sont capables de la bloquer.

### C) Réduction de la viabilité des oeufs.

L'immunisation de souris ou de singes par la Sm28GST ou le transfert passif d'un anticorps monoclonal bloquant l'activité enzymatique de la molécule induit une réduction de la viabilité des oeufs pondus par les schistosomes à la fois *in vitro* et *in vivo*. (réduction d'environ 30%) (Boulanger, D. et coll. 1991a - Boulanger, D 1991b - Xu, C. B. et coll. 1991 - Grezel, D. 1992). Il semble que, là aussi, seule la fraction IgA des sérums anti-Sm28GST soit impliquée (Grzych, J. M. et coll. 1993).

### D) Réduction de la pathologie.

L'immunisation de souris ou de babouins par la Sm28GST induit une diminution de la taille des granulomes et de la fibrose hépatique (Boulanger, D. et coll. 1991b - Pancré, V. et coll. 1993 - Grezel, D. 1992). Deux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer ce phénomène :

-1/ L'intensité de la réaction granulomateuse et de la fibrose accompagnatrice serait réduite en raison de la diminution de la viabilité des oeufs : Le stimulus antigénique cessant rapidement, le recrutement des cellules inflammatoires et des fibroblastes s'en trouverait restreint.

-2/ L'IFN- $\gamma$  produit par les cellules T murines CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de la Sm28GST inhiberait activement la fibrogenèse (Pancré, V. et coll. 1993).

## **V. Reconnaissance de la Sm28GST par les individus vivant en zone d'endémie.**

### **A) Réponse humorale.**

En 1990, Auriault, C. et coll. montrent que parmi 129 enfants bilharziens kenyans âgés de 9 à 16 ans, 64 % d'entre eux ont des IgA anti-Sm28GST, 97% ont des IgE anti-Sm28GST et 47 % ont des IgG anti-Sm28GST. De façon intéressante, ces auteurs observeront aussi que les enfants se réinfectant fortement après le traitement chimiothérapeutique présentent beaucoup plus d'IgG4 et beaucoup moins d'IgG1 spécifiques de la molécule que ceux ne se réinfectant pas ou peu. Par contre, aucune différence dans les taux d'IgG3, d'IgE ou d'IgA ne fut observée.

Au cours d'une seconde étude épidémiologique portant sur des individus âgés de 6 à 66 ans, Grzych, J. M. et coll. (1993) montreront quant à eux que le taux d'IgA anti-Sm28GST augmente avec l'âge, parallèlement à l'acquisition d'une immunité à la réinfection.

### **B) Réponse cellulaire.**

Au cours d'un stage d'études réalisé au Kenya dans une zone d'endémie à *S.mansoni*, Wolowczuk, I. (1991) montre que 77% des enfants infectés par *S. mansoni* ont parmi leurs lymphocytes périphériques des cellules spécifiques de l'antigène Sm28GST.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la Sm28GST est chez l'homme aussi, un antigène majeur.

## **VI. Epitopes T et B potentiellement impliqués dans le pouvoir protecteur de la Sm28GST.**

Une recherche des épitopes T et B de la Sm28GST fut entreprise à partir de 1987, son objectif étant d'arriver à une compréhension moléculaire des mécanismes impliqués dans la protection, voire d'arriver à définir un vaccin purement synthétique.

L'approche suivante fut entreprise :

### **A) Prédiction des épitopes T et B de la Sm28GST.**

#### **1°) Prédiction des épitopes B.**

Basée sur la détermination mathématique des séquences peptidiques les plus hydrophiles, accessibles et mobiles de la Sm28GST grâce aux méthodes de calcul de Hopp,

T. P. et coll. (1981), de Janin, J. (1979) et de Ponnuswamy, P. K. et coll. (1984), cette approche aboutit à définir les séquences peptidiques 24-43, 65-86, 87-111, 115-131, 140-153, 158-175 et 190-211 de la Sm28GST comme 7 épitopes B potentiels (figure 4).

## 2°) Prédiction des épitopes T.

A l'époque, les 7 séquences définies comme épitopes B potentiels ont été analysées pour leur capacité:

- d'une part à présenter une structure  $\alpha$ -hélicoïdale (Chou, P. Y. et coll. 1974) (structure montrée être présente chez de très nombreux épitopes T (Berzofsky, J. A. et coll. 1987))

et - d'autre part à posséder le motif suivant : Acide Aminé (AA) polaire suivi de 2 ou 3 AA non polaires puis terminé par un AA hydrophile : motif décrit par Rothbard, J. B. et coll (1988) comme fréquemment présent dans les épitopes T jusqu'alors découverts.

Quatre des peptides se sont avérés avoir une structure prédictive en  $\alpha$ -hélice. Il s'agit des séquences 65-86, 87-111, 115-131 et 158-175. Par contre, tous possèdent au moins un exemplaire du motif défini par Rothbard.

## B) Analyse de l'antigénicité des peptides sélectionnés.

### 1°) Etude dans les modèles expérimentaux.

#### a) Antigénicité T.

##### $\alpha$ ) Chez le rat :

Les 7 peptides ont été synthétisés par le laboratoire du Professeur Tartar et testés pour leur capacité à restimuler *in vitro* des lymphocytes T de rats immunisés par la Sm28GST : Aucun peptide ne s'est montré stimulant mais le couplage de tous ces peptides à une molécule porteuse (ovalbumine ou toxine tétanique) aboutit à définir les peptides 24-43 et 115-131 comme potentiellement porteurs d'un épitope T. En effet, dans ces conditions, les lymphocytes T prolifèrent face aux peptides couplés mais pas face à la toxine tétanique ou à l'ovalbumine. Une réponse faible mais significative fut aussi obtenue avec les peptides 140-153, 158-175, et 190-211 couplés mais pas avec les peptides 87-111 ou 65-86 couplés (Wolowczuk, I. et coll. 1990).

Par ailleurs, les peptides 115-131 et 24-43 s'avèrent capables de restimuler *in vitro* les lymphocytes T de rats infectés par *S.mansoni* (Wolowczuk, I. et coll. 1990) (les autres peptides n'ont pas été étudiés).

La séquence 24-43 de la Sm28GST contiendrait en fait 2 épitopes T, l'un en position N

**24-43** : NH<sub>2</sub>-Leu-Val-Ala-Ala-Gly-Val-Asp-Tyr-Glu-Asp-Glu-Arg-Ile-Ser-Phe-Gln-Asp-Trp-Pro-Lys-COOH

**65-86** : NH<sub>2</sub>-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** : NH<sub>2</sub>-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** : NH<sub>2</sub>-Lys-Pro-Gln-Glu-Glu-Lys-Glu-Lys-Ile-Thr-Lys-Glu-Ile-Leu-Asn-Gly-Lys-COOH

**140-153** : NH<sub>2</sub>-Cys-Glu-Ser-Leu-Lys-Gly-Ser-Thr-Gly-Lys-Leu-Ala-Val-Gly-COOH

**158-175** : NH<sub>2</sub>-Leu-Ala-Asp-Leu-Val-Leu-Ile-Ala-Val-Ile-Asp-His-Val-Thr-Asp-Leu-Asp-Lys-COOH

**190-211** : NH<sub>2</sub>-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Ser-Ser-Pro-Arg-Leu-Ala-Lys-Tyr-Leu-Ser-Asn-Arg-Pro-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Pro-Phe-COOH

**Figure 4 : Peptides dérivés de la Sm28GST prédits comme étant des épitopes B** (Auriault, C. et coll. 1991)

terminale et l'autre en position C terminale. Cette hypothèse découle de l'observation que les peptides synthétiques (couplés) comprenant les AA 10-36 ou 29-53 de la Sm28GST peuvent reproduire l'effet stimulant du peptide 24-43 couplé (Auriault, C. et coll. 1988).

*β) Chez la souris :*

Les peptides 115-131 et 24-43 couplés à une molécule porteuse (seuls peptides alors étudiés) sont capables de restimuler *in vitro* les lymphocytes T de souris immunisées par la Sm28GST et les lymphocytes T de souris infectées par *S.mansoni* depuis 8 ou 35 jours mais pas depuis 63 jours (période où l'intensité de la réaction granulomateuse est maximale). Aucune restimulation ne fut par contre obtenue avec les peptides non couplés (Wolowczuk, I. et coll. 1989 - Wolowczuk, I. et coll. 1990).

*b) Antigénicité B.*

*α) antigénicité B des peptides 115-131 et 24-43 :*

Les peptides 115-131 et 24-43 couplés ou non à une molécule porteuse sont reconnus par les IgG et par les IgA des sérums de souris ou de rats immunisés par la Sm28GST. Par ailleurs, des injections répétées de Sm28GST engendreraient aussi des IgE spécifiques de ces peptides chez le rat (Auriault, C. et coll. 1988 - Grezel, D. 1992).

*β) peptides reconnus par les anticorps inhibant l'activité enzymatique de la Sm28GST.*

Parmi les peptides 10-36, 29-53, 65-86, 87-111, 115-131, 140-153, 158-175 et 190-211, seuls les peptides 190-211 et 10-36 sont capables d'inhiber la reconnaissance de la Sm28GST par des Ac dirigés contre le site actif de l'enzyme. Par ailleurs le peptide 190-211 et dans une moindre mesure le peptide 10-36 peuvent aussi lever l'inhibition de l'activité enzymatique par ces anticorps (Xu, C. B. et coll. 1993 - Grezel, D. 1992).

Le site enzymatique de la Sm28-GST résulterait donc d'une association spatiale des séquences N et C-terminales de la molécule.

2°) Pertinence chez l'homme.

*a) Antigénicité T:*

Les études de terrain réalisées au Kenya dans une zone d'endémie à *S.mansoni* ont confirmé l'intérêt des peptides 115-131 et 24-43 puisque ces 2 peptides sous forme couplée

se sont avérés capables de restimuler les lymphocytes T périphériques d'environ 35 % des individus infectés (Wolowczuk, I. 1991). Toutefois, la séquence 190-211 de la Sm28GST (séquence faiblement antigénique chez le rat) s'est avérée la plus "réactive" en terme de nombre de répondeurs et en terme d'intensité de la réponse proliférative (Wolowczuk, I. 1991).

### b) Antigénicité B.

Deux études ont été réalisées pour analyser l'antigénicité B des différents peptides dérivés de la Sm28GST au cours de l'infection humaine.

La première concerne deux groupes de jeunes enfants (9 à 16 ans), l'un défini comme résistant à la réinfection après traitement chimiothérapeutique, l'autre considéré comme susceptible (Auriault, C. et coll. 1990). Elle montre que :

-1/ Les peptides 115-131 et 24-43 couplés ou non couplés peuvent être reconnus par les IgA, les IgE et les IgG4 des individus.

-2/ Le taux moyen d'IgG4 anti-115-131 mais pas celui d'IgG4 anti-24-43 est significativement plus élevé chez les populations fortement infectées que chez les populations à faible morbidité.

-3/ Les taux moyens d'IgA et d'IgE anti-115-131 et anti 24-43 sont identiques dans les 2 populations.

La seconde étude concerne quant à elle des individus âgés de 6 à 66 ans. Elle met en évidence une corrélation positive entre l'acquisition de l'immunité à la réinfection avec l'âge et le taux d'IgA anti-115-131, mais pas le taux d'IgA anti-24-43 ou anti-190-211 (Grzych, J. M. et coll. 1993).

L'ensemble de ces données pourrait donc signifier que l'épitope 115-131 induit chez les enfants une forte réponse IgG4 bloquant l'immunité protectrice et chez les adultes une forte réponse IgA protectrice via un mécanisme d'ADCC anti-schistosomule impliquant éosinophiles et IgA.

### C) Immunogénicité des peptides 115-131 et 24-43.

Dès les premiers résultats démontrant l'antigénicité des peptides 24-43 et 115-131 obtenus (Auriault, C. et coll. 1988), le groupe du Docteur C. Auriault envisagea l'élaboration d'une approche vaccinale peptidique.

En 1988, cette équipe montra ainsi plusieurs faits intéressants :

1/ Une injection de peptide 115-131 ou 24-43 en adjuvant de Freund suivie de deux injections de ces mêmes peptides sans ou avec adjuvant chez le rat Fischer n'induit pas de réponse IgG spécifique alors qu'une injection de peptide 115-131 ou 24-43 **couplé à une molécule porteuse** en présence d'adjuvant de Freund suivie de deux injections des

peptides non couplés aboutit à une forte production d'IgG spécifiques des peptides utilisés et par ailleurs capables de reconnaître la Sm28GST recombinante et la Sm28GST native.

2/ Dans ce dernier protocole, les sérums sont cytotoxiques en présence d'éosinophiles vis-à-vis de la larve de *S.mansoni in vitro*.

3/ Enfin, toujours dans ce dernier protocole, les lymphocytes T des animaux sont capables de proliférer *in vitro* en présence des peptides couplés mais aussi en présence de la Sm28GST recombinante ou en présence d'extraits antigéniques totaux de vers adultes ou de schistosomules.

L'ensemble de ces résultats suggérait donc qu'une approche vaccinale peptidique était possible. Toutefois, d'une part en raison du caractère aléatoire de la fixation des peptides sur les molécules porteuses et donc par conséquent de **l'impossibilité de standardiser la production de ces conjugués** et d'autre part en raison de la probabilité de se trouver confronté à une suppression de la réponse anti-peptide chez les individus déjà immunisés contre la molécule porteuse (phénomène de **suppression épitopique** (Schutze, M.P. et coll. 1985 - DiJohn, D. et coll. 1989)), il était nécessaire d'envisager une autre méthode de présentation de ces peptides.

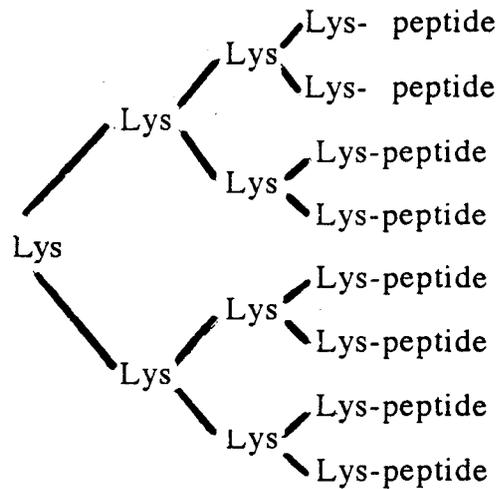
#### D) Constructions peptidiques particulières : Données de la littérature.

Si la nécessité de coupler nos peptides à une molécule porteuse constituait un frein au développement d'une approche vaccinale peptidique, nous n'étions pas les seuls dans ce cas. En effet, très rares étaient les peptides capables d'induire sous leur forme monomère une réponse immune. De nombreuses études avaient donc été entreprises pour trouver comment rendre un peptide immunogène. Trois approches ont ainsi été développées. Il s'agit de :

a) **l'homopolymérisation des peptides** par divers agents "liants" comme le glutaraldéhyde qui permet de relier les peptides via leurs groupements NH<sub>2</sub> créant ainsi une macromolécule immunogène capable de susciter des anticorps qui, de façon importante, peuvent reconnaître la molécule native (Jacob, C. O. et coll. 1985 - Borrás-Cuesta, F. et coll. 1988).

b) la **synthèse linéaire en tandem de plusieurs copies du peptide** : Grillot, D. et coll. (1990) montrent ainsi qu'il est possible de rendre des séquences de *Plasmodium yoelii* immunogéniques sans utilisation de molécule porteuse.

c) la **synthèse de plusieurs copies du peptide** (en général 8) autour d'un noyau polylysine :



Dans cette approche appelée par leurs inventeurs "**Multiple Antigenic Peptide (MAP) system**" (Posnett, D. N., et coll. 1988), plusieurs acides aminés lysines sont reliés entre eux via leur fonction COOH et leurs fonctions NH<sub>2</sub> présentes en positions C $\alpha$  et C $\epsilon$ . Les peptides sont ensuite liés à une des fonctions NH<sub>2</sub> des lysines via leur extrémité COOH. Grâce à cette construction, de très nombreux peptides ont été rendus immunogéniques. Les anticorps obtenus sont T-dépendants, ne sont pas dirigés contre le noyau polylysine et reconnaissent en général la protéine native (Posnett, D. N. et coll. 1988 - Tam, J.P. et coll. 1989a - Del Giudice, G. et coll. 1990 - Troalen, F. et coll. 1990 - Li, J. K. K. et coll. 1990 - Tam, J. P. et coll. 1990). Par ailleurs, un pouvoir protecteur de ces constructions contre une infection challenge expérimentale par l'agent pathogène *Plasmodium berghei* a aussi été décrit (Tam, J. P. et coll. 1990).

En raison de l'ensemble de ces résultats, nous avons donc décidé d'essayer ces méthodes et de les comparer afin de définir une approche vaccinale peptidique optimale. La séquence peptidique de la Sm28-GST qui a été utilisée pour cette étude est la séquence 115-131. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article qui suit.

# RESULTATS

# ANALYSE DE L'ANTIGENICITE ET DE L'IMMUNOGENICITE DE CINQ CONSTRUCTIONS CHIMIQUEMENT DEFINIES DU PEPTIDE 115-131 DE LA SM28GST DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

---

## I. Résumé de l'article.

La séquence 115-131 de la Sm28-GST de *Schistosoma mansoni* ayant été démontrée comme étant :

1/ reconnue par les sérums anti-Sm28-GST de rats ou de souris ainsi que par les sérums d'individus chroniquement infectés par le parasite.

2/ reconnue par les lymphocytes T de rats, de souris et d'individus infectés par *S.mansoni* mais ce uniquement lorsqu'elle est couplée à une molécule porteuse.

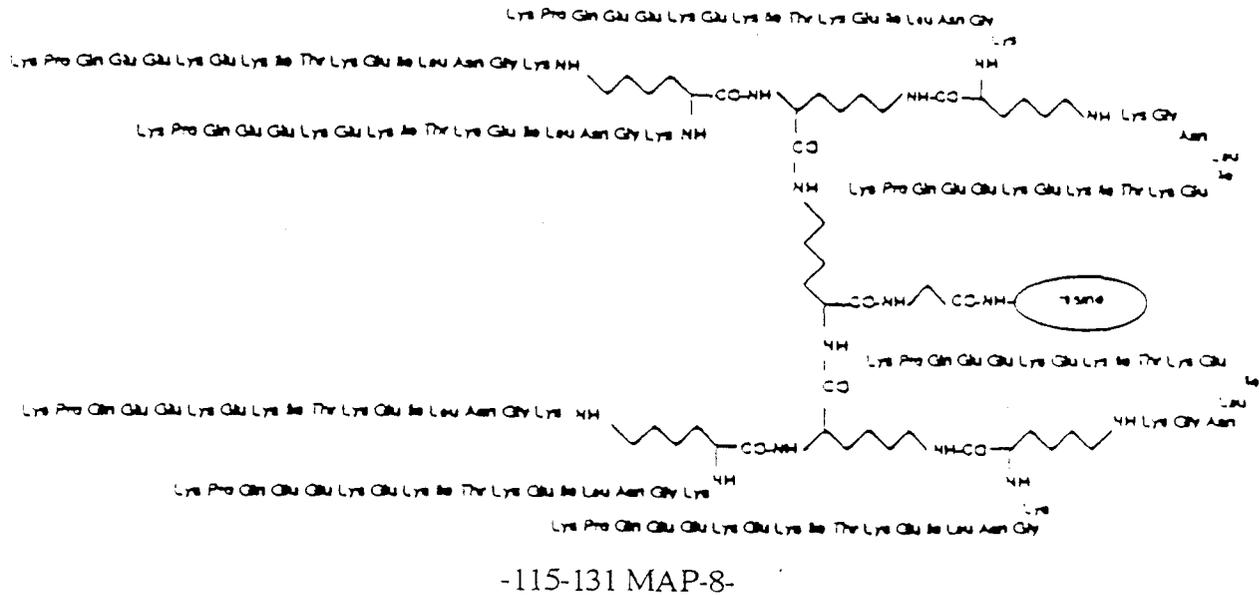
3/ capable d'induire après injection chez l'animal sous forme couplée à une molécule porteuse mais pas sous forme non couplée des anticorps anti-Sm28GST.

Elle apparaissait être un important déterminant antigénique de la Sm28-GST. Toutefois, la nécessité d'utiliser une molécule porteuse pour la rendre immunogène constituait un obstacle au développement d'une approche vaccinale purement peptidique.

Afin de pallier à cet inconvénient, les Docteur Auriault C. et Tartar A. ont décidé de synthétiser différentes constructions du peptide 115-131 n'utilisant pas de macromolécules porteuses. Celles-ci (**synthétisées par Marc Bossus**) sont les suivantes :

- Une construction faite de plusieurs copies du peptide 115-131 reliées entre elles par leurs extrémités NH<sub>2</sub> grâce à la glutaraldéhyde. Une quantité faible de glutaraldéhyde (1 équivalent) a été utilisée comparée aux nombres de groupements NH<sub>2</sub> disponibles (un en position C $\alpha$  et 5 en position C $\epsilon$  présents sur les lysines), cette démarche ayant pour but de limiter le nombre de chaînes latérales modifiées et ainsi de préserver les épitopes T et B contenus dans la séquence. Cette construction a été appelée "**polymère**".

- une construction faite de deux ("**MAP-2**") ou 8 ("**MAP-8**") copies du peptide 115-131 branchées sur un corps de polylysine via leurs extrémités COOH situées en position C $\alpha$ .



- une construction faite de trois exemplaires de la séquence 117-128 synthétisés en tandem. La raison ayant conduit à raccourcir la séquence 115-131 était de supprimer un résidu proline (position 116) et un résidu glycine (position 130) afin d'obtenir une configuration  $\alpha$ -hélicoïdale de l'ensemble. Cette construction a été appelée "**tandem**".

Le but de notre travail a consisté à déterminer si :

-1/ Ces constructions permettaient la conservation des épitopes T et B contenus dans la séquence 115-131. Pour cela, nous avons testé l'aptitude de ces différentes constructions à être reconnues par les IgG et par les lymphocytes T de rats Fischer immunisés par la Sm28GST.

-2/ L'injection de ces constructions à des rats Fischer induisait une réponse immunitaire spécifique de l'épitope 115-131 natif de la Sm28GST.

Le peptide 115-131 a été inclus dans cette étude comparative.

Les résultats obtenus sont les suivants :

### A) Antigénicité des constructions.

#### 1°) Antigénicité B.

Chacune des constructions est reconnue spécifiquement par les IgG anti-Sm28GST. Le test ELISA employé révèle toutefois que la sensibilisation des plaques par la construction MAP-8, et dans une moindre mesure par la construction MAP-2, induit la fixation d'une plus grande quantité d'anticorps spécifiques comparée aux formes polymère, tandem et peptide monomère qui ont dans ce test un comportement identique.

Afin de déterminer si ce résultat pouvait être dû, au moins en partie, à une meilleure

aptitude des formes MAP et plus particulièrement de la forme MAP-8 à se fixer au plastique des plaques de microtitration sans perturber la conformation du ou des épitopes B contenus dans la séquence 115-131, nous avons immunisé des rats Fischer par le peptide 115-131 monomère et analysé la réactivité de leurs sérums en sensibilisant des plaques de microtitration par la Sm28GST, par le peptide monomère et par la construction MAP-8. Conformément aux résultats de Auriault, C. et coll. (1988), aucun anticorps spécifique ne put être détecté en utilisant la Sm28GST ou le peptide simple comme agents sensibilisants des plaques. Par contre une détection spécifique d'anticorps fut possible chez deux rats sur neuf en utilisant la construction MAP-8. Ceci montre donc l'intérêt que présente la construction MAP-8 dans la détection d'anticorps anti 115-131. Ce point est particulièrement important dans l'objectif d'un suivi immuno-logique sur le terrain de patients qui seraient immunisés par la Sm28GST ou par certains de ses épitopes. En effet, puisque dans ces conditions, des dosages radio-immunologiques sont clairement non envisageables, il est possible qu'une technique ELISA utilisant cette structure octamérique puisse permettre une sensibilité de détection tout à fait acceptable.

## 2°) Antigénicité T.

Seule la construction MAP-8 permet la prolifération des lymphocytes T anti-Sm28GST *in vitro*. En effet, le polymère s'avère être un mitogène non spécifique tandis que les formes MAP-2, tandem et peptide simple ne sont pas antigéniques.

## B. Immunogénicité des constructions.

(En raison des résultats précédents, le polymère n'a pas été inclus dans cette étude.)

### 1°) Réponse cellulaire T.

Bien que les lymphocytes T des animaux immunisés par le peptide monomérique, le tandem, le MAP-2 ou le MAP-8 prolifèrent spécifiquement *in vitro* en présence de MAP-8, une réponse proliférative face à la Sm28-GST n'est observée qu'avec ces trois dernières constructions. L'amplitude de cette réponse est plus élevée en utilisant MAP-2 et MAP-8 (réponse identique après trois injections) comme immunogènes.

### 2°) Réponse IgG.

Le tandem, le MAP-2 et le MAP-8 induisent la production d'IgG reconnaissant la Sm28-GST. Le MAP-8 s'avère toutefois, en ce sens, être la construction la plus immunogène.

Par ailleurs, nous avons aussi montré que l'immunisation avec tandem, MAP-2 ou

MAP-8 induit la production d'IgG2a (anticorps effecteurs impliqués dans des mécanismes d'ADCC éosinophiles dépendants capables de détruire le schistosomule) et d'IgG2c (anticorps bloquant cette ADCC) et que la valeur du rapport IgG2a/IgG2c est indépendante de la construction.

**En conclusion, ce travail a donc permis de montrer qu'il est possible de rendre le peptide 115-131 immunogène sans utilisation de macromolécule porteuse. La construction MAP-8, qui est la plus antigénique, est aussi la plus immunogénique en terme de production d'IgG capables de reconnaître l'épitope contenu dans la séquence 115-131 de la Sm28GST et en terme de réactivité lymphocytaire T spécifique de la molécule.**

**Par ailleurs, nous montrons l'intérêt de la forme MAP-8 pour détecter des anticorps spécifiques du peptide.**

## ANALYSIS OF ANTIGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF FIVE DIFFERENT CHEMICALLY DEFINED CONSTRUCTS OF A PEPTIDE

MONIQUE MARGUERITE,\* MARC BOSSUS,† CHRISTINE MAZINGUE,\* ISABELLE WOLOWCZUK,\*  
HÉLÈNE GRAS-MASSE,† ANDRÉ TARTAR,† ANDRÉ CAPRON\* and CLAUDE AURIAULT\*

\*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, 1 rue due Professeur Calmette, 59019 Lille cédex, France and †Chimie des biomolécules, URA-CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

(First received 7 October 1991; accepted in revised form 31 October 1991)

**Abstract**—The aim of this study was to compare the antigenicity and the immunogenicity of five constructs of a peptide, including the peptide in single copy, a tandem repeat containing three copies, a copolymer with glutaraldehyde and two constructs based on the MAP (Multiple Antigenic Peptide) model, one containing two copies (MAP-2) and the other, eight copies of the peptide (MAP-8). The peptide used in this test was the 115–131 sequence derived from the rSm28-GST antigen of *Schistosoma mansoni*.

All constructs were recognized by rSm28-GST specific antibodies in solid phase immunoassays. However, the binding was higher when the MAP-8 was used as antigen at least partly because of its better coating on the microtiter plates. *In vitro* lymphoproliferative assays showed that polymer was mitogenic, repeat and MAP-2 did not stimulate rSm28-GST specific T cells while MAP-8 induced a slight response. The injection of MAP-8 to rats led to important antibody and T cell responses higher than those obtained with the other constructs. The IgG2a (cytotoxic antibody in schistosomiasis)/IgG2c (blocking antibody) ratio was independent of the immunogen. Taken together these results demonstrate that both the antigenicity and the immunogenicity of a peptide containing T and B cell epitope(s) are strongly related to the molecular form whereby it is presented and that the MAP-8 construct can be useful in serodiagnosis or in vaccination trials using synthetic peptides.

### INTRODUCTION

A major evolution of vaccines is to include the different components responsible for the protective immune response in preparations defined at a molecular level. In this context, the use of synthetic peptides mimicking major epitopes appears to be very promising. However, free peptides are often poorly immunogenic by themselves and require to be covalently linked to carrier proteins to induce significant T and B cell responses. Conjugation of a peptide to a carrier protein not only raises difficult problems of scale-up, stability and control in view of a vaccine development, but may also be responsible for carrier-induced epitopic suppression (Schutze *et al.*, 1985; Di John *et al.*, 1989; Schutze *et al.*, 1989).

Another rapidly expanding use of synthetic peptides takes advantage of their antigenic character, either to detect the presence of epitope-specific antibodies in serological diagnosis or to restimulate specific T cells. In these cases too, covalent linkage of peptides to carrier molecules has been shown to improve their antigenic properties towards antibodies as well as T cells. In this case, also, use of a carrier protein may be responsible for difficulties such as the occurrence of cross-reactivities.

In order to bypass the requirement for a carrier, several alternatives have been proposed. Among them, different possibilities of increasing the molecular weight

by covalent association of several copies of a single short epitope have been described: polymerisation of the peptide using bifunctional cross-linking reagents reacting with specific side chains (Jacob *et al.*, 1985; Borrás-Cuesta *et al.*, 1988), synthesis of a single chain peptide containing several tandem repeats of the peptide (Del Giudice *et al.*, 1986; Grillot *et al.*, 1990) and, more recently the Multiple Antigenic Peptide (MAP) approach in which 2<sup>n</sup> (*n* being generally 3) copies of the peptide are linked through their COOH-terminus groups to the amino groups of a dendritic matrix of lysyl residues (Posnett *et al.*, 1988; Tam, 1988; Del Giudice *et al.*, 1990; Troalen *et al.*, 1990; Tam *et al.*, 1990). We report here a comparative study of the antigenicity and immunogenicity of these different constructs. The peptide which is used in this study is the 115–131 sequence derived from the 28 kDa protective antigen of *Schistosoma mansoni* (rSm28-GST) (Balloul *et al.*, 1987a; Balloul *et al.*, 1987b) since this peptide was previously described: (1) to induce the proliferation of T lymphocytes from experimentally infected rats, mice and baboons as well as from naturally infected humans but only when linked to carrier proteins (Auriault *et al.*, 1988; Wolowczuk *et al.*, 1990; Wolowczuk *et al.*, submitted for publication); (2) to be specifically recognized by IgG, IgE and IgA antibodies of *S. mansoni* infected schoolchildren (Auriault *et al.*, 1990) and (3) to be poorly immunogenic by itself.

## MATERIALS AND METHODS

### Rats

Male syngeneic Fischer ICO F344 rats (6–8 weeks of age) (Iffa Credo, France) expressing the RTL<sup>iv1</sup> haplotype were used throughout the experiments.

### Peptide synthesis

**Linear peptides.** The monomeric (115–131) peptide and the three tandemly repeated (117–128) residues were synthesized by solid phase synthesis according to Merrifield's method (Merrifield, 1963). It was protected as follows: Glu (*N*-BOC-*L*-glutamic acid- $\gamma$ -cyclohexyl ester), Thr (*N*-BOC-*L*-threonine-benzylester) and Lys (*N*- $\alpha$ -BOC-*N*- $\epsilon$ -(2-chlorobenzoyloxycarbonyl) *L*-lysine). The peptide resins were dried, cleaved and deprotected by the low/high hexafluoric acid (HF) procedure. The crude (115–131) peptide was purified by gel filtration on fractogel TSK HW 40-S (Merck, Darmstadt, Germany) in aqueous HCl pH 2, and lyophilized. Peptides were checked for homogeneity by thin layer chromatography and reverse phase-HPLC, and for identity by amino acid analysis after total hydrolysis.

### Polymerized construct

In order to promote intermolecular rather than intramolecular reactions, the peptide was solubilized in a very concentrated form (10 mg/100  $\mu$ l NaHCO<sub>3</sub>, pH 9), corresponding to  $\approx 5$   $\mu$ moles of peptide, or 30  $\mu$ equivalents of NH<sub>2</sub> groups). After 10 min, 2  $\mu$ l of a 25% commercial glutaraldehyde solution (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) was added, corresponding to  $\approx 5$   $\mu$ moles of glutaraldehyde, or 10  $\mu$ equivalent of aldehyde groups. The mixture was vortexed for 10 min, diluted to 4 ml with water, and then extensively dialysed on a YM5 membrane (Amicon, Epernon, France), against 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), concentrated, and filtrated on a 0.22  $\mu$ m filter (Millipore, Bedford, MA). Final volume was 1.3 ml, containing 8 mg of polymerized construct as determined by amino acid analysis of an aliquot.

### Conjugation on carrier protein

A solution of peptide (115–131) (12 mg, corresponding to  $\approx 6$   $\mu$ moles, or 36  $\mu$ equivalents of NH<sub>2</sub>) in 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8.5 was added to a solution of ovalbumine (10 mg, in 4 ml 0.01 M PBS). After 2 hours, 30  $\mu$ l (3  $\mu$ moles) of a 1/25 dilution of a 25% commercial glutaraldehyde solution (Sigma) was added; the same quantity was then added twice a day, to a final quantity of 180  $\mu$ l, corresponding to  $\approx 18$   $\mu$ moles, or 36  $\mu$ equivalents of CHO groups. Five hours after the last glutaraldehyde addition, the conjugate was extensively dialysed against 0.01 M PBS, and filtrated on a 0.22  $\mu$ m filter (Millipore). The quantity of conjugated peptide was calculated after the determination of amino acid composition, by reference with the carrier alone, and was of 53  $\mu$ g of peptide ( $\approx 26$  nanomoles) per mg of conjugate.

### Multiple Antigenic Peptides (MAP)

The synthesis of an eight-fold branched core attached to eight peptide residues (similar procedure for the

dimeric MAP construct) was accomplished manually by a stepwise solid phase procedure on BOC- $\beta$ Ala-paramethylbenzylamine resin with a load of 0.28 mmol./g (Posnett *et al.*, 1988). The three lysine level of the core was achieved using 2.5 M excess of *N*- $\alpha$ BOC, *N*- $\epsilon$ BOC *L*-lysine dicyclohexylamine salt and benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluoro-phosphate (BOP) (Castro *et al.*, 1975) as a coupling agent. The coupling of the BOC-amino acids was performed in *N*-methyl-pyrrolidone using the BOP/diisopropylethylamine procedure. The MAP-8 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. Amino acid analysis gave results in agreement with the expected composition.

### Recombinant Sm28-GST antigen

A full length copy of the complementary DNA encoding the Sm28-GST was expressed in *Escherichia coli* using a PL-expression vector (Balloul *et al.*, 1987c). The purified recombinant Sm28-GST protein (rSm28-GST) (95% purity by passage through a glutathione-sepharose column) was provided by F. Trottein from Institut Pasteur (Lille, France).

### Parasite life cycle and Soluble Adult Worm Preparation (SWAP)

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 worms were collected by perfusion of the liver and the mesenteric vein of gold hamsters 40 days after the infection (1,000 cercariae/animal). After three brief washes in cold 0.01 M PBS, they were passed rapidly from  $-196^{\circ}\text{C}$  to  $37^{\circ}\text{C}$  and sonicated 15 sec. The homogenate was then centrifuged at 10,000 *g* for 20 min and the supernatant collected.

### Immunization procedures

rSm28-GST (100  $\mu$ g/rat) in saline (9 g/l NaCl) was mixed 1/1 with complete Freund's adjuvant (CFA) (Difco Laboratories, Detroit) and injected subcutaneously into the base of the tail of Fischer rats on day 0. On day 10, inguinal lymph nodes were aseptically removed. 115–131 peptide, repeat, MAP-2 or MAP-8 (100  $\mu$ g/rat) were injected using the same route on day 0. On days 7 and 14, animals were reinjected with these constructs (100  $\mu$ g/rat) in incomplete Freund's adjuvant (IFA). They were weekly bled during 2 months and inguinal lymph nodes were harvested on week 14.

### Lymphocyte culture medium

RPMI-1640 (Gibco, Courbevoie, France) was supplemented with  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol (Merck), 2 mM L-glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 20 mM Hepes (Sigma) and 100% heat inactivated foetal calf serum (Gibco).

### Lymphocyte proliferation assay

Inguinal lymph nodes were harvested aseptically and cell suspensions were prepared. T lymphocytes were separated by passage through a nylon wool column (Julius *et al.*, 1973) and maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in lymphocyte culture medium. For the assays, 5 × 10<sup>5</sup> T cells and 10<sup>6</sup> irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 A1, 100 Ku, 8 mA) syngeneic thymic cells as antigen presenting cells (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 tritiated deoxythymidine (<sup>3</sup>H-TdR) for the last 18 hr 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 <sup>3</sup>H 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 or as a stimulation index (S.I.) calculated according to the formula:

$$\text{S.I.} = \frac{\text{Bx} - \text{Bo}}{\text{Bo}}$$

with Bx (proliferation in the presence of Ag) and Bo (proliferation without Ag) being the arithmetic mean of cpm of triplicate cultures.

### Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc, Maxisorp, Roskilde, Denmark) were incubated overnight at 4°C with 5 µg/ml of the different antigens in 100 µl of 0.1 M sodium carbonate buffer pH 9.6. To block nonspecific antibody binding, the wells were saturated with PBS containing 1% bovine serum albumine (BSA) (Sigma) for 1 hr at room temp. After removing this solution, 100 µl of different serum dilutions were added and incubated overnight at 4°C. The wells were washed four times with PBS containing 1% tween 20 (PBST) and then incubated at room temperature for 1 hour with a 1/10,000 solution of peroxidase labelled anti-rat IgG (ICN, Lisle, IL) in PBST. After four washes, an enzyme substrate (1 mg/ml o-phenylenediamine (Sigma) + 0.001% hydrogen peroxide in phosphate/citrate buffer) was added. The resulting color development was stopped with HCl 1N (25%) after 15 minutes at room temp and the absorbance at 492 nm was measured using a multichannel spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC 1340). ELISA titres correspond to the serum dilution giving an absorbance three fold higher than that on the irrelevant antigen ovalbumine.

### Dot Blot immunobinding assay

Nitrocellulose sheets (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) were cut into 4 × 30 mm strips. The antigens (rSm28-GST or BSA) were dot-blotted on strips (1 µl of a 1 mg/ml solution per dot). After 1 hour of saturation in PBS containing 1.5% (w/v) casein (Merck), serum

diluted 1/50 was added for 2 hr at room temp. Preparations were washed in PBS-casein buffer and the strips were incubated overnight at 4°C with a 1/2,000-diluted rabbit antiserum specific for rat IgG2a or for rat IgG2c (Biosys, Compiègne, France). After additional washes, samples were reacted for 1 hr with a 1/20,000-diluted anti-rabbit peroxidase labelled serum (Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France). The color reaction was developed for 30 min in a buffer containing 30 mg 4-chloro-1-naphthol (Biorad, Munich, Germany) in 10 ml cold methanol, 40 ml PBS and 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The intensity of the spots was measured with a light reflecting densitometer (D142-1, Gretag, Regensdorf, Switzerland) and expressed as optical density (OD) units.

## RESULTS

### Composition of the different immunogens (Fig. 1)

MAP-2 consists of a single lysine on which two copies of (115–131) peptide are linked through their C-terminus, one to the α NH<sub>2</sub> and the second to the ε-NH<sub>2</sub>.

In the case of MAP-8 the core consists of seven lysine residues, providing eight aminogroups on which eight copies of (115–131) peptide are linked through their C-terminus.

An irrelevant MAP (Irr.MAP-8) was prepared following the same model except that eight copies of an irrelevant peptide were used.

Polymer was obtained by crosslinking (115–131) peptides with an homobifunctional reagent, glutaraldehyde. A limited amount of glutaraldehyde (1 eq) was used when compared to the number of amino groups available (5ε-NH<sub>2</sub> and one α-NH<sub>2</sub> groups present on the lysines) per molecule of peptide. Such a low ratio leads to copolymers containing a small number of peptide units, but simultaneously, allows to keep the number of modified side chains as low as possible.

Similarly, (115–131) peptide was conjugated to ovalbumine using a limited amount of glutaraldehyde. The quantity of peptide conjugated was estimated to be 53 µg per mg of conjugate.

The tandemly repeated peptide contains three copies of a slightly shorter sequence (117–128) synthesized as a single chain peptide. The reason for the choice of a shorter sequence was to avoid the presence of repeated proline residues and thus to maximize a possible α-helical organization of the repeated peptide by conformational cooperation between the repeats.

### Analysis of the binding of rSm28-GST specific antibodies to different constructs of 115–131 peptide

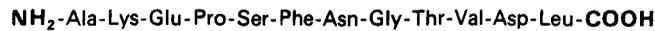
The ability of MAP-8, MAP-2, polymer, repeat and (115–131) peptide to detect (115–131) epitope(s) specific antibodies in anti-rSm28-GST antisera was analysed by ELISA after coating all constructs onto plastic microtiter plates. As shown in Fig. 2. (115–131) specific IgG were detected with each of the (115–131) constructs when the anti-rSm28-GST antiserum was diluted to 1/50. However, whereas IgG bindings on MAP-8 and MAP-2 were, respectively, 7 and 5 fold higher than those

(A)

Amino acid sequence of the 115–113 synthetic peptide:



Amino acid sequence of the irrelevant peptide (used for the Irr.MAP-8 construct):



(B)

Schematic representations of polymer, repeat, MAP-2 and MAP-8:

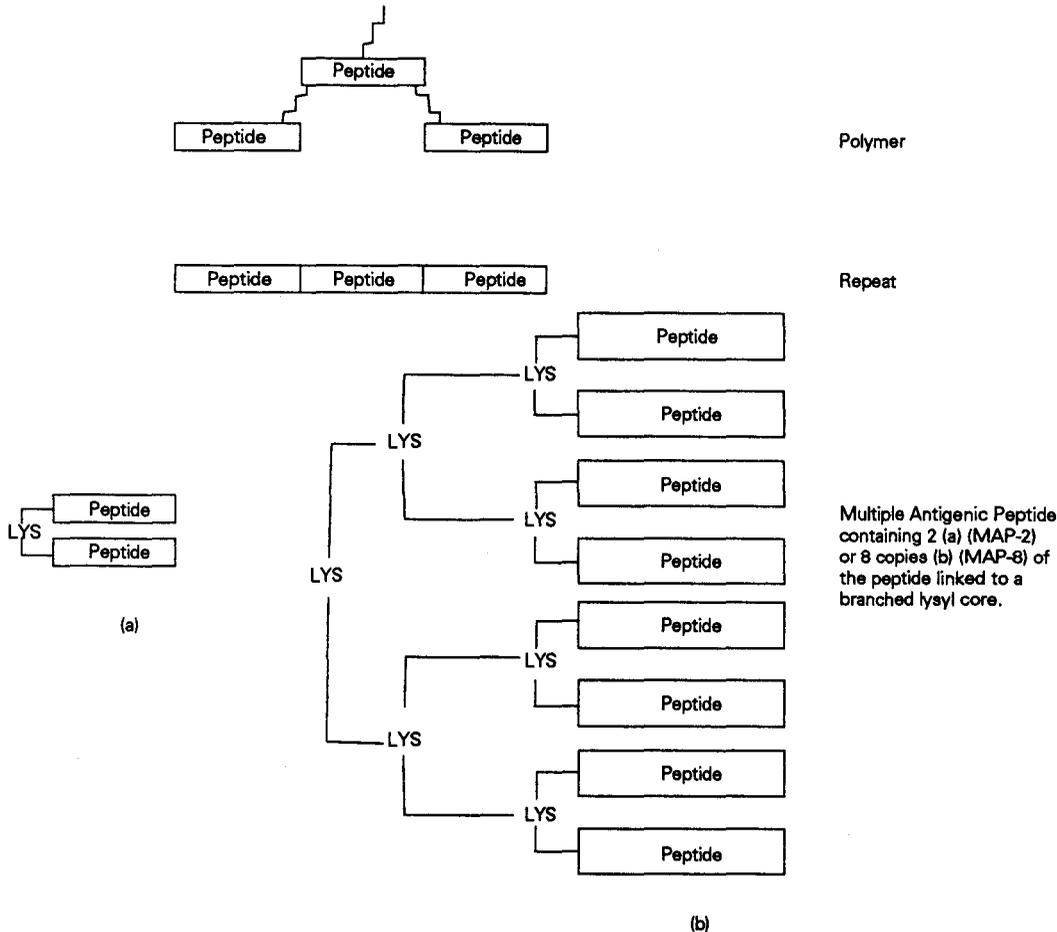


Fig. 1. Amino acid sequence of the 115–131 synthetic peptide and of the peptide used for the irrelevant MAP-8 construct (Irr.MAP-8) (a). Schematic representations of polymer, repeat, MAP-2 and MAP-8 (b).

on Irr.MAP-8 or BSA, bindings on (115–131) peptide, polymer or repeat were only twice higher than controls. Also, the maximal antiserum dilution required for (115–131) specific antibody detection (i.e. obtention of OD values twice higher than with irrelevant antigens BSA and Irr.MAP-8) reached 1/200 and 1/400 using MAP-2 and MAP-8 constructs respectively, whereas it was only 1/60 with (115–131) peptide, repeat or polymer coated antigens.

#### Comparison of MAP-8 with 115–131 monomer as coating antigens

In order to compare the binding of MAP-8 versus (115–131) peptide on the microtiter plates, 1/50 diluted sera of nine rats immunized with the (115–131) peptide were monitored in ELISA using (115–131) peptide, MAP-8, rSm28-GST and Irr.MAP-8 as coating agents. No significant binding of IgG was observed when

(115–131) peptide or rSm28-GST were coated. However, a detection of (115–131) peptide specific antibodies was clearly possible in two sera of rats recovered 42 and 49 days after primary challenge when MAP-8 was used as coating agent (Table 1).

#### Analysis at the T cellular level of the antigenicity of the 115–131 peptide constructs

Groups of five Fischer rats were immunized with rSm28-GST or with saline in the presence of CFA. Ten days later, T cells were removed and the proliferation of these cells cultured with the different 115–131 peptidic constructs was compared to the proliferation obtained with the native Ag or (115–131) peptide coupled to a carrier protein (115–131-Ova). Only one of these constructs, i.e. the polymer, was mitogenic since inducing the proliferation of T cells from rats immunized with saline (Fig. 3B). As previously described (Wolowczuk

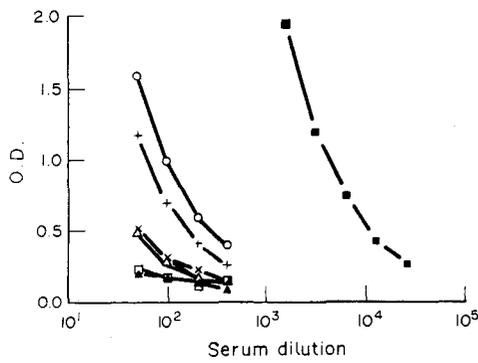


Fig. 2. Binding of rSm28-GST specific IgG to different constructs of the 115-131 peptide. Serial dilutions of pooled sera from 5 rats immunized with rSm28-GST were tested by ELISA on microtiter plates coated with rSm28-GST (—■—), MAP-8 (—○—), MAP-2 (—+—), repeat (—), 115-131 peptide (—△—), polymer (—x—) and two control antigens: bovine serum albumine (BSA) (—□—) and a control MAP-8 construction referred to as Irr.MAP-8 (—▲—). Results are expressed as the mean of two experiments realized in duplicate.

Variation coefficients were less than 10%.

*et al.*, 1991), rSm28-GST specific T cells were highly restimulated by 115-131-Ova whereas no proliferation was obtained with the 115-131 peptide alone (Fig. 3A). The proliferation induced by 115-131-Ova was of the same order of magnitude as that induced by rSm28-GST. A slight but significant and reproducible proliferation was only observed with MAP-8 whereas MAP-2 and repeat did not induce any restimulation (Fig. 3A). Data are only shown for an antigen concn of 50 µg/ml but similar results were obtained for concns ranging from 5 µg/ml to 40 µg/ml.

*Comparison of the immunogenicity of different constructs of the 115-131 peptide*

*Analysis of T cell response.* Groups of five Fischer rats were immunized with MAP-8, MAP-2, repeat or 115-131 peptide (three injections of 100 µg at day 0 in CFA and 100 µg at days 7 and 14 in IFA). Twelve weeks later (week 14), inguinal lymph nodes were removed and T cells were monitored in *in vitro* proliferative assays in the presence of increasing concns (ranging from 5 µg/ml to 40 µg/ml) of rSm28-GST and SWAP. The reactivity of these cells towards MAP-8 was also tested since

Table 1. Binding of anti-115-131 monomer IgG to 115-131 peptide, MAP-8, rSm28-GST and Irr.MAP-8

Coated Ag	Rat A		Rat B	
	Day 0	Day 42	Day 0	Day 49
115-131 peptide	0.11	0.12	0.12	0.13
MAP-8	0.19	0.69	0.16	0.45
rSm28-GST	0.14	0.30	0.23	0.30
Irr.MAP-8	0.16	0.15	0.14	0.17

Sera recovered 42 (rat A) or 49 (rat B) days after primary immunization with 115-131 peptide were tested by ELISA on microtiter plates coated with 115-131 peptide, MAP-8, rSm28-GST and Irr.MAP-8. The results are expressed in O.D. units. They represent mean values of duplicates. Variation coefficients were less than 10%.

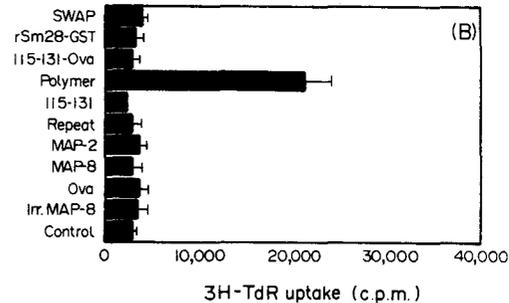
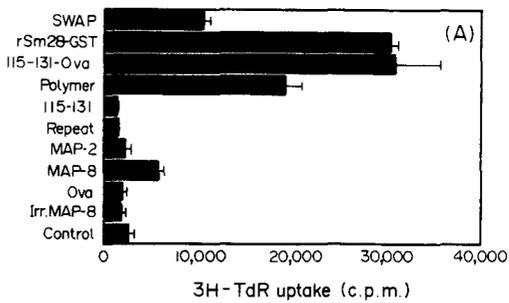


Fig. 3. *In vitro* proliferative responses of T lymphocytes from Fischer rats immunized with rSm28-GST antigen (A) or with saline (B). Stimulations were performed with SWAP, rSm28-GST, 115-131-Ova, polymer, 115-131 peptide, repeat, MAP-2, MAP-8, with the control antigens Ova and Irr.MAP-8 and without antigen (Control). Two independent experiments were performed in triplicate with antigen concentrations ranging from 5 µg/ml to 50 µg/ml. Data are shown for an antigen concentration of 50 µg/ml.

MAP-8 was previously shown to induce *in vitro* proliferation of rSm28-GST specific T cells (see Fig. 3). As shown in Fig. 4, T lymphocytes from rats immunized with the different constructs proliferated *in vitro* when challenged with MAP-8, rSm28-GST or SWAP. The proliferation of T cells from rats immunized with (115-131) peptide was reproducibly observed but was of low intensity compared to that obtained using repeat, MAP-2 or MAP-8 as immunogens. A comparison of the immunogenicity of these latter constructs revealed that, whatever the concentrations of Ag used for *in vitro* proliferations, (data shown only for 40 µg/ml), repeat

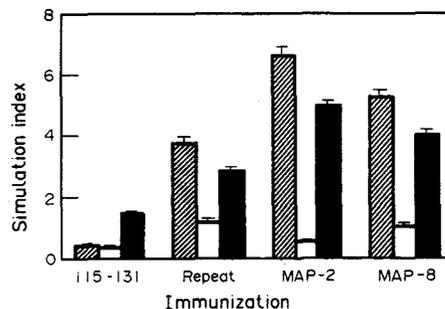


Fig. 4. *In vitro* proliferative response of T lymphocytes from Fischer rats immunized with 115-131 peptide, repeat, MAP-2 or MAP-8 after stimulation with 40 µg/ml of MAP-8 (▧), rSm28-GST (□), or SWAP (■). <sup>3</sup>H-TdR incorporation backgrounds were 8,747; 5,799; 3,250 and 4,554 cpm for immunogens 115-131 peptide, repeat, MAP-2 and MAP-8, respectively.

always appeared to be slightly less immunogenic than MAP-2 and MAP-8 which were similar. Thus, MAP-2 and MAP-8 appeared as the better constructs to generate *in vivo* T lymphocytes recognizing an epitope present both in MAP-8, in rSm28-GST and in SWAP.

**Analysis of anti rSm28-GST IgG response.** Fischer rats immunized with MAP-8, MAP-2, repeat or (115-131) peptide as previously described were weekly bled till day 35 for 4 rats and till day 63 for five other rats. The production of specific IgG was investigated by ELISA and titres were calculated.

Whereas none of the nine rats immunized with (115-131) peptide had mounted a rSm28-GST specific IgG response, repeat, MAP-2 and MAP-8 induced IgG detectable with rSm28-GST coated antigen. A comparison of productions obtained with these constructs is shown in Fig. 5.

Only immunization with MAP-8 could induce in some rats (four among nine) a significant production of rSm28-GST specific IgG after two injections ( $P < 0.01$  with the  $\chi^2$  test). After three injections, despite a high individual variability, animals showing the better rSm28-

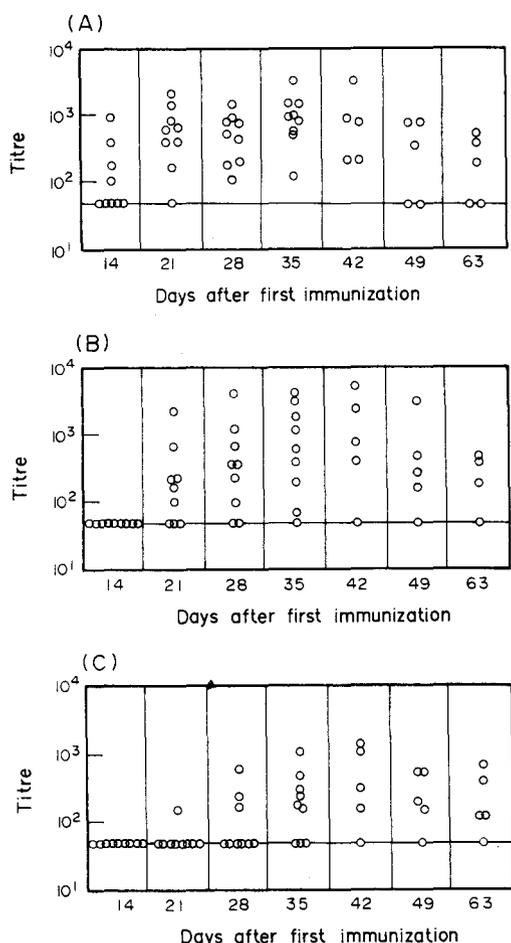


Fig. 5. Individual rSm28-GST specific IgG response of Fischer rats immunized with MAP-8 (A), MAP-2 (B) or repeat (C) (three injections of 100  $\mu$ g at day 0 in CFA and at days 7 and 14 in IFA). ELISA titre corresponds to the serum dilution giving an absorbance three times that of the irrelevant antigen, Ova. All rat sera having titre  $\leq 50$  have been drawn on the — line.

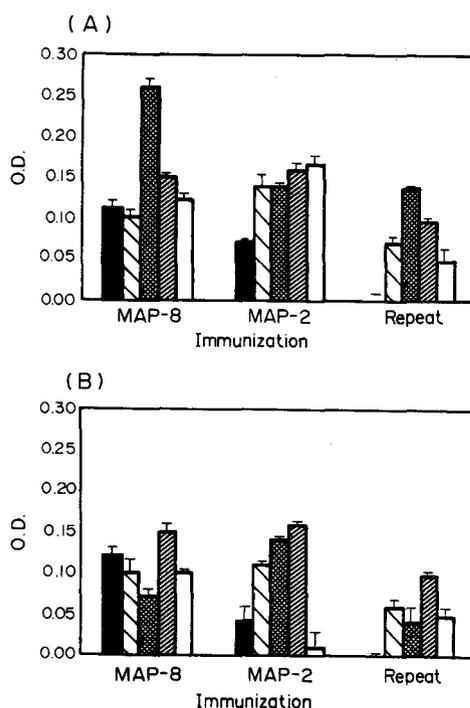


Fig. 6. Individual rSm28-GST specific IgG2a (A) and IgG2c (B) levels in sera of 5 rats (■, ▨, ▩, ▪, □) immunized with MAP-8, MAP-2 or repeat. Sera were collected 35 days after primary immunization and tested by dot immunoassay using nitrocellulose sheets coated with rSm28-GST. Two experiments were performed in duplicate.

GST specific IgG responses were more numerous among MAP primed animals than repeat primed animals (significant difference— $P < 0.01$  with the Student's *t*-test—between MAP-(8 or 2) and repeat mean pairs for days 21, 28 and 35). However, no clear cut difference between MAP-2 and MAP-8 B cell immunogenicity could be observed.

Thus, MAP-8 appears to be the more immunogenic construct in terms of ability to mount a rSm28-GST specific IgG response with low immunizing doses.

As a monoclonal antibody of the IgG2c isotype was reported to block the eosinophil dependent cytotoxicity mediated by an IgG2a monoclonal antibody during schistosomiasis in the rat model (Grzych *et al.*, 1984), it was then of interest to study the isotype distribution of antibodies induced by immunization with repeat, MAP-2 and MAP-8. The identification of rSm28-GST specific IgG2a and IgG2c antibodies was performed by dot immunoassay using nitrocellulose sheets dotted with rSm28-GST. Figure 6 shows the results obtained 35 days after the first immunization (i.e. when IgG responses were maximal). Both repeat, MAP-2 and MAP-8 generated *in vivo* IgG2a and IgG2c antibodies recognizing rSm28-GST. No difference in the ratio IgG2a/IgG2c was noticed depending on the constructs used for immunization. The reactivities were specific since (1) no binding on rSm28-GST was observed with sera collected before immunization and (2) no binding on ovalbumin was observed with sera collected after immunization (data not shown).

## DISCUSSION

The experiments described in this report were designed to compare the antigenicity and the immunogenicity of five chemically defined constructs of a peptide including the peptide in a single copy (sequence 115–131 of the rSm28-GST antigen of *Schistosoma mansoni*), a tandem repeat containing 3 copies, a copolymer with glutaraldehyde and two constructs based on the MAP (Multiple Antigenic Peptide) model, one containing two copies and the other eight copies of the peptide.

Although all these constructs showed specific recognition by anti-rSm28-GST antisera in ELISA, MAP-8 and MAP-2 coated antigens increased respectively 7 and 3 fold the sensitivity of detection of specific IgG compared to (115–131) peptide, repeat or polymer. These results thus confirm the initial observation reported by Tam (Tam *et al.*, 1989) showing that use of MAPs as coated antigens in solid phase immunoassays increases the sensitivity of the assay. A plausible explanation could be that, when coated on the polymer surface of an ELISA plate, at least some side chains of a single peptide are involved in this interaction, thus limiting their availability for interacting with antibodies. Moreover, this interaction can favor a particular conformation of the peptide which antibodies are not able to recognize. On the other hand, in the case of MAP-2 and MAP-8, one of the peptides can interact with the plate while the other(s) remain(s) free from any constraint of the support and thus is (are) more accessible to antibodies. In order to assess the importance of both factors, we have studied the recognition of antibodies raised against (115–131) peptide itself, which is less likely to generate conformation specific antibodies than the complete protein used in previous experiments. In this case, the use of MAP-8 as coated antigen allowed the detection of anti 115–131 antibodies while no significant binding could be detected using the unmodified (115–131) peptide as coated antigen. Similar behaviours could be expected from the polymer and from the repeat. However, in these cases, the fact that a part of the side chains has been modified by the cross linking agent (polymer) or that the peptide sequence is incomplete (repeat) may explain why they were less effective.

*In vitro* analysis of antigenicity of the five constructs towards rSm28-GST specific T cells further revealed the inability of (115–131) peptide, repeat and MAP-2 to induce a proliferative signal and mitogenicity of polymer whereas MAP-8 induced a significant and specific proliferation of the cells. Several reasons for this can be given. The lysyl rich core of MAP-8 could provide appropriate additional amino acids facilitating epitope binding to the TcR or, although less probably, to the MHC molecules of APCs. Second, this matrix and/or the high number of covalently linked (115–131) peptides (eight copies) could protect some (115–131) T cell site(s) from excessive enzymatic degradation during antigen processing by inducing protease resistant conformations of (115–131) peptides or by providing additional enzymatic cleavage targets. Experiments involving inhibition

of the processing by specific drugs such as chloroquine are at present undertaken to clarify this hypothesis. However, antigenicity of MAP-8 remained too slight compared to that obtained when the peptide was coupled to a carrier protein (115–131-Ova) to use this construct approach in the identification of the protein T epitopes.

The immunogenicities of repeat, MAP-2, MAP-8 and (115–131) monomer were assessed by *in vitro* proliferation assays and by titration of specific IgG antibodies after immunization with these constructs. Results obtained after three immunizations, revealed the better ability of MAP-8 and MAP-2 and to a lesser extent of repeat to induce Sm28-GST specific T and B cells compared to (115–131) monomer. It could be argued that the lysyl core of MAP constructs, more than the size of the antigen, played an important role in conferring a good immunogenicity to the (115–131) peptide. However, repeat only contains a shorter part of this peptide, namely the 117–128 sequence. It is thus possible that these missing amino acids, if not essential, contribute to the induction of an optimal response. Moreover, as MAP-8 but not MAP-2 immunized rats had already mounted a high rSm28-GST specific IgG response one week after two injections, we clearly cannot rule out a possible positive influence of a high number of peptides on the immunogenicity of the constructs.

Thus, among the five constructs studied, MAP-8 appeared as the better tool for (115–131) peptide specific antibody detection, for *in vitro* specific T cell restimulation and for enhancing the T and B cell immune response towards the derivative protein. The fact that polymerisation here appeared totally devoid of interest was probably a consequence of the high number of lysines in the (115–131) peptide sequence leading to a too reticulated construct.

Finally, as in the rat model, IgG2c has been described to block the eosinophil dependent cytotoxicity mediated by IgG2a against the schistosomula, we analysed the production of these isotypes after immunization with repeat, MAP-2 and MAP-8 and demonstrated that all constructs induced both IgG2a and IgG2c without favouring one or the other isotype. Vaccination trials against experimental *S. mansoni* infection were thus performed in the rat model using MAP-8 as immunogen. They led to a level of protection ranging between 40 and 50% (Wolowczuk *et al.*, 1991) demonstrating the protective potential of such a construct.

In conclusion, this work provides encouraging information about the possibility of using synthetic peptides in immunoprophylaxis and diagnosis protocols. Nevertheless, a great deal of work remains to be done in this field of research, notably the definition of the presentation of these synthetic constructs to the specific immune cells and the possibility of bypassing the genetic restriction.

*Acknowledgements*—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.

We thank Anne Delanoye and D. Grezel for their contributions to our experiments, Dr C. Van Den Broecke and Dr J. M. Grzych for very kind and helpful discussions.

## REFERENCES

- Auriault C., Gras-Masse H., Wolowczuk I., Pierce R. J., Balloul J. M., Neyrinck J. L., Drobecq H., Tartar A. and Capron A. (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *S. mansoni* P28 antigen in the rat model using synthetic peptide. *J. Immunol.* **141**, 1687–1694.
- 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. (1990) Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. clin. Microbiol.* **28**, 1918–1924.
- 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. (1987a) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*, pp. 77–84. Alan R. Liss, New York.
- Balloul J. M., Grzych J. M., Pierce R. J. and Capron A. (1987b) A purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**, 3448–3453.
- Balloul J. M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J. M., Pierce R. J., Carvallo D., Lecocq J. P. and Capron A. (1987c) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**, 149–153.
- Borras-Cuesta F., Fedon Y. and Petit-Camurdan A. (1988) Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerisation. *Eur. J. Immunol.* **18**, 199–202.
- Castro B., Dormoy R. J., Evin G. and Selve C. (1975) BOP, hexafluorophosphate de benzotriazol *N*-oxytrisdimethylamphosphonium. *Tetr. Lett.* **14**, 1219.
- Del Giudice G., Cooper J. A., Merino J., Verdini A. S., Pessi A., Togna A. R., Engers H. D., Corradin G. and Lambert P. H. (1986) The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite repetitive epitope is I-A<sup>b</sup>-restricted: possible implications for malaria vaccines. *J. Immunol.* **137**, 2952–2955.
- Del Giudice G., Tougne C., Louis J. A., Lambert P. H., Bianchi E., Bonelli F., Chiappinelli L. and Pessi A. (1990) A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the *Plasmodium malariae* circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1619–1622.
- Di John D., Wasserman S., Torres J. R., Cortesia M. J., Murillo J., Losonsky G., Herrington D. A., Sturcher D. and Levine M. M. (1989) Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. *The Lancet* 1415–1418.
- Grillot D., Michel M., Müller I., Tougne C., Rénia L., Mazier D., Corradin G., Lambert P. H., Louis J. A. and Del Giudice G. (1990) Immune responses to defined epitopes of the circumsporozoite protein of the murine malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1215–1222.
- Grzych J. M., Capron M., Dissous C. and Capron A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **133**, 998–1003.
- Jacob C. O., Arnon R. and Sela M. (1985) Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Molec. Immunol.* **22**, 1333–1339.
- Julius M. H., Simpson E. and Herzenberg L. A. (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3**, 645–649.
- Merrifield R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154.
- Posnett D. N., McGrath H. and Tam J. P. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. biol. Chem.* **263**, 1719–1725.
- Schutze M. P., Leclerc C., Jolivet M., Audibert F. and Chedid L. (1985) Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* **135**, 2319–2322.
- Schutze M. P., Deriaud E., Przewlocki G. and Leclerc C. (1989) Carrier-induced epitopic suppression is initiated through clonal dominance. *J. Immunol.* **142**, 2635–2640.
- Tam J. P. (1988) Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigen peptide system. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5409–5413.
- Tam J. P. and Zavala F. (1989) Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J. Immun. Meth.* **124**, 53–61.
- Tam J. P., Clavijo P., Lu Y. A., Nussenzweig V., Nussenzweig R. and Zavala F. (1990) Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. exp. Med.* **171**, 299–306.
- Troalen F., Razafindratsita A., Puisieux A., Voeltzel T., Bohuon C., Bellet D. and Bidart J. M. (1990) Structural probing of human lutropin using antibodies raised against synthetic peptides constructed by classical and multiple antigen peptide system approaches. *Molec. Immunol.* **27**, 363–368.
- Wolowczuk I., Auriault C., Gras-Masse H., Mazingue C., Vendeville C., Tartar A. and Capron A. (1990) T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **93**, 350–358.
- Wolowczuk I., Auriault C., Bossus M., Boulanger D., Gras-Masse H., Mazingue C., Pierce R. J., Grezel D., Reid G. D., Tartar A. and Capron A. (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. I. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J. Immunol.* **146**, 1987–1995.

Une étude approfondie de l'immunogénicité de la construction MAP-8 a ainsi été menée par Wolowczuk, I. et coll.(1991). Elle a permis de montrer que les sérums des animaux immunisés par cet antigène contenaient aussi des IgE spécifiques de la Sm28GST, que ces sérums étaient cytotoxiques vis-à-vis des schistosomules en présence de macrophages, de plaquettes ou d'éosinophiles et enfin que de façon tout à fait spectaculaire, les rats Fischer immunisés par cette construction étaient fortement protégés contre une infection expérimentale par *S.mansoni* (réduction de la charge parasitaire de 40 à 50%).

Suite à ces résultats, deux thèmes de recherche ont été entrepris :

- 1/ Définir si d'autres peptides contenant des épitopes immunodominants de la Sm28-GST pouvaient être rendus immunogènes en utilisant l'approche MAP-8.
- 2/ Etudier l'immunogénicité de ces constructions dans le modèle murin, modèle où les mécanismes effecteurs sont susceptibles d'être différents de ceux du rat.

Le premier thème de recherche a été étudié par Ivanoff N. (1991). Cet auteur a ainsi montré que la présentation du peptide 24-43 sous forme MAP-8 rendait celui-ci très immunogène et permettait l'induction d'une réponse cellulaire T et d'une réponse humorale (IgG) spécifique de la Sm28-GST (Ivanoff, N. 1991).

Nous avons démarré l'étude du second thème de recherche, c'est-à-dire l'étude de l'immunogénicité des MAP-8 115-131 et 24-43 chez la souris.

# IMMUNOGENICITE DES MAP-8 115-131 et 24-43 DERIVES DE LA SM28GST CHEZ LA SOURIS

---

## I. Introduction.

### A) Choix du protocole d'immunisation.

Le protocole d'immunisation utilisé a été choisi identique à celui utilisé dans nos études chez le rat afin que le seul paramètre susceptible d'influencer la réponse immune soit le statut génétique de l'animal. Il s'agit d'une injection en sous-cutanée à la base de la queue en présence d'adjuvant complet de Freund suivie de deux rappels en adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée. Seules les doses d'antigènes injectés ont été diminuées.

### B) Choix des conditions de culture *in vitro* et choix de l'haplotype des souris.

Nous avons démarré notre étude en immunisant des souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) avec le MAP-8 115-131, en restimulant *in vitro* leurs cellules spléniques ou ganglionnaires par les antigènes MAP-8 115-131 ou Sm28GST en présence de milieu RPMI additionné de divers composés nutritifs (voir matériels et méthodes) dont du sérum de veau (SVF) décomplémenté et en analysant la production des cytokines IL-2, IL-3, IL-4 et IL-5 et la prolifération des cellules. Nous n'avons pas obtenu de prolifération spécifique des cellules ni de production spécifique d'IL-2, d'IL-3, d'IL-4 ou d'IL-5. Par contre, une très forte prolifération aspécifique (prolifération en absence d'antigènes ou en présence d'antigènes irrelevantes) avoisinant constamment 20 000 cpm et une très forte production aspécifique d'IL-2 et d'IL-3 furent observées.

Deux hypothèses nous ont paru pouvoir expliquer ces résultats :

- 1/ Nous ne visualisons pas de prolifération ou de production d'IL-2 et d'IL-3 spécifique car le "bruit de fond" de notre test est trop important.
- 2/ La souris Balb/c est mauvaise répondeuse à l'octopus 115-131.

C'est pourquoi, nous avons décidé de :

1/ Remplacer le milieu de culture par un milieu ne contenant pas de SVF ( nous n'avons en effet pu améliorer nos résultats en changeant de lot ou de marque de SVF) mais contenant à la place 1% de sérum de souris saine autologue frais non décomplémenté (milieu montré par divers auteurs être dépourvu d'effet mitogénique et par ailleurs utilisé par Liew, F.Y. et coll. (1990) dans leur études sur l'antigénicité et l'immunogénicité cellulaire T de constructions

MAP-8 dérivées de *Leishmania major*).

-2/ Etudier l'immunogénicité du MAP-8 115-131 chez la souris BALB/c mais aussi chez une autre souche de souris présentant une bonne réponse à la Sm28GST et au conjugué 115-131-Ova : la souris CBA (H-2<sup>k</sup>) (Wolowczuk, I. et coll. 1989).

Par ailleurs, nous avons étudié, sous ces mêmes conditions, l'immunogénicité du MAP-8 24-43.

Nous avons ainsi montré que bien que la prolifération aspécifique des cellules de rates ou de ganglions des souris BALB/c immunisées par le MAP-8 115-131 ou par le MAP-8 24-43 fût inférieure à 2 000 cpm, aucune augmentation de prolifération n'était induite par l'ajout des antigènes immunisants au milieu, ceci dans deux expériences sur deux. Par contre, une réponse proliférative spécifique fut obtenue avec les cellules spléniques ou ganglionnaires des souris CBA immunisées par l'un ou l'autre des deux MAP-8. Nous avons donc ainsi défini un modèle d'étude.

## **II. Immunogénicité des MAP-8 115-131 et 24-43 chez la souris CBA.**

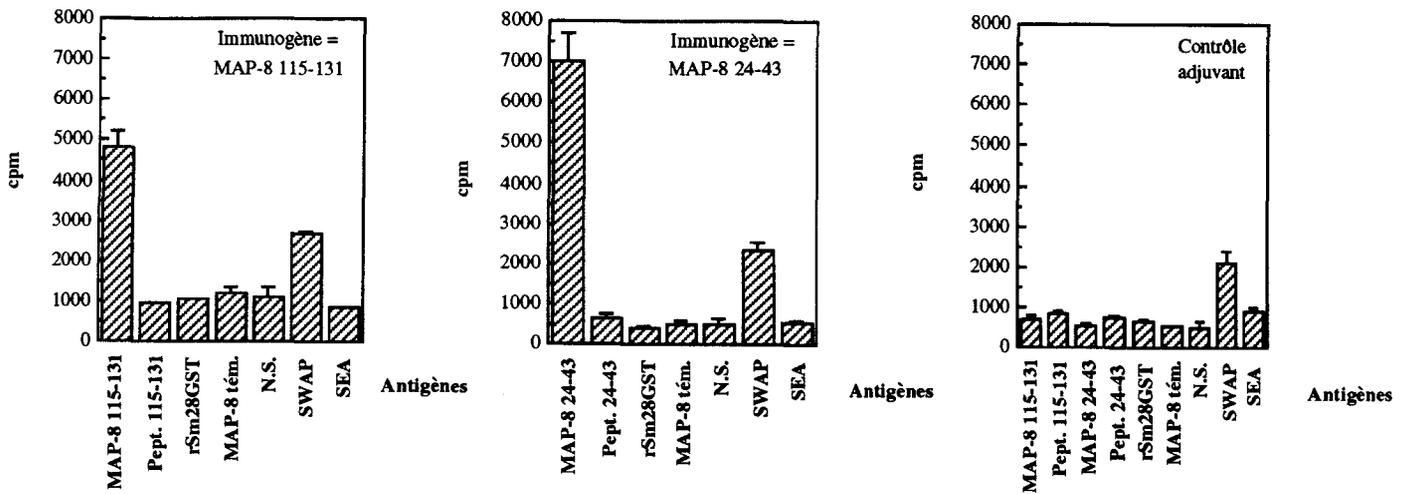
### **A) Etude de la réponse cellulaire.**

Seule la réponse cellulaire splénique a été étudiée en détail.

#### **1°) Réponse proliférative face aux différents antigènes contenant les séquences peptidiques immunisantes.**

L'aptitude des splénocytes de souris CBA immunisées par le MAP-8 115-131 ou par le MAP-8 24-43 à proliférer *in vitro* en présence des antigènes immunisants, des peptides monomériques et de la Sm28GST recombinante ou native (Sm28GST contenue dans l'antigène de ver adulte (SWAP) ou dans l'antigène d'oeuf (SEA)) est présentée figure 5. Des animaux n'ayant reçu que des injections de Hanks Wallace (milieu salin servant à diluer les antigènes) en présence d'adjuvant de Freund ont été introduits dans cette étude pour contrôler la spécificité des réponses.

Nous observons que les cellules spléniques totales de souris CBA immunisées par les MAP-8 115-131 ou 24-43 prolifèrent spécifiquement face aux antigènes immunisants mais ne prolifèrent pas face aux peptides libres 115-131 ou 24-43, ou face à la Sm28GST recombinante ou native contenue dans l'antigène d'oeuf (SEA). La prolifération obtenue en présence de l'antigène SWAP semble par contre aspécifique puisque également observée chez les animaux contrôles.



**Figure 5 :** Réponse proliférative d'un "pool" de splénocytes de 5 souris CBA immunisées par le MAP-8 115-131, par le MAP-8 24-43 ou par du milieu salin non antigénique en présence d'adjuvant de Freund. Les cellules ont été stimulées *in vitro* par les MAP-8 115-131 ou 24-43, les peptides 115-131 ou 24-43, la Sm28GST recombinante (rSm28GST), une construction MAP témoin contenant 8 copies du peptide 48-67 dérivé de la protéine P30 de *Toxoplasma gondii* (Darcy, D. et coll. 1992) (MAP-8 tém.), une préparation contenant les antigènes solubles extraits des schistosomes adultes (SWAP "Soluble Worm Antigenic Preparation") ou des oeufs de *S.mansoni* (SEA "Soluble Egg Antigen"), ou ne sont pas stimulées (milieu de culture seul) (N.S. "Non Stimulé"). Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

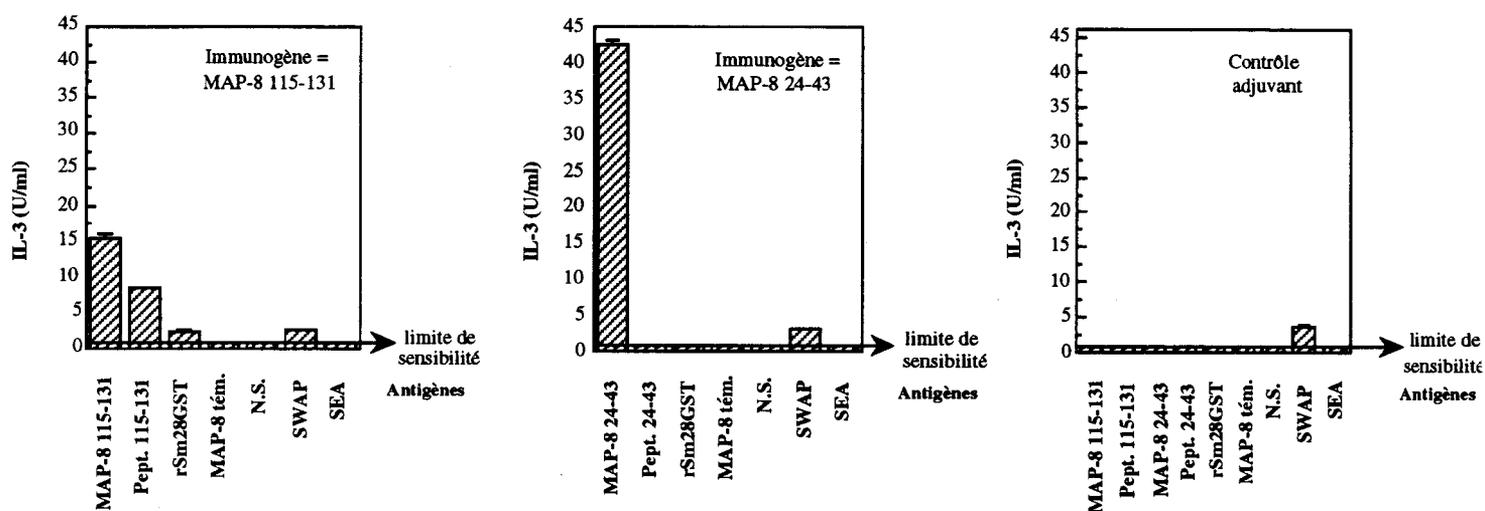
## 2°) Production d'IL-3.

La figure 6 représente les quantités d'IL-3 détectées dans les surnageants de culture récupérés 48 heures après le début de la stimulation des cellules spléniques par les différents antigènes *in vitro* (Ce temps de récupération s'est révélé être optimal pour le dosage de cette cytokine quelque soit l'antigène et l'immunogène testé). Cette figure nous montre que :

- 1/ Les splénocytes des souris contrôles produisent de l'IL-3 en présence de l'antigène SWAP mais pas en présence des autres antigènes.
- 2/ Les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131 produisent spécifiquement de l'IL-3 en présence du MAP-8 115-131 mais aussi, bien que dans une moindre mesure, en présence du peptide 115-131 ou de la Sm28-GST. La production d'IL-3 obtenue en présence de l'antigène SWAP semble non spécifique puisque identique à celle obtenue chez les animaux contrôles.

3/ Les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 24-43 ne produisent spécifiquement de l'IL-3 qu'en présence de l'antigène immunisant mais pas en présence du peptide 24-43 ou de la Sm28GST native ou recombinante.

4/ La production d'IL-3 obtenue après stimulation des cellules anti-MAP-8 24-43 par le MAP-8 24-43 est plus élevée que celle obtenue après stimulation des cellules anti-MAP-8 115-131 par le MAP-8 115-131. Le MAP-8 24-43 apparaît donc en ce sens plus immunogène que le MAP-8 115-131.



**Figure 6 :** Production d'IL-3 *in vitro* par les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131, le MAP-8 24-43 ou du milieu salin en présence d'adjuvant de Freund. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

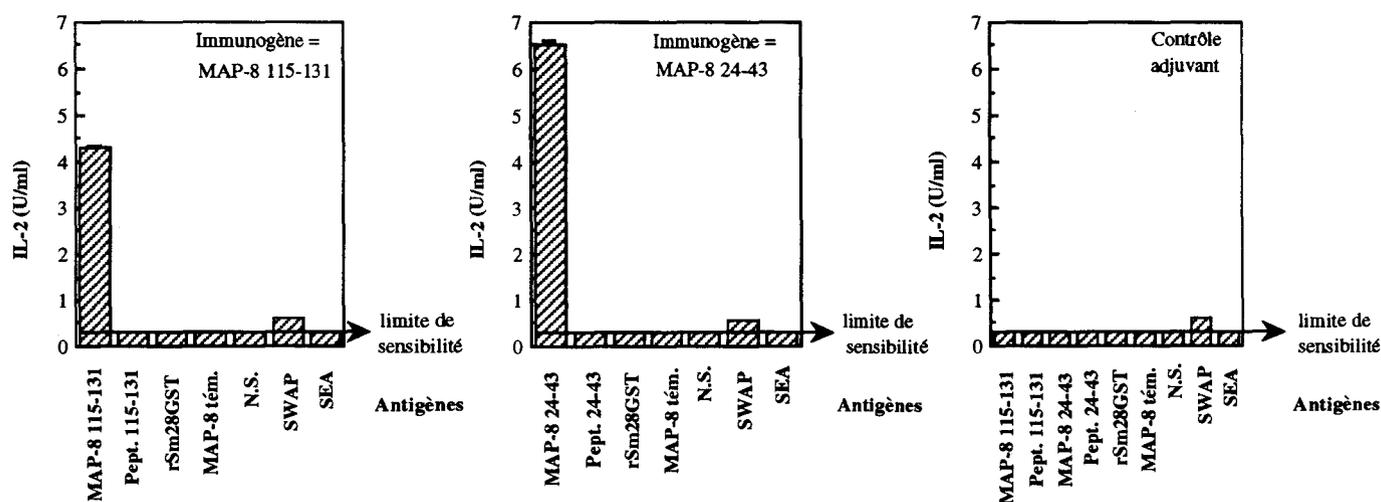
### 3°) Production d'IL-2.

Dans tous les cas où il y a production d'IL-2, le maximum de cette production est observé 48 heures après le début de la stimulation *in vitro*. Les résultats obtenus sont présentés figure 7. Ils montrent que :

1/ Les splénocytes des souris contrôles produisent de l'IL-2 en présence de l'antigène SWAP mais pas en présence des autres antigènes.

2/ Les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131 ou par le MAP-8 24-43 produisent spécifiquement de l'IL-2 en présence des antigènes immunisants mais pas en présence des peptides monomères ou de la Sm28-GST native ou recombinante.

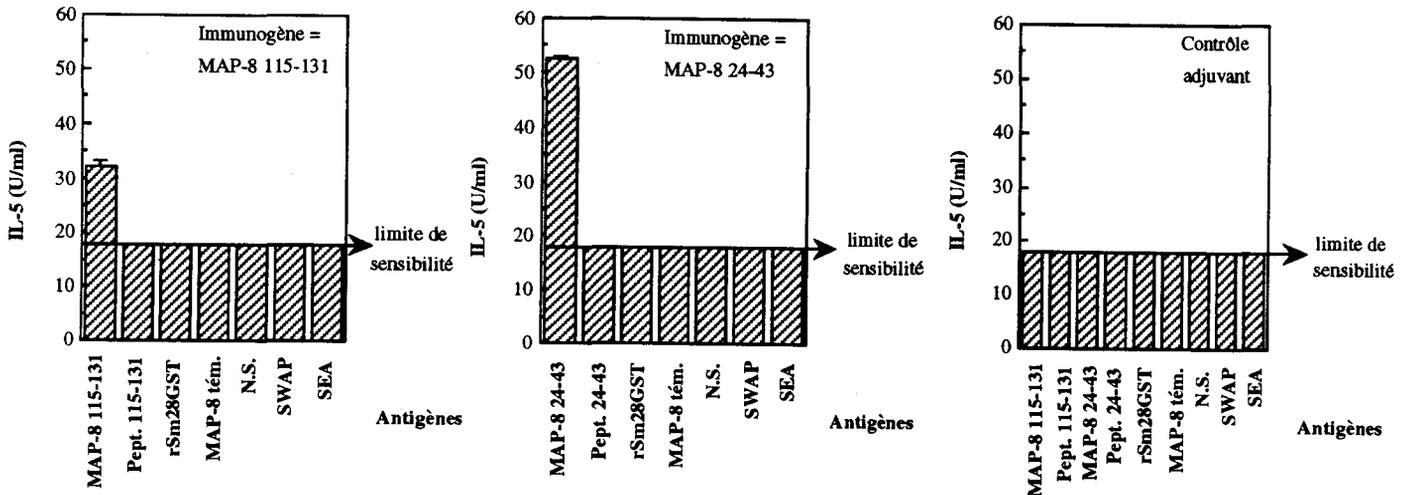
3/ La production d'IL-2 par les cellules anti-MAP-8 24-43 est plus élevée que celle des cellules anti-MAP-8 115-131.



**Figure 7 :** Production d'IL-2 *in vitro* par les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131, le MAP-8 24-43 ou du milieu salin en présence d'adjuvant de Freund. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

#### 4°) Production d'IL-5.

La figure 8 présente les résultats des dosages IL-5 des surnageants récupérés 4 jours après le début de la culture. Elle montre que les splénocytes des animaux immunisés par le MAP-8 115-131 ou par le MAP-8 24-43 produisent de l'IL-5 face aux antigènes immunisants mais pas face aux peptides monomères ou à la Sm28GST native ou recombinante. La production d'IL-5 s'avère reproductiblement plus élevée avec les cellules anti-MAP-8 24-43 qu'avec les cellules anti-MAP-8 115-131.



**Figure 8 :** Production d'IL-5 *in vitro* par les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131, le MAP-8 24-43 ou du milieu salin en présence d'adjuvant de Freund. Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

#### 5°) Production d'IL-4.

Aucune production d'IL-4 n'a pu être détectée dans les surnageants récupérés 24, 48 ou 96 heures après la mise en culture quelque soit l'antigène et l'immunogène testé.

#### 6°) Production d'IL-10.

Alors que notre technique de dosage de l'IL-10 (ELISA) nous a permis de détecter cette cytokine dans les surnageants de culture de splénocytes de souris infectées depuis 60 jours par *S.mansoni* stimulés par l'antigène SEA (densité optique comprise entre 0,60 et 0,65 pour un témoin négatif ne dépassant pas 0,09 (les valeurs sont exprimées en DO car nous ne disposons pas d'IL-10 recombinante)), nous n'avons pas pu détecter cette molécule dans les surnageants de culture des splénocytes des animaux immunisés par le MAP-8 115-131 ou le MAP-8 24-43 et ce quel que soit l'antigène stimulant et quelle que soit la date de

récupération (24, 48 ou 96 heures) des surnageants.

### 7°) Production d'IFN- $\gamma$ .

Aucune production d'IFN- $\gamma$  n'a pu être détectée dans les surnageants récupérés 24, 48 ou 96 heures après la mise en culture quelque soit l'antigène et l'immunogène testé.

### 8°) Conclusion.

L'ensemble de ces résultats nous apporte donc les trois renseignements suivants :

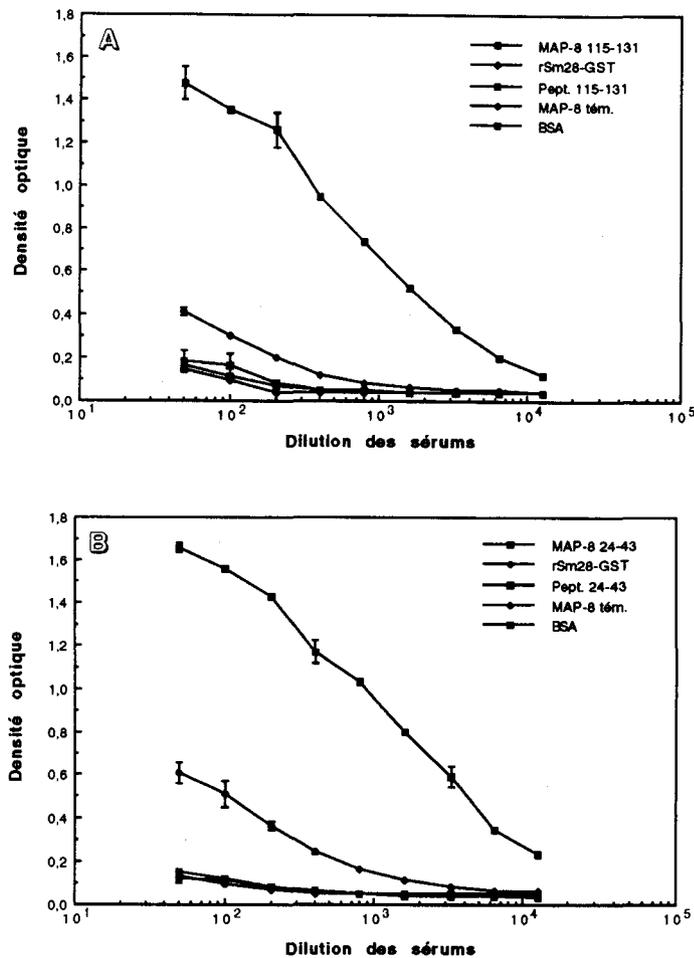
- 1/ Bien que dans nos conditions expérimentales nous ne détectons pas de prolifération des cellules anti-MAP-8 115-131 face au peptide 115-131, ce peptide s'avère quand même antigénique puisque capable d'induire une production spécifique d'IL-3 *in vitro*.
- 2/ Le MAP-8 24-43 s'avère plus immunogénique que le MAP-8 115-131 mais les cellules T générées après immunisation par cet antigène ne sont pas, contrairement aux cellules T anti-MAP-8 115-131, restimulables *in vitro* par la Sm28GST ou par le peptide monomère.
- 3/ Nous n'avons pas observé de différence dans le profil des cytokines induites par nos deux MAP-8. Ce profil n'est ni Th1 ni Th2.

## B) Etude de la réponse humorale.

Au moment où nous avons récupéré les splénocytes des animaux immunisés, nous avons aussi récupéré les sérums et avons dosé leurs IgG, IgG1 et IgA.

### 1°) Analyse de la réponse IgG.

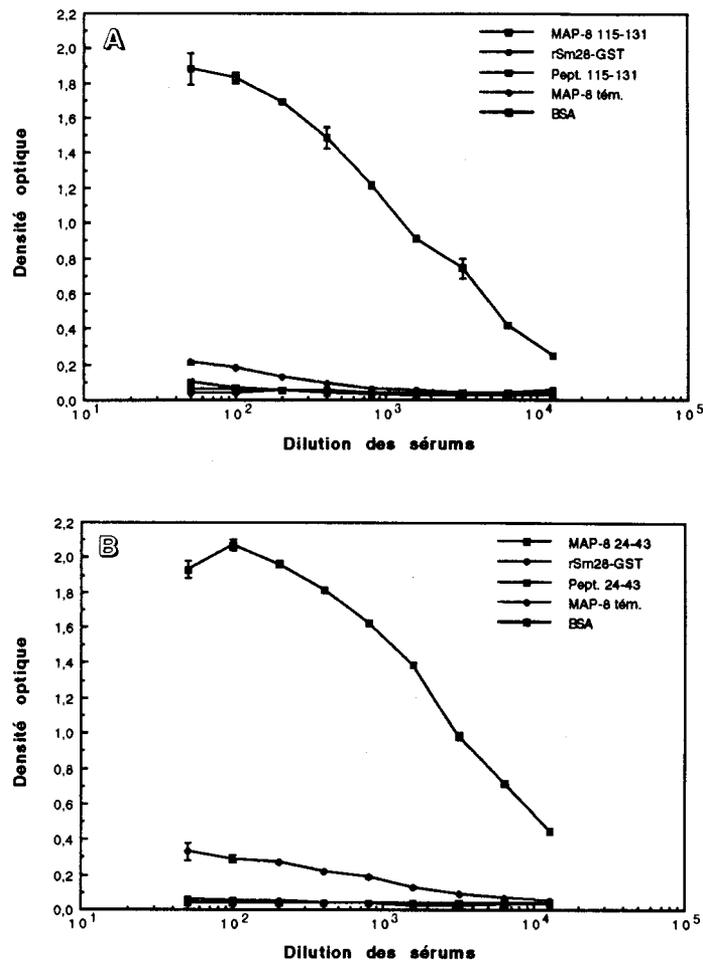
Comme le montre la figure 9, les sérums des animaux immunisés par les MAP-8 115-131 et 24-43 contiennent des IgG spécifiques de l'antigène immunisant dont au moins une partie est capable de reconnaître la Sm28GST. Le taux de ces anticorps est un peu plus élevé chez les animaux immunisés par le MAP-8 24-43. Par contre, aucune fixation spécifique des IgG sur les formes peptides monomères n'est observable.



**Figure 9 :** Analyse de la réponse IgG des souris CBA immunisées par le MAP-8 115-131 (A) ou par le MAP-8 24-43 (B). Les sérums de 8 souris immunisées par un même antigène ont été assemblés et le "pool" obtenu a été testé en ELISA contre l'antigène immunisant, le peptide monomère, la rSm28GST, un MAP-8 témoin et la sérum albumine bovine (BSA). **NB:** Les sérums des animaux récupérés avant les immunisations (J0) n'ont pas montré de réactivité face aux antigènes utilisés.

## 2°) Analyse de la réponse IgG1.

Comme le montre la figure 10, la réponse IgG1 des animaux immunisés par le MAP-8 115-131 ou le MAP-8 24-43 est très similaire à la réponse IgG totale : On note l'induction par ces deux immunogènes d'un réponse IgG1 reconnaissant l'antigène immunisant mais aussi, bien que dans une moindre mesure, la Sm28-GST. Là encore, le MAP-8 24-43 semble légèrement plus immunogène que le MAP-8 115-131.



**Figure 10 :** Analyse de la réponse IgG1 des souris CBA immunisées par le MAP-8 115-131 (A) ou par le MAP-8 24-43 (B). La technique utilisée est identique à celle utilisée pour doser les IgG totales.

### 3°) Analyse de la réponse IgA.

Comme le montre le tableau 1, les sérums des animaux immunisés par le MAP-8 24-43, mais pas ceux des animaux immunisés par le MAP-8 115-131, contiennent des IgA spécifiques. Ces IgA sont capables, dans nos conditions expérimentales, de se fixer sur la Sm28GST mais pas sur le peptide 24-43.

Lorsque nous comparons ces résultats avec ceux de notre témoin positif ("pool" de 2 sérums de souris infectées par 50 cercaires de *S.mansoni* depuis 13 semaines), nous observons toutefois que la quantité d'IgA anti-Sm28GST contenue dans les sérums anti-

MAP-8 24-43 est extrêmement faible comparée à celle obtenue lors de l'infection. En effet, dans ce dernier cas, des valeurs atteignant 11077 cpm sont obtenues en sensibilisant les puits par l'antigène Sm28GST.

Antigènes Immunogènes	MAP-8 115-131	MAP-8 24-43	Pept. 115-131	Pept. 24-43	rSm28GST	BSA	MAP-8 tém.
MAP-8 115-131	<250	Non étudié	<250	Non étudié	<250	<250	<250
MAP-8 24-43	Non étudié	970±3	Non étudié	<250	785±15	<250	<250

**Tableau 1 :** Analyse de la réponse IgA des souris CBA immunisées par le MAP-8 115-131 ou par le MAP-8 24-43. Les sérums de 8 souris immunisées par un même antigène ont été assemblés et le "pool" obtenu a été testé en RIA contre l'antigène immunisant, le peptide monomère, la rSm28GST, un MAP-8 témoin et la sérum albumine bovine (BSA). Les valeurs sont exprimées en cpm. Seules sont considérées comme interprétables les valeurs supérieures à 250 cpm. **NB:** Les sérums des animaux récupérés avant les immunisations (J0) n'ont montré aucune réactivité face aux différents antigènes.

#### 4°) Conclusion.

Cette étude sur la réponse humorale nous montre que :

- 1/ Bien que les animaux immunisés par le MAP-8 24-43 ne montrent pas de réactivité cellulaire T *in vitro* face à la Sm28GST, ils présentent une réponse humorale spécifique de cette molécule.
- 2/ Les sérums des animaux immunisés par le MAP-8 115-131 semblent aussi reconnaître la Sm28GST .
- 3/ Le MAP-8 24-43 semble plus immunogène que le MAP-8 115-131 en terme de production d'IgG, d'IgG1 et d'IgA.

# Antigénicité des MAP-8 115-131 et 24-43 au cours de la schistosomiase murine

---

## I. Introduction.

Etant donné que la Sm28GST est présente à tous les stades de développement du parasite (schistosomule, schistosome et oeuf) (Trottein, F. 1992) et que la réponse immune dirigée contre les vers adultes apparaît être de phénotype Th1 tandis que la réponse immune induite par les oeufs apparaît de type Th2, il nous est apparu intéressant de déterminer si les séquences 115-131 et 24-43 de la Sm28GST étaient susceptibles de stimuler à la fois une réponse Th1 et une réponse Th2 ou si elles ne pouvaient stimuler que l'une d'entre elles et si oui laquelle d'entre elles.

Des souris CBA ont donc été infectées par *S.mansoni* et nous avons récupéré leurs splénocytes différents temps après l'infection. Nous avons ensuite stimulé ces cellules *in vitro* par les MAP-8 115-131 et 24-43, par un MAP-8 témoin et par les antigènes solubles totaux de vers adultes (SWAP) et d'oeufs (SEA), ces dernières préparations étant utilisées à titre de témoins positifs. Les surnageants de ces cultures ont été récupérés 24, 48 et 96 heures après le début de la stimulation afin d'analyser leur contenu en cytokines. Une étude lymphoproliférative a aussi été réalisée.

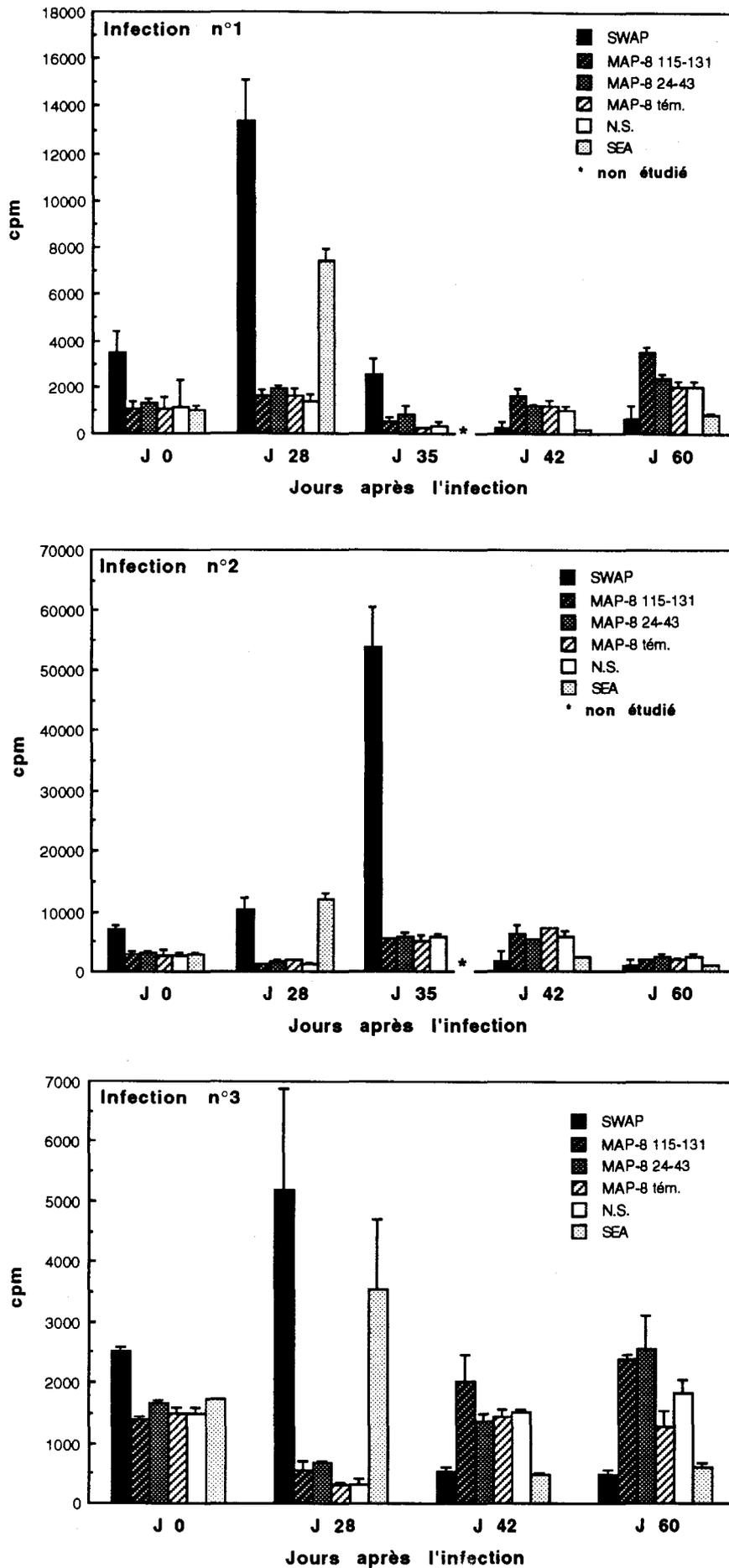
## II. Résultats.

Comme le montrent les figures 11, 12 et 13, nous n'avons pas pu détecter de réponse proliférative ou de production d'IL-2, d'IL-4 ou d'IL-5 en stimulant les splénocytes des animaux par les MAP-8 24-43 et 115-131 et ce quelle que soit la date de l'infection ou le moment de récupération des surnageants. Etant donné que nous n'avons pas non plus pu détecter dans ces conditions d'IL-3 ou d'IFN- $\gamma$  (résultats non présentés), l'ensemble de ces résultats nous a donc fait constater que les constructions MAP-8 des peptides 115-131 et 24-43 de la Sm28GST n'étaient pas suffisamment antigéniques pour nous permettre de répondre à la question que nous nous étions posée.

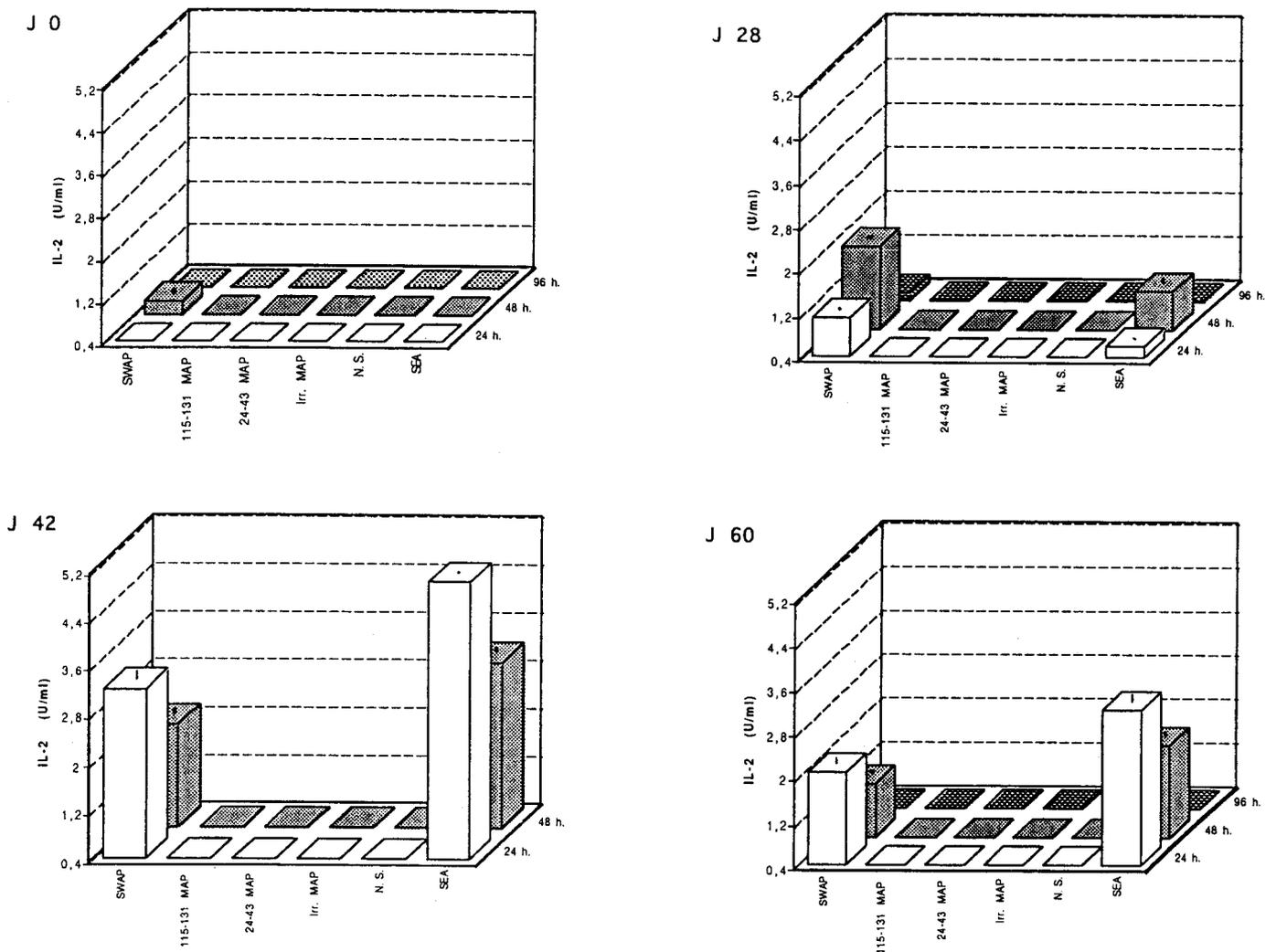
Toutefois, l'analyse des résultats met en évidence un comportement particulier des splénocytes récupérés après la ponte des parasites.

En effet, nos résultats décrivent que :

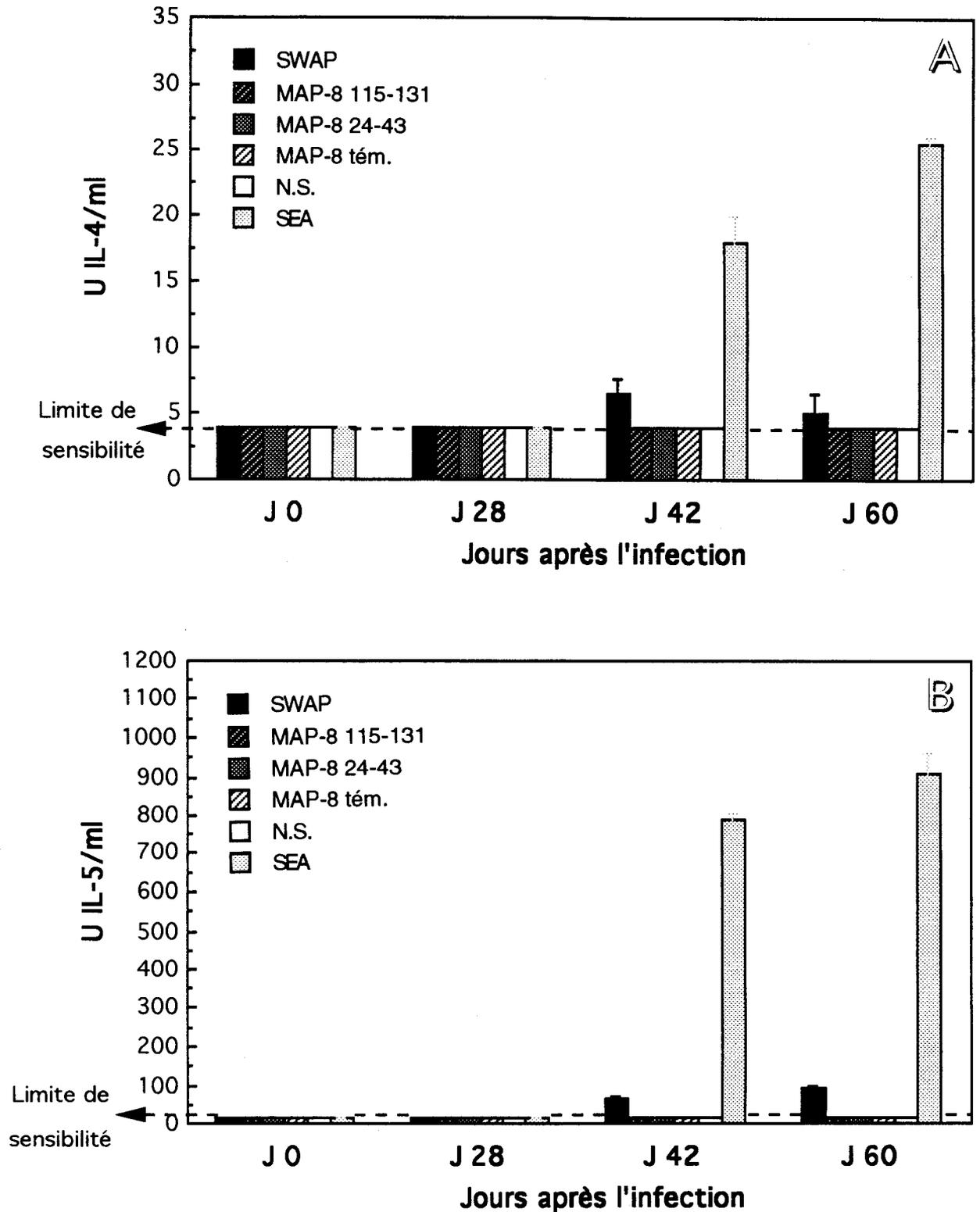
1/ **A J 42 et J 60 d'infection**, les splénocytes ne montrent pas, après quatre jours de culture en présence d'extraits totaux des antigènes parasitaires de vers adultes et d'oeufs, de



**Figure 11 : Réponse proliférative d'un "pool" de cellules spléniques totales de 5 souris CBA infectées par 50 cercaires de *Schistosoma mansoni* depuis 0, 28, 35, 42 ou 60 jours. Les cellules sont stimulées *in vitro* par 40 µg/ml des antigènes SWAP, SEA, MAP-8 115-131, MAP-8 24-43, par la construction MAP-8 témoin ou ne sont pas stimulées (N.S.). La thymidine tritiée est ajoutée quatre jours après le début de la culture. Trois cinétiques d'infections sont représentées (infections n°1, 2 et 3).**



**Figure 12 : Production d'IL-2 par un "pool" de cellules spléniques totales de 5 souris CBA infectées par 50 cercaires du parasite *S. mansoni* depuis 0, 28, 42 et 60 jours. Les cellules sont stimulées *in vitro* par 40  $\mu$ g/ml des antigènes SWAP, SEA, MAP-8 115-131, MAP-8 24-43, par la construction MAP-8 témoin ou ne sont pas stimulées (N.S.). L'IL-2 est dosée dans les surnageants récupérés 24, 48 et 96 heures après le début de la stimulation. Ces résultats sont représentatifs de trois cinétiques d'infections.**



**Figure 13 : Production d'IL-4 (A) et d'IL-5 (B) par un "pool" de cellules spléniques totales de 5 souris CBA infectées par 50 cercaires du parasite *S. mansoni* depuis 0, 28, 42 et 60 jours. Les cellules sont stimulées *in vitro* par 40 µg/ml des antigènes SWAP, SEA, MAP-8 115-131, MAP-8 24-43, par la construction MAP-8 témoin ou ne sont pas stimulées (N.S.). Ces résultats montrent les quantités d'IL-4 et d'IL-5 présentes dans les surnageants récupérés respectivement 24 et 96 heures après le début de la stimulation.**

réponse proliférative. Par ailleurs, et de façon tout à fait surprenante, ces cellules **incorporent même moins de thymidine que lorsqu'elles sont cultivées en présence du milieu de culture seul** (figure 11).

2/ A l'inverse, à J 28 et 35 d'infection, les splénocytes s'avèrent dans ces mêmes conditions de culture présenter une réponse proliférative face aux antigènes SWAP et SEA (Figure 11) suggérant ainsi que a/ les animaux ont bien été infectés et que **b/ les antigènes ne sont pas toxiques**. Notons à titre indicatif que, puisque la littérature décrit que la ponte des parasites ne démarre réellement chez la souris qu'au cours de la 6ème semaine d'infection, il nous apparaît probable que la réactivité cellulaire observée à cette période vis-à-vis de l'antigène d'oeuf soit due à la présence dans cette préparation de molécules antigéniquement proches de celles contenues dans la préparation extraite de vers adultes.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous amène à suspecter que, **après la ponte, la stimulation antigénique *in vitro* des splénocytes puisse conduire à l'élimination de certaines de ces cellules.**

De façon très intéressante, nos résultats montrent aussi que **la culture, en présence d'antigène SWAP ou SEA, de splénocytes récupérés après la ponte des parasites conduit cependant à leur activation** puisque nous détectons dans les surnageants de culture de ces cellules de l'IL-2 (figure 12), de l'IL-4 et de l'IL-5 (figure 13). Notons que la présence de ces deux dernières cytokines à cette période d'infection est en accord avec les résultats de Grzych, J. M. et coll. (1991) montrant que la ponte des schistosomes induit l'apparition d'une réponse Th2.

De façon particulière, nous avons aussi observé que d'une manière reproductible, la production d'IL-2 par ces cellules s'avérait maximale dès 24 heures après le début de la stimulation. Etant donné que, avant la ponte, les splénocytes présentent *in vitro* une production d'IL-2 qui n'est maximale qu'à 48 heures (figure 12), nous sommes amenés à spéculer qu'une hyper-réactivité cellulaire après la ponte pourrait peut être expliquer cette cinétique différentielle.

Emettant suite à ces derniers résultats, l'hypothèse que, après la ponte, les splénocytes pourraient peut être proliférer *in vitro* face aux antigènes parasitaires de façon très précoce, nous avons décidé de réaliser une expérience où la thymidine serait ajoutée un, deux, trois ou quatre jours après le début de la stimulation antigénique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2. Comme nous le voyons, ils montrent qu'une réponse proliférative peut être mise en évidence si la thymidine est ajoutée le premier ou le second jour de la culture.

Jours après le début de la stimulation antigènes	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
SWAP	59020±5201	2608±146	192±36	56±6
Non Stimulé	14386±342	1605±312	391±133	366±89

**Tableau 2 ; Cinétique de la réponse proliférative *in vitro* des cellules spléniques totales de souris CBA infectées par 50 cercaires de *S.mansoni* depuis 42 jours.** Les cellules sont stimulées *in vitro* par 40 µg/ml d'antigène de ver adulte (SWAP) ou ne sont pas stimulées. La thymidine tritiée est ajoutée un, deux, trois ou quatre jours après le début de la culture.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous amène à émettre l'hypothèse que les splénocytes des souris infectées par *S.mansoni* pourraient présenter, après la ponte des parasites, une hyper-réactivité cellulaire face aux extraits totaux d'antigènes parasitaires qui serait suivie de l'élimination rapide de ces cellules.

## DISCUSSION

**Contribution au développement d'une approche  
vaccinale peptidique contre la schistosomiase**

Nos travaux se sont inscrits dans le cadre d'une approche vaccinale peptidique contre la schistosomiase utilisant les séquences peptidiques 115-131 et 24-43 de l'antigène protecteur Sm28GST dérivé de *Schistosoma mansoni*.

### **I. Recherche de constructions chimiques capables de rendre la séquence 115-131 de la Sm28-GST immunogène sans utilisation de molécule porteuse.**

Notre approche a consisté à synthétiser quatre constructions du peptide 115-131 en choisissant des constructions dont on sait, dans d'autres modèles, qu'elles sont capables de rendre des peptides immunogènes en terme d'induction d'une réponse humorale T-dépendante reconnaissant les molécules natives et nous avons comparé leur immunogénicité.

Nous avons ainsi montré que bien que nos quatre constructions (un **polymère** de peptides 115-131 associés entre eux grâce à la glutaraldéhyde, une construction contenant une configuration en **tandem** de trois peptides légèrement raccourcis pour faciliter la configuration  $\alpha$ -hélicoïdale de l'ensemble et deux constructions contenant soit pour l'une 2 (**MAP-2**) soit pour l'autre 8 (**MAP-8**) peptides 115-131 reliés par leurs extrémités COOH terminales à un "noyau" de résidus lysines) permettaient la conservation du (des) épitope(s) B de la séquence 115-131 reconnus par les anticorps anti-Sm28-GST, **la construction MAP-8 s'avérait être la plus immunogène en terme d'induction d'une production d'IgG capable de reconnaître la Sm28GST et en terme d'induction d'une réponse cellulaire T restimulable *in vitro* par la Sm28GST.**

Notons que, comme lors d'une étude comparative de l'immunogénicité de constructions MAP-2 et MAP-8 de peptides issus du virus FMDV et du virus de l'hépatite B, Tam, J.P. et coll. 1990 et Francis, M.J. et coll. (1991) avaient aussi observé que leur construction MAP-8 était plus immunogène que leur construction MAP-2 en terme d'induction d'une réponse humorale spécifique avec notamment de faibles doses d'immunogènes, ceci pourrait suggérer un phénomène général (indépendant de la séquence peptidique). Par contre, selon les résultats de ces mêmes auteurs, la construction MAP-4 serait aussi efficace que la construction MAP-8.

L'intérêt de la construction MAP-8 (ou MAP-4) dans l'induction d'une réponse humorale reconnaissant la molécule native sera confirmé, dans notre laboratoire par Ivanoff, N. (1991) qui montrera que la présentation du peptide 24-43 de la Sm28GST sous forme MAP-8 rend celui-ci fortement immunogène en terme d'induction d'une réponse humorale et d'une réponse cellulaire T reconnaissant la molécule Sm28GST et, dans d'autres laboratoires par de nombreux chercheurs travaillant dans des modèles aussi différents que le Virus de

l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) (Wang, C.Y. et coll. 1991 - Nardelli, B. et coll. 1992), le virus FMDV (Francis, M. J. et coll. 1991) ou les agents responsables du paludisme (Del Giudice, G. et coll. 1990 - Pessi, A. et coll. 1991).

**Toutefois**, comme le montrent les résultats de Briand, J.P. et coll. (1992), ces constructions peuvent aussi n'induire que des anticorps ne reconnaissant pas la molécule native. C'est pourquoi comme le suggèrent ces auteurs, l'approche MAP doit être considérée comme une stratégie très intéressante mais dont le succès reste dépendant du modèle peptidique à moins de trouver des astuces supplémentaires. Par exemple, Lu, Y. A. et coll. (1991) montrent qu'il est possible d'obtenir, dans certains cas, des constructions MAP induisant une réponse humorale spécifique de la molécule native si les peptides (principalement C terminaux des molécules) sont reliés au noyau polylysine non plus via leur partie COOH terminale mais via leur partie N terminale par l'intermédiaire de ponts thio-acétates.

## **II. Mise en évidence de l'intérêt de la construction MAP-8 dans le dosage d'anticorps anti-peptides.**

Lors de l'analyse de l'antigénicité de nos différentes constructions du peptide 115-131, nous avons observé que lorsque MAP-8 et, dans une moindre mesure, MAP-2 étaient utilisés pour sensibiliser les plaques de microtitration, la détection des anticorps anti-115-131 contenus dans les sérums des animaux immunisés par la Sm28GST était grandement améliorée. Grâce à l'utilisation de sérums de rats immunisés par le peptide 115-131 monomère, nous avons par la suite démontré que la construction MAP permettait d'augmenter la sensibilité du test par la fixation non dénaturante d'un plus grand nombre d'épitopes sur le support solide.

Cette propriété qui sera aussi mise en évidence en utilisant la construction MAP-8 du peptide 24-43 de la Sm28GST (Ivanoff, N. 1991) semble actuellement être indépendante des peptides constituant le MAP (Tam, J.P. et coll. 1989 - Francis, M.J. et coll. 1991 - Marsden, H.S. et coll. 1992). MAP-8 serait en fait comparativement à MAP-16, MAP-4 ou MAP-2 la meilleure construction (Tam, J.P. et coll. 1989b - Francis, M. J. et coll. 1991). Il serait toutefois possible d'augmenter encore la "qualité" de ces molécules en insérant quelques résidus glycines entre les peptides et les résidus lysines du noyau (Marsden, H.S. et coll. 1992). Ces MAPs ont déjà ainsi été utilisés très efficacement pour détecter des anticorps spécifiques du VIH-1 (Marsden, H.S. et coll. 1992) ou de *Plasmodium malariae* (Habluetzel, A. et coll. 1991) dans les sérums de patients infectés. Il serait donc judicieux de les utiliser aussi pour le suivi immunologique des populations humaines qui seraient immunisées par la Sm28GST ou par certains de ses épitopes.

### **III. Potentiel vaccinal de la construction 115-131 MAP-8 chez le rat.**

Le potentiel vaccinal de la construction 115-131 MAP-8 a été étudié par Wolowczuk, I. et coll. (1991). Ces auteurs ont ainsi montré que de façon spectaculaire, l'injection de cette molécule à des rats Fischer en présence d'adjuvant de Freund avant infection par *S.mansoni* permettait une réduction de la charge parasitaire de 40 à 50 % comparée aux animaux témoins immunisés avec de l'ovalbumine ou avec une construction MAP-8 irrelevante.

La mise en évidence par ces mêmes auteurs que les animaux immunisés présentaient avant l'infestation des IgE spécifiques de la Sm28GST et que leurs sérums étaient cytotoxiques *in vitro* vis-à-vis des schistosomules en présence de macrophages, d'éosinophiles ou de plaquettes suggéra par ailleurs et en coordination avec nos observations de la présence d'IgG2a dans ces sérums, que la protection observée devait être due à des mécanismes d'ADCC impliquant ces différentes catégories d'anticorps et de cellules effectrices.

Ces résultats, joints à ceux de Tam, J.P. et coll. (1990) et de Lugovskoi, A. A. et coll. (1992) montrant qu'il est possible en utilisant ces constructions, de protéger des animaux contre les infections pour lesquelles les mécanismes effecteurs sont dépendant d'anticorps démontrent donc l'intérêt de l'approche moléculaire MAP-8 dans l'élaboration d'une stratégie vaccinale peptidique. Toutefois, parce que la schistosomiase est une parasitose où des mécanismes protecteurs différents sont mis en place selon le modèle animal et que le débat est complètement ouvert quant à la nature de l'immunité protectrice chez l'homme, il nous est donc apparu essentiel d'étudier l'immunogénicité de la construction 115-131 MAP-8 chez la souris. En effet, contrairement au rat, l'immunité serait plutôt à médiation cellulaire chez cet animal. Pour cette même raison, une étude de l'immunogénicité de la molécule 24-43 MAP-8 chez la souris fut aussi entreprise.

### **IV. Immunogénicité des constructions 115-131 MAP-8 et 24-43 MAP-8 chez la souris.**

#### **A) Nature de la réponse cellulaire : Analyse des cytokines produites.**

**1°) Cytokines produites après la stimulation *in vitro* des cellules par l'immunogène : un profil ni Th1 ni Th2 ?**

Lorsque nous avons stimulé *in vitro* les splénocytes des animaux immunisés par les MAP-8 115-131 et 24-43 avec les immunogènes respectifs, nous avons pu détecter une production d'IL-3, d'IL-2 et d'IL-5 mais n'avons pas pu détecter de production d'IL-4, d'IL-10 ou d'IFN- $\gamma$ .

Ces résultats nous amènent donc aux interprétations suivantes :

1/ La réponse anti-MAP-8 115-131 ou 24-43 serait, au moment de notre étude, en phase de différenciation. Cette hypothèse fait référence :

- d'une part aux résultats de Firestein, G. S. et coll. (1989) mettant en évidence qu'après une culture à court terme de populations lymphocytaires issues de souris immunisées depuis 7 jours par l'antigène KLH "Keyhole Limpet Hemocyanin", les clones T CD4<sup>+</sup> obtenus sont producteurs à la fois d'IL-2, d'IL-3, d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  (seules cytokines étudiées) et que certains d'entre eux deviennent de phénotype Th2 après une culture à long terme *in vitro*.
- et d'autre part aux travaux de Vella, A. T. et coll. (1992) montrant que l'injection d'oeufs de *Schistosoma mansoni* (J0) à des souris saines, induit une réponse immune qui à J3 est productrice d'IL-2, d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 et qui à J10 est productrice uniquement d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10.

2/ La réponse anti-MAP-8 115-131 ou 24-43 serait, au moment de notre étude, complètement différenciée. Dans ce cas, nos résultats amèneraient à suggérer que :

a/ Soit les MAP-8 115-131 et 24-43 contiennent plusieurs épitopes T, certains induisant une réponse Th2 dont la production d'IL-4 et d'IL-10 ne serait pas détectée en raison d'un manque de sensibilité des techniques de dosage, et d'autres induisant une réponse Th1 dont la production d'IFN- $\gamma$  ne serait pas détectée là aussi à cause d'un manque de sensibilité du test. Cette hypothèse est toutefois bien sûr en désaccord avec le postulat de Mosmann, T.R. et coll. (1991) selon lequel toute réponse immune (qu'elle soit induite par un ou plusieurs épitopes) serait polarisée soit vers le phénotype Th2 soit vers le phénotype Th1.

b/ Soit les MAP-8 115-131 et 24-43 induisent effectivement (via un ou plusieurs épitopes) une réponse immune qui n'est pas productrice d'IL-4, d'IL-10 ou d'IFN- $\gamma$ . Notons à cet égard que nous n'avons pas non plus pu détecter de production d'IL-4 ou d'IL-10 en stimulant *in vitro* par les MAP-8 115-131 ou 24-43 les cellules des ganglions inguinaux et périaortiques de nos animaux bien que ces organes soient décrits par DeKruyff, R.H. et coll. (1992) et par Caulada-Benedetti, Z. et coll. (1991) "meilleurs producteurs de cytokines de type Th2 que la rate" (résultats non présentés). Bien que cette hypothèse n'ait pas de fondements particuliers, on peut toutefois la rapprocher des données de la littérature suivantes :

- $\alpha$ ) En infectant par *Nippostrongylus brasiliensis* des souris mutantes n'exprimant pas le gène codant pour l'IL-4, Kopf, M. et coll. (1993) observent que les splénocytes des animaux ne produisent pas d'IL-4 mais produisent encore un peu d'IL-5. Ils démontrent ainsi que dans cette infection, l'IL-4 contrôle en grande partie mais pas totalement la production d'IL-5.

- $\beta$ ) En injectant de l'IL-2 recombinante à des souris saines Yamaguchi, Y. et coll. (1990) notent que les animaux se mettent à produire des quantités d'IL-5 telles qu'une

hyperéosinophilie est même induite (l'IL-5 est le facteur de différenciation terminale et de prolifération des éosinophiles (Yamaguchi, Y. et coll. 1988)). Ces auteurs démontrent ainsi qu'une cytokine de type Th1 peut stimuler la production d'une cytokine de type Th2.

-γ) En incubant *in vitro* en présence d'IL-2 des clones Th2, Bohjanen, P.R. et coll. (1990) notent l'apparition d'une production d'IL-5 non accompagnée d'une production d'IL-4. Ils démontrent ainsi que l'IL-2 peut stimuler la production d'IL-5 mais pas celle d'IL-4. En fait, comme des anticorps anti-IL-2 sont toutefois capables d'inhiber à la fois *in vitro* (Metwali, A. et coll. 1993a, 1993b) et *in vivo* (Wynn, T.A. et coll. (1993) la production d'IL-4 par les lymphocytes T producteurs de cette cytokine, tout ceci suggère que l'IL-2 soit nécessaire à la production d'IL-4 par les lymphocytes T mais soit en elle-même incapable de stimuler la production de cette cytokine.

-δ) En stimulant *in vitro* des mastocytes murins par un système anticorps IgE - anticorps anti-IgE pour agréger les récepteurs pour les IgE de ces cellules, Plaut, M. et coll. (1989) observent que ceux-ci peuvent produire des ARN messagers codant pour l'IL-5 tandis que lors d'un suivi immunologique de patients atteints de la maladie coeliaque, Desreumaux, P. et coll. (1992) montrent que les éosinophiles qui infiltrent la muqueuse intestinale sont producteurs d'IL-5. Ces auteurs démontrent ainsi que l'IL-5 peut aussi être produite par des cellules non T.

-ε) Etant donné que l'IL-10 est connue pour inhiber la production d'IFN-γ par les cellules T et les cellules NK (Moore, K.W. et coll. 1993) on peut se demander si l'IL-10 ne serait pas produite uniquement lorsqu'il y a production d'IFN-γ, ce pour freiner l'amplification d'un phénomène inflammatoire (l'IFN-γ est une cytokine de l'inflammation) qui pourrait par excès devenir toxique. Notons à cet égard que d'une part le LPS induit l'apparition simultanée d'IFN-γ (produit par les cellules NK) et d'IL-10 (produit par les macrophages et les cellules B) (O' Garra, A. et coll. 1990) et que d'autre part l'injection de bactéries tuées du genre *Brucella abortus* à des animaux induit *in vivo* dans les dix premiers jours suivant l'immunisation l'apparition d'une production simultanée d'IFN-γ et d'IL-10 par les cellules T CD4<sup>+</sup> sans alors induire d'IL-2, d'IL-4 ou d'IL-5 (Svetic, A. et coll. (1993).

Comme nous le voyons donc, la nature d'une réponse immune pourrait dépendre de multiples facteurs. Par ailleurs, il apparaît probable que la classification des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins en cellules Th1 et Th2 (classification établie à partir d'études clonales *in vitro* (Mosmann, T.R. et coll. 1986 - Cherwinski, H.M. et coll. 1987)) soit aussi un peu trop réductionniste.

Enfin, notons que le profil sécrétoire que nous avons obtenu ne semble pas être une propriété générale des MAPs puisque certains MAPs peuvent induire une production d'IL-4 mais pas d'IL-2 ni d'IFN-γ (Liew, F.Y. et coll. 1990) et d'autres la production d'IFN-γ mais pas d'IL-5 (Munesinghe, D.Y. et coll. 1991).

## 2°) Cytokines produites après stimulation *in vitro* des splénocytes par la Sm28GST.

De façon très intéressante, nous avons mis en évidence une production spécifique d'IL-3 par les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 115-131, mais pas par les splénocytes de souris immunisées par le MAP-8 24-43, lorsque ces cellules étaient cultivées en présence de Sm28GST. Etant donné qu'aucune autre cytokine (IL-2, IL-4, IL-5 et IL-10 étudiées) et qu'aucune prolifération de ces cellules n'était détectable dans ces conditions, que l'immunogène soit le MAP-8 115-131 ou le MAP-8 24-43, ceci nous suggère que la dégradation de la Sm28GST par les cellules présentatrices d'antigènes de la rate aboutit à la production de peptides capables de stimuler les lymphocytes T anti-MAP-8 115-131 mais pas les lymphocytes T anti-MAP-8 24-43. Ce point est essentiel car il suggère que si ces études *in vitro* sont le reflet de ce qui se passe *in vivo*, une immunisation par le MAP-8 115-131 mais pas une immunisation par le MAP-8 24-43 pourrait permettre lors d'une infection ultérieure par *S.mansoni* une réponse anti-Sm28GST anamnastique (principe de la vaccination).

Toutefois, étant donné que l'antigénicité de la Sm28GST vis-à-vis des lymphocytes T anti-MAP-8 115-131 ne s'est caractérisée que par une production d'IL-3, nous sommes amené à nous demander si ce résultat est dû à un manque de sensibilité des techniques de dosage des autres cytokines ou s'il est dû au fait que les peptides issus de la dégradation de la Sm28GST sont capables d'interagir avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et avec le récepteur T (TcR) des lymphocytes anti-octopus 115-131 mais que cette interaction ne peut aboutir qu'à une production d'IL-3. Cette hypothèse fait référence aux travaux de Quill, H. et coll. (1987), de Evavold, B.D. et coll. (1991), de Röcken, M. et coll. (1992) et de Racioppi, L. et coll. (1993) montrant que le profil sécrétoire des cellules T est modifié lorsque l'avidité de l'interaction TcR/CMH-peptide est changée.

Pour expliquer l'absence d'antigénicité de la Sm28GST vis-à-vis des lymphocytes T anti-MAP-8 24-43 alors que ces mêmes lymphocytes répondaient à une stimulation par le MAP-8 24-43, nous émettons les deux hypothèses suivantes :

a/ les cellules spléniques présentatrices d'antigènes ne sont pas capables *in vitro* de dégrader l'antigène Sm28GST de manière à présenter correctement le(s) épitope(s) contenus dans la séquence 24-43.

b/ les cellules T anti-MAP-8 24-43 reconnaissent un (des) épitope(s) qui ne sont pas présentés par la séquence 24-43 seule même non dégradée. Etant donné que les molécules de classe 2 du complexe majeur d'histocompatibilité ont un présentoir qui peut accueillir des peptides de taille variée (présentoir non fermé aux extrémités (Brown, J. H. et coll. 1993)) et que certains MAP-4 peuvent activer les lymphocytes qui leur sont spécifiques sans avoir besoin d'être dégradés par les cellules présentatrices d'antigènes (Grillot, D. et coll. 1993), il nous apparaît ainsi tout à fait envisageable que les lymphocytes T "anti"-MAP-8 24-43 ne

soient stimulables que par l'ensemble : séquence peptidique- résidus lysines du MAP ou "bras" peptidiques du MAP. Notons à cet égard que le peptide 24-43 monomère s'est aussi avéré non activateur dans nos conditions expérimentales.

### B) Nature de la réponse humorale.

Grâce à des tests ELISA ou RIA, nous avons mis en évidence que les sérums des animaux immunisés par le MAP-8 24-43 contenaient des IgG, des IgA et des IgG1 spécifiques de l'immunogène et qu'au moins une partie de ces anticorps reconnaissent la Sm28GST. Ce résultat est intéressant dans la mesure où les cellules T spléniques des animaux immunisés par le MAP-8 24-43 ne sont pas restimulables *in vitro* par la Sm28GST. Ce phénomène, déjà observé dans d'autres modèles antigéniques (Grillot, D. et coll. 1990), nous rappelle ainsi qu'une construction peptidique qui induit *in vivo* la production d'anticorps reconnaissant la molécule native n'est pas forcément un bon candidat vaccinal et que le critère "bon candidat vaccinal" devrait en fait très exactement uniquement faire référence à l'aptitude ou non du candidat à induire une réponse anamnétique lors du challenge infectieux.

Lorsque nous comparons ces résultats avec ceux du dosage des cytokines, nous constatons que la présence simultanée d'IL-5 et d'IgA concorde avec les résultats de la littérature montrant que la production d'IL-5 stimule *in vitro* (Schoenbeck, S. et coll. 1989) et *in vivo* (Ramsay, A.J. et coll. 1993) la production d'IgA. Toutefois, nous notons que la quantité d'IgA que nous avons détectée est remarquablement faible. Etant donné que dans notre laboratoire, Gaubert, S. (1993) a montré qu'une immunisation avec la Sm28GST en présence d'adjuvant de Freund induit une réponse IgA qui s'amplifie très tardivement, nous pouvons suspecter que ce faible taux d'IgA soit lié à une récupération précoce des sérums. Par ailleurs, comme seule la réponse IgA sérique a été étudiée, il serait très intéressant d'analyser si ces constructions peuvent induire la production d'IgA sécrétoires, notamment en adaptant pour cela le protocole d'immunisation.

Quant à la production d'IgG1, elle pourrait aussi être liée à la production d'IL-5. En effet, bien que Purkerson, J.M. et coll. (1992) décrivent que la synthèse de ces anticorps est en grande partie liée à la présence simultanée d'IL-4 et d'IL-5, Kühn, R. et coll. (1991) montrent que des souris mutantes dépourvues du gène codant pour l'IL-4 sont quand même capables de produire de l'IL-5 et des quantités modérées d'IgG1.

Dans les sérums des souris immunisées par le MAP-8 115-131 furent aussi détectées des IgG et des IgG1 anti-Sm28GST bien qu'en quantités plus faibles que celles trouvées dans les sérums des animaux immunisés par le MAP-8 24-43. Ces résultats sont en accord avec la mise en évidence de la plus faible immunogénicité de cet antigène. Par ailleurs, le fait que nous n'ayons pas pu détecter d'IgA bien que nous détectons de l'IL-5 nous amène à

suspecter une sensibilité de dosage insuffisante ou/et un prélèvement trop précoce.

### **V. Potentiel vaccinal des MAP-8 115-131 et 24-43 chez la souris.**

Comme nous le voyons donc, l'ensemble de ces résultats apporte des renseignements importants mais qui demandent à être complétés :

- par une analyse de l'immunogénicité T et B de ces constructions à des périodes plus tardives après l'immunisation avec une analyse de la réponse cellulaire T au niveau de la rate et des autres organes lymphoïdes.
- par l'analyse des cytokines produites *in vivo* dans ces différents organes puisque aucune étude n'a encore vérifié si les résultats obtenus par stimulation *in vitro* des cellules reflétaient la stimulation chez l'animal. Notons que cette comparaison sera très prochainement réalisable dans notre laboratoire grâce à la mise en place par Françoise Cottrez d'une technique faisant appel à la PCR quantitative. Cette technique consiste à récupérer les ARNs messagers totaux produits dans les organes lymphoïdes des animaux immunisés, à les transformer en ADNc complémentaires (ADNc), à amplifier les ADNc codant pour les cytokines recherchées à l'aide d'amorces spécifiques en utilisant la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et à quantifier les produits de l'amplification à l'aide de témoins internes. Cette quantification semble nécessaire puisque des animaux ayant reçu uniquement de l'adjuvant de Freund présentent une production non spécifique d'ARN messagers codant pour diverses cytokines (IL-4, IFN- $\gamma$  (autres cytokines non étudiées)) (Van Den Broecke, C. Résultats non publiés).
- par l'analyse de la réponse cellulaire T et B induite par les animaux immunisés puis infectés, d'une part afin de déterminer si les réponses cellulaires T induites par ces constructions sont restimulables *in vivo* par le parasite et d'autre part afin de caractériser la nature de la réponse immune amplifiée aux différentes périodes de l'infection. Ce point est particulièrement important puisque l'on sait que des facteurs d'origine parasitaire peuvent influencer d'une manière déterminante la réponse immunitaire notamment dans la sélection des cytokines ainsi que des isotypes d'anticorps produits (Verwaerde, C. et coll. 1986 - Verwaerde, C. et coll. 1988 - Grzych, J. M. et coll. 1991 - Kullberg, M.C. et coll. 1992).
- par l'analyse du pouvoir protecteur de ces constructions.

### **VI. Conclusions - Perspectives.**

L'ensemble de ces résultats nous laisse présager que le MAP-8 115-131 puisse servir de support à une stratégie vaccinale peptidique contre la schistosomiase chez l'homme tandis que nous sommes actuellement plus réservés en ce qui concerne l'utilisation du MAP-8 24-43. Toutefois, nous savons que cette approche vaccinale nécessitera de surmonter les deux problèmes suivants :

*1/ Le problème de la restriction génétique de la réponse immune.*

En effet, bien que le MAP-8 115-131 semble pouvoir être immunogène chez des animaux de statut génétique différent (rat Fischer, souris CBA) et bien que l'on sache d'après les données de la littérature que la présentation de certains peptides sous forme MAPs peut rendre ceux-ci immunogènes dans de nombreux haplotypes (Del Giudice, G. et coll. 1990 - Pessi, A. et coll. 1991), il nous apparaît malgré tout très peu probable que cette construction puisse contourner la restriction génétique au sein de la population humaine puisque celle-ci est panmictique. C'est pourquoi des solutions devront être trouvées. Parmi celle-ci l'approche combinatoire "Mixotope" pourrait s'avérer judicieuse. Cette approche qui a été mise au point sur un peptide issu du HIV-1 consiste à dégénérer le peptide acide aminé par acide aminé afin de créer une multitude de séquences à la fois proches et différentes (Gras-Masse, H. et coll. 1992). Elle semble permettre de contourner considérablement la restriction génétique (Estaquier, J. et coll. 1994) et l'on comprend donc pourquoi l'équipe du Docteur Auriault a décidé de déterminer si elle pouvait être appliquée aux constructions MAPs et plus particulièrement au MAP-8 115-131.

*2/ Le problème du choix de l'adjuvant :*

L'adjuvant de Freund est souvent utilisé chez l'animal en raison de son aptitude à amplifier de façon remarquable une réponse immune. Toutefois, cet adjuvant n'étant pas utilisable chez l'homme en raison des effets secondaires qu'il induit, d'autres candidats devront inévitablement être choisis et l'objectif majeur sera d'une part d'éviter ou de limiter la perte d'immunogénicité de ces constructions et d'autre part de ne pas modifier "de façon négative" la nature de la réponse immune.

Grâce à l'ensemble des travaux des multiples équipes qui travaillent à la fois dans les domaines de l'immunologie et de de la biochimie des peptides, il est très probable que des vaccins entièrement synthétiques pourront un jour être proposés à l'homme.

Dans cet objectif, il apparaît que les constructions MAPs puissent être des outils de choix puisque les résultats actuellement obtenus chez l'animal dans divers modèles d'infection sont très encourageants. Notons d'ailleurs que des astuces supplémentaires ont récemment été développées pour augmenter encore le potentiel protecteur de ces molécules. Ainsi, en ajoutant une queue lipidique à un MAP dérivé de la protéine GP120 du HIV-1, Defoort, P.J. et coll. (1992) et Nardelli, B. et coll. (1993) ont montré que le "lipo-MAP" s'avère capable de susciter, outre une réponse humorale, une réponse cellulaire de type CTL ("Cytotoxic T Lymphocytes" : cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques) capable de détruire *in vitro* les cellules infectées par le virus.

Etant donné que les cellules T CD8<sup>+</sup> sont décrites dans la littérature comme des cellules productrices d'IFN- $\gamma$  (Fong, T. A. T. et coll. 1990), notons qu'il serait intéressant de créer un lipo-MAP-8 115-131 et de déterminer si la réponse immune induite peut protéger l'animal contre la schistosomiase de façon plus efficace que le MAP-8 115-131.

**Mise en évidence d'un comportement particulier du système immunitaire après la ponte des schistosomes**

Au cours de notre étude sur l'antigénicité des constructions MAP-8 115-131 et MAP-8 24-43 vis-à-vis des lymphocytes T d'animaux infectés par *S.mansoni*, nous avons été amené à observer que le contrôle positif que nous utilisons dans ces expériences, à savoir la stimulation de ces cellules par les extraits totaux d'antigènes parasitaires, mettait en évidence un comportement "anormal" des cellules récupérées après la ponte des parasites.

### **I. Rappel des résultats.**

Dans un premier temps, nous avons constaté que, contrairement aux splénocytes de souris infectées depuis 28 ou 35 jours (période pré-ponte des parasites), les splénocytes de **souris infectées depuis 42 ou 60 jours (période post-ponte)** ne montraient pas de réponse proliférative *in vitro* face aux extraits totaux d'antigènes parasitaires (antigène de vers adultes et antigène d'oeufs) lorsque la thymidine tritiée était ajoutée 4 jours après le début de la culture et, de façon très surprenante, **incorporaient alors moins de thymidine que lorsqu'ils étaient laissés dans le milieu de culture seul supposant ainsi que la stimulation antigénique ait conduit à l'élimination de certaines de ces cellules.**

Par la suite, nous avons mis en évidence que, de façon particulièrement intéressante, ces cellules produisaient en présence des extraits totaux d'antigènes parasitaires de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-2 **suggérant ainsi qu'une activation cellulaire ait préalablement pris place.**

Par ailleurs, nous avons observé que :

-1/ cette production d'IL-2 s'avérait maximale dès seulement 24 heures après le début de la stimulation alors que la production d'IL-2 par les splénocytes de souris infectées depuis 28 jours était reproductiblement maximale au second jour de culture.

-2/ il était possible de mettre en évidence une prolifération des splénocytes de souris récupérés à une période post-ponte si la thymidine était ajoutée soit le premier, soit le second jour de culture.

Ces derniers résultats nous suggéraient donc que **les splénocytes des souris infectés depuis 42 ou 60 jours puissent être hyper-réactifs.**

C'est pourquoi, l'ensemble de ces résultats nous amène à émettre l'hypothèse que les splénocytes des souris infectées par *S.mansoni* pourraient présenter, après la ponte des parasites, une hyper-réactivité cellulaire face aux extraits totaux d'antigènes parasitaires qui serait suivie de l'élimination rapide de ces cellules.

## II. Comparaison des résultats avec les données de la littérature.

### A) L'anergie des lymphocytes Th1 après la ponte dans la schistosomiase.

#### 1°) Qu'est-ce que l'anergie ?

En 1987, des études réalisées dans le domaine de l'immunologie fondamentale montrent pour la première fois que la mise en culture de clones T en présence de leur antigène spécifique et de cellules présentatrices d'antigènes chimiquement modifiées ne permet pas aux lymphocytes T de proliférer (Jenkins, M. K. et coll. 1987). Par ailleurs ces auteurs observent que le traitement rend aussi les clones ultérieurement réfractaires à une stimulation antigénique classique (cellules présentatrices d'antigènes non modifiées). Ce phénomène est nommé "anergie".

Actuellement, plusieurs travaux tendent à suggérer que ces résultats reflètent le fait que la stimulation antigénique fonctionnelle des lymphocytes T nécessite que deux signaux soient délivrés simultanément à la cellule T, l'un de ces signaux étant médié par l'interaction récepteur T-peptide présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité et l'autre étant médié par l'interaction entre des molécules présentes sur la cellule T comme la molécule CD28 et des molécules présentes sur la cellule présentatrice d'antigène saine (non détériorée par des processus chimiques) comme la molécule B7 (Jenkins, M. K. 1992 - Harding, F. A. et coll. 1992 - Linsley, P. S. et coll. 1993 - Jenkins, M. K. et coll. 1993).

#### 2°) Anergie et schistosomiase.

De façon intéressante, on note que les données de la littérature décrivent que la ponte des schistosomes s'accompagne de la mise en place d'un système qui conduit à l'anergie des lymphocytes Th1 :

Les macrophages granulomateux, sous l'influence de l'IL-10 sécrétée par les lymphocytes Th2 spécifiques de l'antigène d'oeuf, subiraient une diminution de l'expression de la molécule B7 qui bien que n'empêchant pas la présentation de l'antigène empêcherait l'activation fonctionnelle de la cellule Th1 et la rendrait anergique (Stadecker, M.J. et coll. 1990 - Stadecker, M. J. 1992 - Flores Villanueva, P. O. et coll. 1993 - Ding, L. et coll. 1993).

#### 3°) Intégration de nos résultats dans cette hypothèse de l'anergie.

Etant donné que l'anergie est, de par sa définition, un mécanisme où il y a absence

de réactivité cellulaire et que 2/ nous avons démontré que nos cellules produisaient des cytokines et étaient capables de proliférer en début de culture, nos résultats n'excluent pas qu'il puisse y avoir un mécanisme d'anergie mais ne peuvent être expliqués uniquement par ce processus.

De plus, le fait que les cellules stimulées par les antigènes parasitaires incorporaient moins de thymidine que lorsqu'elles étaient cultivées en présence du milieu de culture seul nous amenait à suggérer qu'une partie de ces cellules devait être éliminée.

## B) Elimination des lymphocytes : l'hypothèse de l'apoptose.

### 1°) Qu'est-ce que l'apoptose ?

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé encore appelé mort par suicide qui a été décrit pour la première fois par Kerr, J. F. R. et coll. en 1972.

Actuellement, plusieurs données tendent à considérer l'apoptose :

- d'une part comme un processus physiologique c'est à dire un processus qui intervient naturellement chez tout individu sain.

Ainsi, l'apoptose semble intervenir lors de l'embryogenèse pour notamment permettre l'élimination des vestiges larvaires (Bret, L. et coll. 1993). Elle interviendrait aussi dans la sélection du répertoire T (élimination des thymocytes non affins pour le complexe majeur d'histocompatibilité (cellules inutiles) - élimination des thymocytes trop affins pour le soi (cellules dangereuses)) (Lo, D. 1992 - Bret, L. et coll. 1993).

- et d'autre part comme un processus qui peut aussi être induit par des facteurs extérieurs.

En effet, en 1991, les équipes des Docteurs Montagnier et Ameisen mirent en évidence que les lymphocytes T des patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) mais pas ceux de patients sains meurent *in vitro* par apoptose après stimulation mitogénique (Groux, H. et coll. 1992 - Gougeon, M. L. et coll. 1991). Etant donné que l'infection par le VIH aboutit à la diminution progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et conduit ainsi à une immunosuppression généralisée de la réponse immune, on comprend pourquoi de nombreux chercheurs essaient de définir si le dérèglement de l'activation des cellules T matures qui aboutit à leur suicide *in vitro*, peut *in vivo* expliquer les conséquences pathologiques de l'infection. Actuellement d'autres infections virales ont été montrées conduire *in vitro* à l'induction de mécanismes d'apoptose et de façon importante, on note que certaines d'entre elles s'avèrent sans conséquence pathologique (cas de la mononucléose infectieuse) (Uehara, T. et coll. 1992).

Toutefois, le mécanisme d'apoptose n'a actuellement jamais été décrit comme existant dans les infections autres que virales.

## 2°) Données de la littérature montrant qu'une hyper-réactivité cellulaire peut conduire à l'apoptose.

De façon particulièrement intéressante, on remarque que plusieurs travaux font état de phénomènes d'apoptose associés à une hyper-réactivité cellulaire. Ainsi :

- Kawabe, Y. et coll. (1991) montrent que la super-activation des cellules T induite par l'injection de "supers antigènes" du type Staphylococcus entérotoxine B (SEB) conduit *in vivo* d'une part dans un premier temps à l'expansion des cellules spécifiques (cellules T V $\beta$ 8<sup>+</sup>) et d'autre part dans un second temps à la mort de ces cellules par un phénomène d'apoptose.

- Lenardo, M. J. (1991) confirme les résultats précédents et montre de plus que la disparition des cellules V $\beta$ 8<sup>+</sup> est d'autant plus intense et plus rapide que la quantité de SEB injectée est plus importante.

- Russell, J. H. et coll. (1991) montrent là *in vitro* que lorsque des lymphocytes T activés sont re-stimulés par des anticorps anti-TcR et de l'IL-2, un mécanisme d'apoptose est induit. Par contre lorsque la même expérience est réalisée avec des lymphocytes T au repos, la stimulation n'induit pas ce mécanisme.

## 3°) L'hypergammaglobulinémie observée après la ponte des schistosomes révèle-t-elle un phénomène d'apoptose ?

Etant donné que la mort des cellules par apoptose est connue entraîner le relargage de protéines nucléaires qui sont capables d'activer les cellules B à proliférer et à sécréter des anticorps (activation polyclonale) (Bell, D. A. et coll. 1987), et que l'on sait que la ponte des schistosomes s'accompagne de productions de fortes quantités d'anticorps en partie seulement spécifiques (Sher, A. et coll. 1977), on peut se demander si un lien n'existerait pas entre ces deux données.

## 4°) Intégration de nos résultats dans l'hypothèse de l'apoptose.

Afin de vérifier si nos résultats ne pouvaient pas être effectivement expliqués par l'apoptose, nous avons entrepris un travail collaboratif avec Jérôme Estasquier. Ce travail est actuellement en cours de rédaction en vue de publication et nous avons choisi de ne pas le présenter en détail dans la rédaction de notre thèse. Toutefois, ces travaux montrent clairement que, après la ponte des schistosomes, les lymphocytes T sont effectivement engagés dans un processus actif de mort cellulaire, ce qui a été démontré grâce aux caractéristiques cytologiques et biochimiques spécifiques des cellules apoptotiques (Cohen, J. J. 1993) (condensation de la chromatine - fragmentation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases - inhibition du mécanisme par des inhibiteurs de la synthèse protidique).

### III. Conclusions.

L'ensemble de ce travail (les résultats présentés dans ce mémoire associés à ceux effectués en collaboration avec Jérôme Estaquier) **constitue la première démonstration de l'existence d'un mécanisme d'apoptose au cours d'une infection parasitaire**. Par ailleurs, nous avons tout lieu de penser que ce mécanisme puisse être lié à une hyper-réactivité cellulaire ou même soit la conséquence de cette hyper-réactivité puisque différents travaux mettant en évidence un mécanisme d'apoptose des lymphocytes T mûres, montrent aussi que ce phénomène est précédé de la prolifération rapide des cellules (Kawabe, Y. et coll. 1991 - Lenardo, M. J. 1991).

Nous n'avons toutefois aucune hypothèse précise permettant d'expliquer pourquoi la ponte des schistosomes s'accompagne d'une hyper-réactivité cellulaire. En effet, outre le fait qu'il soit possible que ce phénomène soit directement induit par certains des composants de l'oeuf, nous devons aussi considérer que les diverses modifications du système immunitaire qui interviennent à cette période (apparition d'une réponse Th2 (Grzych, J.M. et coll. 1991), activation des mastocytes à produire de l'IL-4 (Williams, M. E. et coll. 1993), activation des cellules B (Sher, A. et coll. 1977)) puissent perturber de façon générale le fonctionnement du système immunitaire.

Quant aux conséquences possibles de ce mécanisme d'apoptose, il nous apparaît probable qu'elles soient, au moins en partie, bénéfiques pour l'hôte. En effet, en induisant comme il apparaît probable une diminution du "pool" de lymphocytes T spécifiques de l'antigène d'oeuf, l'apoptose pourrait se rajouter aux mécanismes déjà décrits qui permettent la modulation de la réaction granulomateuse lors de la phase chronique de l'infection. Un lien éventuel entre ces mécanismes n'est par ailleurs pas à exclure.

L'hypothèse d'un lien éventuel entre l'apoptose observée et l'immuno-suppression qui existe lors de la phase aiguë de la schistosomiase (immuno-suppression mise en évidence par l'immunisation, à cette période d'infection, des animaux par des antigènes non parasitaires (Kullberg, M. C. et coll. 1992)), nous paraît par contre peu relevante puisque les données de littérature semblent montrer que l'élimination par apoptose est une élimination spécifique d'antigène (Kawabe, Y. et coll. 1991- Lenardo, M. J. 1991). C'est pourquoi, il nous apparaît plus probable que l'immuno-suppression soit due à des mécanismes autres, peut-être à l'anergie.

Finalement, l'ensemble de ces résultats nous suggère donc que le comportement du système immunitaire au cours de l'infection par *S. mansoni* est très certainement remarquablement complexe. L'étude de ce comportement est toutefois susceptible de nous apporter des renseignements qui pourraient être un atout majeur pour le développement d'une stratégie vaccinale efficace contre la bilharziose.

# ANNEXE TECHNIQUE

## **I. Les animaux.**

Les souris BALB/c (haplotype H-2d) et CBA/J (H-2k) proviennent de chez Iffa Credo (L'Arbresle, France) et sont âgées de 6 à 8 semaines au début des expériences.

## **II. Préparation de l'antigène d'oeuf (SEA : Soluble Egg Antigen).**

Les oeufs sont récoltés à partir d'homogénats de foie de hamsters dorés infectés par 1000 cercaires depuis 40 jours. Ils sont centrifugés, rincés plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un culot propre, congelés et enfin homogénéisés à l'aide d'une presse X-Press (A.B. Biox, Jarfalla, Suède) qui permet l'éclatement de la coque. La suspension obtenue est alors centrifugée (10000 g, 20 min), le surnageant constitue l'antigène SEA. Le contenu protéique de cette préparation est évalué par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munchen, Allemagne).

On vérifie par la suite, grâce à la technique du western blott, que l'antigène ainsi préparé n'est pas dégradé et contient toujours une molécule de 28kDa reconnaissable par les sérums anti-rSm28GST .

## **III. Protocole d'immunisation.**

Cinquante microgrammes des différentes constructions peptidiques sont solubilisés dans du milieu Hanks Wallace (Gibco, Courbevoie, France) et injectés par voie sous-cutanée à la base de la queue en présence d'adjuvant de Freund (adjuvant complet à la première injection et adjuvant incomplet par la suite) (Difco, Détroit) aux jours 0, 7 et 18. La rate et les sérums des animaux sont récupérés au jour 23.

## **IV. Protocole d'infection.**

Les souris sont anesthésiées par un mélange d'Imalgène (Rhône Mérieux, Lyon, France) (125 mg/kg) et de Valium (Roche, Neuilly-s/Seine, France) (6,2 mg/kg) injecté en sous-cutané dans les pattes arrières. Le ventre des animaux est ensuite rasé et un anneau y est déposé. Cet anneau va permettre d'accueillir 0,5 ml d'eau volvic contenant 50 cercaires. Le temps d'exposition des cercaires sur la peau dure 30 minutes. Cette technique a été initialement décrite par Smithers, S.R. et coll. (1965).

## V. Analyse de la réponse cellulaire.

### A) Stimulation *in vitro* des splénocytes.

Les rates de 5 animaux/immunogène ou /date d'infection, sont dilacérées ensemble aseptiquement sur un tamis de type Blutex (Tripette et Renaud, Comblès, France). Les globules rouges sont lysés par un passage de 5 minutes dans une solution de Tris (170mM) - NH<sub>4</sub>Cl (155 mM) pH 7,2 et les splénocytes sont ensuite lavés 3 fois dans du milieu HBSS (Gibco). avant d'être déposés dans des plaques P96 (Falcon, Becton-Dickinson, New Jersey) à raison de  $7,5 \times 10^5$  cellules dans 200  $\mu$ l de milieu de culture contenant 40  $\mu$ g/ml des différents antigènes. Le milieu de culture est du RPMI (Gibco) additionné de 2mM de glutamine (Merck, Darmstadt, Allemagne), 1mM de pyruvate de sodium (Gibco),  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Merck), 100 UI/ml de pénicilline (Specia, Paris, France), 100 mg/ml de streptomycine (Specia), 2 mM de Hépes (Sigma Chemical CO, St Louis, MO) et 1% de sérum frais de souris saine autologue non décomplémenté ou 10 % de sérum de veau foetal (Gibco ou Eurobio (Les Ulis, France)) décomplémenté par passage 30 min à 56°C. L'incubation des cellules se fait à 37°C dans une atmosphère contenant 90% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub>.

Remarque : Chaque analyse comparative de l'immunogénicité des différentes constructions est effectuée le même jour avec le même milieu de culture.

### B) Quantification de la prolifération des cellules.

La prolifération des cellules est étudiée en ajoutant dans chacun des puits 18,5 kBq de déoxythymidine tritiée (<sup>3</sup>H-TdR) le quatrième jour de culture. Après 18 heures d'incubation, le contenu nucléique des cellules est récupéré sur filtre grâce à un collecteur de cellules (Titertek Harvester, Skatron, Lirbven, Norvège) et la quantité de thymidine incorporée est déterminée par un compteur à scintillation liquide (Beckman Instruments, Irving, C.A.). Les résultats sont exprimés en compte par minutes (cpm). Nous effectuons chaque test en triplicate. Les moyennes des valeurs sont présentées.

### C) Analyse des cytokines produites par les cellules.

#### 1°) Récupération des surnageants de culture.

Après 24, 48 ou 96 heures de stimulation *in vitro*, le milieu est récupéré, centrifugé pour éliminer les cellules, aliquoté et stocké à -40°C.

### 2°) Dosage de l'IL-2.

L'IL-2 est dosée grâce à l'utilisation d'une lignée lymphocytaire T murine dont la croissance est strictement dépendante de la présence d'IL-2 ou d'IL-4. Il s'agit de la lignée CTLL-2 (TIB 214 ATCC, Rockville, USA). Les surnageants à doser sont incubés avec  $1 \times 10^4$  cellules en présence d'Ac anti-IL-4 (Ac produits par l'hybridome 11B11 (ATCC HB 188) et purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium) dans des puits de plaques P96 (Falcon, Becton-Dickinson, New Jersey). Dix huit heures après le début de la culture, 18,5 kBq de deoxythymidine sont ajoutés. La prolifération est arrêtée 14 heures plus tard et la radioactivité chiffrée grâce à un compteur à scintillation liquide (Beckman Instruments, Irving, CA). La quantité d'IL-2 contenue dans les surnageants est obtenue par référence à l'intensité de la prolifération des CTLL-2 en présence de différentes concentrations d'IL-2 recombinante (Genzyme, Boston, MA). La spécificité du test est confirmée en montrant que la prolifération induite par les surnageants est complètement inhibée par des anticorps anti-IL-2 (Genzyme). Ceci permet de vérifier que la lignée n'a pas dérivé et prolifère toujours uniquement en présence des cytokines IL-2 ou IL-4.

### 3°) Dosage de l'IL-3.

Le principe de dosage de l'IL-3 est similaire à celui de l'IL-2. Il est basé sur l'utilisation d'une lignée dont la croissance est strictement dépendante d'IL-3 : la 32 DC1.

$1 \times 10^4$  cellules sont incubées pendant 48 heures avec des dilutions croissantes des différents surnageants et 18,5 kBq de désoxythymidine sont ensuite ajoutés. La prolifération est chiffrée 14 heures plus tard. Une gamme étalon est réalisée avec de l'IL-3 recombinante (Genzyme). La spécificité du test est confirmée par inhibition totale de la prolifération en présence d'anticorps anti-IL-3.

### 4°) Dosage de l'IL-4.

L'IL-4 est dosée grâce à une technique immunoenzymatique (ELISA). Des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc, Roskilde, Denmark) sont sensibilisées par des anticorps monoclonaux anti-IL-4 de souris de nomenclature BVD4-1D11 (Pharmingen, San Diego, USA) ( $0,1 \mu\text{g}/\text{pts}$  sous  $100 \mu\text{l}$  de tampon carbonate-bicarbonate  $0,1\text{M}$  pH 9,6) pendant une nuit à  $4^\circ\text{C}$ . Après 2 lavages en tampon NaCl ( $9 \text{ g/l}$ ) phosphate  $10^{-2} \text{ M}$  (PBS) additionné de  $0,1 \%$  de tween-20 (Merck), les sites aspécifiques des puits sont saturés pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$  par du PBS-BSA  $1\%$ . Les plaques sont ensuite lavées et  $100 \mu\text{l}$  des surnageants de culture sont ajoutés pour une incubation de une nuit à  $4^\circ\text{C}$ . Après 4 rinçages,  $100 \mu\text{l}$  de PST-tween contenant  $0,1 \mu\text{g}$  d'anticorps monoclonaux anti-IL-4 biotinylés reconnaissant un épitope différent des anticorps BVD4-1D11 (anticorps BVD6-24G2, Pharmingen) sont

ajoutés et incubés pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. Les plaques sont alors lavées 6 fois et un conjugué streptavidine-biotine peroxydase (Amersham, Les Ulis, France) dilué au 1/1000 dans le tampon de lavage (100 µl) est ajouté. La révélation a lieu 30 minutes après l'addition du substrat : Ortho-Phénylène Diamine (OPD) (Sigma) utilisé à 1 mg/ml dans un tampon phosphate-citrate 0,1 M pH 5,5 additionné de 0,001% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, générant une coloration orange mesurée à 492 nm après l'arrêt de la réaction par 25 µl d'HCl 1N. Le taux d'IL-4 dans les surnageants est déterminé par rapport à une gamme étalon d'IL-4 recombinante (Genzyme). Le seuil de sensibilité du test est de 4 unités/ml.

#### 5°) Dosage de l'IL-5.

L'IL-5 est aussi dosée par test ELISA "sandwich". L'Ac servant à sensibiliser les plaques est l'anticorps monoclonal TRFK5 (Pharminghen) et l'anticorps biotinylé est le TRFK4 (Pharminghen). La gamme est établie à l'aide d'IL-5 recombinante (Genzyme). Les temps d'incubation et concentration des anticorps sont identiques à ceux utilisés pour doser l'IL-4. Le seuil de sensibilité du test est de 18 unités/ml.

#### 6°) Dosage de l'IL-10.

L'IL-10 est dosée par ELISA à l'aide des anticorps monoclonaux JES5-2A5 (non biotinylé) et SXC-1 (biotinylé) (Pharminghen). La technique est identique à celle utilisée pour doser l'IL-4.

#### 7°) Dosage de l'IFN-γ.

Le dosage d'IFN-γ a été effectué par technique ELISA grâce à un kit commercial (Genzyme) qui utilise un anticorps monoclonal de hamster spécifique de l'IFN-γ de souris et un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre plusieurs épitopes présents sur l'IFN-γ. La courbe standard est réalisée à partir de dilutions successives d'une solution d'IFN-γ à 8200 pg/ml. Ce test permet de détecter jusqu'à 125 pg/ml d'IFN-γ.

## **VI. Analyse de la réponse humorale.**

### **A) Dosage des IgG spécifiques d'antigènes.**

La technique employée est un ELISA direct. Des plaques Maxisorp (Nunc) sont sensibilisées par les antigènes (0,1 µg/pts sous 100 µl de tampon carbonate-bicarbonate 0,1M pH 9,6) pendant une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées deux fois en PBS-tween 0,1% et saturées une heure à 37°C par du PBS-BSA 1%. Après deux lavages, 100 µl

des différents sérums dilués en tampon PBS-tween sont ajoutés. Après une nuit à 4°C, la fixation des anticorps spécifiques est révélée par un anti-sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) dilué au 1/5000 (100 µl/puit) et incubé 1H30 à 37°C. La réaction colorée est obtenue par addition d'OPD.

### B) Dosage des IgG1 spécifiques.

Le protocole est identique à celui utilisé pour le dosage des IgG. La seule différence réside dans l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IgG1 de souris marqué à la peroxydase (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, UK).

### C) Dosage des IgA spécifiques.

La technique employée est une technique radio-immunologique (RIA). Les antigènes sont fixés sur un support (plaques RIA, Falcon, France) à raison de 1 µg/pts (incubation pendant une nuit à 4°C dans un tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6). Les plaques sont ensuite lavées deux fois par du PBS-Tween 0,1% et saturées pendant 1 heure par du PBS-BSA 1%. Les sérums dilués au 1/50 dans du PBS-tween sont mis en contact pendant 1 nuit à 4°C. Après 4 lavages, on ajoute un anticorps monoclonal anti-IgA de souris (Sigma) marqué à l'iode ( $10^5$  cpm/puits dans 100 µl de PBS-tween) pendant 1 heure, avant de laver extensivement les puits (6 lavages). Chaque puits est ensuite découpé et déposé dans un tube à hémolyse pour comptage (compteur Beckman).

#### \* Marquage de l'anticorps anti-IgA.

Le marquage est réalisé sous une hotte filtrante ("boîte à gants"), en utilisant de l'iode libre (2 µCi) dissous dans la soude, qu'on ajoute au réactif anti-IgA (20 µg) en présence de chloramine T (50 µg), sous agitation douce pendant 1 minute. La réaction est arrêtée par du métabisulfite de soude (100 µg). La séparation de l'iode non fixé et de l'anticorps s'effectue sur une colonne de sépharose (Pharmacia, Uppsala, Suède), en fractionnant par tubes de 0,5 ml le volume d'élution (élution avec du PBS-BSA 0,5 %). L'activité spécifique du réactif marqué se situe environ à 5-6 µCi/µg d'anticorps.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M. Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H.** 1992. Tumor necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg laying in schistosoma-infected SCID mice. *Nature*. 356. 604.
- 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  $\beta$ -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 *Schistosoma mansoni* : role of proteases. *J.Immunol.* 131. 464.
- 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. *Inf. Immun.* 55. 1163.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Neyrinck, J. L., Drobecq, H., Tartar, A. and Capron, A.** 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* 141. 1687.
- 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.** 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 28. 1918.
- Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A. and Tartar, A.** 1991. Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST). *Pept. Research.* 4. 6.
- Balloul, J. M., Grzych, J. M., Pierce, R. and Capron, A.** 1987a. 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., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. and Capron, A.** 1987b. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*. 326. 149.
- Balloul, J. M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. and Capron, A.** 1987c. Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S.mansoni* expressed in *E.coli*. *Molecular Paradigms. for. Eradicating Helminthic. parasites.* Alan R. Liss, Inc.77.
- Bell, D. A., Morrison, B. and VandenBygaart, P.** 1990. Immunogenic DNA-related factors. *J. Clin. Invest.* 85. 1487.
- 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.

- Bohjanen, P. R., Okajima, M. and Hodes, R. J.** 1990. Differential regulation of IL-4 and IL-5 gene expression. A comparison of T cell gene induction by anti-CD3 antibody or by exogenous lymphokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87. 5283.
- Boros, D. L., Pelley, R. P. and Warren, K. S.** 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 114. 1437.
- Boros, D. L., Amsden, A. F. and Hood, A. T.** 1982. Modulation of granulomatous hypersensitivity. IV. Immunoglobulin and antibody production by vigorous and immunomodulated liver granulomas of *S.mansoni* infected mice. *J. Immunol.* 128. 1050.
- Borras-Cuesta, F., Fedon, Y. and Petit-Camurdan, A.** 1988. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *Eur. J. Immunol.* 18. 199.
- Boulanger, D., Reid, G. D. F., Sturrock, R. F., Wolowczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Buttrerworth, A. E. and Capron, A.** 1991a. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13. 473.
- Boulanger, D.** 1991b. Schistosomiasis humaines africaines : Evaluation chez l'animal du pouvoir vaccinal d'une glutathion S-transférase exprimée par le schistosome. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Mai 1991.
- Bret, L., Delverdier, M. et Fournie, G. F.** 1993. L'apoptose. *Revue Méd. Vét.* 144. 579.
- Briand, J. P., Barin, C., Van Regenmortel, M. H. V. and Muller, S.** 1992. Application and limitations of the multiple antigen peptide (MAP) system in the production and evaluation of anti-peptide and anti-protein antibodies. *J. Immun. Meth.* 156. 255.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 364. 33.
- Butterworth, A. E., Vadas, M. A., Wassom, D. L., Dessen, A., Hogan, M., Sherry, B., Gleich, G. J. and David, J. R.** 1979. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.* 150. 1456.
- 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, J. H., Richardson, B. A., Arap Siongok, 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.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 79. 393.
- Butterworth, A. E., Dunne, D., Fulford, A., Capron, A., Khalife, J., Capron, A., Koech, D., Ouma, J. and Sturrock, R.** 1988. Immunity in human schistosomiasis *mansoni* : cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie.* 70. 1053.
- Byram, J. E., Von Lichtenberg, F.** 1977. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 26. 944.
- Capron, A., Dessaint, J-P., Capron, M. and Bazin, H.** 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature.* 253. 274.
- 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. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 29, 849.

**Capron, A., Capron, M. and Dessaint, J. P.** 1980b. 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, 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.** 1981a. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. *J. Immunol.* 126, 1764.

**Capron, M., Capron, A., Goetzl, E. J. and Austen, K. F.** 1981b. Tetrapeptides of the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) enhance eosinophil Fc receptor. *Nature.* 289, 71.

**Capron, M., Capron, A., Dessaint, J. P., Torpier, G., Johansson, S. G. O. and Prin, L.** 1981c. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J.Immunol.* 126, 2087.

**Capron, M., Nogueira-Queiroz, J. A., Papin, J. P. and Capron, A.** 1984. Interaction between eosinophils and antibodies : *in vivo* protective role against rat schistosomiasis. *Cell. Immunol.* 3, 60.

**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.

**Caulada-Benedetti-Z., Al-Zamel, F., Sher, A. and James, S.** 1991. Comparison of Th1 and Th2 associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Immunol.* 146, 1655.

**Cheever, A. W., Byram, J. E., Hieny, S., Von Lichtenberg, F., Lunde, M. N. and Sher, A.** 1985. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B cell depleted mice. *Parasite Immunol.* 7, 399.

**Cheever, A. W. and Deb. S.** 1989. Persistence of hepatic fibrosis and tissue eggs following treatment of *S.japonicum* infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 620.

**Cheever, A. W., Finkelman, F. D., Caspar, P., Heiny, S., Macedonia, J. G. and Sher, A.** 1992 Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophils in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.* 148, 3244.

**Chensue, S. W., Terebuh, P. D., Warmington, K. S., Hershey, S. D., Evanoff, H. L., Kunkel, S. L. and Higashi, G. I.** 1992. Role of IL-4 and IFN- $\gamma$  in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function. *J. Immunol.* 148, 900.

**Chensue, S. W., Warmington, K. S., Hershey, S. D., Terebuh, P. D., Othman, M. and Kunkel, S. L.** 1993. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. *J.Immunol.* 151, 1391.

**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.
- Cherwinski, H. M.**, Schumacher, J. H., Brown, K. D. and Mosmann, T. R. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J.Immunol.* **166**. 1229.
- Chou, P. Y.** and Fasman, G. D. 1974. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet and random coil regions calculated for proteins. *Biochemistry.* **13**. 211.
- Coffman, R. L.**, Ohara, J., Bond, M. W., Carty, J., Zlotnick, A., and Paul, W. E. 1986. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* **136**. 4538.
- Cohen, J. J.** 1993. Apoptosis. *Immunol. Today.* **126**. 14.
- Colley, D. G.** 1981. Immune responses and immunoregulation in experimental and clinical schistosomiasis. In : *Mansfield, J.M., ed. Parasitic diseases. Vol. I*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1-83.
- Cottrell, B.**, Pye, C. and Butterworth, A. E. 1989. Cytotoxic effects *in vitro* of human monocytes and macrophages on *Schistosoma mansoni*. *Parasite. Immunol.* **11**. 91.
- Coulson, P. S.** and Wilson, R. A. 1988. Examination of the mechanisms of pulmonary phase resistance to *Schistosoma mansoni* in vaccinated mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**. 529.
- Czaja, M. J.**, Weiner, F. R. and Eghbali, M. 1987. The differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. *J. Biol. Chem.* **262**. 13348.
- Czaja, M. J.**, Weiner, F. R., Takahashi, S., Giambrone, M. A., Van der Meide, P. H., Schellekens, H., Biempica, L. and Zern, M. A. 1989a.  $\gamma$ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* **10**. 795.
- Czaja, M. J.**, Weiner, F. R., Flanders, K. C., Giambrone, M. A., Wind, R., Biempica, L. and Zern, M. A. 1989b. *In vitro* and *in vivo* association of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 with hepatic fibrosis. *J. Cell. Biol.* **108**. 2477.
- Damonneville, M.**, Wietzerbin, J., Pancré, V., Joseph, M., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. 1988. Recombinant Tumor Necrosis Factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J. Immunol.* **140**. 3962.
- Darcy, F.**, Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron, M. F., Tartar, A. and Capron, A. 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P 30 antigen. *J. Immunol.* **149**. 3636.
- Davis, A.** 1986. Recent advances in schistosomiasis. *Quat. J. Medecine.* **58**. 95.
- Dean, D. A.** 1983. *Schistosoma* and related genera acquired resistance in mice. *Exp. Parasitol.* **55**.1.
- Defoort, J. P.**, Nardelli, B., Huang, W., Ho, D. D. and Tam, J. P. 1992. Macromolecular assemblage in the design of a synthetic AIDS vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**. 3879.

- Dekruyff, R. H.**, Fang, Y. and Umetsu, D. T. 1992. IL-4 synthesis by *in vivo* primed keyhole limpet hemocyanin specific CD4<sup>+</sup> T cells. I. Influence of antigen concentration and antigen-presenting cell type. *J. Immunol.* 149. 3468.
- Delgado, V.** and McLaren, D. J. Evidence for enhancement of IgG1 subclass expression in mice polyvaccinated with radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* and the role of this isotype in serum-transferred immunity. *Parasite Immunol.* 12. 15.
- Del Giudice, G.**, Tougne, C., Louis, J. A., Lambert, P. H., Bianchi, E., Bonelli, F., Chiappinelli, L. and Pessi, A. 1990. A multiple antigen peptide from the repetitive sequence of the *Plasmodium malariae* circumsporozoite protein induces a specific antibody response in mice of various H-2 haplotypes. *Eur. J. Immunol.* 20. 1619.
- Desreumaux, P.**, Janin, A., Colombel, J. F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A. and Capron, M. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* 175. 293.
- Dessaint, J. P.** 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.**, Rihet, P., Demeure, C., Couissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Prata, A., Goudot, V., Bourgois, A. and Abel, L. 1992. Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Med. Sci.* 8. 108.
- Diaw, O. T.**, Vassilidès, G., Sarr, Y. 1990. Prolifération de mollusques après la construction du barrage de Diama au Sénégal. *Bull.Soc.Franç.Parasitol.* 8. 772.
- DiJohn, D.**, Torres, J. R., Murillo, J., Herrington, D. A., Wasserman, S. S., Cortesia, M. J., Lososky, G. A., Stürcher, D. and Levine, M. M. 1989. Effect of priming with carrier on response to conjugate vaccine. *The Lancet*, decembre. 16. 1415.
- Doenhoff, M. J.**, Musallam Bain, J. and McGregor, A. 1978. Studies of the host parasite relationship in *Schistosoma mansoni* infected mice : the immunological dependance of parasite egg excretion. *Immunology.* 35. 771.
- Domingo, E. O.** and Warren, K. S. 1968. Endogenous desensitization : changing host granulomatous response to Schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.* 52. 369.
- Ding, L.** and Shevach, E. M. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. 148. 3133.
- Ding, L.**, Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N. and Shevach, E. M. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151. 1224.
- Dunne, D. W.**, Butterworth, A. E., Fulford, A. J. C., Kariuki, H. C., Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. J. and Sturrock, R. F. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22. 1483.
- El Meneza, S.**, Olds, G. R., Kresina, T. F. and Mahmoud, A. A. F. 1989. Dynamics of hepatic connective tissue matrix constituents during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Hepatology.* 9. 50.

- Estaquier, J.,** Gras-Masse, H., Boutillon, C., Ameisen, J. C., Capron, A., Tartar, A. and Auriault, C. 1994. The mixotope : a multipotent combinatorial agretope eliciting a large T-cell repertoire. *Submitted*.
- Evavold, B. D.** and Allen, P. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*. 252. 1308.
- Fidel, P. L.** and Boros, D. L. 1991. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. V. Antigen-induced T cell-derived suppressor factors down-regulate proliferation and IL-2, but not IL-4, production by CD4<sup>+</sup> effector T cells. *J.Immunol.* 146. 1941.
- 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.
- Firestein, G. S.,** Roeder, W. D., Laxer, J. A., Townsend, K. S., Weaver, C. T., Hom, J. T., Linton, J., Torbett, B. E. and Glasebrook, A. L. 1989. A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143. 518.
- Flores Villanueva, P. O.,** Chikunguwo, S. M., Harris, T. S. and Stadecker, M. J. 1993. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 151. 3192.
- Fong, T. A. T.** and Mosmann, T. R. 1990. Alloreactive murine CD8<sup>+</sup> T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* 144. 1744.
- Francis, M.J.,** Hastings, G. Z., Brown, F., McDermed, J., Lu, Y. A. and Tam, J. P. 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology.* 73. 249.
- Gaubert, S.** 1993. Analyse des cytokines impliquées dans la régulation isotypique locale de la réponse immune spécifique de l'antigène Sm28GST de *Schistosoma mansoni*. *Mémoire de DEA Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Septembre 1993.
- Gorrillot, I.** 1990. Clonage moléculaire des glutathion-S-transférases de *Schistosoma haematobium*. *Mémoire de DEA Sciences de la vie et de la santé*. Université de Lille I. Septembre 1990.
- Gougeon, M. L.,** Olivier, R., Garcia, S., Guetard, D., Dragic, T., Dauguet, C. and Montagnier, L. 1991. Mise en évidence d'un processus d'engagement vers la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. III. Sci. Vie.* 312. 529.
- Gras-Masse, H.,** Ameisen, J.C., Boutillon, C., Rouaix, F., Bossus, M., Deprez, B., Neyrinck, J.L., Capron, A. and Tartar, A. 1992. Synthetic Vaccines and HIV-1 hypervariability : A "Mixotope" approach. *Pept. Research.* 5. 211.
- Grezel, D.** 1992. Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes de défense contre le schistosome au cours d'infestations expérimentales. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Septembre 1992.
- Grezel, D.,** Capron, M., Grzych, J. M., Fontaine, J., Lecocq, J. P. and Capron, A. 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen : effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 23. 454.
- Grillot, D.,** Michel, M., Müller, I., Tougne, C., Rénia, L., Mazier, D., Corradin, G., Lambert, P. H., Louis, J. A. and Del Giudice, G. 1990. Immune responses to defined

- epitopes of the circumsporozoite protein of the murine malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *Eur. J. Immunol.* 20. 1215.
- Grillot, D.**, Valmori, D., Lambert, P. H., Corradin, G. and Del Giudice, G. 1993. Presentation of T-cell epitopes assembled as Multiple-Antigen Peptides to murine and human T lymphocytes. *Inf. Immun.* 61. 3064.
- Groux, H.**, Torpier, G., Monté, D., Mouton, Y., Capron, A. and Ameisen, J. C. 1992. Activation-induced death by apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.* 175. 331.
- Gryseels, B.** 1989. The relevance of schistosomiasis for public health. *Trop. Med. Parasitol.* 40. 134.
- 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.* 129. 2739.
- Grzych, J-M.**, Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, S, Lewis, F. and Sher, A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 146. 1322.
- Grzych, J. M.**, Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. and Capron, A. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 150. 527.
- Habluetzel, A.**, Pessi, A., Bianchi, E., Rotigliano, G. and Esposito, F. 1991. Multiple antigen peptides for specific detection of antibodies to a malaria antigen in human sera. *Immunol. Letters.* 30. 75.
- Hagan, P.**, Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. and Greenwood, B. M. 1985. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.* 7. 625.
- Hagan, P.**, Blumenthal, U. J., Dunn, D., Simpson, A. J. G. and Wilkins, H. A. 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* 349. 243.
- Hafez, M.**, Aboul Hassan, S., El-Tahan, H., El-Shennawy, F., Khashaba, M., Al-Tonbary, Y., El-Morsi, Z., El-Sallab, S. H., El-Desoky, I., El-Shazly, A. and Eteba, S. 1991. Immunogenetic susceptibility for post-schistosomal hepatic fibrosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44. 424.
- Harding, F. A.**, McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. and Allison, J. P. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 356. 607.
- Harnett, W.** 1988. The anthelmintic action of praziquantel. *Parasitol. Today.* 4. 144.
- Henderson, G. S.**, Lu, X., McCurley, T. L., and Colley, D. G. 1992. *In vivo* molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. II. Quantification of IL-4 mRNA, IFN- $\gamma$  mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. *J. Immunol.* 148. 2261.

- 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. Immunopharmacologie*. 7. 231.
- Holy, J.M.,** O'Leary, K. A., Oaks, J. A. and Tracy, J. W. 1989. Immunocytochemical localization of the major GST in adult *S.mansoni*. *J. Parasitol.* 75. 181.
- Hopp, T. P.** and Woods, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78. 3824.
- Ivanoff, N.** 1991. Etude chez le rat de la forme octopus du peptide 24-43 de la molécule protectrice Sm28GST de *Schistosoma mansoni* : Antigenicité, immunogénicité, association à l'octopus 115-131. Mémoire de DEA de Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lille I. Septembre 1991.
- Jacob, C. O.,** Arnon, R. and Sela, M. 1985. Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Mol. Immunol.* 22. 1333.
- James, S. L.** and Colley, D. G. 1976. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Reticulo. Endothel. Soc.* 20. 359.
- 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. *Parasite Immunol.* 5. 567.
- James, S. L.,** Correa-Oliveira, R. and Leonard, E. J. 1984. Defective vaccine-induced immunity to *schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.* 133. 1587.
- James, S. L.** and Sher, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 155. Springer-Verlag Berlin ed.21-31.
- James, S. L.** and Nacy, C. 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites. *Cur. Op. Immunol.* 5. 518.
- Janin, J.** 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature.* 277. 491.
- Jenkins, M. K.** and Schwartz, R. H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 165. 302.
- Jenkins, M. K.** 1992. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol. Today.* 13. 69.
- Jenkins, M. K.** and Johnson, J. G. 1993. Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr. Opinion. Immunol.* 5. 361.
- 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 new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* 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.
- Kabawe, Y. and Ochi, A.** 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature.* **349**. 245.
- Kagan, I. G.,** 1958. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice Inst. Pamph.* **45**. 151.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**. 239.
- Ketterer, B., Meyer, D. J. and Clark, A. G.** 1988. Soluble glutathione transferase isoenzymes. In : Glutathione conjugation : its mechanisms and biological significance (Sies, H. and Ketterer, B., eds.), pp73-135. Academic Press, London.
- 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.
- Khalife, J., Dunne, D., Richardson, B.A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A. and Butterworth, A. E.** 1989. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosome of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **142**. 4422.
- Kloetz, K., Da Silva, J. R.** 1967. Schistosomiasis *mansoni* acquired in adulthood : behaviour of egg counts and the intradermal test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **16**. 167.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H. and Köhler, G.** 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature.* **362**. 245.
- Kovacs, E. J.** 1991. Fibrogenic cytokines : the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today.* **12**. 17.
- Kühn, R., Rajewsky, K and Müller, W.** 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* **254**. 707.
- Kullberg, M. C., Pearce, E. J., Hieny, S. E., Sher, A. and Berzofsky, J. A.** 1992. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.* **148**. 3264.
- Lansperger, 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.
- Lawson, J. R. and Wilson, R. A.** 1980. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. *Parasitol.* **81**. 337.
- Lenardo, M. J.** 1991. Interleukin-2 programs mouse  $\alpha\beta$  T lymphocytes for apoptosis. *Nature.* **353**. 858.
- Lewis, S. A. and Strand, M.** 1991. Characterization of proteins and immunogens released by adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **77**. 263.
- Li, J. K. K. and Yang, Y. Y.** 1990. Mapping of two immunodominant antigenic epitopes conserved among the major inner capsid Vp 7 of five blue-tongue viruses. *Virology.* **178**. 552.

- Liew, F. Y.**, Millott, S. M. and Schmidt, J. A. 1990. A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T helper type 2 cells and enhance disease progression. *J. Exp. Med.* 172. 1359.
- Linsley, P. S.** and Ledbetter, J. A. 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11. 191.
- Lo, D.** 1992. T-cell tolerance. *Curr. Opinion. Immunol.* 4. 711.
- Loker, E. S.** 1983. A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitol.* 87. 343.
- Lu, Y. A.**, Clavijo, P., Galantino, M., Shen, Z. Y., Liu, W. and Tam, J. P. 1991. Chemically unambiguous peptide immunogen : preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the MAP system. *Mol. Immunol.* 28. 623.
- Lugovskoi, A. A.**, Rybakov, S. S., Ivaniushchenkov, V. N., Chepurkin, A. V., Petrov, V. N., Driagalin, N. N. and Burdov, A. N. 1992. Protection of naturally susceptible animals against foot-and-mouth disease with a peptide synthesized on a lysine matrix. *Bioorg-Khim.* 18. 942.
- Lukacs, N. W.**, Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Warmington, K. and Chensue, S. W. 1993. The role of macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J. Immunol.* 177. 1551.
- 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.
- Mangold, B. L.** and Dean, D. A. 1984. The migration and survival of gamma-irradiated *Schistosoma mansoni* larvae and the duration of host-parasite contact in relation to the induction of resistance in mice. *Parasitology.* 88. 249.
- Mangold, B. L.** and Dean, D. A. 1986. Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. 136. 2644.
- Marsden, H. S.**, Owsianka, A. M., Graham, S., McLean, G. W., Robertson, C. A. and Subak-Sharpe, J. H. 1992. Advantages of branched peptides in serodiagnosis. Detection of HIV specific antibodies and the use of glycine spacers to increase sensitivity. *J. Immunol. Methods.* 147. 65.
- Mathew, R. C.** and Boros, D. L. 1986. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Inf. Immun.* 54. 820.
- Mathew, R. C.**, Ragheb, S. and Boros, D. L. 1990. Recombinant IL-2 therapy reverses diminished granulomatous responsiveness in anti-L3T4-treated, *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.* 144. 4356.
- Mazingue, C.**, Camus, D., Dessaint, J. P., Capron, M. and Capron, A. 1980. *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Archs. Allergy. appl. Immun.* 63. 178.
- 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*. *Parasite Immunol.* **3**. 359.
- Mc Nair, A. T.** Dissous, C., Duvaux-Miret, O. and Capron, A. 1993. Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene.* **124**. 245.
- Metwali, A.,** Elliott, D., Mathew, R., Blum, A. and Weinstock, J. V. 1993a. IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *S.mansoni*. *J. Immunol.* **150**. 536.
- Metwali, A.,** Elliott, D., Blum, A. M. and Weinstock, J. V. 1993b. Granuloma eosinophils enhance IL-5 production by lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **151**. 7048.
- Moloney, N. A.,** Hinchcliffe, P. and Webbe, G. 1987. Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**. 247.
- Moore, D. L.,** Grove, D. I. and Warren, K. S. 1976. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma : quantification of cell populations. *J. Pathol.* **121**. 41.
- Moore, K. W.,** O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Viera, P. and Mosmann, T. R. 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **11**. 165.
- 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 lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**. 2348.
- Mosmann, T. R.** and Moore, K. W. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol. Today.* **12**. A49.
- Mountford, A. P.,** Coulson, P. S., Pemberton, R. M., Smythies, L. E. and Wilson, R. A. 1992. The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology.* **75**. 250.
- Munesinghe, D. Y.,** Clavijo, P., Calvo Calle, M., Nussenzweig, R. S. and Nardin, E. 1991. Immunogenicity of multiple antigen peptides (MAP) containing T and B cell epitopes of the repeat region of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.* **21**. 3015.
- Nadler, S. A.** 1987. Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitol. Today.* **3**. 154.
- Nardelli, B.,** Lu, Y. A., Shiu, D. R., Delpierre-Defoort, C., Profy, A. T. and Tam, J. P. 1992. A chemically defined synthetic vaccine model for HIV-1. *J. Immunol.* **148**. 914.
- Nardelli, B.** and Tam, J. P. 1993. Cellular immune responses induced by *in vivo* priming with a lipid-conjugated multimeric antigen peptide. *Immunology.* **79**. 355.
- 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.
- O'Garra, A.,** Stapleton, G., Dhar, V., Pearce, M., Schumacher, J., Rugo, H., Barbis, D., Stall, A., Cupp, J., Moore, K., Vieira, P., Mosmann, T., Whitmore, A., Arnold, L., Houghton, G. and Howard, M. 1990. Production of cytokines by mouse B cells : B

lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.* **2**. 821.

**Oswald, I. P.**, Eltoun, I., Wynn, T. A., Schwartz, B., Caspar, P., Paulin, D., Sher, A. and James, S. L. 1994. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**. 999.

**Pancré, V.**, Joseph, M., Mazingue, M., Wietzerbin, J., Capron, A. and Auriault, C. 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines : role of interferon- $\gamma$ .

**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.

**Pancré, V.**, Wolowczuk, I., Guerret, S., Copin, M. C., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. 1993. Role of rSm28GST-specific T cells in the reduction of the hepatic pathology in Schistosomiasis. *submitted*.

**Pearce, E. J.** 1993. Proselytizing with immunity. *Nature.* **363**. 19.

**Perrin, P. J.** and Phillips, S. M. 1988. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. I. A T cell derived suppressor effector factor. *J.Immunol.* **141**.1714.

**Perrin, P. J.**, Prystowsky, M. B. and Phillips, S. M. 1989a. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. II. Analogies of a T cell-derived suppressor effector factor to the T cell receptor. *J.Immunol.* **142**, 985.

**Perrin, P. J.** and Phillips, S. M. 1989b. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. III. *In vivo* effects of a T cell-derived suppressor effector factor and IL-2 on granuloma formation. *J. Immunol.* **143**. 649.

**Pessi, A.**, Valmori, D., Migliorini, P., Tougne, C., Bianchi, E., Lambert, P. H., Corradin, G. and Del Giudice, G. 1991. Lack of H-2 restriction of the *Plasmodium falciparum* (NANP) sequence as multiple antigen peptide. *Eur. J. Immunol.* **21**. 2273.

**Phillips, S. M.**, Reid, W. A. and Sadun, E. H. 1977. The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. *Cell. Immunol.* **28**.75.

**Phillips, S. M.** and Lammie, J. P. 1986. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitol. Today*.**11**. 296.

**Phillips, S. M.**, Perrin, P. J., Tung, A. S., Lin, J., Diamantstein, T. and Galal, N. 1991a. Immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. VII. Resistance is contingent on OX-8<sup>+</sup>regulated high affinity IL-2 receptor bearing W3/25<sup>+</sup> lymphocytes but not on IL-4 dependent cells. *J.Immunol.* **147**. 330.

**Phillips, S. M.**, Lin, J., Galal, N., Tung, A. S., Linette, G. P. and Perrin, P. J. 1991b. Resistance in murine schistosomiasis is contingent on activated IL-2 receptor-bearing L3T4<sup>+</sup> lymphocytes, negatively regulated by Lyt-2 cells and uninfluenced by the presence of IL-4. *J. Immunol.* **146**. 1335.

**Picket, C. B.** and Lu, A. Y. H. 1989. GST : gene structure, regulation and biological fonction. *Ann. Rev. Biochem.* **58**. 743.

**Pierce, R. J.** and Capron, A. 1993. Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. *Submitted*.

- Pitchford, R. J., 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.
- Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R. P. and Paul, W. E.** 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc $\epsilon$ RI or to calcium ionophores. *Nature.* 339. 64.
- Ponnuswamy, P. K. and Bhaskaran, R.** 1984. Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 24. 168.
- Posnett, D. N., McGrath, H. and Tam, J. P.** 1988. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor  $\beta$ -chain. *J. Biol. Chem.* 263. 1719.
- 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.
- Prakash, S., Postlethwaite, A. E., Stricklin, G. P. and Wyler, D. J.** 1990. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. IX. Schistosomal egg granulomas from congenitally athymic mice are deficient in production of fibrogenic factors. *J.Immunol.* 144. 317.
- Prakash, S., Postlethwaite, A. E. and Wyler, D. J.** 1991. Alterations in influence of granuloma-derived cytokines on Fibrogenesis in the course of murine *Schistosoma mansoni* infection. *Hepatology.* 13. 970.
- Prakash, S. and Wyler, D. J.** 1992. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. XII. Identification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes within schistosomal egg granulomas as a source of an apparently novel fibroblast growth factor (FsF-1). *J. Immunol.* 148. 3583.
- Purkerson, J. M. and Isakson, P. C.** 1992. Interleukin 5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. *J. Exp. Med.* 175. 973.
- Quill, H. and Schwartz, R. H.** 1987. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes : specific induction of a long lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* 138. 3704.
- 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.
- Racioppi, L., Ronchese, F., Matis, L. A. and Geramin, R. N.** 1993. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signalling. *J. Exp.Med.* 177. 1047.
- Ragheb,S. and Boros, D. L.** 1989. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni* infected mice. *J. Immunol.* 142. 3239.
- Ramalho-Pinto, F. J., De Rossi, R. and Smithers, S. R.** 1979. Murine Schistosomiasis *mansoni* : anti-*schistosomula* antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and-eosinophil-mediated killing of *schistosomula in vitro*. *Parasite. Immunol.* 1. 295.
- Ramsay, A. J. and Kohonen-Corish, M.** 1993. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 23. 3141.
- Renom, G.** 1992. Approche de la réponse isotypique spécifique de l'antigène protecteur

Sm28GST de *Schistosoma mansoni* : importance de la réponse IgA chez l'homme. Mémoire de DEA de Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lille I. Septembre 1992.

**Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A. and Dessein, A.** 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21. 2679.

**Rihet, P., Demeure, C. E., Dessein, A. J. and Bourgois, A.** 1992. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. *Eur. J. Immunol.* 22. 2063.

**Röcken, M., Müller, K. M., Saurat, J. H., Müller, I., Louis, J. A., Cerottini, J. C. and Hauser, C.** 1992. Central role for TcR/CD3 ligation in the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells towards a Th1 or Th2 functional phenotype. *J. Immunol.* 148. 47.

**Rothbard, J. B. and Taylor, W. R.** 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.

**Russell, J. H., White, C. L., Loh, D. Y. and Meleedy-Ray, P.** 1991. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88. 2151.

**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.

**Salam, E. A., Ishaac, S. and Mahmoud, A. A. F.** 1979. Histocompatibility-linked susceptibility for hepatosplenomegaly in human schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 123. 1829.

**Schoenbeck, S., McKenzie, D. T. and Kagnoff, M. F.** 1989. Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur. J. Immunol.* 19. 965.

**Schutze, M. P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. and Chedid, L.** 1985. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 135. 2319.

**Sher, A., McIntyre, S. and Von Lichtenberg, F.** 1977. *Schistosoma mansoni* : Kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Exp. Parasitol.* 41. 415.

**Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S. and Cheever, A. W.** 1990a. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.* 145. 3911.

**Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., Scott, P. and Cheever, A. W.** 1990b. IL-5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87. 61.

**Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. and Mosmann, T. R.** 1991. Production of IL-10 by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.* 147. 2713.

**Short, R. B.** 1983. Sex and the single schistosome. *J. Parasitol.* 69. 4.

- Silberstein, D. S.** and David, J. R. 1986. Tumor Necrosis Factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**. 1055.
- Simurda, M. C.**, Van Keulen, H., Rekosh, D. M. and Lo Verde, P. T. 1988. *Schistosoma mansoni* : Identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* **67**. 73.
- 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 glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**. 8703.
- 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.
- Smythies, L. E.**, Pemberton, R. M., Coulson, P. S., Mountford, A. P. and Wilson, R. A. 1992a. T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **148**. 1512.
- Smythies, L. E.**, Coulson, P. S. and Wilson, R. A. 1992b. Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.* **149**. 3654.
- Soussi Gounni, A.**, Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J. P. and Capron, M. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature.* **367**. 183.
- Stadecker, M. J.**, Kamisato, J. K. and Chikunguwo, S. M. 1990. Induction of T helper cell from unresponsiveness to antigen by macrophages from schistosomal egg granulomas. A basis for immunomodulation in schistosomiasis ?. *J. Immunol.* **145**. 2697.
- Stadecker, M. J.** 1992. The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. *Parasitol. Today.* **8**. 199.
- Stenger, R. J.**, Warren, K. S., Johnson, F. A. 1967. An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine schistosomiasis *mansoni*. *Exp. Mol. Pathol.* **8**. 116.
- Stirewalt, M. A.** 1974. *Schistosoma mansoni* : cercariae to schistosomula. *Adv. Parasitol.* **12**. 115.
- Svetic, A.**, Jian, Y. C., Lu, P., Finkelman, F. D. and Gause, W. C. 1993. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. Immunol.* **5**. 877.
- Takahashi, S.**, Dunn, M. A. and Seifter, S. 1980. Liver collagenase in murine schistosomiasis. *Gastroenterology.* **78**. 1425.
- Tam, J. P.** and Lu, Y. A. 1989a. Vaccine engineering : enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T and B cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**. 9084.
- Tam, J. P.** and Zavala, F. 1989b. Multiple antigenic peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J. Immunol. Methods.* **124**. 53.

- Tam, J. P.**, Clavijo, P., Lu, Y. A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. and Zavala, F. 1990. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* 171. 299.
- Taylor, J. B.**, Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J. M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Capron, A. and Ketterer, B. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 465.
- Torpier, G.**, Capron, M. and Capron, A. 1977. Structural changes of the tegument membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Ultrastruct. Res.* 61. 309.
- Torpier, G.**, Capron, A. and Ouassi, M. A. 1979. Receptor of IgG (Fc) and human b2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature.* 278. 447.
- Troalen, F.**, Razafindratsita, A., Puisieux, A., Voeltzel, T., Bohuon, C., Bellet, D. and Bidart, J.M. 1990. Structural probing of human lutropin using antibodies against synthetic peptides constructed by classical and multiple antigen peptide system approaches. *Mol. Immunol.* 27. 363.
- Trottein, F.**, Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schmitt, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. 1989. Molecular cloning and tissue distribution of a 26-kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione-S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41. 35.
- Trottein, F.**, Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B., Taylor, M. G., Gorillot, I., Sampaio Silva, M., Lecocq, J. P. and Capron, A. 1992a. Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54. 63.
- Trottein, F.** 1992b. Contribution à l'étude moléculaire des glutathion-S-transférases dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de lille I. Septembre 1992.
- Tweardy, D. J.**, Osman, G. S., Kholy, A. E., Ellner, J. J. 1983. Abnormalities of immunosuppression in patients with hepatosplenic schistosomiasis *mansoni*. *Trans. Assoc. amer. Physicians.* 96. 392-400.
- Uehara, T.**, Miyawaki, T., Ohta, K., Tamaru, Y., Yokoi, T., Nakamura, S. and Taniguchi, N. 1992. Apoptotic cell death of primed CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood.* 80. 452.
- Vella, A. T.** and Pearce, E. J. 1992. CD4<sup>+</sup> Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J. Immunol.* 148. 2283.
- 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.**, Auriault, C., Damonville, M., Neyrinck, J.L., Vendeville, C. and Capron, A. 1986. Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.* 24. 509.
- Verwaerde, C.**, Joseph, M., Capron, M., Pierce, R. J., Damoneville, M., Velge, F., Auriault, C. and Capron, A. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J.Immunol.* 138. 4441.
- Verwaerde, C.**, Auriault, C., Neyrinck, J. L. and Capron, A. 1988. Properties of serine

proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.* 27. 17.

**Wang, C. Y.,** Looney, D. J., Li, M. L., Walfield, A. M., Ye, J., Hosein, B., Tam, J. P. and Wong-Staal, F. 1991. Long-term-high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen. *Science.* 254. 285.

**Ward, R. M.** and McLaren, D. J. 1988. *Schistosoma mansoni* : evidence that eosinophils and/or macrophages contribute to skin-phase challenge attrition in vaccinated CBA/Ca mice. *Parasitology.* 96. 63.

**Warren, K.S.** 1966. The pathogenesis of "clay-pipestem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis *mansoni* with note on the longevity of the schistosomes. *Am. J. Pathol.* 49. 477.

**Warren, K. S.,** Domingo, E. O. and Cowan, R. T. B. 1967. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 51. 735.

**Williams, D. L.,** Pierce, R. J., Cookson, E. and Capron, A. 1992. Molecular cloning of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52. 127.

**Williams, M. E.,** Kullberg, M.C., Barbieri, S., Caspar, P., Berzofsky, J. A., Seder, R. A. and Sher, A. 1993. Fcε receptor-positive cells are a major source of antigen-induced interleukin-4 in spleens of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 23. 1910.

**Wilson, R. A.,** Coulson, P. S., McHugh, S. M. 1983. A significant part of the "concomitant immunity" of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunol.* 5. 595.

**Wolowczuk, I.,** Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., tartar, A. and Capron, A. 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.* 142. 1342.

**Wolowczuk, I.,** Auriault, C., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Vendeville, C., Tartar, A. and Capron, A. 1990. T-cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *Int. Arch. Allergy. Appl. immunol.* 93. 350.

**Wolowczuk, I.** 1991a. Détermination et analyse des épitopes T fonctionnels de l'antigène protecteur Sm28GST du parasite trématode *Schistosoma mansoni*. *Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé*. Université de Lille I. Février 1991.

**Wolowczuk, I.,** Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R. J., Grezel, D., Reid, G. D., Tartar, A. and Capron, A. 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28GST antigen in rat, mouse and monkey. 1. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J. Immunol.* 146. 1987.

**Wyler, D. J.** 1992. Why does liver fibrosis occur in schistosomiasis ? *Parasitol. Today.* 8. 277.

**Wynn, T. A.,** Eltoun, I., Cheever, A. W., Lewis, F. A., Gause, W. C. and Sher, A. 1993. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 151. 1430.

**Xu, C. B.,** Verwaerde, C., Grzych, J. M., Fontaine, J. and Capron, A. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase

activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* **21**. 1801.

**Xu, C.B.**, Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. and Capron, A. 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Immunol.* **150**. 940.

**Yamaguchi, Y.**, Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A. and Takatsu, K. 1988. Purified interleukin-5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* **167**. 43.

**Yamaguchi, Y.**, Suda, T., Shiozaki, H., Miura, Y., Hitoshi, Y., Tominiaga, A., Takatsu, K. and Kasahara, T. 1990. Role of IL-5 in IL-2 induced eosinophilia. *In vivo* and *in vitro* expression of IL-5 mRNA by IL-2. *J. Immunol.* **145**. 873.

**Yamashita, T.** and Boros, D. L. 1992. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* **149**. 3659.

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b> .....	7
<b>INTRODUCTION</b> .....	8
<b>GENERALITES</b> .....	10
I. Place des schistosomes dans le règne animal.....	10
II. Le cycle biologique.....	12
III. Répartition géographique des schistosomiases.....	14
IV. Pathologie associée aux bilharzioses.....	16
V. Les traitements.....	16
VI. Prophylaxie sanitaire des schistosomiases.....	17
<b>PROPHYLAXIE MEDICALE DES SCHISTOSOMIASES</b>	18
I. La réponse immune dirigée contre <i>S.mansoni</i> dans les modèles animaux	18
A. Le choix du modèle animal.....	18
B. Les mécanismes de l'immunité protectrice.....	19
1°) Préambule : l'immunité concomitante.....	19
2°) Mécanismes effecteurs chez le rat : Mécanismes d'ADCC.....	20
a) La coopération avec les macrophages.....	20
b) La coopération avec les plaquettes.....	20
c) La coopération avec les éosinophiles.....	20
d) Pertinence <i>in vivo</i> .....	21
3°) Mécanismes effecteurs développés par la souris après une infection expérimentale par des cercaires irradiées.....	22
C. Immunopathologie de la schistosomiase murine.....	23
1°) Qu'est-ce que la réaction granulomateuse ?.....	23
2°) Pourquoi la réaction granulomateuse s'accompagne t-elle d'une fibrose ?.....	23

3°) Mécanismes contrôlant la réaction granulomateuse et la fibrose :	
Analyse des processus impliqués lors de l'infection.....	25
a) Démonstration d'un phénomène d'immunomodulation	
spontanée.....	25
b) Mécanismes contrôlant l'induction de la réaction granulomateuse	
et de la fibrose : Rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	25
α) Sous-populations impliquées.....	25
β) Cytokines nécessaires au développement de la réaction	
granulomateuse.....	26
γ) Cytokines nécessaires au développement de la fibrose.....	27
c) Mécanismes contrôlant la modulation de la réaction	
granulomateuse.....	28
α) Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	28
β) Implication potentielle des cellules T CD4 <sup>+</sup> .....	29
γ) Implication des cellules B.....	29
δ) L'anergie des lymphocytes Th1.....	29
d) Mécanismes contrôlant la modulation de la fibrose.....	30
II. Mécanismes d'échappement du parasite.....	30
III. La réponse immune dirigée contre <i>S.mansoni</i> chez l'homme.....	31
A. Mécanismes effecteurs potentiels.....	31
1°) Mécanismes dépendants d'anticorps.....	32
2°) Mécanismes dépendants de lymphokines.....	32
B. Données épidémiologiques.....	32
1°) L'immunité à la réinfection.....	32
2°) Corrélations entre l'immunité à la réinfection et la présence de	
certains isotypes d'anticorps.....	33
a) Isotypes effecteurs.....	33
b) Isotypes bloquants.....	33
3°) Corrélations entre la pathologie, la réponse cellulaire T et le	
statut génétique des patients.....	34
<b>UN CANDIDAT VACCINAL PROMETTEUR :</b>	
<b>  LA SM28GST.....</b>	<b>35</b>
I. Découverte de la Sm28GST.....	35

II. Rôle des GSTs.....	36
A. Rôle des GSTs chez les mammifères.....	36
B. Rôle des GSTs chez les schistosomes.....	36
III. Localisation de l'antigène Sm28GST.....	37
IV. Mécanismes effecteurs impliqués dans la protection.....	37
A. Réduction de la charge parasitaire.....	37
1°) Chez le rat.....	37
2°) Chez la souris.....	38
3°) Chez le babouin.....	38
B. Réduction de la ponte des parasites.....	38
C. Réduction de la viabilité des oeufs.....	39
D. Réduction de la pathologie.....	39
V. Reconnaissance de la Sm28GST par les individus vivants en zone d'endémie.....	40
A. Réponse humorale.....	40
B. Réponse cellulaire.....	40
VI. Epitopes T et B potentiellement impliqués dans le pouvoir protecteur de la Sm28GST.....	40
A. Prédiction des épitopes T et B de la Sm28GST.....	40
1°) Prédiction des épitopes B.....	40
2°) Prédiction des épitopes T.....	41
B. Analyse de l'antigénicité des peptides sélectionnés.....	41
1°) Etude dans les modèles expérimentaux.....	41
a) Antigénicité T.....	41
α) Chez le rat.....	41
β) Chez la souris.....	43
b) Antigénicité B.....	43
α) Antigénicité des peptides 115-131 et 24-43.....	43
β) Peptides reconnus par les anticorps inhibant l'activité enzymatique de la Sm28GST.....	43
2°) Pertinence chez l'homme.....	43
a) Antigénicité T.....	43
b) Antigénicité B.....	44
C. Immunogénicité des peptides 115-131 et 24-43.....	44
D. Constructions peptidiques particulières : Données de la littérature.....	45

<b>RESULTATS</b> .....	47
<b>ANALYSE DE L'ANTIGENICITE ET DE L'IMMUNOGENICITE DE CINQ CONSTRUCTIONS CHIMIQUEMENT DEFINIES DU PEPTIDE 115-131 DE LA SM28GST DE SCHISTOSOMA MANSONI</b> .....	48
I. Résumé de l'article.....	48
A. Antigénicité des constructions.....	49
1°) Antigénicité B.....	49
2°) Antigénicité T.....	50
B. Immunogénicité des constructions.....	50
1°) Réponse cellulaire T.....	50
2°) Réponse IgG.....	50
II. Article.....	52
<b>IMMUNOGENICITE DES MAP-8 115-131 ET 24-43 DERIVES DE LA SM28GST CHEZ LA SOURIS</b> .....	61
I. Introduction.....	61
A. Choix du protocole d'immunisation.....	61
B. Choix des conditions de culture et choix de l'haplotype des souris.....	61
II. Immunogénicité des MAP-8 115-131 et 24-43 chez la souris CBA...	62
A. Etude de la réponse cellulaire.....	62
1°) Réponse proliférative face aux différents antigènes contenant les séquences peptidiques immunisantes.....	62
2°) Production d'IL-3.....	63
3°) Production d'IL-2.....	64
4°) Production d'IL-5.....	65
5°) Production d'IL-4.....	66
6°) Production d'IL-10.....	66
7°) Production d'IFN- $\gamma$ .....	67
8°) Conclusion.....	67
B. Etude de la réponse humorale.....	67

1°) Analyse de la réponse IgG.....	67
2°) Analyse de la réponse IgG1.....	68
3°) Analyse de la réponse IgA.....	69
4°) Conclusions.....	70
<b>ANTIGENICITE DES MAP-8 115-131 et 24-43 AU COURS DE LA SCHISTOSOMIASE MURINE.....</b>	<b>71</b>
I. Introduction.....	71
II. Résultats.....	71
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>77</b>
<b>Contribution au développement d'une approche vaccinale peptidique contre la schistosomiase.....</b>	<b>78</b>
I. Recherche de constructions chimiques capables de rendre la séquence 115-131 de la Sm28GST immunogène sans utilisation de molécule porteuse.....	79
II. Mise en évidence de l'intérêt de la construction MAP-8 dans le dosage d'anticorps anti-peptides.....	80
III. Potentiel vaccinal de la construction 115-131 MAP-8 chez le rat.....	81
IV. Immunogénicité des constructions 115-131 MAP-8 et 24-43 MAP-8 chez la souris.....	81
A. Nature de la réponse cellulaire : Analyse des cytokines produites.....	81
1°) Cytokines produites après la stimulation <i>in vitro</i> des cellules par l'immunogène : un profil ni Th1 ni Th2 ?.....	81
2°) Cytokines produites après stimulation <i>in vitro</i> des splénocytes par la Sm28GST.....	84
B. Nature de la réponse humorale.....	85
V. Potentiel vaccinal des MAP-8 115-131 et 24-43 chez la souris.....	86
VI. Conclusions - Perspectives.....	86

<b>Mise en évidence d'un comportement particulier du système immunitaire après la ponte.....</b>	<b>88</b>
I. Rappel des résultats.....	89
II. Comparaison des résultats avec les données de la littérature.....	90
A. L'anergie des lymphocytes Th1 après la ponte dans la schistosomiase.....	90
1°) Qu'est-ce que l'anergie ?.....	90
2°) Anergie et schistosomiase.....	90
3°) Intégration de nos résultats dans cette hypothèse de l'anergie.....	90
B. Elimination des lymphocytes : l'hypothèse de l'apoptose.....	91
1°) Qu'est-ce que l'apoptose ?.....	91
2°) Données de la littérature montrant qu'une hyper-réactivité cellulaire peut conduire à l'apoptose.....	92
3°) L'hypergammaglobulinémie observée après la ponte des schistosomes révèle-t-elle un phénomène d'apoptose ?.....	92
4°) Intégration de nos résultats dans l'hypothèse de l'apoptose.....	92
III. Conclusions.....	93
 <b>ANNEXE TECHNIQUE.....</b>	 <b>94</b>
I. Les animaux.....	95
II. Préparation de l'antigène d'oeuf (SEA : Soluble Egg Antigen).....	95
III. Protocole d'immunisation.....	95
IV. Protocole d'infection.....	95
V. Analyse de la réponse cellulaire.....	96
A. Stimulation <i>in vitro</i> des splénocytes.....	96
B. Quantification de la prolifération des cellules.....	96
C. Analyse des cytokines produites par les cellules.....	96
1°) Récupération des surnageants de culture.....	96
2°) Dosage de l'IL-2.....	97
3°) Dosage de l'IL-3.....	97
4°) Dosage de l'IL-4.....	97



5°) Dosage de l'IL-5.....	98
6°) Dosage de l'IL-10.....	98
7°) Dosage de l'IFN- $\gamma$ .....	98
VI. Analyse de la réponse humorale.....	98
A. Dosage des immunoglobulines G spécifiques d'antigènes.....	98
B. Dosage des immunoglobulines G1 spécifiques .....	99
C. Dosage des immunoglobulines A spécifiques.....	99
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>100</b>