

N° d'ordre :

# Université 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

Jinli Liu



Analyse de la localisation d'antigènes à potentialité vaccinale dans le parasite Schistosoma mansoni : incidence sur la compréhension des mécanismes de l'immunité

# Présentée le 29 Octobre 1996

# Membres du jury:

Président :

**Professeur** 

A. Dhainaut

Rapporteurs:

Docteur

J. F. Dubremetz

**Docteur** 

J. de Bont

Examinateurs:

Professeur

A. Capron

**Docteur** 

C. Dissous

Docteur

J. M. Grzych

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père, qui m'a toujours soutenu et qui est parti avant la fin de cette thèse.

> Bauyuan, qui m'a aidé et encouragé.

Yawei,
qui est arrivée durant cette thèse et m'a apporté la plus grande
joie de ma vie.

A toute ma famille, pour ses encouragements sincères.

# A Monsieur le Professeur A. Capron,

Vous m'avez accueillie dans votre unité. Vous m'avez aidé à régler mes divers problèmes et c'est avec votre permission et votre bienveillance que ce travail a pu être réalisé.

Que cette thèse soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. Dhainaut qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse.

Monsieur le Docteur J. F. Dubremetz et Monsieur le Docteur J. de Bonte qui ont accepté de juger ce travail. Je vous en remercie très sincèrement.

# A Monsieur le Docteur J. M. Grzych,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du groupe que vous dirigez. Vous avez suivi tout ce travail avec beaucoup d'attention et corrigé ce manuscrit avec beaucoup de patience. Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié et de ma reconnaissance.

## A Madame le Docteur C. Dissous,

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre compétence scientifique et l'éfficacité dans la correction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier très vivement :

A S. Lafitte, J. Fontaine et J.-L. Neyrinck. C'est en bénéficiant de vos compétences techniques, de vos précieux conseils et de votre merveilleuse gentilliesse que cette thèse a pu être réalisée. Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur R. J. Pierce, le Docteur J. Khalife et le Docteur E. Serra pour leur coopération et leur participation dans la correction de ce manuscrit.

A Monsieur le Professeur D. Ledividich et ses collaborateurs, le Professeur J. Montreuil et le Docteur J. de Bont pour leur collaborations.

A O. Poulain-Godefroy, G. Woerly, S. Gaubert, K. Petiprez, C. Pierrot, V. Lardans, M.-A. Viana da Costa, N. Yvanoff pour leur sympathie, leur encouragement et leur disponibilité dans la correction de cette thèse en français.

A M. Leroux, S. Vanwingène et J. P. Gazet ainsi que tout le personnel de l'animalerie pour leur sympathie et l'entretien du cycle du schistosome et des animaux.

A Monsieur J. M. Merchez pour sa sympathie et sa compétence professionnelle qui assure l'exellente qualité des travaux photographiques dans cette thèse.

A J. Derick et C. Kizonzolo pour leur disponibilité dans les recherches bibliographiques.

A tout le personnel des secrétariats ainsi que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

A l'Institut Pasteur de Lille qui m'a financé pendant la préparation de ma thèse. A l'INSERM Unité 167 et à la CEE (contrats Bio2CT-CT930111; STD3, 910030) qui ont permis d'assurer une grande partie du financement de ce travail.

# Ce travail a été accompli:

Au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire INSERM U167

Institut Pasteur de Lille

Directeur: Pr. A. Capron

Et plus particulièrement dans le groupe de recherche dirigé par le Dr. J. M. Grzych

# Il a fait l'objet d'une collaboration avec :

Le Département de Parasitologie
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Gand
Belgique
Dirigé par le Pr. J. Vercruysse

Station INRA
Avenue Maître
33590 Saint Gilles L'hermitage
Dirigé par le Pr. D. Ledividich

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

#### Articles publiés ou sous presse

- Liu, J. L., Fontaine, J., Capron, A. and Grzych, J. M. (1996) Ultrastructural localization of Sm28 GST in adulte of S.mansoni. Parasitology. sous presse.
- Roche, C., Liu, J. L., Le Presle, T., Capron, A. and Pierce, R. J. (1996) Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 187-195.
- Serra, E. C., Liu, J. L., Capron, A., Zemzoumi, K. and Dissous, C. (1996) Expression of NF-Y nuclear factor in Schistosoma mansoni. Parasitology. sous presse.
- Khalife, J., Liu, J. L., Pierce, R. J., Porchet, E., Godin, C. and Capron, A. (1993) Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology* 108, 527-532.

# Articles soumis ou en préparations

- Liu, J. L., Lafitte, S., Fontaine, J., Montreuil, J., Ledividiche, D., Capron, A. and Grzych, J. M. The different forms of IgA directed against Sm28 GST in the mammary secretion of swine and their biological functions. *en préparation*.
- Liu, J. L., Khalife, J., Grzych, J. M. and Capron, A. Ultrastructural localization of calreticulin in S.mansoni adulte. en préparation.
- Grzych, J. M., De Bont, J., Liu, J. L., Neyrinck, J.-L., Fontaine, J., Vercruysse, J. and Capron, A. Recombinant *Schistosoma bovis* Glutathione S-Transferase protects cattle against *S.mattheei* infection: II: Immune parameters, *soumis*.

#### Communications

- Roche, C., Liu, J. L., Lepresle, T., Capron, A., Pierce, R. J. The phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of *Schistosoma mansoni*. The British Society for Parasitology, Spring meeting, 1st-3rd, April, 1996.
- Pierrot, C., Godin, C., Liu, J. L., Capron, A. and Khalife, J. (1996) Molecular characterization of *Schistosoma mansoni* elastase. The British Society for Parasitology, Spring meeting, 1st-3rd, April, 1996.
- Serra, E. C., Zemzoumi, K., Liu, J. L., Mantovani, R., Capron, A. Cloning and charaterization of a CCAAT-binding protein from the human parasite *Schistosoma mansoni*. Keystone Symposia. Molecular Helminthology: An international Approche, Santa Fe, New Mexico, USA, Feb. 22-28, 1996.

Des travaux réalisés durant notre formation doctorale non présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes

Bi, B. Y., Liu, J. L., Roche, A. C., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1996) Internalization of human lactotransferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 288-296.

Pierrot, C., Godin, C., Liu, J. L., Capron, A. and Khalife, J. (1996) Molecular characterization of Schistosoma mansoni elastase. Parasitology. sous presse.

Bi, B. Y., Leveugle, B., Liu, J. L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A. C., Nillesse, N., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1994) Immunolocalization of lactotransferrin receptor on human T lymphoblastic cell line Jurkat. *Eur. J. Cell Biol.* 65, 164-171.

Torpier, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J. L., Darde, M. L. and Capron, A. (1993) *Toxoplasma gondii*: differential localization of antigens secreted from encysted bradyzoites. *Exp. Parasitol.*77,13-22.

Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F. (1993) Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitology.* 59, 143-154.

# **SOMMAIRE**

AbréviationsP.	9
RésuméP.	10
IntroductionP.	11
Matériels et méthodesP.	72
RésultatsP.	84
Discussion et perspectivesP.	130
Références bibliographiquesP.	149
Table des matièresP.	. 177

# **ABREVIATIONS**

ADCC: Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps ADNc: Acide déoxyribonucléique complémentaire

Ag: Antigène Ac: Anticorps

AP-1: La protéine activatrice 1

ARNm : Acide ribonucléique messager BCG : Bacille de Calmette et Guérin CFA : Adjuvant complet de Freund

D.O.: Densité optique

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acide

**ELISA**: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

RFX : Facteur de régulation X

**GSH**: Glutathion

**GSTs**: Glutathion S-transférases **H2O2**: Peroxyde d'hydrogène

**HSF**: Heat shock factor

IFA: Adjuvant incomplet de Freund

IFN: InterféronIL: InterleukinekDa: Kilodalton

NADPH: Nicotine amide adénine dinucleotide phosphate

NF-Y: Le facteur nucléaire Y/CCAAT

NF-YA: Sous unité A du facteur nucléaire Y/CCAAT NF-YB: Sous unité B du facteur nucléaire Y/CCAAT

NK: Natural killer

OMS: Organisation mondiale de la santé

**pb**: paire de bases

**PBS**: Tampon phosphate

**PCOOH:** Phospholipide hydroperoxyde **PCR**: Réaction de polymérisation en chaîne

**PHGSHpx**: Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase

**PZQ**: Praziquantel

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium

dodécyl sulfate

SEA: Antigène soluble des oeufs

SmCaR: Calréticuline de S.mansoni

Sm28GST: Glutathion S-transférase 28 kDa de Schistosoma mansoni.

SmNF-YA: Sous unité A du facteur nucléaire Y/CCAAT de Schistosoma mansoni

SWAP: Préparation antigènique soluble de ver adulte

**TBS**: Tampon Tris

TPI: Triose-phosphate-isomérase

# **RESUME**

Dans le but d'élaboration d'un vaccin efficace contre les schistosomiases, la stratégie de recherche de notre laboratoire vise à la compréhension des mécanismes de la protection induite par les 28GSTs, ainsi qu'à l'identification de nouvelles molécules du schistosome à potentialité vaccinale pour la construction d'un vaccin "multifactoriel". Nos travaux de thèse se sont organisés autour de trois axes principaux :

- 1. L'application de la technique d'immunohistochimie et de la microscopie électronique a permis la localisation de 4 antigènes de S.mansoni à potentialité vaccinale dans différents stades du parasite: La Sm28 GST est largement distribuée dans les tissus de l'adulte. Cette molécule est localisée dans le cytosole et est plus concentrée dans les noyaux, elle se trouve surtout dans les cellules non différenciées. La SmNF-YA est observée dans touts les stades étudiés (cercaire, oeuf et adulte). Elle se trouve dans les cellules possédant un noyau rond et localisée uniquement dans le noyau. La SmCaR a été détectée dans tous les stades et les cellules observés, avec une concentration plus importante au niveau de l'épithélium intestinal et les organes génitaux. Au niveau ultrastructural, elle est associée au réticulum endoplasmique. La SmPHGSHpx a été observée spécialement dans les cellules vitellines. La comparaison de la localisation de ces molécules par la technique de double marquage a révélé des caractères particuliairs pour chacune d'entre elles. Cette étude a donné des indications sur leur fonctions biologiques chez le parasite et a ouvert la voie de recherche sur leur rôle dans la stratégie contre la schistosomiase.
- 2. L'analyse des réponses Acs et de l'inhibition sur la fonction catalytique des 28GSTs par des sérums de bovins immunisés par Sb28 GST a révélé une association positive entre ces deux paramètres. La réaction croisée entre la rSb28 GST et la 28 GST native de S.mattheei a permis d'expliquer la protection induite par l'immunisation de Sb28 GST contre l'infection naturelle par S.mattheei.
- 3. L'immunisation de la Sm28 GST dans le modèle porcin a permis l'induction d'une réponse Ac spécifique au niveau sérique et muqueux (sécrétion lactée). Ces Acs induisent une inhibition sur l'activité enzymatique de la Sm28 GST qui est transmis aux porcelets. Ces résultats ont donné la possibilité d'étudier les fonctions biologiques de différentes formes d'Acs spécifiques de l'antigène Sm28 GST dans la schistosomiase.

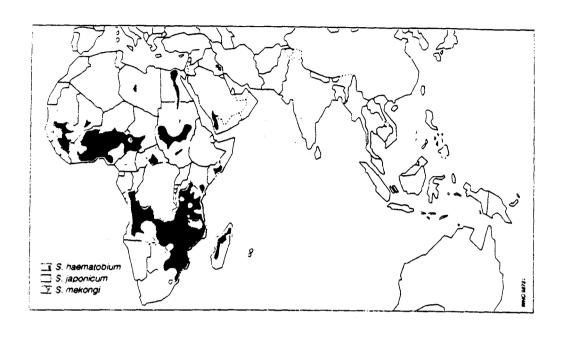
# INTRODUCTION

La schistosomiase, ou bilharziose est une maladie parasitaire due à un helminthe digénétique vivant dans le flux sanguin: le schistosome. Décrites pour la première fois en Egypte en 1852 par Théodore Bilharz, les bilharzioses touchent l'homme et de nombreuses espèces animales. La pathologie de cette maladie est essentiellement due à la fibrose qui accompagne la réaction inflammatoire développée par l'hôte autour des oeufs bloqués dans les tissus hépatiques, intestinaux ou urogénitaux. Cette pathologie entraîne la destruction et le disfonctionnement des organes atteints qui peuvent conduire à la mort des sujets infectés. Actuellement cette maladie affecte plus de 200 millions de personnes et cause 800 000 décès par an selon l'OMS. Le nombre d'individus infectés est par ailleurs en expansion, du fait de modifications favorables du milieu (barrage, irrigation) et d'un accroissement des populations. De ce fait, les schistosomiases sont considérées comme un véritable problème de santé publique dans les pays en voie de développement. De plus, sur le plan vétérinaire, les espèces zoophiles infectant le bétail sont responsables de graves pertes économiques.

Chez l'homme, la bilharziose est due à 5 espèces de schistosomes: S.haematobium, S.mansoni, S.japonicum, S.intercalatum et S.mekongii. Elles sévissent dans les régions où coexistent un climat tropical, des eaux de surface, un niveau socio-économique modeste et une certaine densité de population. Cette parasitose est endémique dans 76 pays, les continents africain, sud-américain et asiatique sont les plus touchés (Fig. 1).

Des programmes de lutte, institués depuis quelques années dans certains pays, ont contribué à la diminution de la prévalence, de l'intensité moyenne d'infestation et donc de la morbidité de la schistosomiase (Brésil, Martinique, Guadeloupe, Egypte et Chine); ces programmes sont fort coûteux, difficiles à établir et en réévaluation permanente. En effet, la réussite du contrôle de l'endémie, soit par lutte contre les mollusques, soit par traitement sélectif ou collectif des sujets parasités, dépend en grande partie d'une élévation du niveau de vie et du développement socio-culturel des populations touchées. De plus, les médicaments les plus actifs ne préviennent pas la réinfection et n'affectent pas la transmission, ils ne permettent pas non plus de réparer la pathologie. C'est pourquoi, les efforts de lutte actuels, s'orientent vers le développement de vaccin.

Cette démarche a été initiée par l'utilisation de parasites atténués (Minard et coll., 1978; Bickle et coll., 1979; Taylor et coll., 1986), ou par l'utilisation d'extraits antigéniques bruts du parasite (SEA, Soluble Egg Antigen, SWAP, Soluble Worm Antigen Preparation) (James et coll., 1990) qui aboutissent à une réduction significative de la charge parasitaire (60%). Cette approche vaccinale n'est malheureusement pas



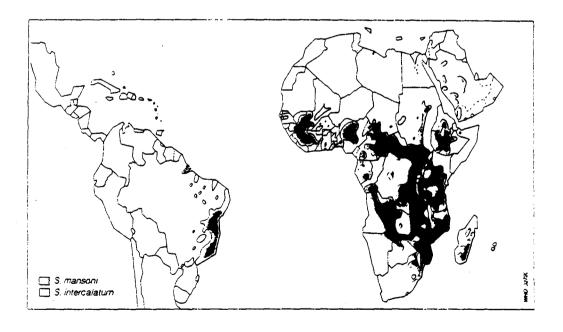


Figure 1. Répartition géographique des schistosomiases humaines (d'après "Atlas de la réparation mondiale des schistosomiases" O. M. S., 1992)

envisageable chez l'homme en raison de l'impossibilité de produire à grande échelle et de façon standardisable ces préparations. Grâce au développement des techniques de la biologie moléculaire, plusieurs protéines recombinantes ont été produites, leurs propriétés protectrices ont été évaluées dans différents modèles. Parmi ces molécules, la glutathion S-transferase de S.mansoni (Sm28 GST) identifiée et caractérisée dans notre laboratoire (Balloul et coll., 1985) représente un candidat vaccinal prometteur. Cet Ag confère une protection significative dans divers modèles animaux (Balloul et coll., 1987a; b; c; Boulanger et coll., 1991; 1994; 1995). La protection se manifeste à deux niveaux : la diminution de la charge parasitaire et la réduction de la fécondité du parasite, ce dernier paramètre étant associé à la pathologie (Boulanger, 1991).

Nos travaux s'intégrent dans un vaste programme de recherche pour l'élaboration d'une stratégie vaccinale contre les bilharzioses. Les objectifs de notre thèse vise à la compréhension des mécanismes de la protection induite par les 28GSTs ainsi qu'a l'identification de nouvelles molécules du schistosome à potentialité vaccinale pour la construction d'un vaccin "multifactoriel". Nos travaux se sont organisés autour de trois axes principaux :

- 1. La localisation des différents antigènes à potentialités vaccinales dans les différents stades du schistosome.
- 2. L'analyse des corrélations liant l'inhibition des fonctions catalytiques des 28 GSTs et l'expression des paramètres de l'immunité protectrice.
- 3. L'étude des propriétés respectives de différents isotypes (IgA, IgG) dans l'expression du phénomène de neutralisation de la fonction glutathion S- transférase de la Sm28 GST.

A. Le schistosome et la schistosomiase

## 1. Place des schistosomes dans le règne animal

Les schistosomes se caractérisent au sein de la classification par leur appartenance à l'embranchement des plathelminthes (vers plats non segmentés), classe des trématodes (appareil digestif avec caecum), sous-classe des digènes (deux hôtes), super-ordre des prostomata (bouche antérieure), ordre des distomes (2 ventouses: buccale et ventrale), sous-ordre des schistosomoïdea (sexes séparés), famille des schistosomatidés (furcocercaires libres), genre schistosoma (hôte définitif mammifère) (Euzeby J., 1970). La classification peut être basée

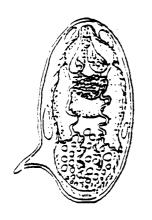
#### -soit sur la morphologie de leurs oeufs (Fig. 2):

- 1. (oeufs) ovales et munis d'un éperon latéral (Schistosoma mansoni).
- 2. (oeufs) ovales et munis d'un éperon terminal (Schistosoma intercalatum).
- 3. (oeufs) ronds et munis d'un éperon minuscule (Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongii).

#### -soit selon leurs spectres d'infectivité :

- 1. Espèces anthropophiles:
- -Schistosoma mansoni (bilharziose intestinale)
- -Schistosoma intercalatum (bilharziose intestinale)
- -Schistosoma haematobium (bilharziose urogénitale)
- 2. Espèces anthropo-zoophiles: Schistosoma japonicum et Schistosoma mekongii
- 3. Espèces zoophiles
- -Rongeurs et carnivores : Schistosoma rodhaini
- -Suidés: Schistosoma incognitum
- -Ruminants: Schistosoma bovis, Schistosoma mattheei, Schistosoma leiperi, Schistosoma margrebowiei, Schistosoma indicum, Schistosoma spindale, Schistosoma nasale et le genre Orientobilharzia

A B







# Figure 2. 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 epidermiological, radiological and clinical correlation". Reeder, M. M. and Palmer, P. E. S., Williams & Wilkins (eds.), 1981, Baltimore, London, pp. 1030)

#### 2. Cycle évolutif

Le cycle biologique de Schistosoma mansoni est illustré dans la Figure 3.

#### 2.1. Stade adulte

Parasites digènes, les schistosomes utilisent un hôte définitif vertébré et un hôte intermédiaire, un mollusque aquatique. Les schistosomes adultes vivent accouplés en quasi permanence dans les capillaires des organes creux, majoritairement le long du tube digestif (S.mansoni, S.japonicum, S.bovis...) mais également autour du système urogénital (S.haematobium) ou dans d'autres localisations plus rares telle la muqueuse pituitaire des fosses nasales (S.nasale). Les femelles pondent de façon presque continue des oeufs dont une partie sera excrétée dans le mileu extérieur par rupture des tissus, dans les selles ou l'urine. Les oeufs non excrétés sont entraînés par le flux sanguin jusqu'aux organes susceptibles de bloquer leur migration.

#### 2.2. Le miracidium

Lorsque les conditions extérieures sont favorables (pH neutre, température élevée, salinité modérée, lumière), les oeufs rejetés dans les excrétas éclosent en libérant une première forme libre, le miracidium qui est doté de cils vibratiles. Aussitôt, la larve va rechercher son mollusque hôte intermédiaire, guidée par divers stimuli d'ordre chimique et sensoriel. Pour les quatre principales espèces du genre Schistosoma infectant l'homme, les hôtes intermédiaires sont spécifiques:

Espèces de schistosomes	Genre de l'hôte intermédiaire
S.mansoni	Biomphalaria
S.haematobium	Bulinus
S.japonicum	Oncomelania
Sintercalatum	Bulinus

# 2.3. Le sporocyste

Après la pénétration du tégument, la larve rejoint l'hépatopancréas du mollusque pour y donner naissance à deux ou trois générations successives de sporocystes qui vont produire, par bourgeonnement, des quantités considérables de cercaires, deuxième forme libre infestante du cycle. On considère qu'un seul miracidium ayant pénétré chez le mollusque peut donner naissance à 100 à 200.000 larves infestantes.

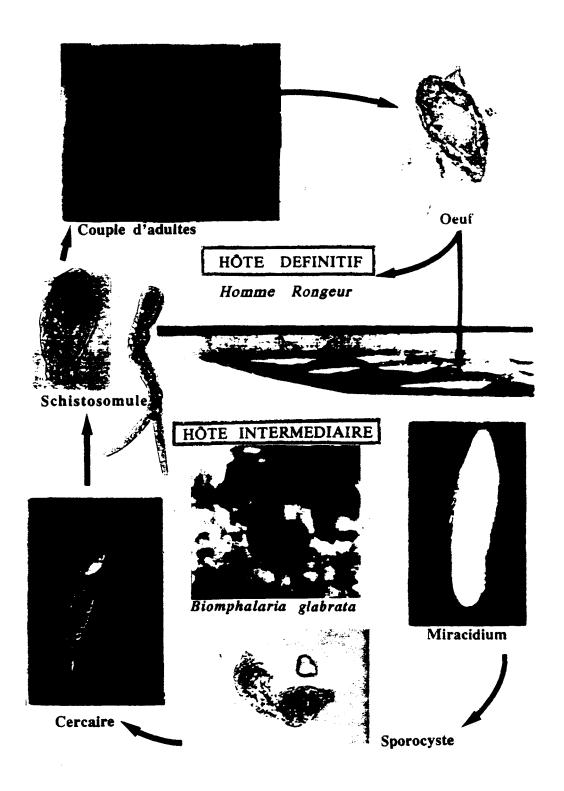


Figure 3. Cycle biologique de S.mansoni

#### 2.4. La cercaire

Libérées aux heures chaudes de la journée (Nojima et coll., 1982), les cercaires pourvues d'une queue bifide et vibrante, nagent alors activement à la rencontre d'une cible adaptée, sous l'influence de signaux physiques et chimiques. Au contact de l'épiderme de l'hôte définitif, les cercaires perdent leur partie caudale et traversent activement les couches supérieures de la peau grâce à la production, par ses glandes acétabulaires, d'enzymes protéolytiques. Ainsi, les larves se transforment en schistosomules.

#### 2.5. Le schistosomule

Après un séjour cutané de quelques jours, les schistosomules migrent vers les poumons par voie lymphatique et sanguine. Puis ils passent au niveau du coeur et du poumon, pour rejoindre, via la circulation, la veine porte intra-hépatique (Knopf et coll., 1986). De façon apparemment aléatoire, une partie des larves en migration va atteindre le foie. Ce cycle va être répété par les larves en circulation jusqu'au 15ème jour post infection, quand le recrutement hépatique sera stabilisé. A ce stade, qui peut survenir dès le 10ème jour pour les premières larves recrutées, les parasites vont subir un profond remaniement de leurs structures, notamment au niveau du tégument (Torpier et coll., 1977), et de leur physiologie pour donner naissance, à partir du 30ème jour d'infestation, au stade adulte sexuellement apte à la reproduction. Après accouplement, le mâle portant sa femelle va migrer à contre-courant le long de la veine porte et s'installer dans les capillaires pariétaux de l'organe creux, où la ponte pourra être initiée.

#### 3. Biologie du schistosome

Le schistosome a deux sexes séparés. Le mâle, long de 5 à 11 mm, présente une ventouse buccale débouchant sur un canal alimentaire. Une deuxième ventouse ventrale est impliquée dans l'attachement aux parois des vaisseaux. Une large rainure ventrale bardée d'épines, dite canal gynécophore, retient la femelle accouplée. La femelle, plus longue (jusqu'à 20 mm) et plus fine que le mâle, possède également deux ventouses et le système digestif (Fig.4).

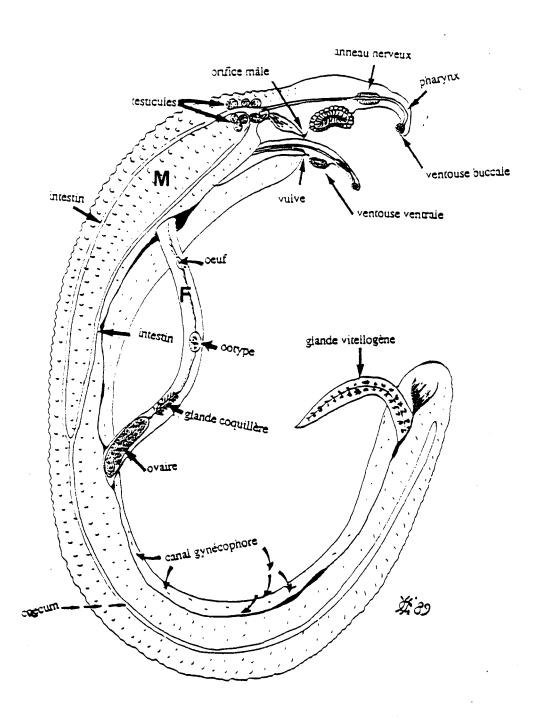


Figure 4. Anatomie schématique d'un couple de schistosomes (D'après "Atlas de parasitologie", Y. Golvan- Ed. Le Léopard d'Or, 1990)

#### 3.1. Nutrition

Chez les schistosomes, ce sont les vers mâles qui assurent la nutrition pour les couples. La fonction principale des femelles localisées au sein du canal gynécophore du mâle, est la reproduction (Basch, 1990). L'absorption se partage entre la voie tégumentaire et buccale selon la nature des nutriments. Le revêtement externe (tégument), largement développé chez le mâle, est caractérisé par d'abondantes papilles. Il est assimilé à une membrane cytoplasmique contenant mitochondries, corps de sécrétions et organes sensitifs (Erasmus et coll., 1987). Les éléments solubles (glucose, acides aminés, sels minéraux) peuvent traverser le tégument et être absorbés par le schistosome. Le système digestif du schistosome commence par la ventouse buccale suivie d'un court oesophage se divisant en deux caeca fermés (Fig.4). Hématophage, les femelles absorbent plus d'hématies (1,4 million/jour) que les mâles (100 000/jour) (Lawrence, 1973). Les globules rouges entrent par la voie buccale, et sont lysés puis dégradés par une hémoglobinase et la cathepsine B (Chappell et Dresden, 1986; Klinkert et coll., 1989) fabriquées par le système digestif. Les produits du catabolisme de l'hémoglobuline constitueront la source principale des acides aminés disponibles pour les néosynthèses. Enfin, les produits terminaux du catabolisme protidique sont l'ammoniac et l'urée.

#### 3.2. Excrétion

La fonction d'excrétion des déchets est principalement assurée par les protonéphridies, qui constituent un système de tubules s'ouvrant sur un néphridiopore. Chaque tubule est pourvu d'une cellule en flamme, munie de flagelles, dont le rôle est d'assurer un flux continu au sein de la néphridie, ce qui permettrait le drainage de divers métabolites du tissu parenchymateux vers l'extérieur du parasite.

Le tégument participe également à l'élimination des déchets toxiques. Les preuves concernant sa participation directe dans ce processus restent toutefois parcellaires.

Les trématodes adultes vivent en général dans un environnement relativement constant. De plus, ces parasites ne semblent pas être munis de fonction d'osmorégulation (Fried et Haseeb, 1991). Leur système néphridial est probablement impliqué dans l'élimination des déchets issus du métabolisme de l'azote. La disulfide isomérase est une enzyme multifonctionnelle : elle est capable de fixer des polypeptides et de catalyser des réactions de réduction (Noiva et Lennarz, 1992). L'accumulation de la protéine disulfide isomérase, au niveau tissulaire, est corrélée avec le taux de synthèse de protéines destinées à

l'excrétion. La présence de concentrations élevées de cette protéine au niveau des cellules néphridiales de schistosomes, est une preuve directe de l'implication de ces organes dans les processus d'excrétion des protéines (Finken et coll., 1994).

# 3.3. Respiration

Elle est double: le glycogène peut être mobilisé à la demande, sous l'action d'une phosphorylase glycogénique pour fournir du glucose qui, selon les conditions, sera utilisé par voie aérobie ou anaérobie. Toutes les enzymes nécessaires à la conversion du glucose en acide lactique sont en effet présentes: hexokinase, phosphofructokinase, aldolase, triose phosphate isomérase, déhydrogénase lactique, kinase pyruvique. Le schistosome est ainsi capable de s'adapter aux disponibilités énergétiques variables qu'il est susceptible de rencontrer au cours de son existence.

Les schistosomes sont des grands consommateurs de glucose qu'ils stockent en importantes réserves de glycogène. Les vers adultes qui vivent dans le système circulatoire, dégradent les carbohydrates par la voie de la fermentation et produisent du lactate. Ces parasites vivent dans des biotopes où la diffusion de l'oxygène n'est pas un facteur limitant pour la respiration aérobie, ce qui suggère que la production d'énergie par voie anaérobie n'est pas liée à une anoxie, ni à une mauvaise diffusion de l'oxygène. En ce qui concerne les stades de vie libre (miracidium et cercaire), la production de l'énergie métabolique se fait par voie aérobie; ils dégradent le glycogène endogène via le cycle de Krebs, ce qui aboutit à la production de CO<sub>2</sub> (Horemans et coll., 1991). Lorsque les cercaires pénètrent dans l'hôte définitif, elles se transforment en schistosomules. Pendant cette transformation biologique qui s'accompagne de changements morphologiques et physiologiques profonds, une transition biochimique survient également. Les schistosomules basculent très rapidement de l'activité aérobie vers la production du lactate (Horemans et coll., 1992). Chez l'hôte intermédiaire, les sporocystes sont des anaérobies facultatifs. Leur métabolisme est ajusté selon les conditions du milieu rencontré chez le mollusque. En aérobiose, ils dégradent le glucose via le cycle de Krebs mais produisent aussi un peu de lactate. Dans des conditions d'anaérobiose, rencontrées parfois chez le mollusque, le parasite s'adapte par la production de lactate et du succinate (Tielens et coll., 1992).

### 3.4. Reproduction

Les schistosomes sont des trématodes digènes, caractérisés par la présence d'organismes de sexes opposés (Short, 1983), dont le développement et la maturation sexuelle se fait au sein de l'hôte définitif.

Le système de reproduction du mâle est constitué de 7 à 8 testicules sphériques situés au niveau dorsal derrière la ventouse ventrale. Les testicules s'ouvrent à l'extérieur par le cirre, via le canal déférent et la vésicule séminale. Délimités par la membrane basale et enveloppés d'une couche de fibres musculaires, les testicules contiennent deux types de cellules: des cellules germinales (spermatocytes) et des cellules non-germinales. Les cellules non-germinales sont supposées avoir des fonctions nutritives et participer à la régulation de la production du sperme (Fig.5B).

Le système de reproduction de la femelle est constitué d'un ovaire en forme de poire; les oocytes se développent progressivement de l'extrémité antérieure vers l'extrémité postérieure de l'ovaire et sont libérés dans l'oviducte. Ce canal présente une région dilatée qui constitue le réceptacle du sperme. A ce niveau, l'oocyte mature est fécondé. La femelle présente de très nombreux follicules vitellins qui constituent les 4 / 5ème de ses tissus. Au sein de ces follicules sont élaborées des cellules vitellines matures qui sont libérées dans un canal vitellin. Canal vitellin et oviducte fusionnent pour former un conduit cillé (le vitello-oviducte). Ce dernier débouche dans l'ootype, chambre dans laquelle l'oeuf est élaboré à partir de l'oocyte fécondé, de cellules vitellines et des produits issus des glandes Mehlis et de l'ootype. Sur sa face antérieure, l'ootype débouche dans l'utérus ventral (Fig.5A).

La présence des mâles est indispensable pour la maturation des femelles. Des essais d'infestation monosexuée démontrent qu'en l'absence des mâles, les femelles sont incapables de se développer; elles demeurent alors de petite taille et leur appareil de reproduction est immature. Les ovaires, les ootypes et l'utérus sont développés, mais les glandes vitellines, qui produisent les précurseurs des protéines de la coquille et qui assurent la nutrition des oeufs sont atrophiées (Basch et Basch, 1984; Erasmus, 1973; Shaw, 1977). De même, des femelles matures et fertiles dégénèrent rapidement, mais réversiblement si elles sont transplantées seules chez un nouvel hôte (Clough, 1981). Par contre, les mâles sont capables de poursuivre normalement leur maturation malgré les différences d'ordre comportemental, physiologique et antigénique qu'ils peuvent présenter vis-à-vis des mâles issus d'infection bisexuée (Armstrong, 1965; Aronstein et Strand, 1984; Cornford and Fitzpatrick, 1985). Il semble qu'un facteur induisant la

maturation soit produit et transféré du mâle vers la femelle. De plus, le développement des glandes vitellines des femelles est influencé par le contact entre les vers de sexe opposé (Shaw, 1977; Basch et Rhine, 1983; Popiel et Basch, 1984).

L'hermaphrodisme peut avoir lieu chez les espèces de schistosomes dans certaines conditions de milieu. Ce mode de reproduction a été classiquement décrit chez les mâles, avec la présence d'un utérus et d'ovaire (Buttner, 1950). Il s'agirait d'un mécanisme de secours destiné à subvenir à la carence momentanée en femelles chez l'hôte infesté. Par contre ce mode de reproduction n'a été que rarement décrit chez les femelles (Chien et Lia, 1960). Les schistosomes peuvent aussi se reproduire par parthénogénèse; ce mécanisme a souvent lieu lorsque les femelles se trouvent en présence de mâles stériles ou hétérospécifiques. Dans ce cas, les femelles pondent des oeufs haploïdes mais qui sont capables, dans certains cas, de poursuivre le cycle parasitaire (Basch et Basch, 1984). La coinfestation d'un vertébré par des cercaires haploïdes mâles et femelles aboutit au développement de schistosomes adultes diploïdes normaux (Khalil et coll., 1995). Sur le plan évolutif, la mise en place de la parthénogénèse chez les schistosomes leur permet, dans le cas où plusieurs espèces de ce genre coexistent, de préserver le matériel génétique pendant quelques générations dans l'attente d'un partenaire spécifique et de sexe opposé (Basch, 1990, Jourdane et coll., 1995).

Après fécondation, les femelles pondent des oeufs isolément (S.mansoni) ou en groupe (S. haematobium). Le nombre d'oeufs excrétés quotidiennement varie suivant les espèces de schistosomes : 300 pour S.mansoni) et 3000 pour S. japonicum (Loker, 1983). A la sortie de l'utérus, l'oeuf est immature et le reste pendant 6 jours jusqu'à l'apparition d'un miracidium complètement développé. L'oeuf ainsi embryonné peut survivre dans les tissus de l'hôte pendant au moins 12 jours (Smith, 1977). Une partie seulement des oeufs passe dans le milieu extérieur avec les fécès, l'urine ou les sécrétions nasales et assure ainsi la continuité du cycle de développement des schistosomes. Le reste des oeufs est bloqué dans les tissus de l'hôte où il provoque la principale manifestation pathologique associée à ce parasite : le granulome.

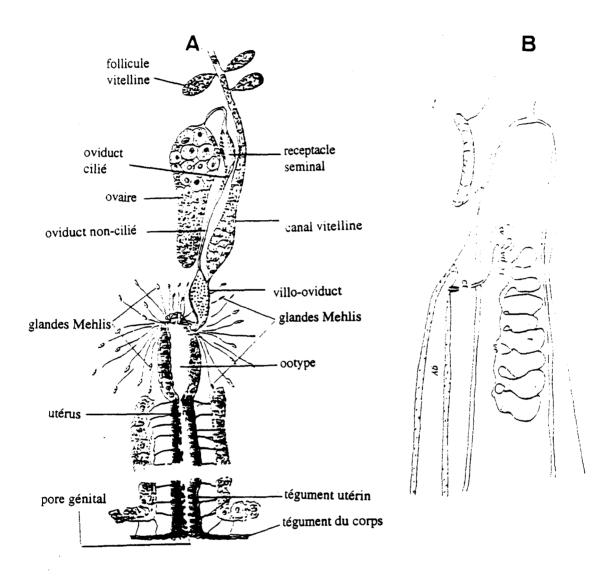


Figure 5. Structure du système génital de S.mansoni.

A: Ver femelle (d'après Spence et Silk, 1971, S. Afr. J. Med. Sci. 36, 41-45.

**B**: Ver mâle. t (testicules), ve (vas efferent), vd (vas déferent), sv (vesicul seminal), ct (tube cirus), gy (canal gynecophore).

(d'après Otbanjo, 1980, Parasitology, 81, 565-571).

# 4. Pathologie et manifestation(s) clinique(s)

# 4.1. Symptômes généraux

Les manifestations pathologiques d'une infection à *S.mansoni* présentent des degrés d'intensité variable, suivant l'importance de la charge parasitaire, l'état immunitaire et la prédisposition des sujets infectés. Les symptômes de la forme sévère sont déjà visibles 4 à 10 semaines après une forte primo-infection chez les individus non-immuns. Ils se traduisent par un état fébrile, une hyperthermie (fièvre de Katayama), une hyperéosinophilie sanguine, une apparition d'urticaire, des malaises, une hépatosplénomégalie et des diarrhées. Cette forme est relativement rare en zone d'endémie ancienne, en raison probablement d'une présensibilisation des jeunes enfants aux antigènes bilharziens par le placenta ou le lait maternel (Carlier et coll., 1980). Dans certaines circonstances, comme lors de l'apparition de néofoyers explosifs dans des populations non-immunes, ce pourcentage peut être toutefois beaucoup plus important (Diaw et coll., 1990; Talla et coll., 1990).

#### 4.2. Dermatite

La première manifestation clinique appelée "dermatite de nageur" est induite par la pénétration cercairienne et la mort précoce des schistosomules incapables de poursuivre leur cycle normal. C'est une réaction inflammatoire non-spécifique due à l'infiltration des cellules inflammatoires, notamment des neutrophiles.

Les symptômes, dominés par le prurit, vont évoluer vers l'apparition de papules érythémateuses de 1 à 2 mm de diamètre qui, dans la plupart des cas, régressent spontanément.

Chez les sujets présensibilisés, le contact cercarien aboutit à une réponse plus intense et plus rapide. L'infiltration de l'épiderme par des neutrophiles et des lymphocytes, suivie peu après par des éosinophiles en grande quantité, aboutit à la lyse des larves de réinfection, ou d'une partie d'entre elles.

# 4.3. Symptômes liés à l'excrétion des oeufs

Les oeufs provoquent des lésions tissulaires au cours de leur migration dans les tissus. Ils progressent grâce à la sécrétion d'enzymes protéolytiques qui provoquent une nécrose et une inflammation des tissus environnants (Pino-Heiss, 1985). Les symptômes s'expriment au niveau vésical ou intestinal selon le parasite concerné. On observe souvent des diarrhées, des hémorragies ou des douleurs abdominales imprécises. La bilharziose urogénitale due à S. haematobium est très fréquemment caractérisée par une hématurie.

#### 4.4. Manifestations granulomateuses

Une grande partie des oeufs pondus par les femelles est piégée dans les tissus. Dès leur arrivée dans les tissus, les oeufs vont susciter le développement d'une réaction de type hypersensibilité retardée, aboutissant à la formation des granulomes. Histologiquement, on note l'accumulation successive de nombreux types cellulaires, notamment d'éosinophiles, suivis par des macrophages, des lymphocytes, des cellules épithélioïdes et des fibroblastes. Cette réponse évolue par la suite vers la fibrose cicatricielle. Selon les espèces de schistosomes et les tissus où les oeufs sont déposés, l'évolution des granulomes peut engendrer des conséquences différentes.

Dans le cas de l'infection par S.mansoni, on note une infiltration granulomateuse du côlon et du rectum pouvant aller jusqu'à l'ulcération et l'hémorragie. Des formes polypeuses sont parfois observées. La fibrose pariétale est par contre constante. Des douleurs abdominales et des diarhées aqueuses apparaissent de façon intermittente et peuvent évoluer vers un symptôme dysentériforme. Curieusement l'absorption intestinale semble peu affectée, contrairement à de nombreuses autres helminthiases à répercussions digestives. Le développement de la fibrose hépatique dû aux granulomes périovulaires engendre l'apparition progressive d'une hypertension portale dont les répercussions sont multiples : splénomégalie parfois considérable, néoartériolisation hépatique, développement de circulations collatérales avec création de varices oesophagiennes, dont la rupture peut aboutir à des hémorragies mortelles. Au cours des formes compensées de la maladie, le fonctionnement hépatique est relativement conservé. Il peut cependant évoluer vers des formes décompensées présentant des troubles circulatoires grâves aboutissant à des oedèmes, de l'ascite, voir de l'ictère. Au niveau de la rate, on observe une hyperplasie réticulohistiocytaire et la présence de quelques granulomes qui, associés à l'hypersplénie immunitaire, rendent compte de la splénomégalie constatée.

S.haematobium est responsable d'une bilharziose urogénitale très particulière et presque exclusivement rencontrée chez l'homme. La localisation des oeufs dans l'épaisseur de la paroi vésicale aboutit à la formation de pseudotubercules évoluant vers la confluence en formes polypeuses. Elles contiennent des agrégats souvent massifs localisés sous les muqueuses ou dans l'ensemble de la paroi. Les symptômes fréquents sont alors la pollakiurie, la dysurie et l'hématurie bien que ce dernier critère soit variable en intensité et en fréquence. Une des particularités des oeufs de S.haematobium est leur forte proportion à la calcification. L'évolution peut se faire soit vers la sclérose vésicale allant jusqu'à l'obstruction complète de l'excrétion avec hydronéphrose associée, soit vers

la nécrose et l'ulcération, voir la cancérisation. La fréquence des cancers vésicaux est nettement plus élevée chez les bilharziens (Pike 1986). Il a été confirmé récemment que l'infection par le schistosome est impliquée dans la cancérogénèse de la vessie (Mostafa et coll., 1995). En dehors de la localisation vésicale, l'appareil génital est souvent fortement atteint, la stérilité en étant le résultat final. Parallèlement, l'évolution des granulomes envahissants peut aboutir de façon inéluctable à des perturbations rénales grâves pouvant aller jusqu'au syndrôme urémique.

## 5. Immunologie des schistosomiases

#### 5.1. Immunité naturelle

Le degré de résistance à l'infection par le schistosome est très variable selon les espèces animales étudiées et va de la résistance totale à l'infection jusqu'à la mort de l'individu. Sur ces observations, Kagan (1958) propose une classification qui divise les espèces animales en 3 catégories suivant leur comportement face à l'infection.

-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 la localisation hépatique, il se produit une chute brutale de la charge parasitaire à la quatrième semaine d'infection (Maddison 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.

Les mécanismes anti-parasitaires s'expriment à plusieurs niveaux. De nombreux paramètres aussi divers que les facteurs écologiques ou les facteurs hormonaux, rendent compte de la susceptibilité d'une espèce aux parasites.

L'homme se comporte comme un hôte susceptible et développe des infections pouvant durer plusieurs années, cette infection arrive à se stabiliser à l'âge adulte. Des observations montrent que la résistance à l'infection par le schistosome se développe progressivement pendant la période de l'enfance et atteint un maximum à l'âge de la puberté (Butterworth et coll., 1985). L'étude sur différentes populations humaines montre qu'il existe un gène co-dominant majeur contrôlant la susceptibilité ou la résistance à l'infection (Abel et coll., 1991).

# 5.2. Immunité acquise

L'immunité contre l'infection par le schistosome revêt un caractère très particulier puisque celle-ci est une immunité non stérilisante efficace contre les formes larvaires de la nouvelle infection mais inefficace contre les vers adultes déjà présents dans l'organisme. Le terme d'immunité concomitante est utilisé pour décrire cette situation où une immunité à la réinfection apparaît en présence d'une infection active (Clegg et coll., 1971). Ce concept implique qu'il existe certaines communautés antigéniques entre le schistosome adulte et le schistosomule et que l'adulte vivant dans les vaisseaux sanguins stimule le système immunitaire de l'hôte via la libération de ses produits métaboliques de sécrétion.

De nombreux mécanismes effecteurs ont été caractérisés in vitro, chez l'homme et dans des modèles expérimentaux au cours de l'infection. On décrit à la fois une réponse spécifique humorale et cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation des cellules inflammatoires (Capron et coll., 1986; Sher et coll., 1989). La signification biologique de chaque élément immunitaire impliqué dans la résistance contre la réinfection dépend de l'espèce de l'hôte infecté et l'espèce parasitaire.

#### 5.2.1. La réponse humorale

La participation des Acs dans l'aquisition de l'immunité à la réinfection dans la schistosomiase a été suggérée par des nombreux travaux réalisés chez l'homme et dans différents modèles expérimentaux. Dans l'infection humaine, une corrélation positive entre l'acquisition d'immunité vis-à-vis de la réinfection et la réponse d'IgE spécifique des antigènes du schistosome a été rapportée par des nombreux travaux (Auriaul et coll., 1990; Dunne et coll., 1992; Hagan et coll., 1991; Rihet et coll., 1991). Cependant, cette immunité semble être modulée par les différents isotypes liés à la susceptibilité à la réinfection, comme les isotypes IgM, IgG2 et IgG4 ont été proposés (Khalife et coll., 1986; Butterworth et coll., 1987; Hagan et coll., 1991). Plus récemment, une association positive entre le taux d'Ac IgA spécifique de l'Ag Sm28 GST du S.mansoni et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été suggérée puis démontrée par Auriault et coll. (1990) et Grzych et coll. (1993).

Dans les modèles expérimentaux et plus particulièrement dans le modèle du rat, la participation active des Acs a été largement illustrée grâce aux expériences de transfert passif d'Acs polyclonaux ou monoclonaux de rat qui ont permis d'établir le rôle prépondérant des Acs de types anaphylactiques (IgE et IgG2a). Tout d'abord, le transfert des IgE spécifiques du schistosome protège l'animal vis-à-vis d'une infection d'épreuve

par le schistosome (Rousseaux-Prevost et coll., 1978). D'autre part, l'effet protecteur des sérums immuns de rat est aboli par déplétion sélective en Ac IgE ou IgG2a selon la période d'infection considérée (Capron et coll., 1979). Le rôle protecteur de ces Acs anaphylactiques a été aussi confirmé par le transfert passif des Acs monoclonaux spécifiques de *S.mansoni* d'isotype IgG2a ou IgE (Grzych et coll., 1982; Vewaerde et coll., 1987).

Parallèlement, de nombreuse études *in vitro* ont permis de caractériser les mécanismes d'action de ces différents Acs. Il apparaît que la cible principale de la réponse immune est le schistosomule. La coopération entre les Acs et différents types de cellules inflammatoires (macrophages, éosinophiles et plaquettes) conduit à la lyse de la larve parasitaire par les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'Ac aussi appelés mécanismes d'ADCC (Antibody dependent Cell Cytotoxycity). Suite à la première démonstration de ce type de mécanisme chez l'homme impliquant des éosinophiles (Butterworth et coll., 1974), des mécanismes similaires ont été rapportés ou décrits dans d'autres espèces animales (rat, babouin) et chez l'homme en présence de différentes cellules (Capron et coll., 1975; 1978; 1981; Joseph et coll., 1978; 1983). Globalement, la destruction du schistosomule dépend essentiellement du pontage réalisé par l'Ac (qui se fixe par son fragment Fab à la surface du parasite et par son fragment Fc sur son récepteur spécifique à la surface des cellules effectrices). Cette interaction déclenche la dégranulation des cellules qui libère des enzymes, des peroxydes et des radicaux libres à la surface du parasite et entraîne sa lyse.

L'utilisation de cellules et de fractions sériques purifiées provenant d'animaux immuns a permis d'évaluer la participation sélective de ces différents isotypes dans la cytotoxicité contre le schistosomule : ce sont essentiellement les IgE et les IgG chez l'homme et le primate (Joseph et coll., 1978; Capron et coll., 1984), les IgE et les IgG2a chez le rat (Capron M et coll., 1978). Dans ce dernier modèle, l'utilisation des Acs monoclonaux confirme le rôle des IgE et IgG2a (Grzych et coll., 1982; Verwaerde et coll., 1987).

In vitro la relevance des mécanismes a été confirmée par le transfert passif des cellules immunes : des éosinophiles (Capron et coll., 1984), des plaquettes (Joseph, et coll., 1983) ou des macrophages (Pestel et coll., 1986) protège les receveurs vis-à-vis d'une infection d'épreuve. Plus récemment, la participation des IgA dans les mécanismes d'ADCC a été démontrée par la déplétion sélective des IgA dans les sérums de rat immunisé ou la compétition des IgA nonspécifiques (Grezel et coll., 1993). La présence du récepteur de la pièce sécrétoire de l'IgA à la surface d'éosinophiles humains a été

récemment démontrée dans notre laboratoire, de plus la fixation des IgA sur leurs récepteurs entraîne la dégranulation cellulaire (Lamkhioued, 1995). Il existe par ailleurs une cytotoxicité due aux macrophages ou aux plaquettes activées par les lymphocytes T spécifiques, par le biais des cytokines (l'IL-6 et l'IFN-γ) (James et Sher,1990; Pancré et coll., 1990).

## 5.2.2. La réponse cellulaire

Il a été démontré qu'il existe deux sous-populations lymphocytaires T auxiliaires (T helper) CD4+, Th1 et Th2, caractérisées par leur production différentielle de cytokines: les cellules Th1 produisent de l' IL-2, de l'IFN-γ et de l'IL-12, alors que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Mosmann et coll., 1986; Cherwinski et coll., 1987; Fiorentino et coll., 1989). Des cellules Th0 ont été décrites par la suite comme des cellules précurseurs de Th1 et Th2, et produisent de l' IL-2, de l'IFN-γ et de l'IL-4 (Firestein et coll., 1989).

La schistosomiase murine a été utilisée pour étudier les mécanismes et les facteurs de polarisation impliqués dans la différenciation des cellules Th1 et Th2 à partir de cellules précurseurs communnes (Th0). L'infection par les cercaires suscite l'apparition d'une réponse cellulaire dominante de type Th1. Cependant, lors de la production d'oeufs par les schistosomes adultes, cette réponse est modifiée en faveur d'une réponse Th2 dominante (Gryzch et coll., 1991; Pearce et coll., 1991). Cet effet de polarisation peut aussi s'exercer à l'encontre d'Ag précédemment décrit comme inducteur d'une réponse de Th1 (Myoglobuline de cachalot) (Kullberg et coll., 1992). Cette inversion de réponse (type Th1 vers type Th2) est liée aux oligosaccharidiques et plus présisément aux structures de type Lewis X présents dans l'antigène des oeufs capables de stimuler la production d'IL-10, une cytokine inhibitrice de la prolifération des cellules Th1 (Velupillai et coll., 1994).

Un autre aspect de la réponse cellulaire dans la schistosomiase concerne la réponse granulomateuse qui représente la pathologie de cette infection. Les granulomes sont induits par les antigènes solubles de l'oeuf (SEA) sécrétés par le miracidium. La réponse inflammatoire est initiée par les cytokines produites par des cellules T helper CD4+, suivie par un recrutement cellulaire autour des oeufs (macrophages, éosinophiles et fibroblastes etc.). Les éosinophiles et les macrophages des granulomes, après activation par les Acs et les lymphocytes spécifiques détruisent les embryons en sécrétant des médiateurs toxiques,

conduisant à la lyse ultérieure de l'oeuf (Olds et coll., 1980).

La réaction granulomateuse suivie d'un développement de fibrose peut entraîner des conséquences graves chez les sujets infectés. Cependant le granulome peut aussi être bénéfique pour l'hôte : en séquestrant les toxines miracidiales, il évite le développement de sévères nécroses du parenchyme hépatique qui seraient dues à la diffusion des toxines sécrétées par le miracidium (Byram et coll., 1977; Phillips et coll., 1986; Amiri et coll., 1992). Des expériences suggèrent que chez la souris, il existe un mécanisme de modulation spontanée de l'ampleur de la réaction granulomateuse. En effet, l'intensité de la réaction granulomateuse induite par les oeufs pondus tardivement au cours de l'infection (phase chronique) est inférieure à celle induite par les premiers oeufs (phase aiguë). Cette modulation de la réponse est assurée par des cellules T CD4+, CD8+ et d'autres facteurs (Boros, 1994). Une meilleure connaissance des mécanismes de modulation pourrait aider à mieux contrôler cette réaction vers une réponse bénéfique pour le sujet infecté.

Chez la souris la participation des différentes cytokines dans la réaction granulomateuse a été envisagée par l'injection d'oeufs ou de SEA fixés sur des billes pour produire des granulomes synchronisés ou par l'injection d'Acs cytokines neutralisant l'effets des cytokines étudiées. Le tableau suivant montre les cytokines produites par les cellules du granulome.

MIF (macrophage migration inhibitory factor)	IFN-γ
IL-1	IFNα/β
IL-2	CSF-1
IL-4	TNF-α
IL-5	TGFβ
MIP-1α (macrophage inflammatory protein)	GM-CSF
D'après Boros (1994), Immunobiol. 191, 441-450.	

Parmi ces cytokines, certaines amplifient ou modulent la réaction inflammatoire, d'autres participent à la formation de fibrose.

Le rôle de l'IFN-γ dans les granulomes est double : il joue un rôle inducteur au début de la réaction granulomateuse; durant la maturation des granulomes, il régule la production inflammatoire d'IL-2 et IL-4 et contrôle ainsi l'expansion des granulomes et la fibrose tissulaire. L'IL-2 est nécessaire pour l'expression de la réponse Th2 ou tout au moins de certaines de ses composantes (Wynn et coll., 1993). L'IL-4 est impliquée dans la phase précoce de la réponse inflammatoire (Boros, 1994). L'IL-5 maintient le nombre d'éosinophiles dans la circulation et localement autour du granulome (Metwali et coll., 1993). Le TNF-α participe au recrutement cellulaire tardif et maintient la réponse granulomateuse (Chensue et coll., 1989). Dans les modèles de granulomes synchronisés, l'IL-12 est capable d'orienter ou inverser la réponse cellulaire vers le profil Th1 (Oswald et coll., 1994).

#### 6. Mécanismes d'échappement du parasite

L'immunité développée chez l'hôte infecté oblige les parasites à développer toute une série de mécanismes d'adaptation pour survivre. Dans le cas du schistosome, pour échapper à la réponse immune de l'hôte, trois mécanismes sont mis en place : remaniement des antigènes de surface, production des Acs bloquants et induction de l'immunosuppression de l'hôte.

#### 6. 1. Remaniement des antigènes de surface

Pour éviter les attaques du système immunitaire, les schistosomes se couvrent en surface avec des antigènes communs à leur l'hôte. Ces antigènes peuvent être acquis directement chez leur hôte. Certains, comme les antigènes du système sanguin ABO (Dean, 1974; Goldring et coll., 1976), les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (Sher et coll., 1978), l'alpha 2-macroglobuline (Damian et coll., 1973; Kemp et coll., 1977), des immunoglobulines (Torpier et coll., 1979), et la fibronectine (Ouaissi et coll., 1984) ont été identifiés chez *S.mansoni*. D'autres déterminants antigèniques communs à l'hôte pourraient également être synthétisés par les parasites. Parmi les antigènes clonés chez le schistosome, certains possèdent des homologies de séquences nucléotidiques importantes avec les gènes de mammifères, attribuables à la conservation fonctionnelle. Les protéines codées sont des immunogènes potentiels (Capron et coll., 1968, 1969, 1992).

En plus de remaniement d'antigènes de surface, au cours du développement du cycle, la structure du tégument du schistosome est modifiée pour mieux résister aux attaques diverses (Hockley et coll., 1973).

# 6.2. Les anticorps bloquants

Ce mécanisme a été démontré chez le rat grâce à la production d'Acs monoclonaux spécifiques d'une glycoprotéine (Gp38) qui se trouve à la surface du schistosomule (Grzych et coll., 1982). Des Acs spécifiques d'un même épitope et d'isotypes différents peuvent avoir des fonctions biologiques opposées. L'un de ces Acs d'isotype IgG2a est protecteur, puisqu'il est capable d'induire des mécanismes d'ADCC en présence d'éosinophiles et protège les animaux receveurs contre l'infection dans les expériences de transfert passif. L'autre Ac d'isotype IgG2c de même spécificité épitopique abolie les effets protecteurs de celui ci dans les expériences in vitro et in vivo (Grzych et coll., 1984). Ces observations sont à l'origine de l'identification d'Acs bloquants dans la schistosomiase humaine. La présence d'Acs dirigés contre des épitopes glycaniques de S.mansoni est corrélée avec la susceptilité à la réinfection chez les enfants. Les Acs bloquants d'isotypes IgM et IgG2 sont caractérisés chez les sujets susceptibles mais pas chez les sujets résistants (Khalife et coll., 1986; Butterworth et coll., 1987). Des observations réalisées séparément ont révéler l'existence d'un autre isotype bloquant, l'IgG4 associé à la susceptibilité à la réinfection (Hagan et coll., 1991; Rihet et coll., 1991). L'effet bloquant des IgG4 a été montré par des expériences d'ADCC dépendentes d'éosinophiles (Khalife et coll., 1989).

#### 6.3. Immunosuppression induite.

Des travaux ont montré que les schistosomes adultes libèrent un facteur appelé SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor) qui inhibe la dégranulation mastocytaire et la réponse IgE chez le rat, résultant en une diminution de l'activation des éosinophiles (Dessaint et coll., 1977). De plus, le SDIF inhibe *in vitro*, la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes parasitaires ou à la stimulation par l'interleukine-2 (Mazingue et coll., 1983 et 1986). Par ailleurs, les schistosomules peuvent lier les IgG à leur surface: ils sécrètent des protéases dont l'action sur les IgG donne un peptide inhibiteur de nombreuses fonctions macrophagiques et altère profondément les capacités cytotoxiques du macrophage sur le parasite (Auriault et coll., 1981; 1983a et b; 1985).

La libération active des neuropeptides par le schistosome comme l'adrénocorticotropine (ACTH), l'hormone de stimulation des mélanocytes (α-MSH) et la Bendorphine, a été démontrée récemment : Leur rôle d'immunosupresseur aussi bien sur les immunocytes de l'hôte intermédiaire (mollusque) que sur les monocytes de l'hôte vertébré a été également démontré (Duvaux-Miret et coll., 1992).

## 7. Diagnostic

Sur le terrain, le diagnostic se fait généralement à l'échelle collective, par exemple sur les enfants scolarisés dans les zones d'endémie. La recherche d'oeufs dans les selles ou les urines en constitue l'élément principal, mais l'absence d'oeufs ne permet pas d'éliminer le diagnostic de l'infection. C'est pourquoi, celui-ci reste basé sur des arguments cliniques et biologiques (symptomatologie et modification des constantes sanguines), des examens immunologiques tels que la recherche d'Acs (les antigènes les plus utilisés pour leur fiabilité sont dérivés de l'oeuf), la recherche d'antigènes circulants ou la recherche de complexes immuns. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) permet la détection des remaniements hépatiques ou vésicaux mais l'absence d'infrastructures locales et le coût élevé de ces techniques limitent leur usage.

#### 8. Lutte contre la schistosomiase

#### 8.1.Traitement

Il existe depuis quelques années plusieurs composés actifs sur les schistosomes qui permettent d'enrayer l'infestation. Le traitement fait également disparaître les lésions inflammatoires associées aux oeufs (Davis, 1986). Néanmoins, cette chimiothérapie ne permet pas de réparer les dommages accumulés (troubles circulatoires dûs aux lésions anciennes fibrosées) (Cheever et coll., 1989).

La découverte du praziquantel (PZQ) a révolutionné le traitement de la schistosomiase. Actif sur toutes les espèces de schistosomes, le PZQ tue rapidement les vers adultes en agissant directement sur la cuticule puis la musculature. Toutefois, *in vivo* son action dépend d'une réponse immunitaire préexistante vis-à-vis du parasite (Doenhoff et coll., 1987; Brindley et coll., 1990). Cette réponse immune est dirigée contre des antigènes démasquées par l'action du PZQ (Fallon et coll., 1992). Il agit aussi, à un moindre degré, sur les schistosomules et sur les oeufs en transit dans les tissus (Picot et coll., 1993).

Excellent schistosomicide, actif en prise unique et bien toléré, le PZQ est cependant d'un prix élevé, ce qui interdit son emploi en médecine de masse en zone endémique. De plus, il ne prévient pas les réinfections et diminue l'immunité acquise (Molohey et coll., 1987). Il peut, dans certains cas, aggraver le tableau clinique par la libération massive d'antigènes parasitaires et par l'apparition de complexes immuns. A côté de ces effets secondaires, la présence de schistosomes résistants aux drogues a déjà été rapportée (Cioli, et coll., 1993). Récemment, une étude réalisée démontre qu'il est possible d'induire une résistance au PZQ chez S.mansoni (Fallon et coll., 1994).

#### 8.2. Prophylaxie sanitaire

Basée sur l'interruption du cycle parasitaire, la prophylaxie sanitaire peut s'éxercer à deux niveaux : d'une part, elle cherche 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 et coll., 1992). D'autre part, elle vise à réduire la contamination des réservoirs d'eau par les excrétats humains et à diminuer la fréquence des contacts de l'hôte définitif avec le biotope infestant, en développant des programmes d'éducation pour l'utilisation de l'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.

#### 8.3. Prophylaxie médicale

Devant les difficultés à établir et à maintenir un programme de lutte efficace contre les schistosomiases, la démarche actuelle est essentiellement dirigée vers l'élaboration d'un vaccin. Cette vaccination doit permettre de réduire le niveau de ré-infection et la fécondité parasitaire. Cela conduirait à une diminution de la morbidité, des formes aiguës de la maladie et permettrait aussi un contrôle de la transmission.

Dans ce contexte, de nombreux antigènes recombinants ont été produits et leurs pouvoirs protecteurs ont été testés dans des modèles expérimentaux. Le chapitre qui suit aborde les antigènes protecteurs et les antigènes découverts récemment dans notre laboratoire.

B. Les antigènes à potentialité vaccinale

Au cours des 2 dernières décades, l'introduction des techniques des Acs monoclonaux et de la biologie moléculaire a contribué à la caractérisation de différents antigènes du schistosome à potentialité vaccinal. Le tableau 1 résume la nature, la localisation et le taux de protection induit par les antigènes sélectionnés comme les candidats vaccins contre la schistosomiase.

Tableau 1. Les candidats des vaccins contre la schistosomiase

Antigène	Taille	Localisation	Fonction	Protection (%)			Référence
	(kDa)			Souris	Rat	Autre	
Paramyosine (Sm97)	97	Schistosomule Vers adultes	Protéine du muscle	30	ND	ND	Pearce et coll., 1988.
IrV5	62	Tous stades	Protéine du muscle	50-70	95	25 (babouin)	Amory Soisson et coll.,1992
Triose-phosphate-							
isomérase (TPI)	28	Tous stades	Enzyme	30-60	ND	ND	Shoemaker et coll., 1992
							Reynolds et coll., 1994
Sm 23	23	Tous stades	Ag membranaire	40-50	ND	ND	Reynolds et coll., 1992
							Köster et coll., 1993
Protéine fixant des	14	Schistosomule	Ag membranaire	65	ND	90-100	Tendler et coll., 1996
acides gras (Sm14)						(lapin).	
Glutation-S-transférase	28	Tous stades	Enzyme	30-40	40-60	40-90	Balloul et coll., 1987c.
(Sm28 GST)						(babouin)	Boulanger et coll., 1991

ND. non déterminé

Ces antigènes ont été exprimés dans différents vecteurs (*Escherichia coli*, *Baculovirus* ou *Saccharomyces cerevisiae*). Les protéines recombinantes ont été sélectionnées par des sondes Acs poly- ou mono-spécifiques, certaines d'entre elles sont capables d'induire une cytotoxicité *in vitro* ou de conférer une protection par transfert passif. L'analyse des séquences d'ADN ou des séquences à partir d'acides aminés déduites en comparaison avec des molécules déjà connues a permis d'identifier leur nature.

#### 1. La paramyosine

La paramyosine est une protéine myofibrillaire qui se trouve exclusivement chez les invertébrés, y compris le schistosome (Butterworth, 1992). La paramyosine de *S.mansoni* est une protéine de 97 kDa (Sm97). Elle a été identifiée initialement par les sérums de souris vaccinées par voie intradermique par des schistosomules irradiés ou des préparations antigéniques de schistosome (Soluble Worm Antigen Preparation, SWAP) en présence de BCG. Ce protocole d'immunisation a été ensuite utilisé pour la production d'Acs monoclonaux. Trois Acs monoclonaux spécifiques de l'antigène Sm97 ont été obtenus puis utilisés pour la purification de Sm97 native à partir de la fraction SWAP. L'antigène Sm97 natif peut induire une hypersensibilité de type retardé chez la souris vaccinée par voie intradermique, suggérant que cet antigène est capable de provoquer une réponse cellulaire (Pearce et coll., 1986). L'ADN complémentaire codant pour une partie de l'antigène Sm97 a été cloné. L'analyse de la séquence d'acides aminés déduite a révélé une similarité avec la paramyosine de plusieurs espèces d'invertébrés (Lanar et coll., 1986).

La localisation de la paramyosine de *S.mansoni* a été réalisée par la technique d'immunofluorescence sur des coupes de vers adultes. L'Ac monoclonal dirigé contre Sm97 montre que la protéine se trouve dans le tégument et le parenchyme (Pearce et coll., 1986).

L'injection intradermique de la paramyosine native ou recombinante en présence de BCG confère une protection de 26 à 33% dans le modèle murin. Cette protection semble dépendre de mécanismes cellulaires, car le transfert passif d'Acs dirigés contre cette molécule ne protège pas les souris receveuses de la schistosomiase. D'autre part, les lymphocytes provenant des souris immunisées produisent en présence de schistosomules vivants de l'IFN-γ, qui est capable d'activer les macrophages pour tuer les schistosomules (Pearce et coll., 1988).

La présence d'Acs spécifiques de la paramyosine a été étudiée dans les sérums de patients vivants en zone endémique au Brésil. Chez les sujets ne présentant ni oeufs dans les selles, ni symptôme d'infection, mais étant séropositifs vis-à-vis du SWAP, le niveau d'Ac anti-paramyosine est beaucoup plus élevé que celui des sujets infectés (présentant des oeufs dans les selles). Après la chimiothérapie, le niveau d'Acs spécifiques de la paramyosine augmente et persiste chez les sujets chez lesquells on n'observe plus d'oeufs dans les selles. Par contre, chez les individus présentant toujours des oeufs dans les selles, le taux d'Acs anti-paramyosine diminue et atteint des valeurs voisines de celles enregistrées avant le traitement. Ces résultats suggèrent que chez l'homme, la réponse immune dirigée contre la paramyosine peut jouer un rôle dans la résistance contre la schistosomiase et qu'un niveau élevé d'Acs dirigés contre cet antigène est associé à un traitement efficace (Correa-Oliveira et coll., 1989).

Récemment, l'homologue de Sm97, la protéine Sj97 a été identifiée et caractérisée dans *S.japonicum*. La séquence nucléotidique de l'antigène Sj97 de la souche Philippine montre plus de 90% d'identité avec la Sm97 (Becker et coll., 1995). Chez la souris, jusqu'à 86% de protection ont été obtenus contre *S.japonicum* par vaccination avec la protéine Sj97 native en absence d'adjuvant (McManus et coll., 1993; Ramirez et coll., 1996). Bien que la paramyosine ait été identifiée comme une protéine du muscle, la Sj97 a été localisée dans les glandes de sécrétion cercariennes de *S.japonicum* par un Ac monoclonal spécifique de cette protéine (Nara et coll., 1994). Des hétérogénéités inter- et intra-espèces existent au niveau des séquences nucléotidiques codant pour la paramyosine de schistosome; celles-ci pourraient avoir des conséquences sur la réponse immune dirigée contre cette molécule (Hooker et coll., 1995). Plus récemment, la vaccination intramusculaire par l'ADN codant pour Sj97 a conduit à l'induction d'Acs spécifiques de cette molécule chez la souris, mais sans effet protecteur contre l'infection par *S.japonicum* (Yang et coll., 1995).

#### 2. L'antigène IrV5

L'antigène rIrV5 est une protéine recombinante de 62 kDa. Il a été exprimé à partir d'une banque d'ADN de *S.mansoni* et sélectionné par le sérum de souris vaccinées par des cercaires irradiées (Amory Soisson et coll., 1992). Cette protéine partage des séquences d'acides aminés homologues à celles des myosines humaines et d'autres espèces. Trois injections successives de rIrV5 en présence d'adjuvant OMP (Out Membrane Protein of meningococci) confèrent une protection de 60% à 80% au niveau de

la charge vermineuse chez la souris. Le même niveau de protection a été obtenu avec la même dose d'rIrV5 sans adjuvant. Dans la même expérience, le groupe ayant reçu deux injections de la même préparation a montré une protection de 14,7% seulement, bien que le niveau d'Acs soit identique à celui du groupe ayant reçu trois injections. Cela suggère que d'autres facteurs peuvent jouer un rôle prophylactique : par exemple l'isotype des Acs ou l'intervention des réponses cellulaires (Amory Soisson et coll., 1992).

Les sérums de souris immunisées par rIrV5 ou l'Ac monoclonal dirigé contre cette molécule reconnaissent une protéine de 200 kDa du schistosome (Tom et coll., 1987). Cette protéine native de 200 kDa se trouve à la surface des schistosomules du poumon et des schistosomules nouvellement transformés (Amory Soisson et coll., 1992).

#### 3. L'antigène Sm23

L'antigène Sm23 a été initialement rapporté comme étant la cible d'un Ac monoclonal (M.2) se fixant à la surface des schistosomules de poumon. Cet Ac protège les souris contre l'infection expérimentale par le schistosome après le transfert passif (Harn et coll., 1987). L'antigène Sm23 a été détecté à la surface des cercaires, des schistosomules et exprimé dans tous les stades parasitaires (Harn et coll., 1985b). Les expériences de vaccination par l'antigène Sm23 natif purifié ont donné des résultats encourageants (40-50% de réduction sur la charge vermineuse chez la souris) (Harn et coll., 1987) (Reynold et coll., 1992).

La structure primaire de l'antigène Sm23 a été déduite d'un clone d'ADN. La molécule contient 218 acides aminés, est constituée de quatre régions hydrophobes et transmembranaires dont trois se trouvent en position N-terminale et de deux domaines hydrophiles présumés être la partie extracellulaire qui se situe en position C-terminal de la molécule devant la quatrième région hydrophobe (Wright et coll., 1990). Une grande similarité existe entre l'antigène Sm23 et une famille de protéines membranaires de type III exprimées dans les cellules hématopoïétiques et / ou les cellules tumorales humaines et la plupart d'entre elles sont glycosylées (Horejsi et Vlcek, 1991).

Des tests sérologiques montrent que l'antigène Sm23 est reconnu par les sérums de souris vaccinées par les cercaires irradiées (Dalton et coll., 1987; Oligino et coll., 1988). Il est reconnu également par les sérums de souris (Dalton et coll., 1987; Reynold et coll., 1992), de lapin (Wright et coll., 1991b) et d'homme infectés (Köster et coll., 1993). La cible des sérums se trouve dans le domaine hydrophile localisé dans la partie C-terminale de la molécule (Köster et coll., 1993). Une étude réalisée avec des peptides synthétiques

montre qu'il existe plusieurs épitopes B et au moins 4 épitopes T dans ce domaine. Les épitopes B semblent être conformationnels (Reynold et coll., 1992). Du fait de la nature hydrophobe de la molécule, aucun système d'expression n'a permis l'obtention en quantité suffisante de la molécule Sm23 pour la réalisation d'une étude vaccinale. Il a été suggéré qu'un peptide contenant le domaine hydrophile pourrait être utilisé à la place d'une protéine entière dans les études de vaccination (Köster et coll., 1993).

L'homologue de l'antigène Sm23 dans *S.japonicum* (Sj23) a été caractérisé. Il présente 84% d'identité avec l'antigène Sm23 sur la base de la séquence d'acides aminés et possède la même structure (Wright et coll., 1991b). La Sj23 a plutôt une importance diagnostic puisque 90% des patients infectés par *S.japonicum* produisent des Acs dirigés contre cette molécule.

Le domaine hydrophile de l'antigène Sm23 est immunogène. Il contient des épitopes B reconnus par les sérums de lapins exposés aux cercaires de *S.mansoni* et présentant une résistance contre la réinfection. Un Ac dirigé contre ce domaine de la protéine recombinante ne reconnait pas la Sj23. La structure déduite de ces deux molécules indique que chez un sujet infecté, la plupart des domaines de ces molécules exposées au système immunitaire de l'hôte existe dans cette zone. La comparaison des séquences d'acides aminés montre qu'une grande divergence existe dans le domaine hydrophile des deux molécules (Wright et coll., 1991b). Ceci explique l'absence de réaction croisée entre ces deux molécules.

#### 4. L'antigène Sm14

L'antigène Sm14 possède des homologies significatives avec une famille de protéines fixant les acides gras (Fatty Acid Binding Protein, FABP). Cette famille de protéines intervient dans la liaison, le transport et le métabolisme des lipides (Glatz et van de Vuss, 1990; Peeters et Veekamp, 1989; Kaikaus et coll.,1990). Les schistosomes sont incapables de synthétiser les acides gras de novo et les stérols (Meyer et coll., 1970). Il semble que les acides gras des schistosomes proviennent de leur hôte et sont acquis, transportés et compartimentalisés par les FABPs (Glatz et Van der Vusse 1990; Ockner 1990). De plus, il a été démontré que les schistosomes libèrent des dérivés d'acides gras qui peuvent jouer un rôle important dans la défense du parasite contre les attaques immunes de leur hôte (Furlong et Caulfield 1989). Les FABPs du schistosome pourraient être utilisées pour l'élaboration d'un vaccin ou comme cible de différents médicaments contre le schistosome (Moser et coll., 1991; Becket et coll., 1994).

La protéine Sm14 recombinante purifiée montre une affinité pour les acides gras. Cette protéine a été localisée, par la technique d'immunofluorescence, dans les tubercules qui contiennent des lipides et qui se trouvent sur la partie dorsale des vers adultes. Elle est aussi détectée entre les couches de muscles dans le parenchyme. Ces observations suggèrent que la protéine Sm14 pourrait jouer un rôle dans le transport des acides gras (Moser et coll., 1991). L'immunisation par l'antigène Sm14 recombinant a conféré dans le modèle murin une protection de 65% contre l'infection d'épreuve par S.mansoni et de 100% vis-à-vis de l'infection par Fasciola hepatica (Tendler, 1996).

Plus récemment, une protéine recombinante de la famille FABP, la Sj-FABPc a été identifiée, caractérisée et purifiée à partir d'une banque d'ADN de *S.japonicum*. Cette protéine a un poids moléculaire de 14,7 kDa et montre 91% d'identité avec l'antigène Sm14. La Sj-FABPc est reconnue par les sérums de patients infectés par *S.japonicum* en phases aiguë et chronique, et est capable de fixer les acides gras avec une forte affinité (Becker et coll., 1994).

#### 5. La Triose-Phosphate-Isomérase (TPI)

La TPI est une protéine de 28 kDa synthétisée à tous les stades du parasite. Elle est exprimée transitoirement à la surface des jeunes schistosomules (0 à 4h) et est présente dans tous les tissus y compris le tégument (Harn et coll., 1985a et 1992). L'Ac monoclonal M.1 spécifique de cette protéine confère une protection partielle (41% à 49%) dans les expériences de transfert passif chez la souris. L'analyse des séquences d'acides aminés montre une grande homologie (79% à 87%) avec la TPI des mammifères. L'antigène natif purifié par l'Ac monoclonal (M.1) a montré une fonction enzymatique comparable à celle observée pour les TPIs de mammifères et levures (Harn et coll., 1992). La protéine recombinante complète a été produite dans E. coli. L'étude de la protéine recombinante a confirmé ses propriétés immunologiques et sont identité avec la TPI. Elle est reconnue par l'Ac monoclonal spécifique de la TPI native. L'homologie avec la TPI d'autres espèces est plus marquée dans les régions qui forment le site catalytique de l'enzyme (Shoemaker et coll., 1992). L'activité spécifique intrinsèque de la TPI de S.mansoni est comparable à celle du lapin et de la levure. Au point de vue immunologique, cet antigène est caractérisé par sa capacité à induire sélectivement et à maintenir une réponse cellulaire de type Th1 (Reynolds et coll., 1994).

Il reste cependant à démontrer que la vaccination avec une protéine entière du parasite,

qui partage une homologie significative avec les TPIs de l'hôte, n'induit pas de réponse autoimmune. Une approche alternative qui éliminerait ce problème serait de déterminer les épitopes T et B, dérivés des régions non-conservées de la molécule, et de construire ensuite un vaccin à partir des peptides synthétisés. Une série d'épitopes provenant des régions non conservées de la TPI de *S.mansoni* a été sélectionnée et des peptides multi-antigéniques (Multiple Antigenic Peptide, MAP) ont été synthétisés et testés ensuite dans plusieurs souches de souris. Parmi les molécules synthétisées, celles contenant des épitopes T et B sont immunogènes chez les souris saines et sont capables d'induire des reconnaissances croisées avec la TPI native en terme de production des cytokines IL-2 et IFN-γ (Reynolds et coll., 1994).

#### 6. La Sm28 GST

C'est une molécule de 28 kDa qui possède une forte homologie avec la famille des glutathion S-transférases, enzymes très répandues chez les eukaryotes (Taylor et coll., 1988). La Sm28 GST a été clonée sur la base de sa potentialité protectrice et de sa nature holoprotéique. La production de la Sm28 GST a été réalisée par les voies du génie génétique dans une bactérie (Escherichia coli), une levure (Saccharomyces cerevisiae), et le virus de la vaccine (Balloul et coll., 1987b).

#### 6.1. Pouvoir protecteur contre la Schistosomiase.

Les potentialités protectrices de la Sm28 GST ont été initialement évaluées par des expériences in vitro. En présence d'éosinophiles de rat normaux, les Acs dirigés contre la Sm28 GST sont capables d'induire une cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules (plus de 70%) (Balloul et coll., 1985). La protéine de 28 kDa native purifiée à partir de vers adultes de S.mansoni a conféré une protection de 70% chez le rat et de 45% chez la souris vis-à-vis d'une infection d'épreuve par S.mansoni (Balloul et coll., 1987c). La molécule recombinante a montré une activité catalytique vis-à-vis de divers substrats de GSTs et reproduit chez les rongeurs les résultats de protection obtenus avec la forme native (Balloul et coll., 1987b; c). L'immunisation par la Sm28 GST entraîne une réduction de 50% de la charge parasitaire chez le rat, la souris et le hamster (Balloul et coll., 1987 a et b). D'autre part, elle contribue d'une façon significative à la diminution du volume du granulome, à la réduction de la fécondité des femelles et de l'excrétion des oeufs chez les rongeurs et les primates immunisés (Boulanger et coll., 1991). Ceci a démontré ses

propriétés immunoprotectrices et par conséquent son rôle potentiel dans la vaccination.

Chez le singe Patas l'immunisation par Sm28 GST contre une infection héterologue par S.haematobium, a donné des résultats très intéressants : une réduction significative des oeufs excrétés dans les urines et les selles de 55% et 77% respectivement a été enregistrée bien qu'aucune réduction de la charge parasitaire n'ait été observée par rapport aux groupes témoins. De plus, la viabilité des oeufs urinaires est significativement affectée par la vaccination. Il existe une bonne corrélation entre les lésions de la vessie et les données parasitologiques (Boulanger et coll., 1995).

La protection conférée par l'immunisation par Sm28 GST dans des modèles expérimentaux se manifeste par deux aspects : la réduction de la charge parasitaire et / ou l'inhibition de la fertilité du parasite.

Pour étudier les mécanismes d'inhibition sur la fertilité du parasite, deux Acs monoclonaux d'isotype IgM et dirigés contre la Sm28 GST ont été produits. L'un de ces deux Acs possède une fonction d'inhibition sur l'activité catalytique de la Sm28 GST. Le transfert passif chez la souris BALB/c de ces Acs, montre que l'inhibition de l'activité enzymatique de la GST est nécessaire pour la réduction de la ponte des vers femelles et de la viabilité des oeufs (Xu et coll., 1991). De plus, cette réduction n'est pas systématiquement corrélée à la réduction de la charge parasitaire, pendant les essais de vaccination (Xu et coll., 1993).

Les propriétés protectrices des peptides dérivés de la Sm28 GST, ont été étudiées chez la souris. La vaccination par un peptide recombinant contenant des motifs répétés de l'épitope T et B de Sm28 GST (115-131) a donné une réduction de 40-50% au niveau de la charge parasitaire (Wolowczuk et coll., 1991). L'immunisation par les peptides N-terminal (10-43) et C-terminal (190-211) de la molécule (séquences reliées au site d'activité enzymatique de la molécule), conduit à une réduction de la ponte et de la viabilité des oeufs du parasite (Xu et coll., 1993), mais sans effet sur la charge parasitaire.

L'effet protecteur de la Sm28 GST dans l'infection par le schistosome se manifeste aussi par la réduction de la pathologie hépatique (Boulanger et coll., 1991). Cette réduction a été reproduite par l'injection du peptide C-terminal (190-211) de la molécule chez la souris. L'étude sur les mécanismes de protection montre que les cellules T spécifiques du peptide, essentielles pour la protection, produisent peu d'IL-4 mais un niveau élévé d'IFN, ce qui indique que l'IFN serait un inhibiteur potentiel de la synthèse du collagène qui, rappelons le, est un des composants importants du granulome (Pancré et

coll., 1994a; b).

La démonstration des potentialités vaccinales de la Sm28 GST dans différents modèles expérimentaux a conduit à la caractérisation des GSTs chez d'autres espèces de schistosome. La présence de deux molécules à activité GST mais de poids moléculaire distinct (26 et 28 kDa) a été mise en evidence dans 3 espèces majeures rencontrées chez l'homme: S.mansoni (Taylor et coll., 1988; Trottein et coll., 1989), S.haematobium (Gorillot, 1990), S.japonicum (Smith et coll., 1986) et dans S.bovis, parasite majeur du bétail africain (Balloul et coll., 1987b). Leurs propriétés protectrices ont été ensuite étudiées.

Les travaux réalisés avec la Sb28 GST de Schistosoma bovis, montrent que malgré l'absence d'une diminution effective de la charge parasitaire chez le bétail, l'excrétion des oeufs et leur densité tissulaire sont réduites (Bushara et coll., 1993). Des expériences plus récentes chez les chèvres immunisées par la Sb28 GST et infectées par S.bovis ont donné une réduction de la charge parasitaire de 45%, en même temps qu'une amélioration de l'état général (gain de poids de 1,4 kg) par rapport aux animaux témoins (perte de poids de 1,2 kg) (Boulanger et coll., 1994). Le tableau 2, regroupe une liste des hôtes chez lesquels un taux de protection significatif a été obtenu suite à l'immunisation par les GSTs de 28 kDa.

Tableau 2. L'effet protecteur des GSTs du schistosome

Schistosom	es GST	Antigène	Hôte	Protection (%)	Effet sur la fécondité	Références
S.mansoni	28	Native	Rat	50-72		Balloul et coll., 1987a
	28	Native	Souris	40-43		Balloul et coll., 1987a
	28	Clonée	Babouin	38	Oui	Boulanger et coll., 1991
	28	Clonée	Souris	27-36	Oui	Boulanger et coll., 1991
	28	Clonée	Rat	67		Balloul et coll., 1987b
	28	Clonée	Hamster	52		Balloul et coll., 1987b
	28	Peptide T-epitopic	Souris	40-50	Oui	Wolowczuk et coll.,1991
	28	Peptide C-terminal	Souris	40	Oui	Xu et coll., 1993
	28	Peptide N-terminal	Souris	20	Oui	Xu et coll., 1993
<u>S.japonicum</u> 26		Protéine de Fusion	Souris (WEH1 129/J)	30		Mitchell et coll., 1988
	26	Protéine Fusion	Souris(BALB/c) Non			Mitchell et coll., 1988
S.bovis	28, 26	Native	Bovin	Non	Oui	Bushara et coll., 1993
	28	recombinante	Chèvre	48	Non	Boulanger et coll.,1994
S.baematobium <sub>28</sub>		recombinante	Singe	Non	Oui	Boulanger et coll.,
						communication personnell

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>Protection en terme de réduction de la charge parasitaire.

#### 6.2. Les fonctions biologiques des GSTs

Jusqu'à présent les fonctions des GSTs de schistosome n'ont pas été totalement élucidées. La plupart des études dans ce domaine se base sur les connaissances obtenues à partir des GSTs de mammifères et des GSTs d'helminthes.

Durant leur cycle de vie les schistosomes, comme les mammifères, sont au contact d'une variété de molécules toxiques. Ces molécules peuvent être des métabolites secondaires, qui dérivent du métabolisme intermédiaire. Elles peuvent aussi dériver des polluants de l'environnement, de la réponse immunitaire de l'hôte et des drogues antiparasitaires. Chez les mammifères, l'activité de défense contre les composés toxiques est prédominante dans le foie. Ce processus de défense est orchestré par un groupe d'enzymes oxydantes. La plupart de ces réactions d'oxydation sont dépendantes de l'activité du complexe cytochrome P-450. Ce complexe joue le rôle d'une oxydase terminale qui accepte les électrons du NADPH et du cytochrome b5. Cependant, les schistosomes semblent dépourvus de réaction de détoxification cytochrome P-450 ou b5 dépendante (Precious et Barrett., 1989) et les GSTs représenteraient le système majeur de détoxification. Des activités enzymatiques GSTs ont été détectées dans de nombreux helminthes. Leur taux apparaît plus élevé chez les parasites à tégument d'origine cytoplasmique (Trématodes et Cestodes) que dans les espèces à tégument cuticulaire (Nématodes) (Brophy et Barrett., 1990a).

#### a) La détoxification des xénobiotiques

La résistance médicamenteuse de cellules tumorales de mammifères, d'insectes et de plantes a été associée à l'activité GST. En ce qui concerne les schistosomes, les GSTs peuvent également constituer un élément majeur de la résistance aux drogues. Brophy et coll. (1990a, 1990b et 1990c) rapportent que les GSTs de cestodes et de trématodes sont capables de fixer différentes drogues anti-helminthiques dont elles assurent l'excrétion. Certaines GSTs de S.mansoni sont capables de métaboliser le dichlorvos, qui est la forme active du composé anti-schistosome : le métrifonate. De plus, cette activité catalytique a aussi lieu in vivo (O'Leary et Tracy, 1991). Une autre étude a relaté des phénomènes d'induction différentielle des isoenzymes GSTs in vitro chez S.mansoni après traitement de souris infectées par le 3-méthylcholanthrène hydroxyanisole butylé et le phénobarbital (Van de Waa et coll., 1993).

Cependant, les GSTs, en se liant aux anti-helminthiques, peuvent également potentialiser les effets du médicament en facilitant son transport intracellulaire et entraîner la formation d'un conjugué inhibant l'activité GST. Par contre, un site de fixation pour le Praziquantel a été retrouvé sur la GST de 26 kDa de S.japonicum, suggérant un rôle potentiel des GSTs dans la résistance des parasites à ce médicament (Mc Tigue et coll., 1995).

#### b) Détoxification des peroxydes lipidiques

Les GSTs des trématodes et des cestodes sont capables de réduire les fonctions peroxydes (sauf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) via une activité glutathion peroxydase (Taylor et coll., 1988). Dans ce cas, l'interaction entre la GST et le ROOH conduit à un composé intermédiaire, le GS-OH. Ce n'est que si une seconde molécule de glutathion (GSH) intervient que la réaction est complète (Burk et coll., 1978; Prohaska, 1980). Ainsi nous avons :

Les GSTs sont également capables d'éliminer les dérivés aldéhydiques issus de la peroxydation lipidique par conjugaison (Brophy et coll., 1990a). Les nématodes privilégient d'avantage l'activité glutathion réductase en utilisant le NADPH.

#### c) Protection de l'ADN

Ces enzymes peuvent aussi assurer la détoxification des produits endogènes, cytotoxiques ou génotoxiques, issus de la peroxydation des lipides et des acides nucléiques (Danielson et coll., 1987; Tan et coll., 1984). La localisation nucléaire de certaines isoformes de GSTs, témoigne en faveur de l'existence de cette activité. En effet, certains travaux rapportent la participation de ces isoenzymes dans les réactions en cascade visant à la réparation de l'ADN, lors de la formation des hydroperoxydes de thymidine (Ketterer et coll., 1987). Ces enzymes sont aussi capables de synthétiser des substances physiologiquement actives, par suite de leur conjugaison avec le GSH (Hammarstrome et coll., 1979).

#### d) La fonction de liaison

La capacité des GSTs de fixer des ligands hydrophobes (hématine, acides gras insaturés, pigments biliaires...) pourrait faciliter leur détoxification passive par transport. On a qualifié cette fonction d' "éponges biochimiques". L'interaction de la Sm28 GST et de la Sj26GST avec l'hématine supporte l'évidence rapportée récemment à propos de leur implication dans la détoxification de ce composé. En effet, ces deux molécules sont capables de s'y fixer passivement afin d'éviter sa cristallisation qui risque de bloquer la circulation sanguine au niveau des veines (Smith et coll., 1986). Un rôle similaire a été proposé pour les GSTs de *F. hepatica* (Brophy et coll., 1990d). Il est à noter cependant que certains auteurs attribuent à cette fonction de liaison un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire en permettant la rétention de ligands lipophiles non toxiques (Brophy et coll., 1990c).

#### e) Les mécanismes d'action

L'activité des GSTs peut se mesurer par spectrophotométrie, la conjugaison du GSH s'accompagnant d'un changement de densité optique mesurable. Toutes les GSTs utilisent le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) comme substrat. Toutefois, en fonction de leur spécificité ces enzymes peuvent utiliser d'autres substrats qui sont soumis à trois types de réactions :

\* La conjugaison du GSH:

$$GSH + R+X- \cdots > R-GS + HX.$$

\* La réduction de la fonction hydroperoxyde.

La première étape de cette réaction consiste en la réduction du groupement R-OOH, résultant de l'attaque nucléophile du GSH sur le groupement hydroperoxyde pour donner un alcool (R-OH) et un intermédiaire réactionnel GS-OH. Ce dernier subit une deuxième attaque nucléophile par une autre molécule de GSH et le produit final observé est le glutathion oxydé, GSSG. Ce type particulier de réaction est qualifié d'activité GSH peroxydase sélénium-indépendante.

\* L'isomérisation par déplacement d'une double liaison.

$$R1-C-C=C-R2-\cdots$$
  $R1-C=C-C-R2$ .

La catalyse de cette réaction semble être GSH dépendante, mais elle se déroule sans consommation de GSH.

#### 6.3. Les GSTs du schistosome et les isoenzymes de Sm28 GST

Chez les mammifères, les GSTs appartiennent à deux catégories distinctes et génétiquement non apparentées : les GSTs microsomales et les GSTs cytosoliques. Ces deux familles d'enzymes diffèrent au niveau des réactifs d'activation, de la distribution cellulaire, de l'inducibilité par des xénobiotiques, du poids moléculaire et la dépendance aux détergents pour leur activité (Morgenstern et coll., 1983; 1988).

L'activité GST microsomale est très faible chez les helminthes et la majorité des travaux a été concentrée sur les GSTs cytosoliques. Les GSTs ont été purifiées par chromatographie sur des colonnes de GSH à partir d'extraits protéiques de schistosomes. En effet, les schistosomes possèdent deux formes de GSTs, dont le poids moléculaire est de 26 et 28 kDa (Smith et coll., 1986; Balloul et coll., 1987a; Trottein et coll., 1989 et 1992; Wright et coll., 1991a). Les GSTs 28kDa ont été clonées dans quatre espèces de schistosomes: S.mansoni (Sm28 GST), S.japonicum (Sj28GST), S.haematobium (Sh28GST) et S.bovis (Sb28GST). L'analyse des séquences d'acides aminés a permis la comparaison entre les différentes formes de GSTs chez plusieurs espèces de schistosomes. Elle montre 75% de résidus conservés pour les GSTs de 28 kDa dans les 4 espèces de schistosomes. L'homologie entre Sb28 GST et Sm28 GST est de 90%, et celle entre Sh28GST et Sb28GST de 98,1%, ce qui indique une très bonne conservation de ces 3 protéines dans les espèces considérées (Trottein et coll., 1992). Par contre, l'homologie de la Sj28 GST par rapport à ces trois GSTs est nettement inférieure (77%). En ce qui concerne les GSTs de 26 kDa, 79% d'homologie existent entre S.mansoni et S. japonicum (Henkle et coll., 1990b). L'homologie de séquence entre les formes de 28 et de 26 kDa n'est pas très significative.

La Sm28 GST recombinante possède une activité enzymatique caractéristique des GSTs de classe  $\pi$  et des homologies de structure dispersées avec les classes  $\alpha$  et  $\mu$ . Ces homologies de structure existent aussi pour la Sj28 GST. Cependant, aucune réaction immunologique croisée n'a été observée entre ces protéines parasitaires et les GSTs

correspondantes chez le rat et chez l'homme (Taylor et coll., 1988). De plus, des études biochimiques réalisées sur la *Sm28 GST* native, en présence d'autres marqueurs de GSTs, ne permettent pas de classer cette enzyme parmi les GSTs de mammifères (O'Leary et Tracy, 1991).

S.mansoni exprime trois formes de Sm28 GST, SmGST1, SmGST2 et SmGST3 (O'Leary et coll., 1988; Pierce et coll., 1994). SmGST1 et SmGST3 se présentent sous forme homodimérique (1/1 ou 3/3) alors que SmGST2 se présente sous forme hétérodimérique (3/1). Ces trois formes montrent une réactivité immunologique croisée et leurs propriétés biochimiques sont similaires mais bien distinctes (O'Leary et coll., 1992).

#### 6.4. Les sites d'expression

L'activité des GSTs peut augmenter au cours du développement et d'une façon différentielle, en fonction des sexes. L'augmentation de cette activité enzymatique, en fonction des stades de développement, a été observée chez les schistosomes (Nare et coll., 1990). La quantité de GST est trois fois plus importante chez les mâles que chez les femelles (O'Leary et Tracy., 1991). Ces différences d'activité enzymatique peuvent être liées à la localisation des parasites chez l'hôte et à l'environnement biologique immédiat de ces organismes. La variété des toxines externes rencontrées, ainsi que la nature et l'importance des mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte, peuvent modifier de façon importante cette activité catalytique (Brophy et Pritchard., 1994). Les travaux récents de Van de Waa et coll. (1993), rapportent que l'expression de la Sm28 GST peut être induite par les xénobiotiques, chez les souris infestées par S.mansoni.

Chez les schistosomes, tous les stades expriment une activité GST (Brophy et Barrett., 1990a). Les travaux de Balloul et coll. (1987a) montrent que chez *S.mansoni*, la Sm28 GST est exportée à la surface des schistosomules et des vers adultes. D'autres études immunologiques ont mis en évidence la présence de la Sj26 GST dans des sérums d'individus infectés par *S.japonicum*. Ces mêmes travaux rapportent que la Sj26 GST est probablement complexée à des molécules contenant la phosphorylcholine (Davern et coll., 1990). Des expériences d'immunocytochimie, chez *S.mansoni*, montrent que la Sm26GST et la Sm28 GST sont localisées dans le tégument et/ou dans les tissus subtégumentaux (Taylor et coll., 1988; Trottein et coll., 1989). Paradoxalement, d'autres travaux se rapportant à ce cadre d'étude avaient auparavant rapporté l'absence de GSTs dans le tégument des schistosomes (Holy et coll., 1989). Les travaux de Porchet et coll. (1994) ont montré que la Sm28 GST est exprimée au niveau des organes génitaux de vers

adultes, mais le type de cellules dans les testicules qui expriment la Sm28 GST n'a pas été précisé et la présence de cette protéine au niveau du tégument n'a pas été retrouvée.

# 6.5. La régulation de l'expression du gène codant pour GST du schistosome

Ces études ont été developpées récemment dans notre laboratoire par l'analyse du gène de la Sm28 GST. Le séquençage du gène qui code pour la Sm28 GST a révélé la présence de séquences consensus dans la région non codante, qui pourraient jouer un rôle dans sa transcription (McNair et coll., 1993). Parmi celles-ci, des séquences nucléotidiques CCAAT (Y1, nt -126 à -121; Y2, nt-145 à -140 et Y3, nt -77 à -72) impliquées dans l'activation de la transcription des gènes des eucaryotes (Bucher, 1990; Raymond et coll., 1988) et une séquence consensus AP-1 (nt -1051 à -1045 et nt -231 à -225) qui est un élément de réponse à l'induction par les xénobiotiques (Van de Waa et coll., 1993; Bergelson et coll., 1994) ont été identifiées. Cette révélation indique la possibilité de l'existence de protéines nucléaires chez le parasite capables de reconnaître ces sites. En effet, par la technique de retard sur gel, il a été démontré qu'un extrait de protéines nucléaires de S. mansoni est capable de se lier à ces deux séquences nucléotidiques. Ces résultats ont conduit à la caractérisation des protéines nucléaires de S.mansoni capables de reconnaître ces deux séquences (Zemzoumi et coll., 1995). L'étude du facteur qui reconnaît la séquence CCAAT est la plus avancée. Une sous-unité A du facteur NF-Y a été clonée à partir d'une banque d'ADN de S.mansoni adulte et ensuite séquencée. L'analyse des séquences nucléotidiques a révélé l'existence d'une région bien conservée par rapport aux NF-YA d'autres espèces. Les séquences homologues sont retrouvées surtout dans la région conservée proche de l'extrèmité C de la molécule. Dans cette région, le facteur NF-YA du schistosome (SmNF-YA) présente 87% d'homologie avec la sous-unité NF-YA des mammifères. Ce même domaine de la protéine SmNF-YA montre 73% d'homologie de séquence avec la sous-unité de la protéine correspondante (HAP-2) chez les levures (Zemzoumi et coll., 1996).

Le facteur NF-Y est un facteur ubiquitaire composé de deux sous-unités A et B, chacune de ces deux sous-unités pouvant fixer directement les séquences d'ADN, mais aucune d'entre elles n'étant capable à elle seule de s'y lier d'une manière stable (Hooft van Huijsduijnen et coll., 1987; Hatamochi et coll., 1988). L'association du facteur NF-Y avec l'ADN nécessite l'intégrité du pentanucléotide CCAAT. Le facteur NF-Y reconnaît le site CCAAT au niveau de plusieurs promoteurs : albumine (Raymondjean et coll., 1988),

globines (Barberis et coll., 1987; Mantovani et coll., 1989; Kim et Sheffery, 1990), β-actine (Quitschke et coll., 1989), α-collagène (Hatamochi et coll., 1988) et l'interleukine 4 (Szabo et coll., 1993). Chez les schistosomes la présence de sites CCAAT a été décrite au niveau du promoteur des gènes qui codent pour la protéine HSP70 de *S.mansoni* (Neumann et coll., 1992), des protéines de la coquille de l'oeuf du schistosome (Henkle et coll., 1990a) et au niveau du promoteur de la calréticuline (Khalife et coll., 1993b).

Les facteurs NF-Y de mammifères peuvent s'associer et se dimériser avec les facteurs correspondants chez la levure (Chodosh et coll., 1988) et une propriété similaire a été démontrée pour le facteur SmNF-YA. Il est capable de s'associer avec les sous-unités du facteur correspondant de souris (NF-YB et C) en l'absence d'ADN. Il a donc été conclu que le domaine conservé dans la protéine SmNF-YA est fonctionnel, du moins pour l'interaction avec les autres sous-unités. Il a été ensuite démontré que le complexe hétérologue SmNF-YA/NF-YB ou C est capable de reconnaître spécifiquement le pentanucléotide CCAAT localisé au niveau du promoteur du gène Sm28 GST(Zemzoumi et coll., 1996).

A la lumière de ces résultats, il a été supposé que le facteur SmNF-Y joue un rôle dans la transcription du gène Sm28 GST bien que l'on ne connaisse toujours pas les modalités de son action ainsi que son rôle chez *S.mansoni*.

Paralellèment à ces antigènes, dans le but d'élaboration d'un vaccin efficace contre la schistosomiase, d'autres molécules de *S.mansoni* ont été récemment clonées dans notre laboratoire et font l'objet d'étude de leur potentialité dans la stratégie contre les schistosomiases.

#### 7. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GSHpx) forment une superfamille de protéines enzymatiques impliquées dans différents processus biologiques et dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs.

## 7.1. La phospholipide glutathion peroxydase du schistosome

La glutathion peroxydase de *S.mansoni* a été caractérisée dans notre laboratoire par Williams et coll. (1992). La comparaison des séquences des gènes a révélé 55% d'identité avec la PHGSHpx de porc (Brigélius-Flohé et coll., 1994). Un Ac dirigé contre un

peptide synthétique correspondant à l'extrémité C-terminale de SmPHGSHpx a été produit chez le lapin. Cet Ac reconnaît une protéine de 20 kDa présente dans une fraction purifiée à partir de SWAP de *S.mansoni* possédant une activité PHGSHpx. Cette même fraction a été reconnue par l'Ac dirigé contre la PHGSHpx de porc. Les séquences des peptides générées par la digestion de la PHGSHpx native de *S.mansoni* par la trypsine montre une identité complète avec la séquence protéique codée par l'ADN cloné (Maiorino et coll., 1996). De plus l'analyse de la protéine native a démontré la présence d'un atome de sélénium par molécule de SmPHGSHpx. L'ensemble de ces résultats montre que la molécule clonée est une PHGSHpx de *S.mansoni*.

L'immunogénicité de la SmPHGSHpx a été testée sur des sérums de patients sénégalais présentant une bilharziose. Un test ELISA sur 40 sérums a révélé 23 sérums ayant des Acs spécifiques pour l'extrémité C-terminale de la SmPHGSHpx (Roche, 1995).

#### 7.2. Les généralités sur les glutathion peroxydases (GSHpxs)

Les glutation peroxydases (GSHpxs) forment une surprenante famille de protéines enzymatiques impliquées dans différents processus biologiques et dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. Décrites pour la première fois en 1957 dans les érythrocytes de bovins, les GSHpxs sont capables de catalyser la réaction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion, protégeant ainsi l'hémoglobine contre des dommages oxydatifs (Mills et coll., 1957).

Quatre types de GSHpx sont identifiés chez l'homme : la GSHpx-1, la GSHpx gastrointestinale, la GSHpx plasmatique et la phospholipide hydroperoxyde GSHpx (PHGSHpx). Chaque type présente des spécificités de substrats, de localisation au sein des tissus et de régulation d'expression.

Toutes les GSHpxs catalysent la réaction d'hydroperoxyde (ROOH) aux dépends de deux molécules de GSH suivant la réaction :

#### $ROOH + 2 GSH---> ROH + H_2O + GSSG$

R peut être un groupe organique aliphatique, ou de l'hydrogène. Les produits issus de cette réaction enzymatique sont H<sub>2</sub>O, un alcool (ROH), ou une seconde molécule d'eau lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sert de substrat, et du glutathion disulfide (GSSG).

En catalysant divers hydroperoxydes issus du métabolisme cellulaire ou de

xénobiotiques oxydants, les GSHpxs permettent de maintenir l'intégrité des membranes lipidiques et de l'ADN des cellules. Elles confèrent ainsi une résistance cellulaire contre les dommages causés par les produits oxydants.

Une augmentation de l'activité peroxydase glutathion dépendante à été associée aux phénomènes de résistance de cellules tumorales vis-à-vis de drogues anti-cancéreuses (Mirault et coll., 1991). Ces propriétés enzymatiques permettent de caractériser les GSHpxs comme des enzymes antioxydantes.

Cependant, elles sont également impliquées dans d'autres processus biologiques. En effet, les GSHpxs participent à la régulation de la formation des prostacyclines (Meister et coll., 1988). La synthèse hormono-dépendante de la phospholipide hydroperoxydase GSHpx (PHGSHpx) au sein des testicules de rat est un argument en faveur d'une implication des GSHpxs dans d'autres phénomènes que la lutte contre les produits oxydants (Roveri et coll., 1992).

#### 7.3. La phospholipide glutathion peroxydase (PHGSHpx)

C'est une protéine monomérique d'environ 20 kDa, phosphorylée *in vivo*. Elle diffère des autres GSHpxs par sa spécifité de substrats. En effet, la PHGSHpx catalyse avec une plus grande efficacité les peroxydes lipidiques (phospholipides, cholestérol, acide linoléique) et plus faiblement l'H2O2 (Thomas et coll., 1990a; 1990b). Elle est capable d'interagir directement avec son substrat sans l'utilisation de phospholipases. De ce fait, la PHGSHpx représente la principale défense des cellules contre la destruction oxydative des bio-membranes. En plus de son rôle antioxydant, la PHGSHpx semble impliquée dans les mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaire.

La PHGSHpx présente une localisation cytosolique, elle a également été détectée au niveau des membranes nucléaires et mitochondriales. Chez le rat, la PHGSHpx a été retrouvée dans tous les tissus, mais à un taux beaucoup plus élevé au niveau des testicules (Roveri et coll., 1992).

L'expression de PHGSHpx post-pubertaire est régulée par les gonadotropines. Elle semble impliquée dans la production de spermatozoïdes fonctionnels. Cette enzyme a également été décrite dans le coeur de porc (Brigélius-Fliohé et coll., 1994) et chez l'homme (Maiorino et coll., 1991, Esworthy et coll., 1994).

#### 8. Les Calréticulines

La calréticuline a été initialement identifiée comme une protéine fixant le calcium avec une forte affinité dans le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (MacLennan et coll., 1972; Ostwald et MacLennan 1974). Quinze ans plus tard, le clonage moléculaire et le séquençage des acides aminés de l'extrémité N-terminale a montré que cette protéine avait déjà été décrite par d'autres groupes sous des noms variés, comme calréguline, CRP55 etc. (Ostwald et MacLennan 1974; Waisman et coll., 1985; Macer et Koch 1988; Damiani et coll., 1990; Treves et coll., 1990). Pour éviter les confusions concernant l'identité de cette protéine, le nom calréticuline a été choisi. Il signifie que c'est une protéine qui fixe le calcium et est localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique / sarcoplasmique (Fligel et coll., 1989; Smith et Koch 1989).

#### 8.1. La calréticuline du schistosome (SmCaR)

Jusqu'à présent, la calréticuline a été identifiée dans deux espèces de schistosome, S.mansoni (SmCaR) et S.japonicum (SjCaR). Leur poids moléculaires sont 58 et 55 kDa respectivement (Khalife et coll., 1994; Huggins et coll., 1995). La séquence déduite des acides aminés montre 75% d'identité entre les deux molécules. La calréticuline de S.japonicum est reconnue par les sérums de souris vaccinées par les cercaires irradiés de la même espèce. Chez le rat, les Acs spécifiques de la SjCaR recombinante ne reconnaissent pas l'antigène de vers adulte de S.mansoni suggère que la SjCaR contient des épitopes spécifiques de l'espèce; par contre, la SjCaR est reconnue par les sérums provenant de rats immunisés par les cercaires irradiés de S.mansoni indiquant la présence d'Ag associé chez ces deux espèces de schistosome (Huggins et coll., 1995). Comme les calréticulines chez d'autres espèces, ces deux molécules fixent le calcium (Khalife et coll., 1994; Huggins et coll., 1995).

La SmCaR a été caractérisée dans notre laboratoire. Il a été démontré qu'il existe une réaction croisée entre le facteur d'infectivité viral (vif) de VIH et l'antigène de surface du schistosome (Khalife et coll., 1993a). Un Ac monoclonal dirigé contre un peptide dérivé de la protéine vif s'accroche à la surface du schistosome et reconnaît une bande majeure de 65 kDa dans l'extrait d'antigènes solubles du schistosome. Le transfert passif de cet Ac monoclonal chez le rat a des effets protecteurs contre l'infection par le schistosome. Ceci indique que l'antigène de 65 kDa reconnu par cet Ac monoclonal est une cible de la réponse immune *in vivo* (Khalife et coll., 1990). Ce résultat a conduit à l'isolement d'une molécule contenant l'épitope lié à cette réaction croisée. Le criblage d'une banque d'ADN

du schistosome a été réalisé par un Ac polyclonal de lapin, dirigé contre une fraction protéique de 60-65 kDa purifiée par électro-élution à partir d'un homogénat de vers adultes. Cette stratégie a abouti à l'isolement d'un clone codant pour une protéine de 45 kDa. L'Ac dirigé contre la protéine recombinante reconnaît un antigène de 58 kDa dans l'homogénat de cercaires et vers adultes (Khalife et coll., 1994). Le séquençage d'ADN de ce clone a été ensuite réalisé (Khalife et coll., 1993b, 1995). La séquence des acides aminés déduite a montré 52% d'homologie avec la calréticuline humaine. Des homologies importantes ont été également retrouvées entre la molécule clonée et la calréticuline de souris d'une part et l'antigène RAL-1 de Onchocerca volvulus d'autre part. Cette molécule a été ensuite nommée calréticuline de S.mansoni (SmCaR). Les Acs dirigés contre la calréticuline recombinante ont été retrouvé dans les sérums de patients bilharziens et de patients ayant un lupus érythémateux systémique (Khalife et coll., 1993a). SmCaR est exprimée par tous les stades du parasite. Il a été démontré qu'un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique HDEL ainsi que la séquence PPKKIKDDP qui ressemble au signal de ciblage nucléaire dans d'autres protéines nucléaires sont présents dans la calréticuline. Bien que la capacité de fixation du calcium de cette protéine ait été déterminée, sa fonction biologique in vivo chez le schistosome et sa localisation à différents stades du parasite reste à étudier.

#### 8.2. La distribution et localisation cellulaire de la calréticuline

La calréticuline est largement répandue chez de nombreuses espèces dans pratiquement tous les tissus. Elle a été identifiée chez toutes les eucaryotes qui ont été étudiées jusqu'à présent, y compris les cellules de plantes (Michalak et coll., 1992). La calréticuline est une protéine hautement conservée : 90% d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés entre les calréticulines de lapin, de souris, de rat et chez l'homme; 60% d'identité de séquence des acides aminés entre la calréticuline de lapin et celle d'*Onchocerca volvulus* partiellement séquencée (Unnasch et coll., 1988). La similarité des séquences entre la CaR mammifère, la CaR de Drosophile et la CaR d'*Onchocerca volvulus* est très marquée surtout quand on considère que les mammifères ont divergé phylogénétiquement il y a 75 million d'années et la Drosophila et le *Onchocerca volvulus* ont divergé il y a 350 million d'années (Barrett et coll., 1986).

Des études en immunohistochimie sur une grande variété de cellules ont confirmé que la calréticuline est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique dans les cellules non musculaires. Le signal de rétention dans le réticulum endoplasmique

KDEL (Pelham 1989) a été retrouvé dans la calréticuline par séquençage des acides aminés (Fliegel et coll., 1989a; Smith et coll., 1989; McCauliffe et coll., 1990a). Cette protéine peut aussi être détectée dans l'enveloppe nucléaire de certaines cellules. Ceci n'est pas surprenant, car le réticulum endoplasmique est parfois lié d'une façon continue à la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Des études d'immunolocalisation ont également montré que la calréticuline est présente dans le noyau de certaines cellules. En effet, un signal de localisation nucléaire PPKKIKPRDP est présent dans la calréticuline (McCauliffe et coll., 1990a; Opas et coll., 1991).

#### 8.3. Les fonctions biologiques de la calréticuline

#### 8.3.1. Stockage du calcium

Dans les cellules non musculaires, la calréticuline est une protéine majeure qui fixe le calcium dans le réticulum endoplasmique. Elle est connue pour sa grande capacité de fixation pour le calcium (environ 200 nmol Ca<sup>++</sup> / mg de protéine) (Treves et coll., 1990). Ceci a un rôle essentiel pour la cellule, car le stockage de Ca<sup>++</sup> dans la lumière du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique a une importance centrale pour la régulation de Ca<sup>++</sup> libre dans le cytoplasme. La calréticuline peut être subdivisée en trois domaines distincts : le domaine N de SmCaR comprend les premiers 200 acides aminés, le domaine P est riche en résidus Proline (187-317) et le domaine C est acide (310-401) (Baksh et coll., 1991). Il a été démontré que la calréticuline contient deux types de site de fixation pour le Ca<sup>++</sup>; le site de forte affinité / faible capacité est localisé dans le domaine P, par contre le site de faible affinité / forte capacité se trouve dans la région C-terminale de la protéine (Baksh et coll., 1991).

#### 8.3.2. Inhibition d'activité du récepteur hormonal

La séquence KXFFKR est présente dans tous les récepteurs nucléaires pour les hormones et se situe dans le domaine qui fixe l'ADN. Les acides aminés de cette séquence sont en contact direct avec les nucléotides sur leur élément de réponse hormonale. Par l'interaction avec les récepteurs hormonaux dans le domaine qui fixe l'ADN (séquence KXFFKR), la calréticuline empêche la fixation de ce dernier sur l'ADN au niveau de leur éléments de réponse pour les hormones. L'interaction entre le récepteur nucléaire et la

calréticuline semble être assurée par le domaine N de la calréticuline, ce qui indique que cette région a une grande importance fonctionnelle. Le domaine N est une région hautement conservée : plus de 95% d'identité des acides aminés est retrouvé dans les calréticulines d'insecte, de nématode, de rat, de lapin, de souris et chez l'homme. En dehors de l'inhibition d'activité du récepteur hormonal d'une manière KXGFFKR spécifique, la calréticuline peut aussi inhiber l'activité de transcription nucléaire *in vivo*, celle-ci pourrait avoir des conséquences différentes selon le récepteur qui interagit. L'interaction entre la calréticuline et le récepteur de l'acide rétinoïque a conduit à l'inhibition de la différenciation de la cellule nerveuse induite par l'acide rétinoïque (Dedhar et coll., 1994). Dans les fibroblastes de souris, la surexpression de la calréticuline est associée à une diminution de la transcription des gènes sensibles aux glucocorticoides (Burns et coll., 1994). Du fait que la séquence KXGFFKR existe dans le domaine cytoplasmique de toutes les sous-unités α de l'intégrine, la calréticuline peut se fixer sur cette séquence et fonctionner aussi comme un modulateur de signal par la translocalisation entre le cytoplasme et le noyau (Michehalak et coll., 1992).

#### 8.3.3. Autres fonctions

Il a été proposé après le séquençage de la molécule que l'antigène Ro/ss-A peut être la calréticuline (Collins et coll., 1988; McCauliffe et coll., 1990a, b). D'autres évidences ont été données par la suite qui suggèrent que la calréticuline n'est pas l'autoantigène Ro/ss-A (Rokeach et coll., 1991). Cet antigène a une importance clinique car il est détecté chez la majorité des patients présentant le syndrome de Sjögren et le lupus érythémateux systémique. Bien que ces découvertes nécessitent une confirmation, les évidences suggèrent que la calréticuline partage peut être des épitopes avec l'antigène Ro/ss-A; par conséquent elle peut avoir un rôle secondaire dans la pathologie de cette maladie autoimmune.

Récemment, il a été démontré que la calréticuline est abondante dans les myoblastocytes en prolifération. La diminution de la quantité de cette protéine après la fusion cellulaire et la formation de myotube, suggère que la calréticuline peut jouer un rôle important dans la prolifération cellulaire et/ou la synthèse de protéine.

C. Propriétés des immunoglobulines A

La capacité protectrice d'un vaccin dépend de la réaction du sujet immunisé; cette réaction est différente selon la forme et la voie d'entrée de l'antigène. Dans le cas de la schistosomiase, l'interaction du schistosome avec son hôte définitif se trouve sur trois sites muqueux : la peau / la muqueuse buccale (bovin), la muqueuse pulmonaire, et la muqueuse intestinale (S.mansoni) ou urogénitale (S.haematobium). L'immunité muqueuse pourrait jouer un rôle important dans la résistance contre l'infection par le schistosome.

Les muqueuses du corps représentent une vaste surface comprenant le tube digestif. les voies respiratoires et la muqueuse urogénitale. Elles sont vulnérables à la colonisation et l'invasion par des micro-organismes. La surface de l'épithélium intestinal est de l'ordre de plusieurs mètres carrés. L'immunité muqueuse constitue la première barrière contre l'infection et protège les organes vitaux du corps. Cette barrière est composée de trois éléments : les IgA sécrétoires qui se chargent de l'interaction avec les microorganismes ou les antigènes dans la sécrétion externe; les cellules épithéliales qui participent à la capture et le transport des antigènes du côté de la lumière d'organes vers les tissus lymphoïdes, et les tissus lymphoïdes associés (Mucosal Associated Lymphoid Tissus, MALT) qui est le site d'induction des réponses immunes et responsable de la production des IgA sécrétoires. La quantité d'IgA sécrétée chaque jour à la surface de la muqueuse intestinale est beaucoup plus importante que la quantité d'IgG présente dans la circulation (Mestecky et coll., 1987; 1991; Seilles et coll., 1985). Une forte concentration de cellules immunitaires est observée au niveau des muqueuses. Les cellules lymphoïdes associées à la surface des muqueuses sont beaucoup plus nombreuses que celles qui se trouvent dans la moëlle osseuse, le thymus, la rate et les ganglions.

Dans ce chapitre, la structure des molécules d'IgA effectrices, les mécanismes effecteurs des IgA sécrétoires dans l'immunité muqueuse et la réponse IgA dans la schistosomiase seront exposés.

#### 1. Les immunoglobulines dans les sécrétions muqueuses

En général, l'IgA est l'isotype prédominant dans la plupart des sécrétions muqueuses où elle existe sous formes dimérique et polymérique. Les IgA sécrétoires sont formées par les IgA monomères associées à la chaîne J et le composant sécrétoire (Secretory Component, SC). Il existe aussi des composants sécrétoires libres dans les sécrétions des muqueuses. Chez l'homme, la majorité des IgA sécrétoires est dérivée de la synthèse locale et non de la circulation (Jonard et coll., 1984), chaque jour plus de 3 g d'IgA

sécrétoire sont transportés dans les sécrétions glandulaires et les muqueuses (Seilles et coll., 1985).

Les IgM dans les sécrétions muqueuses sont composées par 5 IgM monomèriques associées aux chaînes J et SC, cette dernière correspond à la partie clivée du récepteur des immunoglobulines (Brandtzaeg, 1985). Toutefois, la concentration en IgM sécrétoires est nettement moins importante que celle en IgA, du fait qu'il existe beaucoup moins de cellules produisant des IgM dans les tissus muqueux. En effet, une augmentation de la sécrétion d'IgM est observée dans les tissus muqueux chez les individus déficients en IgA (Plebani et coll., 1983).

Dans la plupart des espèces, la concentration des IgG est similaire à celle des IgM. On considère que l'IgG gagne la sécrétion muqueuse non spécifiquement via le transport paracellulaire ou par endocytose de phase fluide. Une exception notable existe chez les ongulés (la chèvre, le mouton et la vache) qui, en plus de l'IgA polymérique, transportent sélectivement l'IgG1 du sérum vers certaines sécrétions muqueuses comme le colostrum, le lait et la salive (Cripps et Lascelles 1976; Butler, 1983).

L'IgE a été détectée dans les sécrétions respiratoires et gastro-intestinales en très petite quantité et est souvent associée à une réponse allergique muqueuse (Brown et coll., 1975; Mygind et coll., 1975; Jonard et coll., 1984).

Des rapports indiquent qu'une concentration très basse d'IgD, synthétisée localement, est retrouvée dans le lait et la salive (Leslie et Teramura 1977).

#### 2. La structure des immunoglobulines A sécrétoires

Une molécule typique d'IgA sécrétoire est composée de deux IgA monomères, d'une chaîne J et probablement de deux molécules de composant sécrétoire (Secretory Component, SC) (Kühu et Kraehenbuhl, 1979; 1981). Les extrémités N-terminales de la partie Fc de deux IgA monomères se trouvent en contact l'un avec l'autre, et les Fabs qui fixent l'antigène se trouvent en position externe (Fig. 6). Les deux IgA monomères sont associées avec un polypeptide additionnel, la chaîne J, acquise pendant le processus de polymérisation dans les plasmocytes avant la sécrétion (McCune et coll., 1981; Parkhouse et Della Corte, 1973). Le composant sécrétoire est ajouté pendant le transport assuré par le récepteur à travers les cellules épithéliales intestinales et glandulaires (Kühu et Kraehenbuhl, 1979; 1981) et correspond à la partie clivée du récepteur pour l'immunoglobuline polymérique (récepteur de poly-Ig). L'IgA sécrétoire est plus résistante aux protéases que l'IgA dimère (composée de deux molécules d'IgA monomère

et d'une chaîne J), ce qui est probablement duà la présence de la pièce sécrétoire qui masque les sites de clivage protéolytique. Les sites de clivage se trouvent dans la région charnière de la molécule d'IgA (Lindh, 1975).

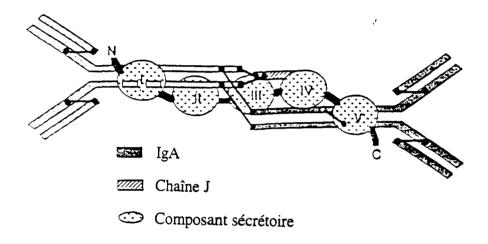


Figure 6. Structure des immunoglobulines A sécrétoires (d'après Kraehenbuhl et Neutra, (1992). Physiological reviews. Am. Physiol. Soc., 72, 853-879).

#### 3. Les sous-classes d'IgA chez l'homme

#### 3.1. La distribution des sous-classes d'IgA

Chez la souris et le rat un seul isotype d'IgA a été identifié, chez le lapin 13 isotypes d'IgA ont été décrits (Burnett et coll., 1989), alors que chez l'homme, il existe deux sous-classes, IgA1 et IgA2, codées par des gènes séparés et exprimés d'une manière tissuspécifique (Mestecky et McGhee, 1987). Une délétion de 13 acides aminés dans la région charnière rend les IgA2 plus résistantes aux protéases sécrétées par les bactéries (Gilbert et coll., 1988; Meyer et coll., 1987). L'IgA2 est produite d'une manière prédominante par des plasmocytes muqueux (Bjerke et Brandtzaeg, 1990a; 1990b).

En utilisant des Acs spécifiques dirigés contre les IgA1 et IgA2 humaines, plusieurs groupes de recherche ont démontré que l'IgA sérique est constituée essentiellement par la sous-classe IgA1 (85% des IgA sériques) (Mestecky et Russell, 1986; Conley et Delacroix, 1987). Cette valeur reflète la proportion de cellules sécrétant l'IgA1 et l'IgA2 dans la moëlle osseuse (Skvaril et Morell, 1974; Crago et coll., 1984). D'autres données (Alley et coll., 1982) suggèrent aussi que la quasi totalité des IgA sériques provient des cellules de la moëlle osseuse. Du fait que les IgA sécrétoires sont produites par des sécrétions locales, il semble que la proportion entre IgA1 et IgA2 reflète la distribution caractéristique des cellules sécrétant des IgA1 et IgA2 dans les différents tissus (Crago et coll., 1984; Kett et coll., 1986; Kutteh et coll., 1988). Bien que les cellules sécrétant l'IgA1 soient prédominantes dans la plupart des tissus muqueux et glandulaires, on trouve dans l'intestin grêle et l'appareil génital femelle un nombre de cellules sécrétant l'IgA2 égal ou supérieur à celui des cellules produisant l'IgA1. Les ganglions contiennent des proportions variées de cellules IgA1 et IgA2 selon leur localisation.

La nature de l'antigène aurait une influence importante sur la détermination de la sousclasse des IgA. Dans le colostrum (Ladjeva et coll., 1989) et la salive (Brawn et Mesteckey, 1985), les Acs spécifiques pour un antigène protéique prédominent sous forme IgA1, contrairement aux Acs dirigés contre les lipopolysaccharides qui appartiennent à la sous-classe IgA2.

#### 3.2. Les différences fonctionnelles des sous-classes d'IgA

Malgré une grande similarité au niveau des structures primaires entre IgA1 et IgA2 humaines, des études récentes ont montré que les différences fonctionnelles existant entre les sous-classes d'IgA sont reliées à leur différences structurales.

La région charnière de la molécule IgA1 la rend susceptible aux protéases spécifiques d'IgA1 produites par les bactéries. Inversement, l'absence de cette région dans la molécule IgA2 la rend résistante aux protéases d'IgA1. Théoriquement, la région charnière confère une flexibilité segmentaire à l'IgA1 et augmente sa capacité de fixation antigénique par rapport à l'IgA2, bien que cette hypothèse n'ait pas été démontrée par des expériences (Pumphrey, 1986).

Une autre différence entre IgA1 et IgA2 concerne la composition en carbohydrates et la distribution des chaînes latérales d'oligosaccharides (Niedermeier et coll., 1972; Tomana et coll., 1972; 1976; Baenziger et Kornfeld, 1974a, b; Torano et coll., 1977; Baenziger, 1979; Mizoguchi et coll., 1982; Wold et coll., 1990). Ces différences pourraient influencer certaines propriétés importantes de ces molécules. La disponibilité des résidus galactose de l'IgA1 permet une meilleure fixation sur le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) exprimé par les hépatocytes; de ce fait l'IgA1 est métabolisée plus rapidement par les hépatocytes que l'IgA2 (Tomana et coll., 1988).

Des analyses plus récentes suggèrent que des protéines de myélomes, surtout celles qui appartiennent à la sous-classe d'IgA2, montrent une hétérogénéité en carbohydrates très importante ainsi que des chaînes latérales d'oligosaccharides tronquées qui se terminent par des résidus de mannose (Wold et coll., 1990). Ces protéines réagissent efficacement avec les bactéries gram négatif qui expriment des lectines spécifiques du mannose. Comme les cellules productrices d'IgA2 sont prédominantes dans le côlon et le vagin où sont présentes les bactéries gram négatif, les IgA2 peuvent fonctionner dans ces organes indépendamment de leur spécificité d'Ac (Crago et coll., 1984; Kette et coll., 1986; Kutteh et coll., 1988). Une grande série de fonctions antibactériennes des IgA sécrétoires est assurée par ce type d'interaction sous le contrôle des carbohydrates dans la lutte contre les entérobactéries, en coopération avec d'autres éléments immunitaires, sans l'intervention de la spécificité antigénique de l'Ac.

Les protéines myélomateuses d'IgA1 et d'IgA2 ont été comparées pour leur capacité d'influencer les fonctions biologiques des cellules, comme les cellules tueuses naturelles (NK) ou les éosinophiles. Les IgA sécrétoires et les IgA2, mais pas les IgA1 inhibent de façon dose dépendante l'activité NK des cellules périphériques HNK-1+contre les cellules cibles K563 (Komiyama et coll., 1986). En ce qui concerne la dégranulation des éosinophiles, l'activité des IgA sécrétoires est nettement supérieure à celle des deux sousclasses d'IgA (Abu-Ghazaleh et coll., 1989). En effet, il a été démontré récemment dans

notre laboratoire que le récepteur pour SC est exprimé par l'éosinophile, et est fonctionnel (Lamkhioued, 1992). On en déduit que l'IgA sécrétoire peut être une immunoglobuline contrôlant les fonctions effectrices des éosinophiles à la surface des muqueuses dans les infections parasitaires et les maladies d'hypersensibilité (Abu-Ghazaleh et coll., 1989). Des expériences *in vitro* montrent que l'IgA participe à la destruction du schistosomule de *S.mansoni* en présence d'éosinophiles (Grezel et coll., 1993).

#### 4. Le transport transépithélial des IgA

Le transport des IgA dimériques ou polymériques du sité de synthèse vers la sécrétion muqueuse ou glandulaire nécessite un processus actif assuré par un récepteur membranaire : le récepteur des immunoglobulines polymères.

Le récepteur de poly-Ig est une glycoprotéine membranaire dont la partie externe est constituée de cinq domaines constant d'immunoglobulines (Ig-like) et comporte un fragment transmembranaire et une queue cytoplasmique. Il est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, glycosylé et phosphorylé dans l'appareil de Golgi avant d'être dirigé vers la surface basolatérale. Avec ou sans ses ligands, le récepteur est internalisé par endocytose de la membrane basolatérale, trié dans les endosomes basolatéraux vers les vésicules de transcytose, et transporté à travers la cellule. Les vésicules de transcytose fusionnent avec la membrane plasmique luminale (Schaerer et coll., 1991). Pendant le transport ou à la surface cellulaire, le récepteur avec ou sans ligand est clivé et le SC ou le complexe SC-IgA sont relâchés dans les sécrétions (Fig. 7). Le site de fixation pour l'IgA est localisé dans le premier domaine "Ig-like" du récepteur poly-Ig (Frutiger et coll., 1986). Au cours du transport ou au moment du clivage une liaison disulfure est formée entre le cinquième domaine du SC et la partie Fc d'un IgA monomère. Les domaines 2, 3, 4 du SC ne participent pas à la liaison, mais ils sont nécessaires pour le positionnement de deux résidus de cystéine dans le domaine 5 qui forme la liaison disulfure avec l'IgA.

Les signaux contrôlant le ciblage basolatéral, l'endocytose, et le tri dans les endosomes basolatéraux sont associés avec la queue cytoplasmique du récepteur. L'expression du gène du récepteur de poly-Ig est amplifiée par plusieurs cytokines, comme l'Interféron-γ (Solid et coll., 1987), suggérant que le transport de l'IgA sécrétoire dans les sécrétions peut être augmenté durant l'inflammation de la muqueuse.

### lg lg 3. Recognition of Polymeric IgA or IgM ( ) Terminal Sugar 4. Endocytosis 2. Processing and Terminal Glycosylation SC Core 5. Transcytosis A Ribosome **Proteolysis** Synthesis 6. Exocytosis and Core Glycosylation elg sigA sigM

#### BASAL-LATERAL OR SINUSOIDAL SURFACE

LUMINAL OR BILE CANALICULAR SURFACE

Figure 7. Schéma du transport transépithélial des IgA

(d'après Tomasi (1994), Introduction: An overview of the Mucosal System. In: Handbook of Mucosal Immunology. Ogra, P. L., Strober, W., Mestecky, J., McGhee, J. R., Lamm, M. E., Bienenstock, J. (eds), Academic Press, Inc. (pp 3-8).

#### 5. Les mécanismes de protection liés à l'IgA

L'IgA sécrétoire, dimère tétravalant, peut se lier éfficacement avec les microorganismes présents à la surface muqueuse du tube digestif, des voies respiratoires et génitales (Tomasi, 1983; Underdown et Schiff, 1986). Les IgA sécrétoires et les complexes IgA sécrétoire-antigène sont piégés facilement dans le mucus, ce qui facilite l'élimination par le mouvement intestinal et le transport mucociliaire à la surface respiratoire. Ce phénomène, qui s'appelle "exclusion immune", peut empêcher efficacement le contact des antigènes et des pathogènes avec la surface épithéliale muqueuse. De plus, la molécule IgA peut bloquer directement les sites de fixation pour l'attachement épithélial, soit par la fixation sur les adhésines spécifiques des pathogènes, soit par encombrement stérique (Williams et Gibbons, 1972).

Des Acs monoclonaux IgA ont été récemment utilisés pour l'étude des fonctions protectrices des IgA sécrétoires dans différents modèles expérimentaux. Il a été démontré que les IgA sécrétoires dirigées contre un seul épitope du composant de surface des virus respiratoires (Renegar et Small, 1991) ainsi que des bactéries et virus intestinaux peuvent être suffisantes pour empêcher la maladie et l'attachement épithélial ou l'invasion intestinale (Weltzin et coll., 1989; Winner et coll., 1991).

Des Acs IgA monoclonaux dirigés contre le *Virus Sendai* ont été produits et testés chez la souris. L'administration passive par voie nasopharyngée des Acs spécifiques du *Virus Sendai* peut éviter l'infection virale et la pneumonie (Mazanec et coll., 1987). L'injection intraveineuse d'IgA spécifiques du virus de l'influenzae a montré que les IgA ont été transportées dans les sécrétions muqueuses respiratoires et ont protégé la souris contre une infection d'épreuve intranasale (Renegar et Small, 1991). Le système "backpack" a été utilisé pour démontrer que seuls les IgA sécrétoires peuvent protéger la souris contre la colonisation de la muqueuse intestinale et la diarrhée induite par des bactéries entériques.

Le Vibrio cholerae est une bactérie qui colonise la surface de la muqueuse et provoque une diarrhée sévère en sécrétant une endotoxine qui s'attache sur les cellules épithéliales. En utilisant le système de "backpack", il a été démontré que la sécrétion intestinale d'un Ac monoclonal dirigé contre un épitope à la surface de Vibrio cholerae est suffisante pour protéger les souris gavées par une dose mortelle de V. cholerae (Winner et coll., 1991).

#### 6. IgA et la schistosomiase

L'IgA est l'isotype majeur d'immunoglobuline muqueuse et joue un rôle important dans la protection contre des agents pathogènes (Davis et coll., 1979; Leid et coll., 1974; Lioyd et coll., 1978; Underdown et coll., 1986).

Dans la schistosomiase humaine, l'étude de la réponse IgA chez les sujets infectés révèle une corrélation entre le niveau de la réponse IgA spécifique de l'Ag Sm28 GST et l'acquisition de l'immunité à la réinfection après traitement au PZQ (Grzych et coll., 1993). Ces IgA sont capables *in vitro* de réduire la fertilité du schistosome et la viabilité des oeufs.

Chez le rat immunisé par l'Ag Sm28 GST, la déplétion sélective de cet isotype réduit les propriétés cytotoxiques des sérums en présence des éosinophiles suggérant la participation des IgA dans les mécanismes de protection (Grezel et coll., 1993).

Chez la souris infectée par *S. mansoni*, la réponse IgA spécifique des antigènes du schistosome apparaît au cours de l'infection expérimentale indiquant le rôle majeur de l'oeuf dans l'induction de cette réponse isotypique. Inversement, dans les modèles d'infection monosexuée, cette réponse isotypique est considérablement réduite (Poulain-Godefroy et coll., 1996).

# MATERIELS ET METHODES

#### 1. Les parasites

Une souche de Guadeloupe de *S.mansoni* fournie par le Professeur Jourdane (Université de Perpignan) est maintenue au laboratoire par passages successifs sur les mollusques *Biomphalaria glabrata* et le hamster doré. Pour les expériences de localisation des différents antigènes, les parasites adultes sont récoltés par perfusion systémique de hamsters infestés depuis 45 jours. Le foie des hamsters a été prélevé en même temps.

Une souche locale de *S.mattheei* de Zambie (De Bont et coll., 1995a et b) maintenue dans le mollusque de *Bulinus globosus* a été utilisée pour les expériences d'infection expérimentale chez le bovin.

#### 2. Les antigènes

#### 2.1. L'antigène Sm28 GST

L'ADN complémentaire codant pour l'antigène de 28 000 Daltons de *S.mansoni* a été cloné et inséré directement dans un vecteur d'expression P<sub>L</sub> (Courtney et coll., 1984) suivant la méthode décrite par Balloul et coll. (1987b). L'induction de la synthèse de la protéine a été réalisée par incubation à 42 °C des cultures d'*Escherichia coli* (*E. coli*) portant l'insert. La purification de la molécule a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion (GSH) (Sigma, St Louis, MO, USA) couplé à des billes de sépharose (Taylor et coll., 1988); cette technique donne une pureté superieur à 95%.

### 2.2. L'antigène Sb28 GST

Le cDNA de S.bovis a été inséré dans Escherichia coli (Y1090). Les clones exprimant la Sb28 GST ont été sélectionnés par les Acs anti-Sm28 GST grâce à l'existence des réactions croisées entre la Sm28 GST et la Sb28 GST. Les clones positifs ont été sous clonés et multipliés pour la préparation d'ADN phagique. L'expression de la protéine a été réalisée dans la levure S.cerevisiae (TGY73,4) contenant le plasmide pTG8887 (Transgène SA, Strasbourg, France) (Trottein et coll., 1992). La purification de la protéine recombinante a été réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne de GSH-agarose (Taylor et coll., 1988).

#### 2.3. La 28 GST native de S. mattheei

Elle a été obtenue à partir des vers adultes de *S.mattheei* prélevés chez les bovins de Zambie. Les parasites ont été homogénéisés en tampon PBS pendant 30 secondes dans un disperseur de type Ultra-Turrax (Bioblock, France) puis soumis aux ultrasons (dans la glace) pendant 30 secondes supplémentaires. Le surnageant obtenu après une centrifugation à 20 000 rpm pendant 2 h est considéré comme la préparation d'antigènes solubles de vers adultes (Soluble Worm Antigen Preparation, SWAP). La GST native de *S.mattheei* a été obtenue par chromatographie d'affinité sur une colonne de GSH-agarose selon la méthode précédemment décrite pour la Sm28 GST. La concentration en protéine a été déterminée par la méthode de Lowry et coll. (1951).

# 2.4. Le facteur nucléaire NF-YA de S.mansoni (SmNF-YA)

Le clone codant pour SmNF-YAc1 (Zemzoumi et coll., 1996) a été amplifié par la technique de PCR et cloné dans le plasmide pQE30. La protéine recombinante a été produite dans *E.coli* et purifiée sur une matrice d'agarose Ni<sup>++</sup> selon les instructions du fabriquant (The QIA expressionist, QIAGEN Inc., CA, USA).

# 2.5. La calréticuline de S.mansoni (SmCaR)

La protéine recombinante de SmCaR fusionnée avec la GST a été produite dans *E. coli*. La protéine de fusion a été clivée par la trombine, la technique de chromatographie d'affinité sur une colonne d'agarose de glutathion (GSH) a été utilisée pour éliminer la GST dans la préparation antigènique selon le protocole décrit par Khalife et coll. (1994).

# 2.6. La phospholipide hydropéroxyde glutathion péroxydase de S.mansoni (SmPHGSHpx)

Du fait des difficultés rencontrées pour la production de l'antigène SmPHGSHpx recombinant (Roche et coll., 1995), une autre alternative a été retenue : selon la séquence nucléotidique, un peptide correspondant à la zone hydrophile situé dans la région C-terminale de SmPHGSHpx, PYDIEGDIMELLEKK (Williams et coll., 1992) a été synthétisé et couplé à l'ovalbumine grâce à l'ajoût de cystéine (Ce travail a été réalisé par H. Gras-Masse, au laboratoire de biochimie, CNRS Unité 1309, Institut Pasteur de Lille).

#### 3. Modèles d'études

#### 3.1. Modèle d'infection

Animaux : 28 veaux mâles castrés (race Frisonne) âgés de 4 à 6 mois ont été divisés en 4 groupes similaires selon leur poids (7 animaux / groupe). Deux groupes pour l'infection expérimentale (vaccination expérimentale (VE) et contrôle expérimental (CE)) et deux autres groupes pour l'infection naturelle (Vaccination Naturelle (VN) et Contrôle Naturel (CN)).

Schéma d'immunisation et d'infection: les veaux des groupes VE et VN ont été immunisés deux fois par voie intra-musculaire avec 250 µl d'une solution de Sb28 GST en PBS (1 mg/ml) en présence du même volume de CFA, à 3 semaines d'intervalle. Les animaux contrôles (EC et VC) reçoivent dans les mêmes conditions un mélange de PBS et de CFA. Deux semaines après le rappel, la moitié des animaux a été exposée pendant 30 min à 10 000 cercaires de S.mattheei au niveau de la queue rasée. Ces animaux ont été perfusés 12 semaines après l'infestation. L'autre moitié des animaux a été transportée dans une ferme où le S.mattheei est endémique dans un enclos où la seule source d'eau est une mare qui héberge les mollusques, l'hôte intermédiaire de S.mattheei (B.globobus et Lymnaea natalensis). Des échantillons sanguins ont été prélevés à la veine jugulaire tous les 15 jours. Les animaux ont été perfusés 32 semaines plus tard.

#### 3.2. L'immunisation de porc

Deux truies ont été immunisées 2 fois par voie sous-cutanée à 3 semaines d'intervalle avec 250 µg de Sm28 GST. La première injection a été réalisée en présence du même volume d'adjuvant complet de Freund (CFA) (Difco, Detroit, MI) et le rappel en présence d'adjuvant uncomplet de Freund (IFA) (Difco). La truie contrôle a été traitée dans les mêmes conditions mais sans antigène. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant la 2ème injection, 21 jours après le rappel et au moment de la parturition. Les truies ont été ensuite saillies. Après la mise bas, les colostrums et les laits de truies ont été prélevés pour une étude cinétique jusqu'au 28ème jour après la parturition. Le sang des porcelets a été prélevé en parallèlle.

#### 4. Les anticorps

### 4.1. La production d'immunsérums

Les immunsérums utilisés pour la localisation des antigènes ont été produits chez le lapin ou le rat. Les antigènes dilués dans une solution de NaCl à 0,9% (1 mg / ml) ont été injectés par voie sous-cutanée en présence d'un volume égale de CFA. Pour les rappels, les antigènes ont été injectés en présence du même volume d'IFA par voie sous claviculaire. La spécificité des immunsérums a été testés sur l'antigène SWAP de S.mansoni par la technique d'immuno-électrotransfert. Le tableau suivant résume les protocoles d'immunisation retenus pour chaque antigène :

		Dose		
Antigène	Animal	Immunisation	Rappel	Intervalle d'immunisation
rSm28 GST	Lapin	250 μg	500 μg	2 semaines (x1*)
rSmNF-YA	Rat	100 mg	500 mg	10 jours (x3*)
rSmCaR	Lapin	500 μg	500 μg	3 semaines (x1*)
SmPHGSHpx (peptides)	Lapin	2 mg	1 mg	8 semaines (x1*)

<sup>\*</sup> Nombre de rappel.

Dans le cas particulier d'immunsérum de lapin dirigé contre les peptides de SmPHGSHpx, la fraction d'immunoglobuline a été purifiée sur protéine A couplée à la sépharose 4B (Pharmacia, Suède). Un milligramme de protéine A-sépharose a été incubé avec 3 ml de sérum (dilué au 1/3 dans du PBS, pH 7,4) pendant une nuit à 4 °C. Après plusieurs rinçages en tampon PBS, la fraction d'immunoglobuline a été éluée par un tampon glycine 2 M / HCl 0,2 M, pH 2,8, neutralisée avec une solution de NaOH (2 N) et dialysée contre du tampon PBS 1 nuit à 4 °C. La spécificité de la fraction a été vérifiée par immuno-électrotransfert. On observe une meilleure reconnaissance de l'antigène spécifique par rapport au sérum avant la purification. La fraction d'immunoglobuline des sérums pré-immuns a été purifiée dans les mêmes conditions et utilisée comme témoin négatif dans l'expérience de marquage.

# 4.2. La purification d'immunoglobuline dans les sécrétions lactées porcines

# 4.2.1 La délipidation et la décaséination du lait et du colostrum

Les laits et les colostrums ont été délipidés par centrifugation pendant 45 min à 20 000 g (à 4 °C), puis ont été décaséinés par l'abaissement du pH à 4,5 et l'ajout de HCl (1N) à température ambiante jusqu'à ce que la coagulation de la caséine soit complète (Hutchens et coll., 1990). Après une centrifugation à 20 000 g pendant 45 min les surnageants ont été récupérés et dialysés contre du tampon PBS 0,01 M (48 h à 4 °C) et concentrés sur l'aquacide II (Cabiochem, Meudon, France) au volume initial de l'échantillon avant le traitement en tenant compte du volume de caséine précipitée. Les lactosérums ainsi obtenus ont été filtrés avec un filtre de 0,22 µm et stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

### 4.2.2. Traitement par la sépharose 4B couplée à la protéine A

Pour évaluer la participation respective des différents isotypes d'immunoglobuline dans la fonction inhibitrice de l'activité catalytique de la Sm28 GST, les lactosérums ont été soumis à un traitement par la protéine A couplée à la sépharose 4B selon le protocole décrit pour les Acs anti SmPHGSHpx. Le niveau d'IgG et d'IgA spécifiques de l'Ag Sm28 GST dans la fraction "d'IgG purifié" et la fraction "épuisée en IgG" a été testé par méthode d'ELISA par rapport au lactosérum avant le traitement. La fonction inhibitrice de chaque fraction sur l'activité enzymatique de l'Ag Sm28 GST a été également testée.

# 5. Techniques d'immunomarquage

### 5.1. Méthode immuno-histochimique

#### 5.1.1.Traitement du tissus

Les vers adultes de *S.mansoni* et le foie de hamster infecté ont été fixés à 4 °C pendant une nuit par une solution de Périodate-Lysine-Paraformaldéhyde (PLP, MacLean et coll., 1974) contenant 0,05% de glutaraldéhyde. Le bloquage des groupes aldéhydes libres est assuré par une solution de L-lysine (0,1M) pendant 4 - 6 h à 4 °C. Les tissus ont été ensuite déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante et inclus en paraffine.

### 5.1.2. Immunomarquages

Des coupes en paraffine de 3 µm d'épaisseur ont été déparaffinées et réhydratées. Le tampon TBS (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,4) contenant 0,5% d'ovalbumine (TNO) et 5% de sérum normal de chèvre décomplémenté a été utilisé pour bloquer les sites de fixation non spécifique sur les coupes. Cette étape a été suivie par l'incubation avec les premiers Acs dilués dans le TNO pendant 1 nuit à 4 °C. Après 2 lavages de 15 min en TNO, le 2ème Ac couplé à la phosphatase alcaline (PA) (Sigma) dilué dans le TNO (1/100) a été incubé pendant 1 h à la température ambiante. Les coupes ont été lavées deux fois en TNO et une fois en H2O. Cette étape a été suivie par la révélation de la réaction enzymatique par le substrat Néo Fuchsine (Dako, Danemark). La contrecoloration a été réalisée par l'hematoxyline de Harris (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les sérums pré-immuns ont été utilisés comme témoins négatifs de l'expérience. Le tableau suivant indique les concentrations d'Acs utilisées pour la localisation des différents antigènes :

Antigène	Anticorps primaire (dilution)	Anticorps conjugué (PA)	
Sm28 GST	Lapin antiSm28 GST(1/1000)	Chèvre anti-lapin IgG	
SmNF-YA	Rat anti-SmNF-YA (1/500)	Chèvre anti-rat IgG	
SmCaR	Lapin anti-SmCaR (1/500)	Chèvre anti-lapin IgG	
SmPHGSHpx	Lapin anti-SmPHGSHpx (1/400)	Chèvre anti-lapin IgG	

#### 5.1.3.Technique de double marquage

-Colocalisation des antigènes Sm28 GST et SmCaR : le marquage de la Sm28 GST a été effectué comme décrit ci dessus. La réaction de la phosphatase alcaline a été arrêtée par une solution d'EDTA (1 mM dans du Tris 10 mM, pH 7,5) pendant 10 min. Le marquage de SmCaR a été assuré dans ces conditions par l'utilisation d'un autre substrat Fast Bleu BB salt (Sigma) qui donne une coloration bleu ciel.

-Colocalisation des antigènes Sm28 GST et SmNF-YA : dans ce cas particulier, pour révéler le marquage de SmNF-YA le 2ème substrat a été remplacé par le BCIP / NBT (Dako, Danemark) qui donne une couleur noire.

# 5.2. Les techniques de microscopie électronique

# 5.2.1.Etape d'inclusion

Les vers adultes ont été coupés en fragments d'environ 1 mm puis fixés et traités par la L-lysine comme précédemment décrit pour l'immunohistochimie. Les prélèvements ont été inclus dans la résine LR white selon les instructions du fabriquant (Agar Scientific, Londre, Grande Bretagne). Les coupes ultrafines ont été faites et recueillies sur des grilles de nickel couvertes par une membrane de collodion.

## 5.2.2.Immunomarquage

Les étapes de bloquage et d'incubation avec le premier Ac sont identiques à celles décrites pour l'immunohistochimie. Après deux rinçages de 15 min les grilles sont incubées avec l'Ac de chèvre spécifique des IgG de lapin couplé à l'or coloïdal et dilué dans le TNO (1/100). Après une incubation d'une heure à la température ambiante suivie par des rinçages en tampon TNO (2 x 15 min) et une fixation en glutaraldéhyde (2%), les coupes ont été lavées intensivement et le marquage des grains d'or a été amplifié par une solution de révélation (Danscher's silver lactate hydroquinone physicol developer) (Moeremans et coll., 1988). Les sérums pré-immuns ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les coupes ont été colorées avec l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb avant observation au microscope électronique (EM 420 Phillips).

# 6. Dosage des anticorps spécifiques : technique immuno-enzymatique (ELISA)

#### 6.1. Anticorps de porc :

Les échantillons ont été incubés 1 nuit à 4 °C sur des plaques de microtitration préalablement traitées par une solution d'antigène (Sm28 GST) à 10 µg / ml (100 µl par puits, 3 h à 37 °C) puis saturées par une solution de gélatine de boeuf à 0,5% (1 h à 37 °C, 200 µl par puits). Après 3 lavages en tampon PBS-Tween (0,1%), les plaques ont été incubées 1 nuit à 4 °C avec les échantillons convenablement dilués dans le tampon de lavage. Après trois lavages les plaques ont été incubées 1 h 30 en présence de sérum de lapin anti-IgG, IgA ou IgM de porc (Interchim, Paris, France). Après 3 nouveaux lavages, la fixation des IgA, IgG et IgM sur l'antigène a été révélée par un sérum anti-

immunoglobuline de lapin marqué à la péroxydase et préparé chez la chèvre (Institut Pasteur, Paris, France). La réaction enzymatique a été développée par l'adjonction du substrat Ortho-Phénylène Diamine (O.P.D.). L'intensité de la coloration a été évaluée à 492 nm après arrêt de la réaction par l'acide chlorhydrique (HCl, 1N). Le tableau suivant résume les conditions expérimentales de la méthode :

	dilutions					
Anticorps à tester	Echantillons sérums ou laits	2ème Ac sérum de lapin	3ème Ac sérum de chèvre			
IgG anti Sm28 GST	1/1000 à 1/25 000	anti IgG de porc (1/50 000)	anti IgG de lapin (1/15 000)			
IgM antiSm28 GST	1/50 à 1/400	anti IgM de porc (1/10 000)	anti IgG de lapin (1/15 000)			
IgA anti Sm28 GST	1/250 à 1/2500	anti IgA de porc (1/2 500)	anti IgG de lapin (1/15 000)			

# 6.2. Anticorps de bovin :

Les étapes de manipulation sont similaires à celles utilisées pour les échantillons porcins. Pour adapter la technique aux sérums de bovin, des modifications ont été effectuées : les plaques ont été sensibilisées par la Sb28 GST diluée dans le tampon Na2CO3 (0,02 M, pH 9,6) (0,1 µg dans 100 µl / puits); le tampon de lavage a été remplacé par un Tampon Tris (TBS) (0,1 M, pH 8) -Tween (0,1%) ; la saturation a été effectuée par la solution de BSA à 0,5% en PBS. Les sérums ont été dilués au 1/100 pour les dosages d'IgG et au 1/20 pour l'IgA. Les Acs monoclonaux de souris spécifiques des isotypes de bovins (Sigma, Inc) ont été utilisés comme second Ac et ont été dilués au 1/1000 pour les IgG et 1/500 pour les IgA. Le 3ème Ac est le sérum de lapin antimmunoglobulines de souris couplé à la péroxydase et diluée au 1/5000 (Institut Pasteur, France).

# 7. Technique d'inhibition enzymatique

Les échantillons (lactosérums ou sérums) ( 24 µl) ont été incubés avec 0,12 µg de GST de schistosome à tester (Sm28 GST, Sb28 GST ou GST native de *S.mattheei*) (diluée dans 1,2 µl de tampon phosphate 0,05 M, pH 6,5) 1 h à 37 °C puis 4 h à 4 °C. Les échantillons ont été ensuite déposés dans des plaques de type d'ELISA (NUNC, InterMed, Danemark) (21 µl/puits contenant 0,1 µg de GST). L'activité résiduelle de la

GST dans chaque préparation a été évaluée en présence de substrat constitué de chloro-1, dinitro-2-4 benzène (C.D.N.B.) (1 mM) et de glutathion réduit (GSH) (1 mM)) dans un volume de 200 µl de tampon phosphate. La lecture a été effectuée par un lecteur de plaque. La densité optique (D.O.) a été évaluée à 340 nm toutes les 15 secondes pendant 2 min. L'augmentation des D.O. a été exprimée par la valeur de la pente (mD.O./min). Le bruit de fond a été soustrait par rapport à chaque échantillon traité dans les mêmes conditions mais sans enzyme. Le pourcentage d'inhibition a été défini par rapport à des préparations d'enzymes incubées dans les mêmes conditions soit en présence de tampon, soit en présence de sérum ou lactosérum contrôle négatif.

L'activité enzymatique résiduelle a été obtenue par le rapport Q, où Q correspond à la pente obtenue pour les sérums à tester divisé par la moyenne des pentes enregistrées pour les 5 sérums témoins.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule : 1 - Q x 100%

### 8. Technique d'immuno-electrotransfert

Cette technique a été utilisée pour étudier d'une part la réaction croisée entre l'Ag Sb28 GST et la GST native de *S.mattheei*, d'autre part pour le contrôle de chaque étape de purification des lactosérums porcins. Elle a été aussi utilisée pour le contrôle de la spécificité des antisérums dans les expériences d'immunomarquage.

# 8.1. Electrophorèse (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

Les électrophorèses en milieu dénaturant (SDS) ont été conduites selon la méthode décrite par Laemmli (1970) avec ou sans modification du pH de la solution de solubilisation : les GSTs de *S.mattheei* ont été repris à raison de 1 à 2 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8 ou 8,9 contenant 3% de SDS; 10% de glycérol; 0,05% de bleu de Bromophénol en présence ou non de 2-mercaptoéthanol. Les mélanges ont été placés dans un bain-marie bouillant durant 3 min, puis déposés sur un gel de concentration (gel de polyacrylamide à 5%, tampon Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%) coulé

sur un gel de séparation (gel de polyacrylamide homogène à 10% pour les fractions de lactosérums porcins et à 13% pour les GSTs de *S.mattheei*, tampon Tris-HCl pH 8,9, SDS 0,1%). Après la migration, les bandes protéiques ont été colorées au bleu de Coomassie 0,85 g dans un mélange méthanol / acide acétique / eau, (500 / 100 /500 en volume) et le gel a été décoloré avec un mélange éthanol / acide acétique / eau (20 / 8 / 72 en volume).

#### 8.2. Immunoélectrotransfert : Western-blot

#### a). Le contrôle des fractions de lactosérums porcins

La technique dérive de celle décrite par Towbin et coll. (1979). Les protéines séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,43 μm; Ceralabo) pendant une nuit à 45 Volts dans un tampon Tris 20 mM, glycine 150 mM, méthanol 20%. La membrane de nitrocellulose a été ensuite saturée avec du lait écrémé à 5% dans du PBS-Tween 0,05% durant 1 h. L'identification des bandes protéiques a été obtenue en incubant, durant 1 nuit à 4 °C, la membrane de nitrocellulose avec une solution d'Ac appropriée : les sérums de lapin (Interchim) anti-IgA de porc (anti-chaine lourde) (1/250), anti-IgG de porc (anti-chaine lourde et légère) (1/5000) ou anti-IgM de porc (anti-chaine lourde) (1/500). Une incubation pendant 2 h avec les Acs de chèvre marqués à la péroxydase dirigés contre les IgG de lapin (dilués au 1/2000, Diagnostic Pasteur, France) permet la révélation des immuncomplexes. L'activité péroxydasique a été détectée par l'addition de PBS contenant du 4-chloro-napthol (60 mg dans 20% de méthanol, Sigma) et 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

# b). Etude de la réaction croisée entre le Sb28 GST et les GSTs de S.mattheei

Des modification ont été effectuées pour l'adaptation aux sérums de bovin : la saturation de la membrane a été réalisée par l'incubation avec 5% d'ovalbumine diluée dans du PBS-Tween. Cette étape a été suivie par l'incubation avec les sérums de bovins dilués au 1/500 dans du PBS-Tween pendant une nuit à 4 °C. L'Ac monoclonal de souris dirigé contre l'IgG de bovin dilué au 1/1000 a été utilisé comme Ac secondaire. La révélation des immuncomplexes a été réalisée par l'Ac de lapin dirigé contre les IgG de souris marquées à la peroxydase (dilué au 1/5000).

Nota: avant l'addition de chaque nouvelle solution, la membrane de nitrocellulose a été soigneusement lavée avec du PBS-Tween 0,05% ou avec du PBS seul (pour le dernier lavage).

# **RESULTATS**

# A. Localisation des antigènes à potentialité vaccinale sur S.mansoni

1. Localisation ultrastructurale de la Sm28 GST chez les vers adultes de S.mansoni

#### 1.1.Immunohistochimie

Sur les coupes histologiques des vers adultes des deux sexes la Sm28 GST est largement distribuée dans le parenchyme et les tubercules dorsaux (Fig.8.1. 1A). L'intensité de coloration est plus importante chez les mâles que chez les femelles (Fig. 8. 1B). Les fibres musculaires du parenchyme et l'épithélium digestif ne sont pas immunoréactives. Quant il s'agit du système génital, l'intensité de l'immunomarquage est variable selon le ver observé. Chez les vers mâles, les cellules montrant des réactions positives se situent au hasard dans les testicules, le noyau est plus marqué que le cytoplasme (Fig.8. 1D, E). Dans l'ovaire, le nombre des cellules positives et la densité du marquage diminue de la région antérieure (contenant des oocytes immatures) vers la région intermédiaire. Dans la région postérieure (contenant des oocytes matures) on ne trouve plus de marquage (Fig.8. 1G, H). L'ootype et l'oocyte contenu dans l'oeuf sont immunoréactifs (Fig.8. 1C), tandis que les marquages sur les glandes vitellines sont faibles ou pratiquement inexistants (Fig.8.1H). Aucun marquage n'est observé dans l'utérus (Fig.8. 1B). Les coupes incubées en présence de sérum de lapin avant l'immunisation ne présentent aucun marquage (Fig.8. 1F, I).

Fig. 8.1. Localisation histologique de la Sm28 GST dans les vers adultes de S.mansoni. (A). La Sm28 GST est localisée dans le parenchyme (p) et les tubercules dorsaux (tête de flèche). L'épithélium de l'intestin (g) est dépourvu de marquage. (B) Une coupe longitudinale de la partie antérieure d'un ver femelle montrant la coloration positive du parenchyme et l'absence d'immunoréaction au niveau de l'utérus (u) et de l'épithélium intestinal (g). (C) Une coupe transversale de l'ootype (Ot) contenant un oeuf. L'oocyte localisée au centre de l'oeuf (flèche) montre une réaction positive intense au niveau du noyau par rapport au cytoplasme. (D) Une coupe d'un ver mâle. La Sm28 GST est détectée dans les testicules (t). Le muscle (m) et l'épithélium intestinal (g) sont dépourvus de marquage. (E) Les testicules à un plus fort grossissement. Les cellules exprimant la Sm28 GST sont marquées plus fortement au niveau du noyau que du cytoplasme. (F) Témoin négatif d'un ver mâle. Aucun marquage. (G) Les organes reproducteurs d'un ver femelle. Dans l'ovaire (o), les cellules positives sont distribuées dans la partie antérieure et la partie intermédiaire. (H) Un grossissement plus fort des organes reproducteurs des femelles. Des cellules dans la partie intermédiaire de l'ovaire sont intensément marquées. Le marquage des cellules vitellines matures (v) est très faible. (I) Témoin négatif d'un ver femelle. (Echelles =  $40 \mu m$ ).



# 1.2. Microscopie électronique

# Tégument, parenchyme et épithélium digestif

Le marquage au niveau du tégument est variable selon les régions et les vers observés. Dans la plupart des cas, on ne trouve pas de marquage. Toutefois, des réactions positives sont observées occasionnellement. Dans certains cas, les grains d'or sont dispersés dans le tégument et les tubercules dorsaux et même dans les épines; dans d'autres cas, ils sont groupés et parfois sont observés en dessous du tégument (Fig.8. 3A, B).

A travers les couches musculaires les prolongements des cellules parenchymateuses liant les corps cellulaires et le tégument sont marqués. Les cellules exprimant la Sm28 GST sont localisées profondément dans le parenchyme. Les prolongements cytoplasmiques marqués sont liés et forment un réseau dans le parenchyme. En général, les cellules qui possèdent des noyaux contenant des chromatines condensées sont marquées, contrairement aux cellules qui possèdent des noyaux avec des chromatines dispersées. Il existe au moins 4 types de cellules présentant un marquage : les deux types de cellules musculaires décrits par Ressig et coll. (1970); les cellules tubulaires du système d'excrétion et les cellules parenchymateuses contenant des noyaux condensés et peu de corps cytoplasmiques. Les cellules parenchymateuses contenant un gros noyau rond clair et riche en corps cytoplasmiques ne sont pas marquées. Dans les cellules positives, les noyaux sont fortement marqués. Dans le cytoplasme, les grains d'or sont dispersés dans le cytosol. Les fibres musculaires, les lipides et les corps cytoplasmiques ne sont pas marqués (Fig. 8. 2A, B, C).

En ce qui concerne le système digestif, des grains d'or sont présents au niveau des projections cellulaires de l'oesophage (Fig.8. 4A); par contre, l'épithélium de l'intestin n'est pas marqué (Fig.8. 4B). Il n'y a pas de marquage sur les fibres musculaires. Les coupes étudiées n'ont pas permis l'observation de cellules nerveuses dans leur totalité, mais les parties de cytoplasme de neurones sont dépourvues de marquage.

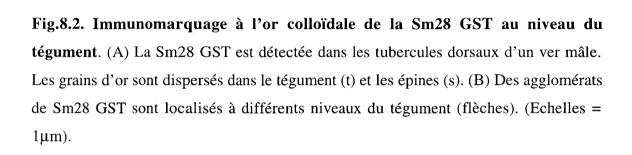
#### Les organes génitaux du ver mâle.

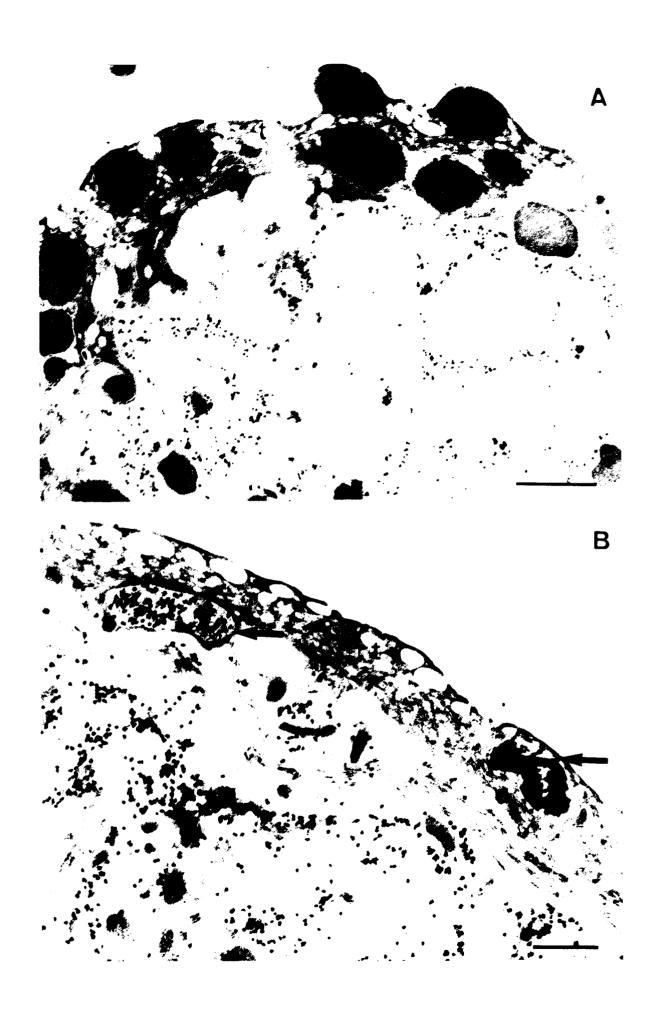
Dans les testicules, les spermatocytes et les cellules sustentaculaires à différents stades de maturation sont positives. La densité du marquage nucléaire est hétérogène. En général, les cellules contenant de l'hétérochromatine sont plus marquées que celles contenant de l'euchromatine. Les marquages ne sont pas associés aux mitochondries, au réticulum endoplasmique ou à d'autres organelles (Fig.8. 5A, B, C). Le sperme ayant

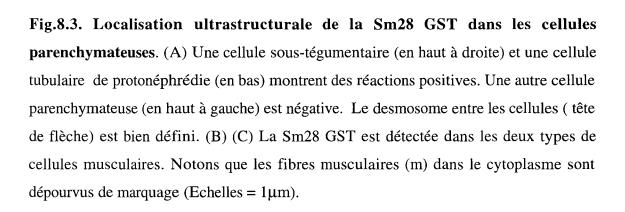
pénétré dans le système génital de femelle est localisé au niveau du réceptacle séminal. L'Ag Sm28 GST est détecté dans le nucléoplasme, le cytoplasme, à la surface et au niveau du flagelle du spermatozoïde (Fig.8. 6A, B). La densité du marquage est inférieure à celle observée dans les spermatocytes immatures. Aucun marquage n'a été observé sur les coupes témoins négatifs (Fig.8. 5D, 6C).

#### Le système génital des vers femelles

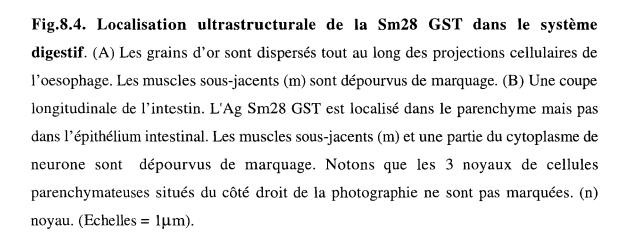
Les oogonies prédominantes dans la région antérieure sont dispersées dans la région intermédiaire. Elles possédent un gros noyau avec des masses de chromatine condensée et sont fortement marquées. Les grains d'or sont diffus dans les cellules avec une densité plus forte au niveau du noyau (Fig.8. 7A). La densité du marquage diminue en parallèle avec la maturation des cellules, surtout au niveau du cytoplasme (Fig. 8. 7B, C, D). Dans la glande vitelline, les cellules vitellines non différenciées montrent des réactions positives au niveau du noyau et du cytoplasme (Fig. 8. 8A). La densité du marquage diminue durant la maturation cellulaire du stade 1 (cellules immatures) au stade 4 (cellules matures). Le noyau des cellules vitellines matures est très peu marqué et dans le cytoplasme quelques grains d'or sont localisés dans le cytosol et ne sont pas liés aux lipides, aux matériaux précurseurs de la coque ou à d'autres organelles cellulaires (Fig.8. 8B). Il existe des cellules vitellines dépourvues de marquage. Dans la glande de Mehlis, les noyaux et la matrice cytoplasmique sont fortement marqués. On observe que la matrice cytoplasmique s'attache sur les membranes trilaminaires qui divisent le cytoplasme en canaux débouchant dans la cavité de l'ootype. Les granules de Mehlis ne sont pas marqués (Fig. 8. 8D, 9A). Quand les différentes parties de l'appareil génital sont observées, l'ootype est l'organe le plus marqué (Fig. 8. 9B). Les cellules endothéliales de l'ovaire, l'oviducte et le véllooviducte sont positifs au niveau du noyau et du cytoplasme (Fig. 8. 7C). L'immunomarquage au niveau du réceptacle séminal, du canal vitellin et de l'utérus est inconstant, des réactions négatives ou faiblement positives sont enregistrées (Fig. 8. 6A, 10C). Quand il s'agit de l'oeuf qui se trouve dans l'ootype, une grande quantité de Sm28 GST est localisée à la surface de la coque visualisée par une couche de grains d'or à la surface extérieure de l'oeuf, mais on observe aussi des marquages plus diffus dans la coque (Fig.8. 10A). Dans le centre de l'oeuf, l'oocyte fertilisé montre une réaction positive avec une densité plus forte au niveau du noyau (Fig.8. 10B).

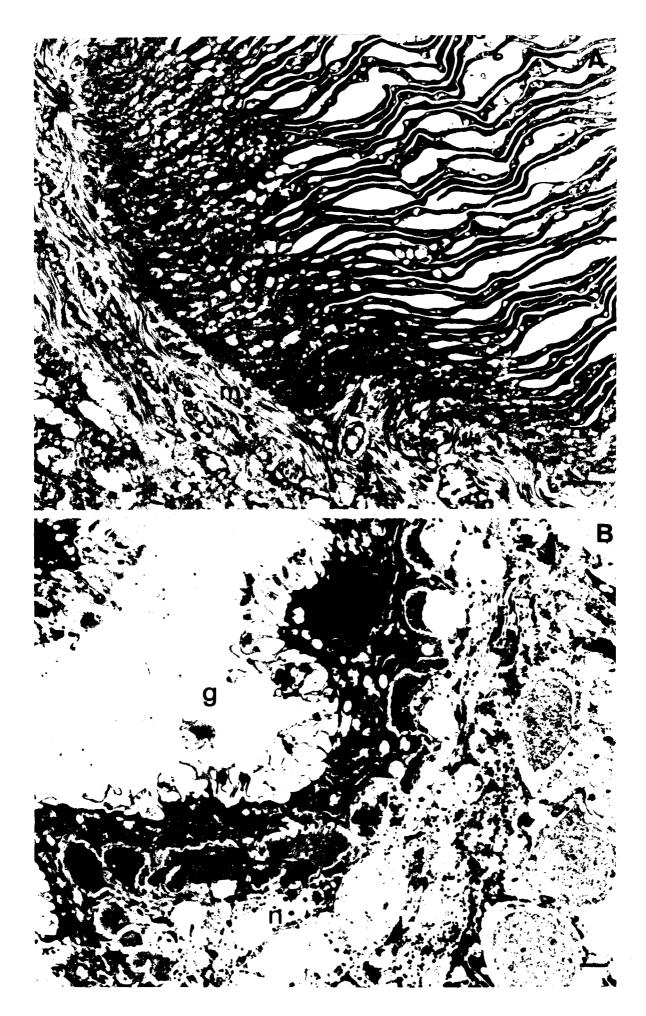


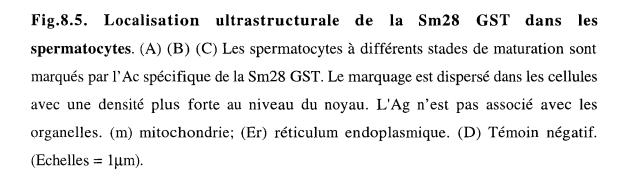


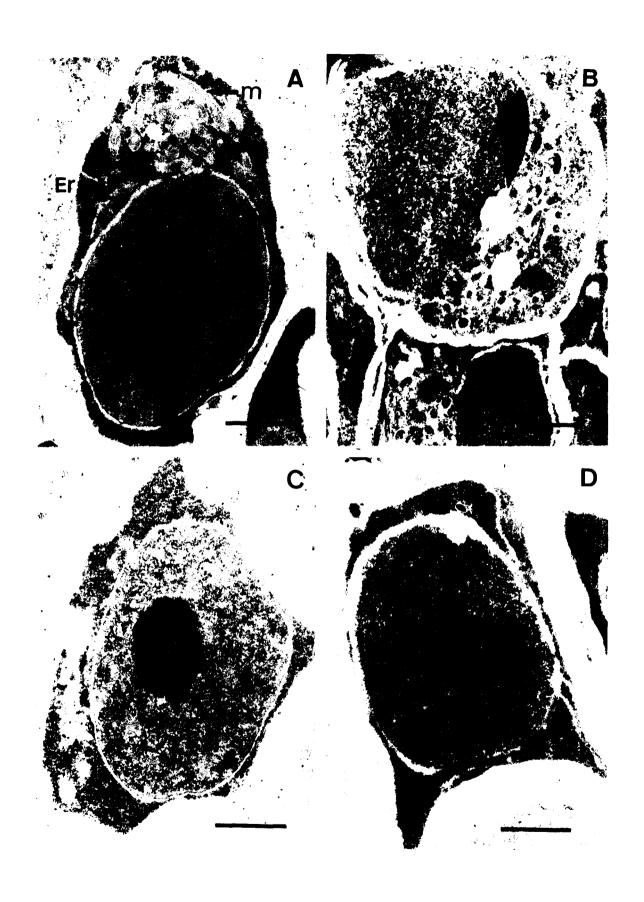


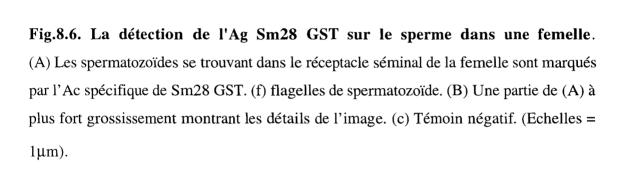












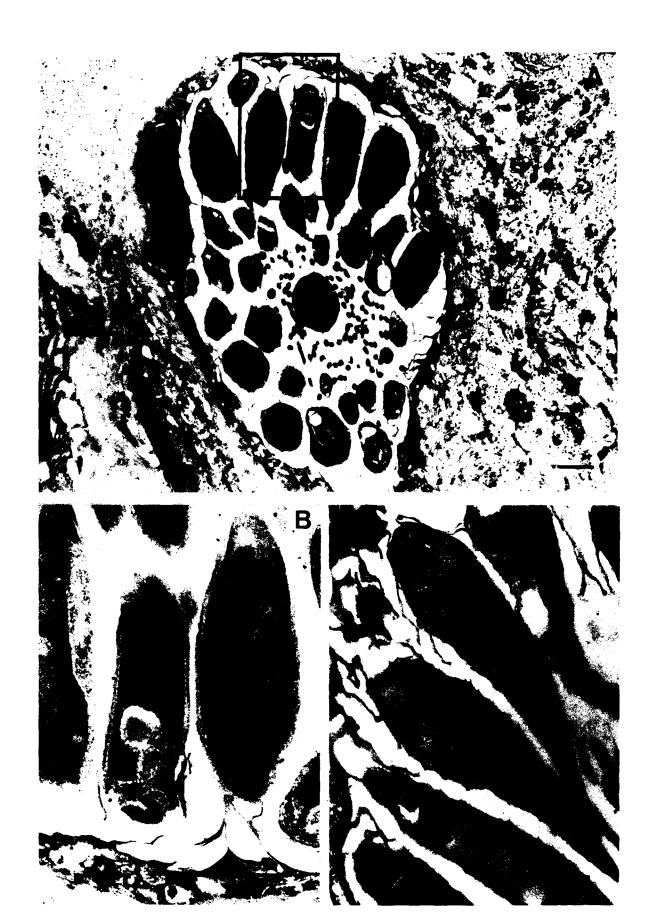
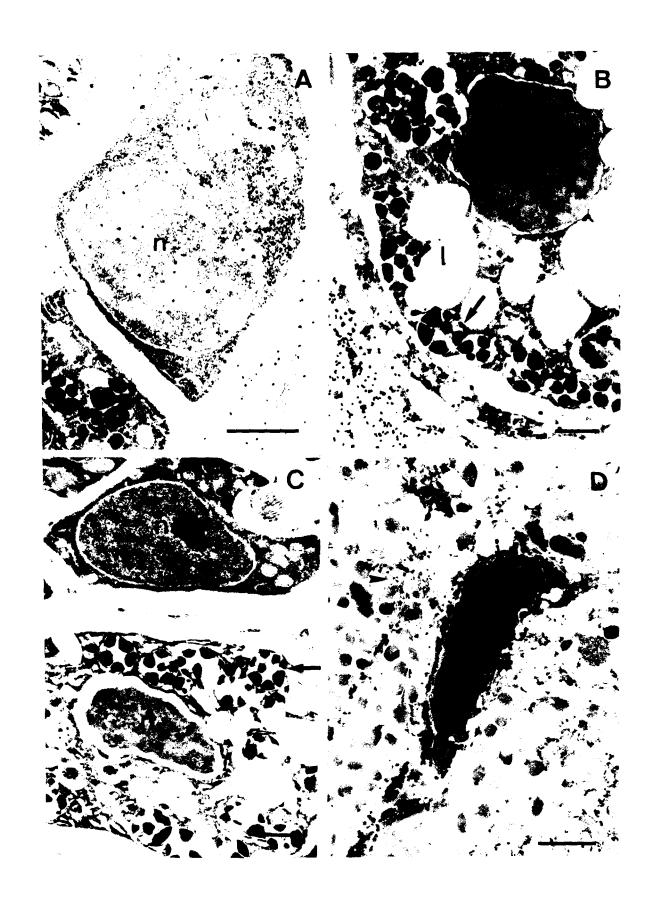
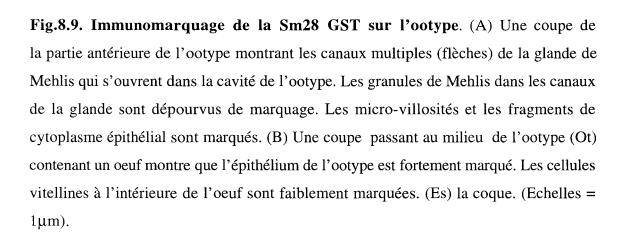


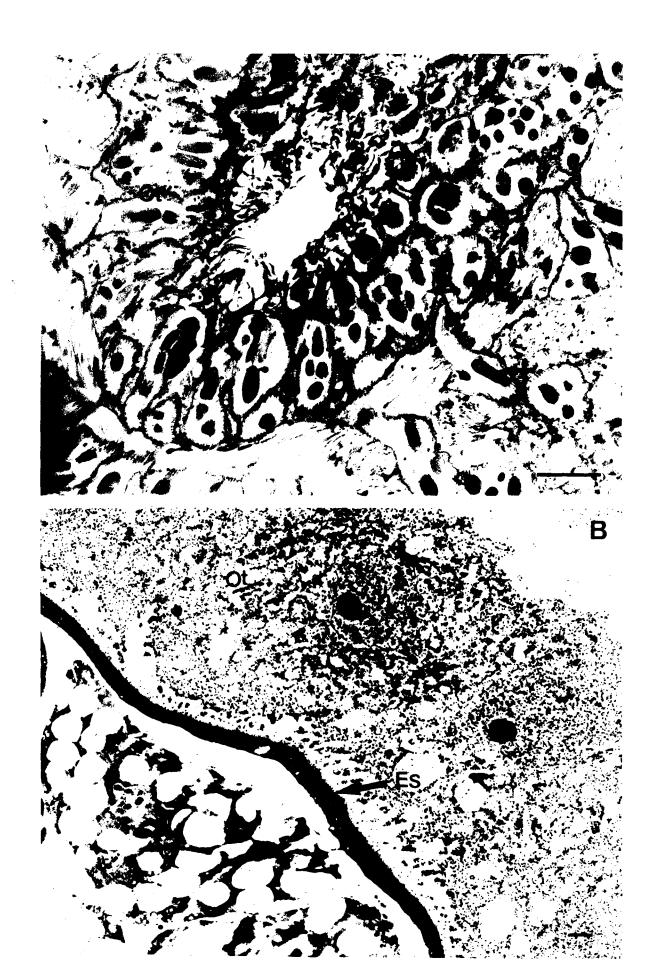
Fig.8.7. L'expression de la Sm28 GST dans les oocytes à différents stades de maturation. (A) Une oogonie avec un gros noyau et peu de cytoplasme est fortement marquée par l'Ac anti-Sm28 GST. (n) noyau. (B) Un oocyte dans une phase intermédiaire de maturation contient des granules corticaux immatures dans le cytoplasme (tête de flèche). L'expression de la Sm28 GST est largement diminuée. (C) Une partie de l'oocyte mature dans la capsule de l'ovaire contenant des mitochondries (m). Les granules corticaux matures se trouvent en périphérie de la cellule (têtes de flèche). Quelque grains d'or sont trouvés dans le cytoplasme. L'endothélium (En) de l'ovaire et de l'oviducte (Od) présente un marquage de l'Ag Sm28 GST. (Echelles = 0,1μm).

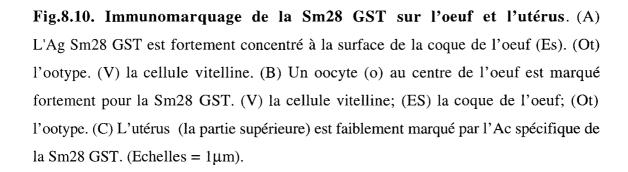


Fig.8.8. Détection de Sm28 GST dans les cellules vitellines et la glande de Mehlis. (A) La Sm28 GST est détectée dans une cellule vitelline immature (stade 1). (n) noyau. (B) Une cellule vitelline mature (stade 4) dans le canal vitellin est faiblement marquée. Ni les lipides (l), ni le matériel précurseur de la coque (flèche) ne sont associés avec le marquage. (C) Témoin négatif. (D) Dans la glande de Mehlis, les noyaux sont marqués. Les grains d'or sont observés dans la matrice du cytoplasme tout au long de la membrane trilaminaire qui divise le cytoplasme en canaux. Les granules de Mehlis ne sont pas marqués. (Echelles =  $1\mu$ m).











# 2. L'expression du facteur SmNF-YA dans les différents stades de S.mansoni, colocalisation avec l'Ag Sm28 GST

#### 2.1. La localisation du facteur SmNF-YA

Trois stades du parasite ont été étudiés par la technique d'immunohistochimie: les vers adultes, les cercaires et les oeufs hépatiques. SmNF-YA est exprimé dans tous les stades examinés.

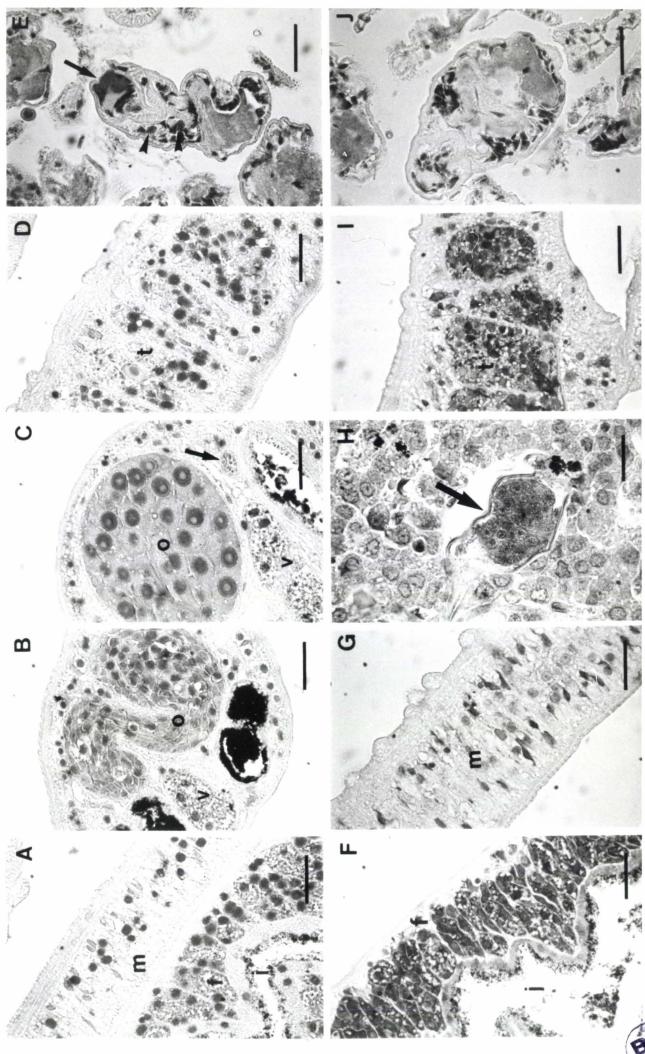
Chez les vers adultes, toutes les cellules positives sont marquées au niveau du noyau; les autres structures ne sont pas marquées. Dans le parenchyme, les cellules contenant un gros noyau rond sont positives, contrairement à celles contenant un noyau fusiforme. Les cellules épithéliales de l'intestin sont marquées (Fig.9. 1A). Chez les femelles, toutes les cellules vitellines sont positives. Dans l'ovaire, le nombre d'oocytes exprimant la SmNF-YA augmente de la partie antérieure (contenant des cellules immatures) vers la partie postérieure (contenant des cellules matures); on observe en même temps une densité croissante du marquage. Dans les oocytes matures, les contours du noyau et des nucléoles sont bien définis. SmNF-YA se trouve dans les noyaux mais pas dans les nucléoles (Fig.9. 1B, C.).

Dans les testicules, la plupart des spermatocytes contenant un gros noyau sont fortement marqués. Par contre, les spermatocytes possédant un petit noyau allongé et condensé montrent une réaction négative (Fig.9. 1D). Au niveau morphologique, cette dernière population est considérée comme étant des spermatocytes matures; ceci est en accord avec l'observation que le sperme ayant pénétré dans l'appareil génital de la femelle ne présente pas de marquage (Fig.9. 1C).

Dans les cercaires, SmNF-YA se localise dans les noyaux des cellules interstitielles, mais aussi d'une façon irrégulière à l'intérieur de la ventouse buccale (Fig.9. 1E).

Dans le foie de hamster infecté, les oeufs ayant suscité une réaction inflammatoire (granulome) sont dépourvus de marquage, contrairement à ceux qui n'ont pas induit de réaction cellulaire périovulaire et qui sont fortement marqués (Fig.9. 1H). Aucun marquage n'a été observé dans les coupes incubées en présence de sérums pré-immuns (Fig.9. 1F, G, I, J).

Fig.9.1. Localisation histologique de SmNF-YA sur différents stades de S.mansoni. (A) Sur les coupes de vers mâles (m) et femelles (f), les gros noyaux ronds des cellules parenchymateuses sont fortement marqués. Par contre, les noyaux fusiformes condensés sont dépourvus de marquage. Notons que les noyaux des cellules épithéliales de l'intestin (i) montrent aussi une réaction positive. (B) Une coupe d'un ver femelle montre la partie antérieure (la partie immature) et la partie intermédiaire de l'ovaire (o) indiquant que le nombre de cellules positives s'accroît de la partie antérieure (à gauche) vers la partie intermédiaire (à droite). Notons que les noyaux des cellules vitellines dans le canal vitellin sont aussi marqués. (C) Dans la partie postérieure de l'ovaire (o), le contour du noyau et du nucléole est bien net; tous les oocytes montrent une réaction positive au niveau du noyau mais pas dans le nucléole. Le sperme contenu dans le réceptacle séminal (flèche) est dépourvu de marquage. (D) Dans les testicules (t), la majorité des cellules positives possèdent un gros noyau rond (spermatocytes immatures). Les cellules ayant un petit noyau allongé (présumées être des spermatozoïdes) sont dépourvues de marquage. (E) Dans une cercaire, des noyaux de cellules interstitielles (têtes de flèches) et la glande céphalique située à l'intérieur de la ventouse buccale sont fortement marqués. (flèche). (F) (G) Contrôles négatifs correspondant à (A). (f) ver femelle. (m) ver mâle. (i) intestin. (H) Un oeuf dans le foie de hamster infesté. Sm NF-YA est localisée dans les cellules de l'oeuf mais pas dans les cellules hépatiques de l'hôte. (I) (J) Contrôles négatifs correspondant à (D) et (E) respectivement. (x 640).



#### 2.2. La colocalisation de SmNF-Y et l'antigène Sm28 GST

Pour étudier la relation entre l'expression de SmNF-YA et Sm28 GST, la technique de double marquage a été appliquée sur les stades adulte et cercaire. Le marquage de la Sm28 GST est dispersé dans le parenchyme des vers adultes et l'épithélium intestinal n'est pas marqué. SmNF-YA se trouve quant à elle dans tous les gros noyaux ronds des cellules parenchymateuses ainsi que dans les cellules épithéliales intestinales dépourvues du marquage pour l'Ag Sm28 GST (Fig.9. 2A). Des images similaires ont été retrouvées chez les cercaires : le marquage de la Sm28 GST est dispersé dans le parenchyme, alors que les noyaux de cellules parenchymateuses et le matériel associé à la ventouse buccale sont bien marqués pour l'Ag SmNF-YA (Fig.9. 2B). Aucun marquage n'a été observé dans les témoins négatifs (Fig.9. 2C,D). En conclusion, les deux antigènes ne sont pas co-exprimés dans tous les types cellulaires.

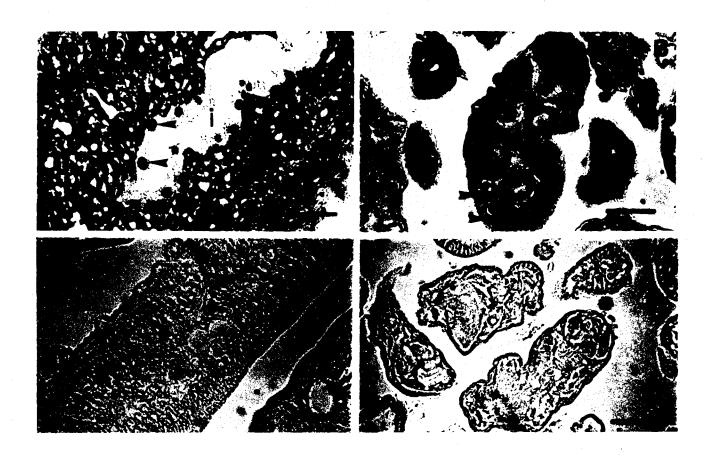


Fig.9.2. La colocalisation de SmNF-YA et Sm28 GST dans le ver adulte et la cercaire. (A) La Sm28 GST (en rouge) est largement distribuée dans le parenchyme, tandis que le marquage de SmNF-YA (en noir) est bien limité dans les gros noyaux ronds des cellules parenchymateuses, y compris les noyaux de cellules épithéliales de l'intestin (têtes de flèches) qui sont dépourvus de marquage pour la Sm28 GST. (i) intestin. (B) Une cercaire doublement marquée pour les deux antigènes. SmNF-YA est localisée dans les noyaux de cellules interstitielles (têtes de flèches) et à l'intérieure de la ventouse buccale (flèches), alors que le marquage de Sm28 GST est diffus. (C) (D) Contrôles négatifs correspondant aux photographies du haut (x 640).

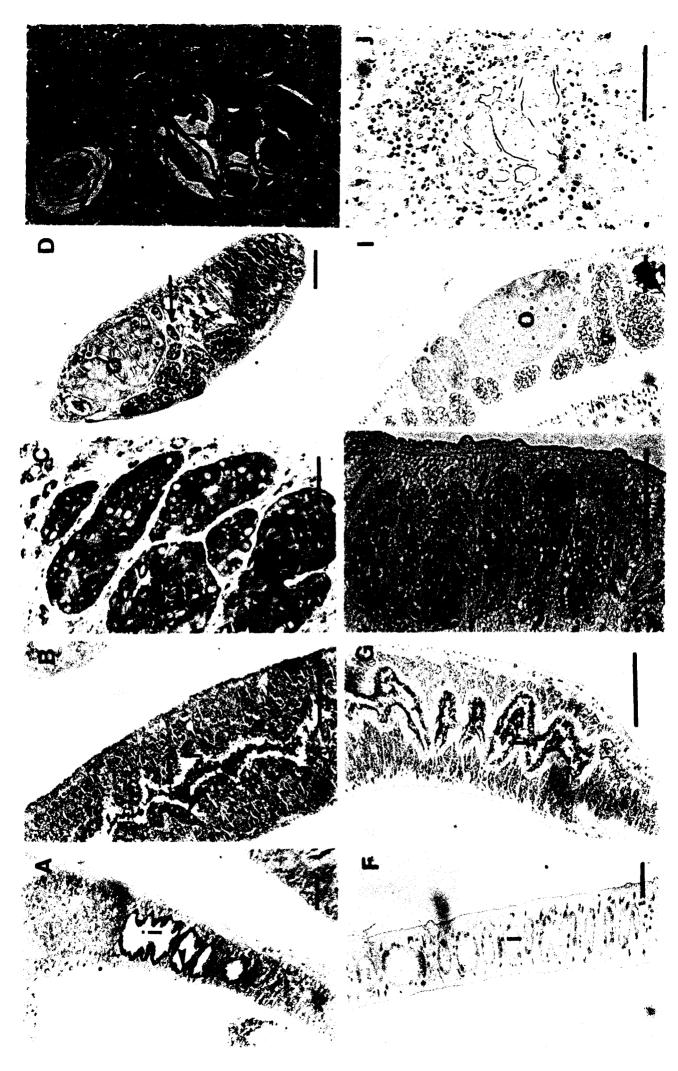
## 3. La localisation de la calréticuline de S.mansoni et la colocalisation avec l'Ag Sm28 GST chez les vers adultes

#### 3.1. L'observation optique.

Sur les coupes de vers adultes, la SmCaR se trouve partout dans le parenchyme avec une densité beaucoup plus forte au niveau de l'épithélium intestinal (Fig.10. 1.A, B) et dans les appareils génitaux du mâle et de la femelle. Dans les testicules, la plupart des cellules contenant un gros noyau (qui pourraient être des spermatocytes immatures) sont fortement marquées au niveau du cytoplasme, la SmCaR n'est pas détectée dans les noyaux. Les cellules contenant un petit noyau condensé (présumées être des spermatocytes matures) sont aussi marquées (Fig.10. 1.C). Le sperme qui se trouve dans les organes génitaux de vers femelles est fortement marqué par l'Ac spécifique de la SmCaR. Chez les vers femelles, la SmCaR est abondante dans les cellules vitellines, les oocytes à différents stades de maturation (Fig.10. 1.D). Pour évaluer la réaction croisée entre la SmCaR et les tissus de l'hôte, les granulomes hépatiques de hamsters infectés ont été observés. On trouve une forte expression de SmCaR dans les cellules de l'oeuf de S.mansoni. Le tissu hépatique de hamster et les cellules inflammatoires présentes autour des oeufs sont dépourvus de marquage (Fig.10. 1.E). Aucun marquage n'a été observé sur les témoins négatifs des coupes correspondantes (Fig.10. 1F-J).

La colocalisation de la SmCaR et la Sm28 GST est étudiée chez les vers adultes. Les deux antigènes ont été détectés dans le parenchyme, les cellules parenchymateuses contenant un gros noyau semblent être marquées uniquement par l'Ac anti-SmCaR tandis que le marquage de la Sm28 GST dans les tubercules dorsaux est prédominant. Dans les cellules épithéliales intestinales, on ne détecte que de l'Ag SmCaR (Fig.10. 2A). Par contre, au niveau des appareils génitaux les deux protéines sont fortement exprimées avec des caractères de localisation différents: la Sm28 GST est exprimée fortement par les oocytes immatures, la SmCaR est détectée dans tous les stades de différenciation; le marquage des cellules vitellines est prédominant pour la SmCaR (Fig.10. 2B). Dans les testicules, les deux antigènes sont colocalisés dans les mêmes cellules (Fig.10. 2C). A plus fort grossissement, on observe que la SmCaR est préférentiellement localisée dans le cytoplasme et que la quantité de Sm28 GST est plus importante dans les noyaux (Fig.10. 2D).

Fig.10.1. Localisation histologique de la calréticuline dans les vers adultes et les oeufs de *S.mansoni*. Sur les coupes longitudinales de vers mâles (A) et femelles (B), la SmCaR est observée partout dans le parenchyme avec une densité beaucoup plus importante au niveau de l'épithélium intestinal (i) (flèches). (C) testicules. Un marquage intense de la SmCaR est observé dans le cytoplasme des cellules. Notons que les noyaux contre-colorés en bleu ne sont pas marqués. (D) Les organes génitaux d'un ver femelle. Les cellules vitellines (v) qui se trouvent dans le canal vitellin sont fortement marquées. La réaction positive est détectée aussi dans les oocytes contenus dans l'ovaire (o) et sur le sperme présent au niveau du réceptacle séminal (flèche). (E) Une coupe de granulome hépatique. Une grande quantité de SmCaR est exprimée par les cellules dans l'oeuf. Autour des oeufs, les cellules inflammatoires et les cellules hépatiques de l'hôte sont complètement dépourvues de marquage. (F) (G) (H) (I) (J) Des témoins négatifs corréspondant aux photographies du haut. (Echelles = 50μm pour A, B, D, E, F, G, I, J; 10μm pour C et H).



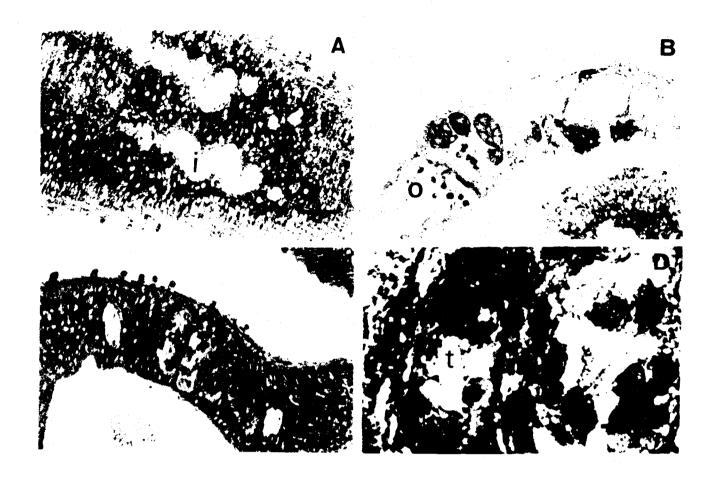
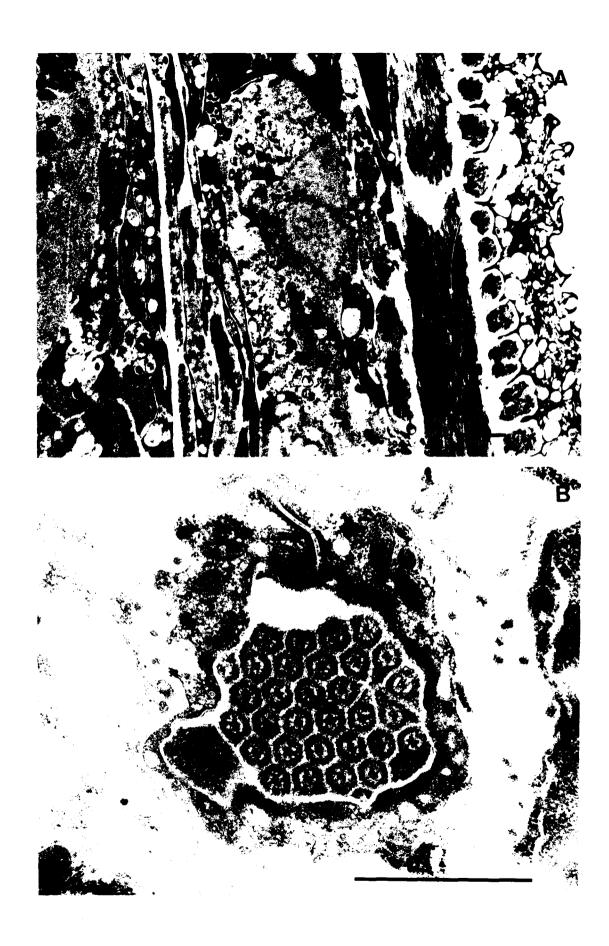


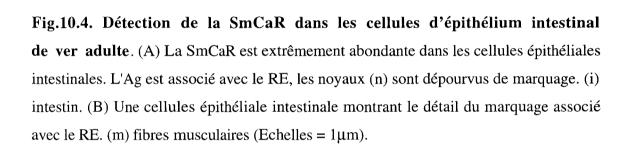
Fig.10.2. Double marquage de l'Ag Sm28 GST (en bleu) et la SmCaR (en rouge) sur les coupes de vers adultes de S.mansoni. (A) Une coupe d'un ver mâle. Les deux antigènes sont détectés dans le parenchyme, mais l'épithélium intestinal (i) est marqué uniquement par l'Ac de SmCaR. (B) Les organes génitaux femelles. Les cellules vitellines (v) sont fortement marquées par la SmCaR. On détecte des oogonies isolées exprimant la Sm28 GST. (C) Une coupe d'un ver mâle montrant que les deux antigènes sont détectés au niveau des testicules (t). (D) Une partie de deux testicules (t) montrant que les deux antigènes sont colocalisés dans les mêmes cellules, la coloration du cytoplasme est dominée par SmCaR (en rouge) et le noyau n'est coloré que par la Sm28 GST (en bleu). (Echelles = 50 μm pour A, B et C; 10 μm pour D).

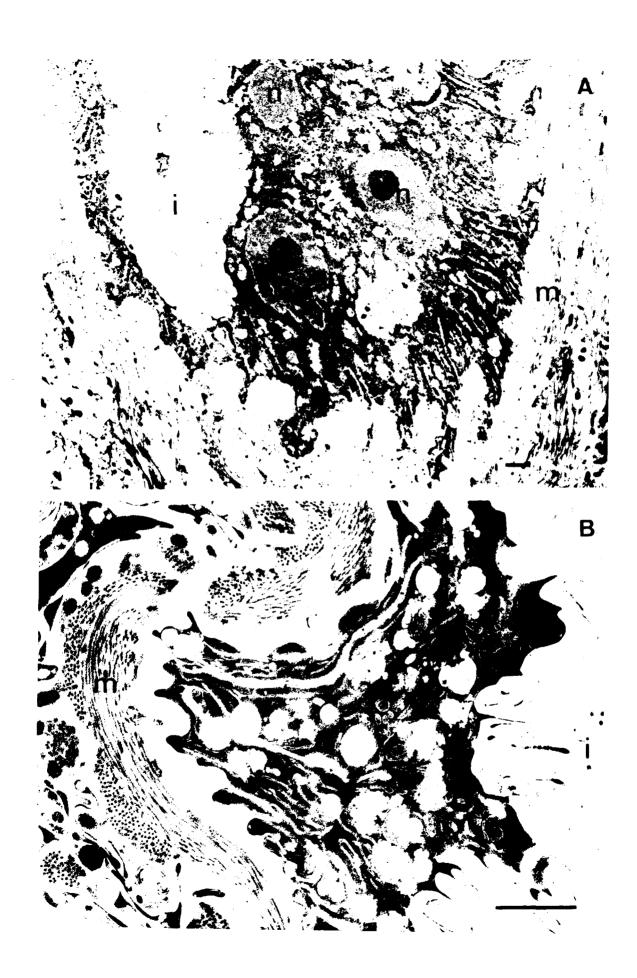
#### 3.2. Observation ultrastructurale

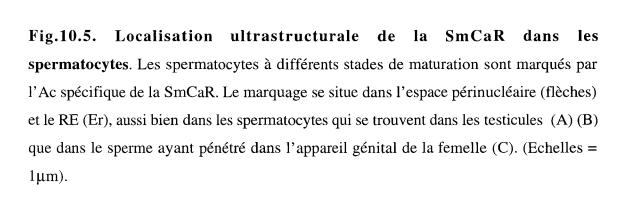
Dans le parenchyme, l'Ag SmCaR est dispersé partout dans le réseau cytoplasmique. Les grains d'or sont associés avec le réticulum endoplasmique (RE) des cellules parenchymateuses et parfois se trouvent dans l'espace périnucléaire. On observe aussi des vacuoles dans le cytoplasme contenant des matériels homogènes (qui pourrait être du réticulum dilaté) fortement marqué (Fig. 10. 3A). Dans les structures de protonéphrédie, les grains d'or sont toujours associés avec le RE; les flagelles des cellules flammes sont dépourvues de marquage (Fig.10. 3B). Contrairement à la Sm28 GST, la SmCaR est extrêmement abondante dans les cellules épithéliales intestinales. L'Ag est associé avec le RE, les noyaux sont dépourvus de marquage (Fig. 10. 4A. B.). La densité du marquage est forte et hétérogène au niveau des spermatocytes. Le marquage se situe dans l'espace périnucléaire et le RE, aussi bien dans les spermatocytes immatures que dans le sperme ayant pénétré dans l'appareil génital femelle (Fig.10. 5A, B, et Fig.10. 6.). Dans l'ovaire, les oocytes à différents stades de différenciation sont marqués (Fig.10. 7A). Comme dans le cas des autres organes, le marquage est aussi associé avec RE dans les cellules vitellines (Fig. 10. 7B) et les cellules épithéliales de l'ootype (Fig. 10. 8A). Aucun marquage n'a été trouvé dans le témoin négatif (Fig. 10. 8B).

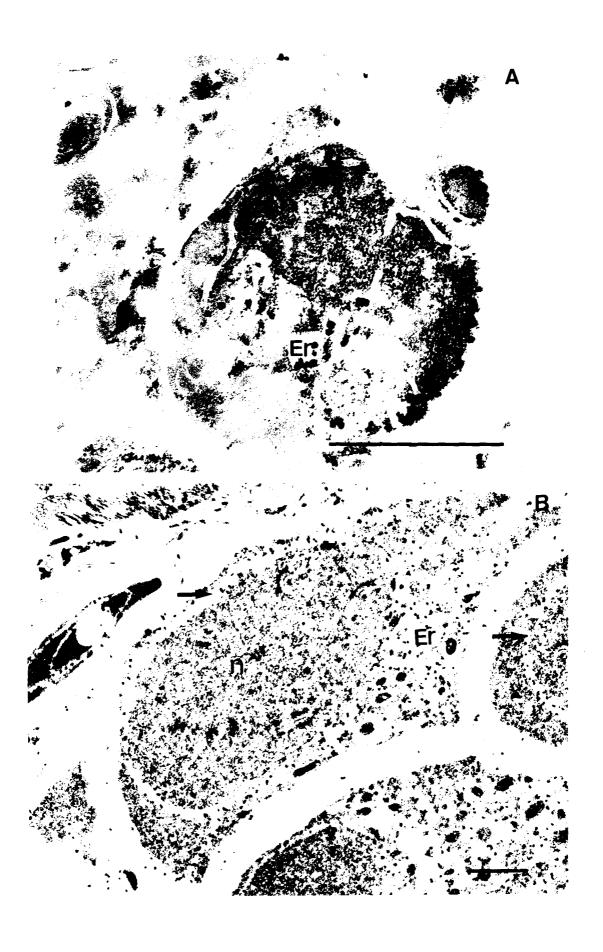
Fig.10.3. Localisation ultrastrucuralle de la SmCaR dans le parenchyme de ver adulte. (A) Sous les couches musculaires (m) négatives pour la SmCaR, les grains d'or sont associés avec des vacuoles cytoplasmiques contenant du matériel homogène (flèches). (B) Dans les structures des protonéphrédies, quelques grains d'or sont détectés dans les cellules tubulaires; les flagelles de cellules flammes (astérisque) sont dépourvues de marquage. (flèche) un desmosome entre les cellules tubulaires (Echelles =  $1\mu m$ ).

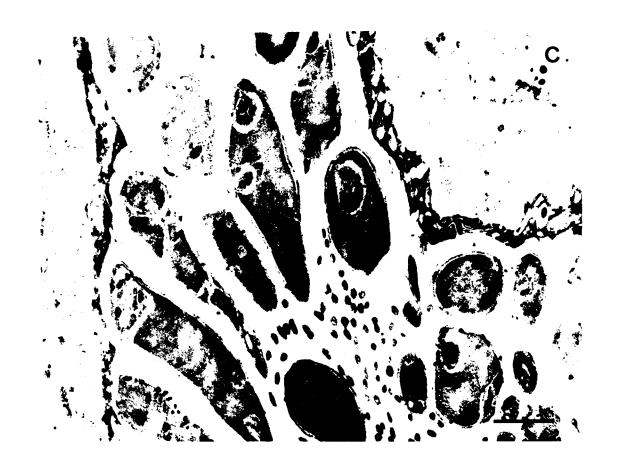


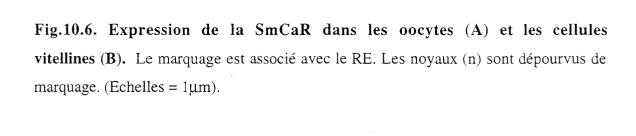




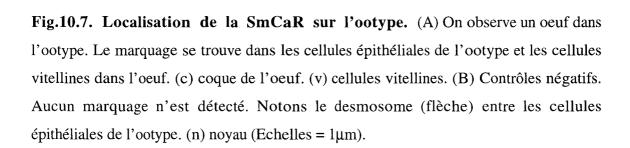


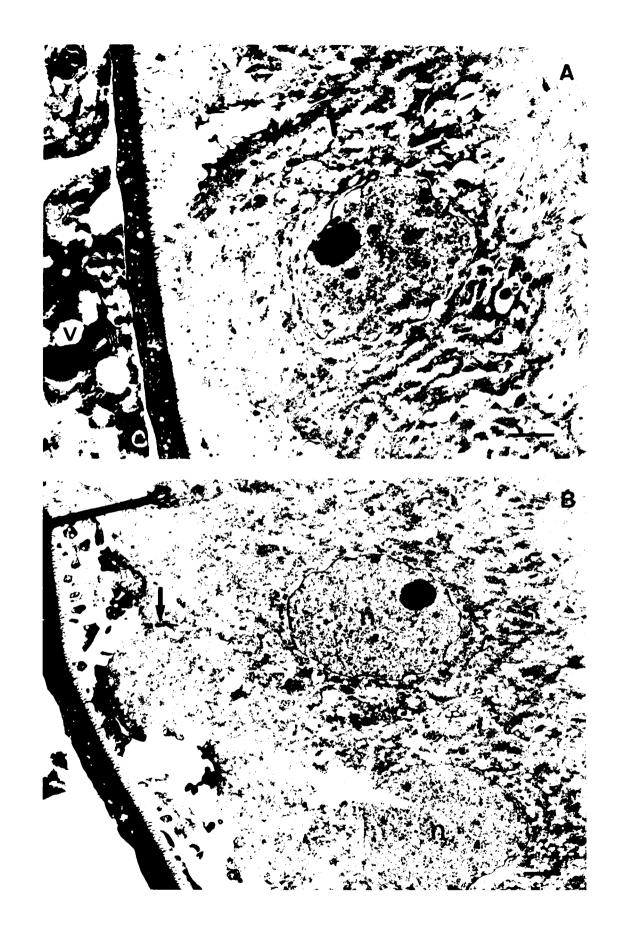








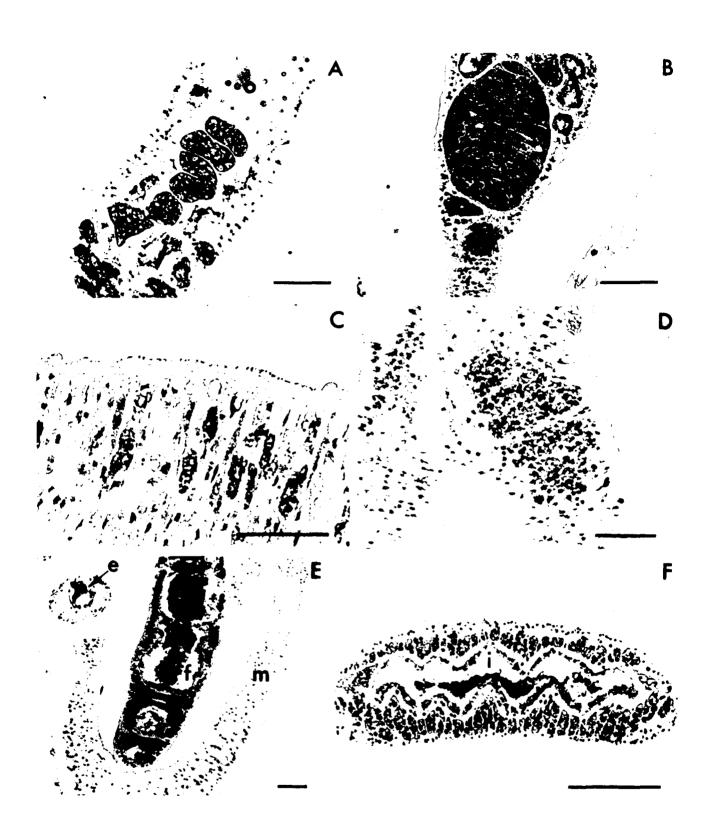




## 4. L'observation histologique de la localisation de la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase de S.mansoni (SmPHGSHpx)

Cette observation a été réalisée chez les vers adultes en utilisant l'Ac spécifique du peptide C-terminal de SmPHGSHpx. Seuls les vers femelles sont marqués. La réaction positive se trouve dans les cellules vitellines présentes dans les glandes vitellines, les canaux vitellins de femelles et dans les oeufs. Par contre, l'ovaire, l'utérus et l'ootype ainsi que les cellules parenchymateuses ne sont pas immunoréactifs (Fig.11. 1A, E). Aucune coloration non-spécifique n'a été observée dans les témoins négatifs (Fig.11. 1B, F). On trouve quelque fois des cellules vitellines dans le parenchyme des vers mâle qui est due à l'hermaphroditisme partiel (Erasmus et coll., 1987). La Fig.11. 1D montre que les testicules et le parenchyme de ver mâle n'exprime pas cet Ag, ce qui suggère que la SmPHGSHpx est une protéine spécifique de femelle et qu'elle est synthétisée par les cellules vitellines.

**Fig.11.** Localisation histologique de SmPHGSHpx dans les vers adultes de *S.mansoni*. (A) La SmPHGSHpx est localisée dans les cellules vitellines qui se trouvent dans les glandes vitellines (en bas à gauche) et le canal vitellin (vd). L'ovaire n'est pas marqué. (B) Contrôle négatif. (C) Les cellules vitellines (v) dans le parenchyme d'un ver mâle sont marquées par l'Ac spécifique de SmPHGSHpx. (D) Les testicules (t) et le parenchyme d'un ver mâle sont complètement dépourvus de marquage. (F) Un couple de vers adultes montrant la différence de marquage selon le sexe. Un oeuf (e) à l'intérieur de l'ootype montre une réaction positive. (f) femelle; (m) mâle. (F) Contrôle négatif d'un ver femelle. (i) intestin; (v) glande vitellines. (Echelles = 50μm).



# B. Analyse de la protection croisée induite par la Sb28 GST recombinante (rSb28 GST) dans l'infection par S. mattheei

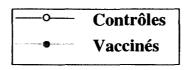
Le but de ce travail est d'une part d'évaluer l'efficacité vaccinale de la Sb28 GST dans un modèle d'infection hétérologue, et d'autre part d'étudier la réponse Ac spécifique de l'Ag Sb28 GST chez ces animaux ainsi que les mécanismes protecteurs induits par l'immunisation. La première partie du travail a été réalisée en Zambie (Jean De Bont, 1996). Ce chapitre concerne le second volet de ces travaux réalisés dans notre laboratoire.

#### 1. La réponse anticorps spécifique de Sb28 GST

La cinétique de la réponse Ac IgA et IgG spécifiques de Sb28 GST a été suivie chez les bovins infectés naturellement pendant 32 semaines après l'infection et pendant 10 semaines après l'infection pour les animaux infectés expérimentalement du fait de leur état sainitaire.

Les résultats obtenus par la méthode d'ELISA sont résumés dans la figure 12. L'immunisation par la rSb28 GST a induit une réponse Ac IgG intense après la première injection et cette réponse ne semble pas être amplifiée par le rappel. Dans le cas de l'infection expérimentale, cette réponse IgG spécifique atteint son maximum au jour de l'infection et reste stable jusqu'à la perfusion. Dans le cas de l'infection naturelle, on observe des fluctuations durant l'éxpérience et une baisse du taux d'IgG après la 16ème semaine de l'infection. Toutefois, le niveau de la réponse IgG spécifique est similaire dans les deux expériences pendant la période des 10 premières semaines.

La réponse IgA montre un profil différent de celui de la réponse IgG. Pendant la période d'immunisation, le signal observé est très proche du bruit de fond enregistré dans les groupes contrôles correspondant. Dans les groupes vaccinés, la réponse IgA spécifique de Sb28 GST est légèrement augmentée après l'infestation par *S.mattheei*. Dans l'infection expérimentale, le titre se stabilise 2 semaines après l'infestation et se maintient jusqu'à la 10ème semaine. Dans l'infection naturelle, une augmentation similiaire est observée jusqu'à la 10ème semaine, puis la réponse atteint à son maximum à la 20ème semaine après l'introduction des veaux dans la zone infectée et se maintient jusqu'à la fin de l'expérience.



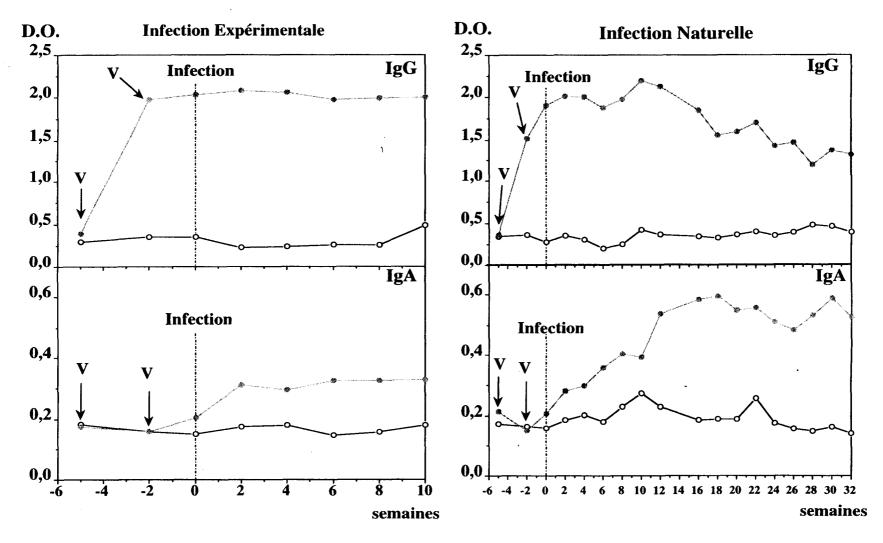


Fig.12. Etude cinétique de la réponse IgA et IgG spécifiques de Sb28 GST chez les bovins infectés par S.mattheei.

Les animaux non vaccinés ne présentent ni de réponse IgG ni de réponse IgA contre la Sb28 GST, même 32 semaines après l'exposition au parasite (infection naturelle), alors qu'il répondent vis-à-vis des antigènes de l'oeuf (SEA) du *S.mansoni* (résultat non présentés).

#### 2. Inhibition de la fonction enzymatique de l'Ag Sb28 GST

Les effets neutralisants des sérums de bovin sur l'activité glutathion-S-transférase de Sb28 GST ont été analysés par la méthode d'inhibition enzymatique. Les résultats (valeurs moyennes) sont présentés dans la figure 13. Dans les deux modes d'infection, l'analyse des échantillons sériques montre un puissant effet inhibiteur induit lors de l'immunisation, les niveaux d'inhibition sont comparables jusqu'à 10 semaine après l'infection. Dans l'infection naturelle, l'activité inhibitrice a pu être détectée jusqu'à la 32ème semaine de l'expérience chez les animaux immunisés. Les pourcentages de l'inhibition varient de 60 à 100%. Par contre, le sérum des animaux contrôles ne montrent pas d'inhibition significative.

### 3. L'analyse de la corrélation entre la réponse anticorps spécifique et l'inhibition de l'activité enzymatique de Sb28 GST.

Pour estimer la participation respective des IgA et IgG dans l'inhibition de l'activité catalytique de la Sb28 GST, une analyse statistique du coefficient de corrélation a été réalisée entre la réponse Ac (IgA et IgG) et le niveau de l'inhibition enzymatique correspondant pour chaque sérum de bovins. Les résultats sont présentés dans la figure 14. Dans l'infection expérimentale l'activité inhibitrice des sérums est associée à la réponse IgG jusqu'à la 4ème semaine d'infection, puis une association possible avec l'IgA est observée. Dans l'infection naturelle, malgré des fluctuations, l'activité inhibitrice est globalement liée avec la réponse spécifique IgA. Néanmoins, à certaines périodes, une association positive avec la réponse IgG a été observée. De plus, les valeurs de corrélation respectivement enregistrées pour les IgG et l'IgA fluctuent d'une manière opposée à certaines périodes.

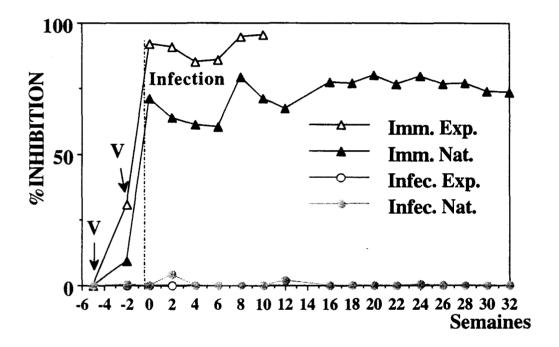


Fig.13. Inhibition de l'activité catalytique de la Sb28 GST par le sérum de bovins (expériences d'infection naturelle et expérimentale).

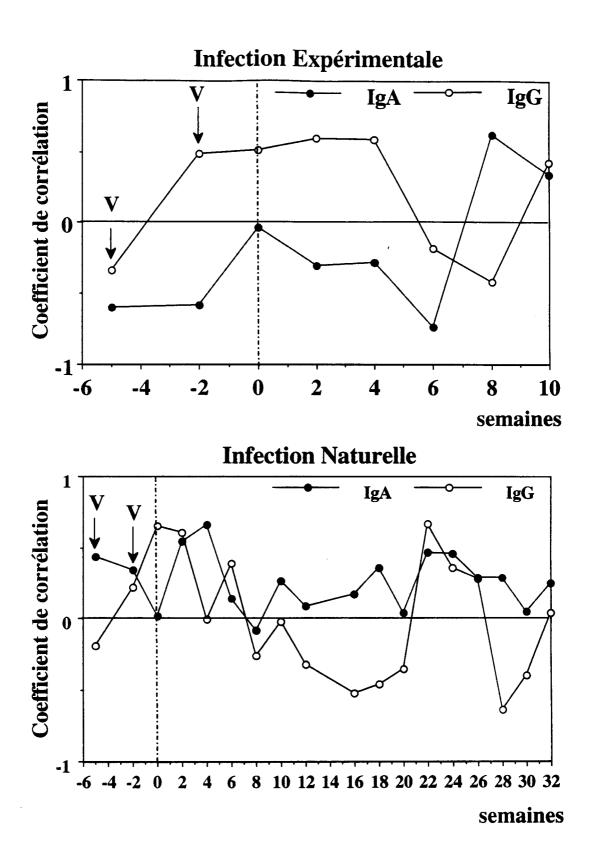


Fig.14. Analyse de la corrélation entre les réponses anticorps et les niveaux d'inhibition de l'activité catalytique de l'Ag Sb28 GST.

### 4. Etude des réactions croisées entre Sb28 GST et la 28 GST native de S.mattheei.

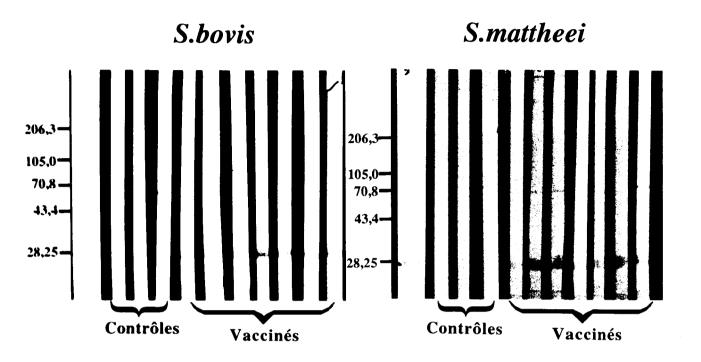
Pour comprendre la protection induite par la Sb28 GST, la présence des réactions croisée entre la Sb28 GST et la 28 GST native de *S.mattheei* a été approchée par la technique d'immuno-électrotransfert et d'inhibition enzymatique. En immuno-électrotransfert, les sérums de bovins immunisés par Sb28 GST avant l'infection par la *S.mattheei* reconnaissent aussi bien la 28 GST native de *S.mattheei* que la rSb28 GST (Fig.15), confirmant l'existence de la réaction croisée entre les deux antigènes. Aucun des deux antigènes n'est reconnu par les sérums contrôles.

D'autre part, les même sérums de bovins immunisés induisent des taux comparables d'inhibition de l'activité catalytique de rSb28 GST et la 28GST native de *S. mattheei*, alors aucune inhibition significative n'est induite par les sérums de bovins non-immunisés (Fig. 16).

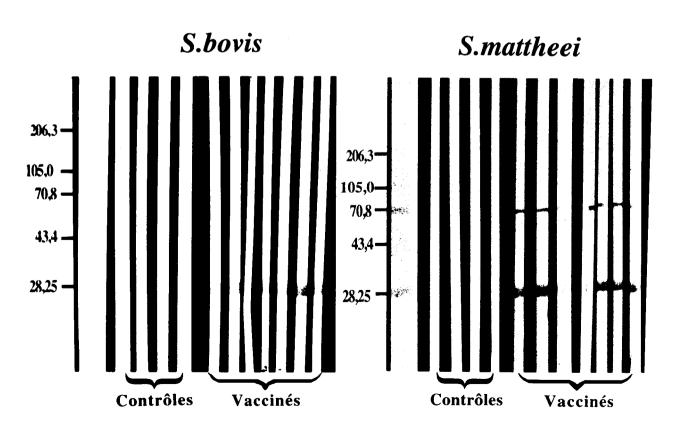
#### Fig.15: Immuno-eléctrotranfert des sérums de bovins immunisés

La rSb28GST ou la 28GST native de *S. mattheei* a été déposée sur un gel SDS-PAGE à 13% puis électrotransférée sur la nitrocellulose. Les bandes sont incubées en présence de sérum de bovins immunisés ou contrôles, puis un Ac monoclonal de souris dirigé contre l'IgG de bovin. La révélation des immuncomplexes est ralisée par l'Ac de lapin dirigé contre les IgG de souris couplés à la peroxydase.

### Infection Expérimentale



#### **Infection Naturelle**



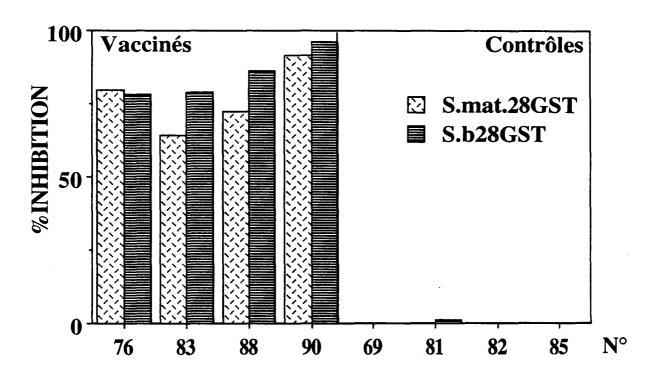


Fig.16. Etude comparative de l'inhibition enzymatique induite par les sérums de bovins vis-à-vis les antigènes Sb28 GST et 28GST native de S.mattheei.

### C. Etude comparative des fonctions inhibitrices des anticorps sériques et des sécrétions lactées sur l'activité enzymatique de l'antigène Sm28 GST

### 1. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inhibitrice dans les sérums de truies

Les prélèvements sanguins réalisés trois semaines après la première injection, 15 jours après le rappel et au moment de la parturition sont testés en ELISA et en inhibition enzymatique sur la Sm28 GST.

Les résultats présentés dans la figure 17 montre que les truies immunisées par la Sm28 GST produisent des IgG et des IgA mais pas d'IgM spécifiques dirigées contre l'Ag Sm28 GST. Les deux truies montrent une forte réponse en IgG, alors qu'une truie présente une intense réponse IgA. Les taux des Ac baissent au moment de la parturition.

En inhibition enzymatique (Fig.18), les sérums de truies immunisées inhibent significativement l'activité catalytique de la Sm28GST par rapport aux contrôles.

### 2. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inhibitrice dans les sécrétions lactées de truies

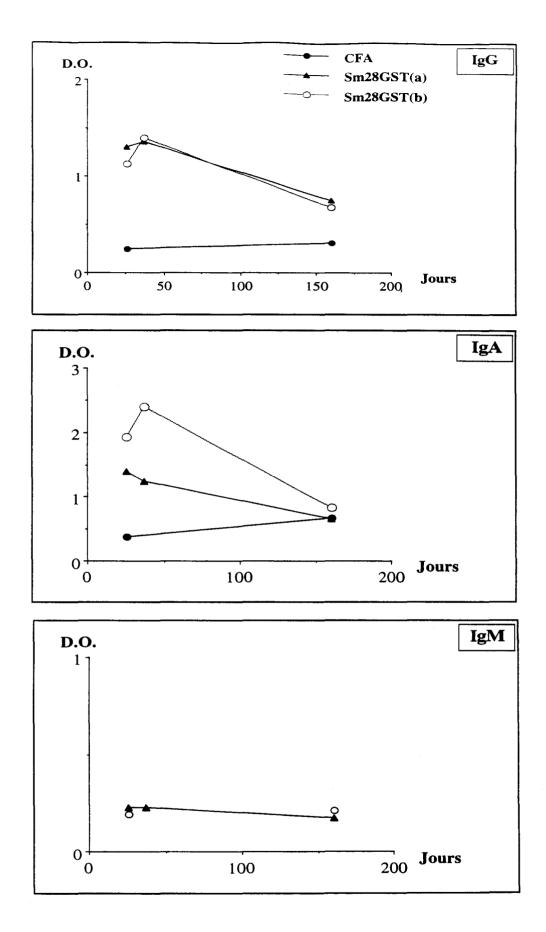
L'étude cinétique des réponses Ac dans les colostrums et les laits de truies est illustrée dans la figure 19.

Le niveau des IgG spécifiques est élevé dans les sécrétions lactées chez les deux truies immunisées au moment de la parturition puis chute rapidement après 24h. Une réponse IgA a été détectée chez la truie qui présente une forte réponse sérique en IgA après la parturition qui décroît ensuite. Cette truie présente aussi une faible réponse d'IgM.

Les colostrums présentant une forte réponse en Ac spécifiques de l'Ag Sm28 GST inhibent l'activité de cet Ag. Paralellement au taux des Ac spécifiques, le pourcentage d'inhibition chute au cours de l'expérience (résultat non présenté).

## 3. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inhibitrice des sérums de porcelets

La figure 20 montre la réponse Ac des porcelets nés de ces truies. Chez les porcelets nés de truies immunisées, une forte réponse IgG a été détecté au moment de la naissance, cette réponse baisse graduellement et se maintient à un certaine niveau jusqu'à un mois



**Fig. 17.** Etude des réponses anticorps spécifiques de l'Ag Sm28 GST par les sérums de truies: analyse des différents isotypes (les sérums sont dilués pour les tests : IgG-1/1000; IgA-1/250; IgM-1/200).

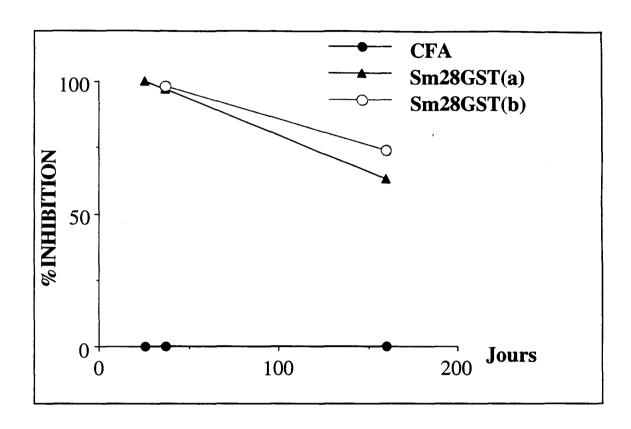


Fig. 18. L'effet inhibiteur des sérums de truies immunisées sur la fonction catalytique de l'Ag Sm28 GST.

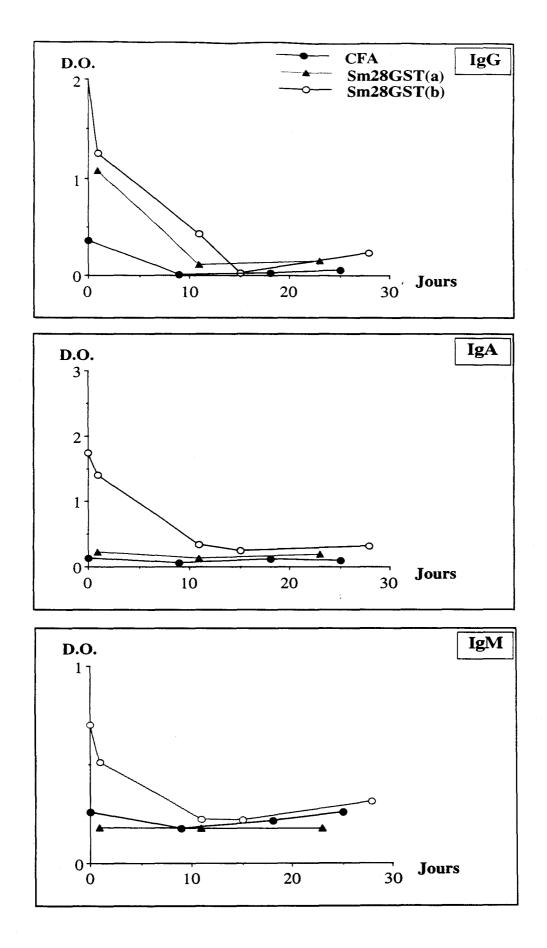
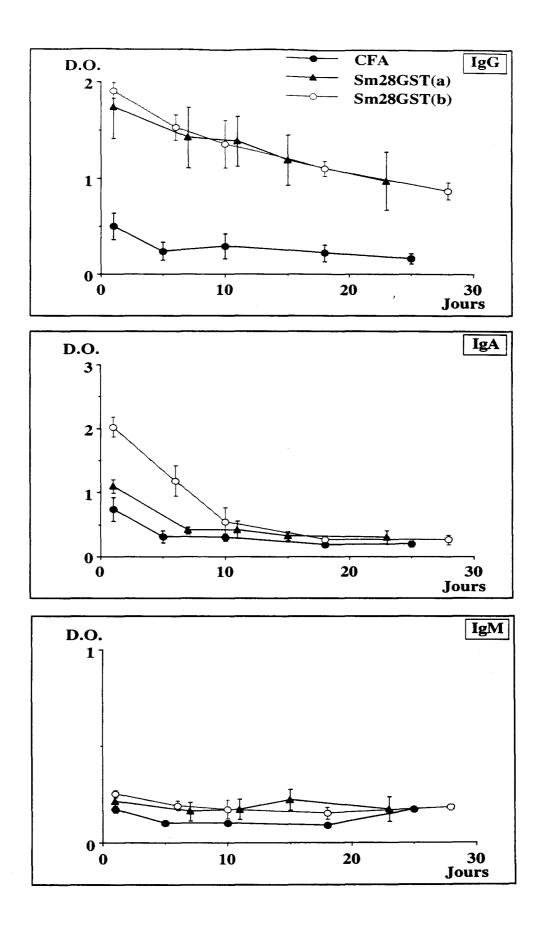


Fig. 19. Etude des réponses anticorps spécifiques de l'Ag Sm28 GST dans les laits de truies (les laits sont dilués pour les tests : IgG-1/2500; IgA-1/250; IgM-1/200).



**Fig. 20.** Etude des réponses anticorps spécifiques de l'Ag Sm28 GST dans les sérums de porcelets nés de truies immunisées ou contrôle (les sérums sont dilués pour les tests : IgG-1/1000; IgA-1/250; IgM-1/200; Bars=SEM; CFA(n = 6); Sm28GST(a) (n =8); Sm28GST(b) (n=6)).

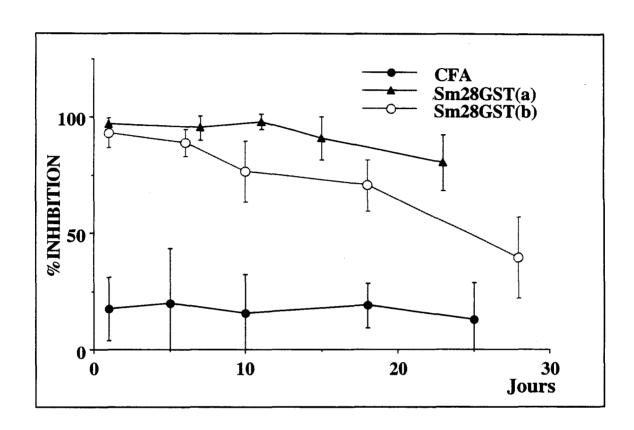
après la naissance. Un haut niveau de réponse en IgA est détecté chez les porcelets nés de la truie présentant une forte réponse en IgA. Aucune réponse IgM n'est détectée par rapport aux témoins.

Ces sérums révèlent d'autre part une fonction inhibitrice sur l'activité enzymatique de la Sm28GST qui diminue avec le niveau de la réponse Ac (Fig.21).

#### 4. Abolition de la fonction inhibitrice

Pour étudier la participation des différents isotypes d'Ac dans l'inhibition de la fonction enzymatique de la Sm 28 GST, des déplétions séléctives en IgG ont été tentées par passage sur la sépharose 4B couplée à la protéine A. Un lait de truie immunisée prélevé 24 h après la parturition ainsi qu'un témoinsont été traités dans ces conditions. Avant le traitement le lactosérum de truie immunisée inhibe fortement la fonction enzymatique de la Sm28 GST. La fraction retenue sur la colonne présente le même niveau d'inhibition, alors que la fraction épuisée ne possède plus de fonction inhibitrice. Aucune inhibition n'a été obtenue pour les différentes fractions du lait contrôle (Fig.22).

L'analyse par la technique d'ELISA indique que le lactosérum de la truie immunisée contient des IgA et IgG spécifiques, contrairement à la fraction épuisée. Par contre, la fraction retenue sur la colonne contient les 2 isotypes. Ce traitement par la protéine A n'a pas permis de séparer les isotypes IgG et IgA (Fig.23).



**Fig. 21.** Inhibition de la fonction catalytique de la Sm28 GST par les sérums de porcelets nés de truies contrôles ou immunisées par l'Ag Sm28 GST (Bars = SEM; CFA(n = 6); Sm28GST(a) (n = 8); Sm28GST(b) (n=6)).

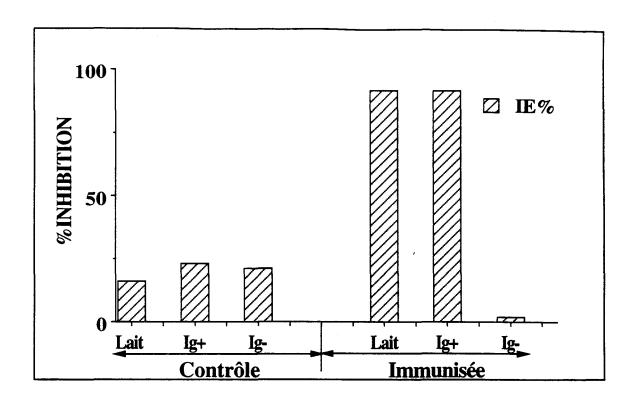


Fig. 22. Inhibittion de l'activité catalytique de la Sm28 GST par les différentes fractions de colostrum de truies avant et après le traitment par la protéine A. Lait = colostrum avant le traitement; Ig+ = fraction retenue par la protéine A; Ig- = fraction épuisée.

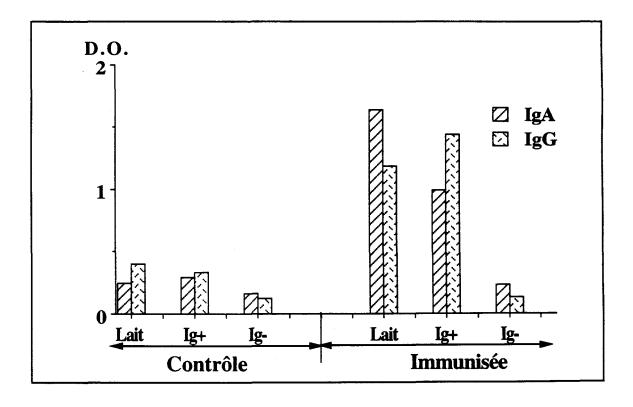


Fig.23. Analyse des différentes fractions obtenues à partir des laits de truies sur la protéine A.

### **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Les travaux expérimentaux que nous avons développés au cours de notre thèse s'inscrivent dans un vaste programme de recherche de vaccins contre les schistosomiases. La découverte de l'antigène Sm28 GST et la démonstration de son rôle protecteur dans divers modèles expérimentaux nous ont incités à étudier les mécanismes de la protection. Parallèlement, d'autres travaux ont été consacrés à la caractérisation d'autres molécules parasitaires à potentialités protectrices permettant le développement de vaccin "multifactoriel". C'est dans cet esprit que ce travail a été réalisé en collaboration avec différents groupes de recherche de notre unité.

### 1. L'analyse de la localisation de différents antigènes de S.mansoni

Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, plusieurs Ags de la *S.mansoni* ont été caractérisés dans notre laboratoire. Ils ont été ensuite clonés et exprimés dans différents vecteurs viraux, bactériens ou dans des cellules eucaryotes. La localisation de ces molécules dans les différents stades du parasite nous a donné de précieuses indications sur leur fonctions biolologiques chez le schistosome et ont ouvert des nouvelles voies de recherche.

#### La Sm28 GST

Deux raisons nous ont conduits à entreprendre l'étude de la localisation ultrastructurale de la Sm28 GST chez les vers adultes de *S.mansoni*: la première est liée à sa potentialité vaccinale qui nécessite une meilleur compréhension de son rôle biologique et des éléments sur les mécanismes de protection qu'il induit; la deuxième raison repose sur les divergences concernant la localisation de cet antigène rapportées par différents groupes de recherche (Taylor et coll., 1988; Holy et coll., 1989, Porchet et coll., 1994).

En utilisant la technique d'immunohistochimie et de la microscopie électronique, nous avons identifié la Sm28 GST au niveau du tégument, dans le parenchyme, les organes génitaux de vers mâle et femelle ainsi que dans l'épithelium de l'oesophage.

L'antigène étant dispersé ou concentré au niveau du tégument suggère que cette protéine peut être exportée du parasite. Les concentrations d'Ag observées dans le tégument indiquent qu'il est en phase d'excrétion. L'antigène dispersé peut être libéré avec le tégument constamment relargué dans l'environnement par le parasite (Kusel et Mackenzie, 1975). Ceci permet un contact direct de la Sm28 GST avec le système

immunitaire de l'hôte : le tégument constamment relargué par le parasite pourrait être phagocyté par les macrophages puis digéré et présenté aux lymphocytes, ce qui explique l'existence des Acs spécifiques de la Sm28 GST chez les sujets infectés.

Dans le parenchyme, les deux types de cellules musculaires initialement décrits par Reissig et coll. (1970), les cellules tubulaires et une sous-population des cellules sous tégumentaires sont marquées. Cette localisation parenchymateuse des GSTs a été aussi rapporté pour *Fasciola hepatica* (Salvator et coll., 1992).

L'expression de la Sm28 GST dans les organes génitaux a été caractérisée dans les cellules germinales des deux sexes, les cellules vitellinés de femelle et les cellules sustentaculaires dans les testicules. Dans les spermatocytes, les cellules vitellines, et surtout dans les oocytes, la Sm28 GST est exprimée abondamment dans les cellules non différenciées ou immatures. L'intensité de la coloration diminue durant la maturation ou la différenciation cellulaire suggérant un abaissement de l'expression de cette protéine. Il est intéressant de noter que dans les oocytes matures peu d'Ag est détecté, alors que dans le cas de l'oocyte fertilisé et contenu dans l'oeuf, l'expression de la Sm28 GST est augmentée, surtout au niveau du noyau. Cette observation suggère que l'expression de la Sm28 GST peut être liée à la prolifération cellulaire et / ou à la synthèse protéique. Des observations similaires ont été rapportées dans les tissus humains et plus particulièrement dans l'ovaire, où le marquage pour le GST Pi est intense dans les follicules primaires mais varie dans les follicules aux cours de leur maturation. Dans le foie foetal, la quantité de GST Pi décroît au début de la gestation et cette enzyme est faiblement exprimée à terme (Hiley et coll., 1988). Dans l'épithélium malpighien, l'intensité du marquage pour les GST est plus forte dans les couches inférieures contenant des cellules moins matures par rapport à celle dans les couches superficielles où se trouvent les cellules matures (Terrier et coll., 1990).

Le fait que l'ootype est fortement marqué et que le marquage a été observé sur la coque de l'oeuf indique la participation possible de cet Ag dans la formation de l'oeuf.

Au niveau ultrastructural, le même type de localisation a été enregistré dans toutes les cellules positives pour la marquage de la Sm28 GST. Cet Ag est distribué dans toute la cellule avec une densité plus forte dans le noyau par rapport au cytoplasme. Aucune association spécifique avec les organelles cellulaires n'a été observée. Ce type de localisation a été rapporté pour les GSTs humaines (Terrier et coll., 1990). Les cellules contenant de l'hétérochromatine considérée comme des cellules en état de division sont plus marquées que celles contenant de l'euchromatine. Ceci indique une fois de plus que

- (2) L'expression dans les cellules reproductrices de cette enzyme apporte une base moléculaire à l'effet observé *in vitro* et *in vivo* sur la réduction de la ponte (Boulanger et coll., 1994; 1995; Xu et coll., 1991; 1993). Toutefois, il est difficile à l'heure actuelle d'expliquer l'effet neutralisant des Acs spécifiques sur la Sm28 GST si l'on tient compte de la localisation interne de cet antigène. Une possibilité serait que les Acs fixés à la surface des spermatozoïdes pénétrant dans la femelle pourraient perturber les processus de fertilisation.
- (3) Le marquage intense observé dans l'ootype suggère la participation de cet Ag dans la formation de l'oeuf. Ceci pourrait expliquer la réduction de la viabilité de l'oeuf qui serait la conséquence d'un dommage fonctionnel de cet organe induit par le blocage de la Sm28 GST. En effet des oeufs malformées ont été observés dans des expériences de vaccination par la Sm28 GST (Boulanger et coll., 1991). La réduction de la viabilité de l'oeuf pourrait être liée à la fixation des Acs spécifiques sur l'Ag Sm28 GST libéré par les oeufs à travers la coque (Porchet et coll., 1994) qui limiterait les processus de détoxification essentiels pour la survie de l'embryon et l'éclosion de l'oeuf. En effet, il a été rapporté qu'un Ac monoclonal spécifique de l'Ag Sm28 GST possédant des fonctions inhibitrices sur l'activité catalytique de l'Ag est capable *in vitro / in vivo* de réduire la ponte et l'éclosion de l'oeuf (Xu et coll., 1991).
- (4) En dehors des effets directs, on peut aussi envisager l'hypothèse que la réponse immune pourrait avoir des effets délétères sur le métabolisme du jeune schistosome en perturbant sa maturation sexuelle. Dans le schistosome, la fonction de reproduction est très sensible à toutes sortes de stress physiologiques, la réduction de la ponte serait la première réaction du schistosome à la réponse immune de l'hôte dirigée contre la Sm28 GST. Ces différentes possibilités restent encore à clarifier.

Nos observations ont partiellement réconcilié les résultats contradictoires qui ont été rapportés précédemment. Les différences pourraient aussi être liées à la souche du parasite puisque nous avons utilisé une souche de la Guadeloupe de *S.mansoni*, alors que les études effectuées auparavant impliquaient une souche Porto Ricaine. Il serait intéressant d'entreprendre une étude comparative de la localisation de l'Ag Sm28 GST dans différentes souches de ce parasite.

alors préférentiellement détecté dans les noyaux des cellules chez lesquelles il est exprimé en grande quantité. La détection des ARN messager in situ (par les techniques de PCR in situ ou d'hybridation in situ) pourrait apporter des renseignements supplémentaires. D'autre part, une amélioration des techniques de détection de protéine in situ pourrait être envisagée.

Des révélations intéressantes ont été obtenues en analysant le marquage des cellules reproductrices chez les vers adultes. Dans les organes génitaux de la femelle, une augmentation de la densité du marquage pour SmNF-YA a été observée au cours de la maturation de l'oocyte. Ceci est en accord avec l'observation réalisée chez le xénope où la présence de NF-Y est corrélée avec l'expression constitutive des gènes dans l'oocyte alors que cette expression est inductible dans les cellules somatiques (Landsberger et Wolfe, 1995). La présence de SmNF-YA en grande quantité dans ces cellules pourrait suggérer l'importance de ce facteur dans le développement éventuel de l'embryon. En effet, il a été démontré dans d'autres espèces que les oocytes matures ne sont pas actifs au niveau de la transcription, mais qu'ils contiennent tous les éléments essentiels pour déclencher ce processus au moment nécessaire dans le programme de développement. Dans ce contexte, on peut supposer que SmNF-YA présent dans les oocytes matures joue un rôle essentiel dans la transcription de nombreux gènes (Landsberger et Wolfe, 1995). Cette hypothèse est supportée par les rapports récents démontrant la potentialité du complexe NF-Y dans la transcription en jouant un rôle architectural (Ronchi et coll., 1995) en coordination avec d'autres facteurs (RFX, HSF) et les protéines de la chromatine (Wright et coll., 1995; Landsberger et Wolfe, 1995; Reith et coll., 1994). Le fait que l'intensité de l'expression de SmNF-YA décroisse au cours de la maturation des spermatocytes reste en accord avec cette idée.

Finalement, nous avons tenté de corréler l'expression de SmNF-Y avec celle des protéines codées par des gènes contenant des boîtes fonctionnelles CCAAT dans leur région promotrice. Un double marquage a été effectué pour SmNF-YA et Sm28 GST. Les résultats de cette expérience n'ont indiqué aucune corrélation directe entre l'expression de ces deux protéines. Par exemple, dans les cellules épithéliales intestinales, une réaction positive a été observée avec l'Ac spécifique de SmNF-YA alors que ces cellules montrent une réaction négative pour l'Ag Sm28 GST. Ces résultats sont surprenants puisque NF-Y est impliqué dans la régulation des gènes. L'absence de l'expression de la Sm28 GST dans les cellules contenant des quantités abondantes de NF-Y peut être expliquée de plusieurs façons : la première explication implique l'existence

d'un (de) facteur(s) de régulation négatif(s) dans ces cellules (Diamond et coll., 1990); la deuxième hypothèse évoque l'absence de synergie entre les facteurs de transcription et les promoteurs nécessaires pour la transcription du gène de Sm28 GST. En effet, l'analyse fonctionnelle du promoteur complet de Sm28GST a révélé la présence d'autres séquences régulatrices impliquées dans ce processus (Serra et coll., communication personnelle). Finalement, il est important de mentionner que la détection des ARN messagers du gène serait probablement plus adaptée à l'étude des relations qui existent entre l'expression des gènes codant pour la SmNF-YA et la Sm28 GST.

En conclusion, ce travail a confirmé la distribution relativement large de NF-Y dans le parasite *S.mansoni*. Dans cette expérience, la technique de double marquage n'a pas donné les résultats attendus. Néanmoins, il reste encore possible que cette technique puisse être utile et applicable avec succès à l'étude des gènes régulés par des facteurs plus spécifiques.

#### La calréticuline du S.mansoni (SmCaR)

Les techniques d'immunohistochimie sur les vers adultes montre une vaste distribution de la SmCaR dans le parasite avec une concentration plus importante aux niveaux de l'épithélium intestinal, des testicules, de l'ovaire et des glandes vitellines. L'abondance de cette protéine pourrait être liée à une surexpression de la molécule dans ces tissus. Néanmoins, elle pourrait aussi être expliqué par une surexpression du récepteur spécifique membranaire de la séquence HDEL, puisque la SmCaR contient la séquence HDEL qui pourrait être piégée par ce récepteur. Quelle que soit l'explication, l'expression de la SmCaR aux niveaux de l'épithilium digestif et des organes génitaux suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la digestion et la reproduction du parasite. Il a été rapporté dans les cellules NK humaines que la calréticuline est colocalisée avec la perforine, enzyme cytolytique. La fonction de stockage du calcium de calréticuline est indispensable pour la fonction enzymatique des perforines (Dupuis et coll., 1993). Une situation similaire existe au niveau de l'épithélium intestinal de S.mansoni où les globules rouges sont lysés par les enzymes. La calréticuline localisée à ce niveau jouerait un rôle important dans la digestion, en contrôlant la concentration de calcium qui est indispensable pour l'activation des enzymes protéolytiques.

Du fait que la Sm28 GST a été détectée dans les cellules reproductrices de deux sexes, il était intéressant d'étudier la colocalisation de ces deux protéines. Le double marquage démontre que ces deux molécules sont exprimées par les mêmes cellules, mais avec des

caractéristiques différentes : au niveau de l'ovaire, contrairement à la Sm28 GST, l'intensité du marquage pour la SmCaR augmente durant la maturation de l'oocyte. Dans les cellules positives la SmCaR a été détectée dans le cytoplasme alors que le noyau semble être marqué uniquement par l'Ac spécifique de la Sm28 GST. Cette observation nous a conduits à l'étude de la localisation ultrastructuralle de la SmCaR dans le ver adulte de S.mansoni.

Confirmant l'observation optique, la SmCaR a été détectée par la microscopie électronique dans les cellules parenchymateuses, les cellules de l'épithélium intestinal, les cellules germinales de deux sexes, l'ootype et les cellules vitellines du ver femelle. Au niveau ultrastructural, la SmCaR est associée au RE dans tous les types de cellules positives, ceci est en accord avec la localisation de la calréticuline décrite chez d'autres espèces animales (Michalak et coll., 1992) et le résultat du séquençage de la SmCaR. Il a été décrit que la SmCaR, comme les calréticulines d'autres espèces, contient la séquence consensus HDEL, un signal de rétention dans le RE (Khalife et coll., 1993a). Par contre, la SmCaR n'a jamais été détecté dans le noyau malgré la présence de la séquence PPKKIKDDP, qui semble être un signal de ciblage nucléaire pour d'autres protéines nucléaires (Khalife et coll., 1994). L'absence de la SmCaR au niveau de noyau n'exclu pas sa possibilité de contrôler l'expression des gènes, puisque l'interaction avec le récepteur nucléaire via la fixation sur la séquence peptidique KXGFFKR pourrait bien avoir lieu dans le cytoplasme. L'étude de l'interaction entre la SmCaR et des récepteurs nucléaires est en cours de réalisation (Khalife et coll., communication personnelle).

L'étude immunohistochimique sur des coupes de foie de hamsters infectés par S.mansoni, a révélé un marquage intense pour la SmCaR dans l'oeuf. Bien que la SmCaR présente une homologie importante avec la calréticuline de mammifère, les tissus de l'hôte ne présente aucun marquage pour la SmCaR. Ceci pourrait s'expliquer soit par l'absence de réaction croisée entre la SmCaR et la calréticuline de hamster, soit par la quantité trop faible exprimée par les cellules de l'hôte. La technique d'immuno-électrotransfert pourrait donner une réponse claire à cette question.

La détection de la SmCaR dans S.mansoni par l'analyse en 'immuno-électrotransfert a révélé que cette molécule est exprimée dans tous les stades du parasite, mais que l'intensité du signal diffère pour une même quantité de protéines déposée (Khalife et coll., 1994). Ceci suggère que l'expression de cette molécule varie durant le développement du parasite. Il est intéressant de noter que la quantité de SmCaR exprimée est relativement faible dans le schistosomule, stade où la division cellulaire marque une pose.

Inversement, des observations sur les cellules T humaines ou murines montrant une expression abondante de la calréticuline après la stimulation par l'Ac spécifique de CD3 (Buens et coll., 1992) indiquent une association possible entre l'expression de cette protéine et la prolifération cellulaire.

Les indications sur les fonctions biologiques de la SmCaR obtenues par nos études soulèvent des questions sur l'utilisation possible de cet Ag dans la stratégie vaccinale. Des expériences *in vitro* montre que l'incubation des sérums de rat immunisé par la SmCaR en présence de macrophages de rat sain aboutit, à la mort du schistosomule. Cependant, la potentialité vaccinale de cette protéine n'a pas été prouvée *in vivo*. Néanmoins, on pourrait envisager l'utilisation d'antagoniste de cette protéine qui en inhibant l'expression de cette protéine pourraient perturber la biologie du parasite et avoir des effets thérapeutiques sur l'infection.

#### La phospholipide hydropéroxyde glutathion péroxydase de S. mansoni

La technique d'immunohistochimie a démontré l'expression de la SmPHGSHpx uniquement dans les glandes vitellines et l'oeuf dans les femelles ainsi que dans les cellules vitellines localisées dans le parenchyme de quelques mâles suite à un phénomène d'hérmaphrodisme.

L'investigation par immunoélectrotransfert montrant la présence de cette protéine à différents stades du parasite a confirmé ce résultat : la protéine est présente dans l'oeuf et est essentiellement retrouvée chez les femelles et absente dans les cercaires qui ne possèdent pas de cellules vitellines (Roche, 1995).

En revanche, l'exploration de la présence d'ARNm spécifique indique l'existence du messager à un taux comparable à celui observé dans l'oeuf, dans la cercaire et dans l'adulte, suggérant un mécanisme de régulation post-transcriptionnel (Roche, 1995).

Les cellules vitellines se multiplient et se différencient dans les glandes vitellines. Lors de la maturation, elles quittent la glande, migrent dans le canal vitellin et rejoignent l'oocyte fécondé avant d'entrer dans l'ootype. Les cellules vitellines relarguent les granules contenant des MPC (Matériels Précurseur de la Coque) et participent ainsi à la formation de la coque de l'oeuf, puis restent à l'intérieur de l'oeuf et assurent le développement éventuel de l'embryon (Erasmus, 1987).

La localisation de SmPHGSHpx, la séquence de cette molécule et les fonctions de PHGSHpx chez d'autres espèces ont donné des indications sur le rôle biologique de cette

molécule.

Du fait que la PHGSHpx intervient dans les processus de réduction des dérivés hydroperoxydes de lipide, on peut supposer que sa présence dans les cellules vitellines participe à la maintenance des structures membranaires dans un environnement hautement oxydatif à l'intérieur de l'ootype.

La localisation de SmPHGSHpx dans les cellules vitellines de *S.mansoni* rappelle les observations chez le rat où la PHGSHpx a été retrouvée à un taux élevé dans les testicules uniquement après la puberté et est régulée par les gonadotropines (Roveri et coll., 1992). Ces résultats indiquent la dépendance hormonale de l'expression de PHGSHpx.

La recherche des éléments régulateurs sur le gène codant pour la SmPHGSHpx, en particulier des séquences consensus impliquées dans l'expression contrôlée par des hormones, a démontré la présence d'un élément de réponse monomérique pour l'oestrogène (5'GGTCAA-3'). En général, deux séquences sont nécessaires pour assurer leur fonctionalité (Laudet et Stehelin, 1992); néanmoins des récepteurs "orphelins" ont été rapportés comme monomères capables de se fixer sur l'ADN (Laudet et Adelmant, 1995). L'existence de séquences semblables à celles impliquées dans la liaison des récepteurs hormonaux nucléaires dans le gène *SmPHGSHpx* et l'absence de sites AP-1 impliqués dans la réponse à un stress oxydatif, laissent supposer que l'expression de la SmPHGSHpx est sous contrôle hormonal (Roche, 1995) et que cette protéine est impliquée probablement dans la reproduction du schistosome, mais pas dans la défense contre le stress oxydatif. Des éléments de réponse à ces questions peuvent être fournis par le traitement des vers avec des inhibiteurs d'hormones stéroïdiennes, tels que le tamoxifène, et la mesure de l'expression de la SmPHGSHpx.

Quant à la potentialité vaccinale de la SmPHGSHpx contre la schistosomiase, l'évaluation du pouvoir immunogène du peptide C-terminal a donné des résultats encourageants : 57% des sérums humains infectés par *S.mansoni* présentent des Acs dirigés contre ce peptide. Si ce résultat se confirme par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons, on pourrait envisager de réaliser des études de protection avec cet Ag. Si la SmPHGSHpx est effectivement impliquée dans la reproduction du parasite, l'association avec la Sm28 GST pourrait renforcer l'effet anti-fertilité de ce dernier.

# 2. La protection croisée induite par la Sb28 GST contre l'infection par S. mattheei dans l'infection naturelle

Dans l'expérience d'immunisation par la Sb28 GST chez les bovins infectés naturellement par *S.mattheei*, les résultats parasitologiques montrent une réduction de la charge parasitaire de vers femelles (50%) et 93% de la viabilité des oeufs fécaux. Par contre aucune protection n'a été obtenue chez les bovins immunisés et infectés expérimentalement (De Bont, 1996). L'analyse de la réponse Ac spécifique de la Sb28 GST a démontré la présence d'IgG et d'IgA spécifiques de cet Ag. La cinétique de la réponse IgG et IgA est comparable dans les deux modes d'infection jusqu'à la 10ème semaine. Malheureusement dans l'infection expérimentale ces paramètres n'ont été suivis que pendant la 10ème semaines après l'infection, il est donc impossible de prédire l'évolution de la réponse après la perfusion. Dans le groupe immunisé et infecté naturellement, durant la période de 10 à 32ème semaine, la réponse IgG présente des fluctuations avec une baisse significative 13 semaines après l'introduction des bovins dans la ferme. Par contre la réponse IgA augmente graduellement 10 semaines après l'infection, atteint son titre maximum à la 20ème semaine et se maintient jusqu'à la fin de l'expérience.

Il est difficile à ce stade de nos études d'expliquer l'émergence tardive de la réponse IgA dans le modèle bovin. Cependant, les études réalisées dans la schistosomiase murine indiquent que les oeufs du schistosome représentent un facteur essentiel pour l'installation de la réponse IgA via l'induction des cytokines appropriées (Poulain et coll.,1996). Ceci pourrait expliquer, au moins dans l'infection naturelle, l'augmentation significative de la réponse IgA dans la période de 8 à 12 semaines après l'infection (peu de temps après l'oviposition du schistosome). Dans les deux modes d'infection, les animaux contrôles ne présentent pas de réponse Ac spécifique de la Sb28 GST, même à la 32ème semaine chez les bovins infectés naturellement, bien qu'ils présentent une réponse Ac dirigée contre les antigènes de l'oeufs (SEA) comparable à celle des animaux vaccinés. Ceci n'est pas surprenant puis qu'il a été rapporté dans d'autres modèles animaux que la réponse spécifique des 28GSTs est faible chez les animaux infectés par rapport aux animaux immunisés (Boulanger et coll., 1994; 1995; Bushara et coll., 1993).

La relation liant la réponse IgA spécifique de Sm28 GST, l'inhibition enzymatique et la perturbation de la fertilité du parasite dans la schistosomiase humaine rapportée par Grzych et coll. (1993) a été aussi évaluée dans ce modèle. Les niveaux d'inhibition dans

les sérums de bovins naturellement ou expérimentalement infectés évoluent d'une manière comparable au cours de l'expérience et sont compris entre 60 à 100%. L'analyse statistique comparative de la réponse Ac individuelle et le niveau d'inhibition révèle que la fonction inhibitrice n'est pas soutenue par le même isotype dans les deux modes d'infection. En effet, chez les bovins immunisés et infectés expérimentalement, l'inhibition de l'activité enzymatique de Sb28 GST semble corrélée avec la réponse spécifique d'isotype IgG; alors que dans l'infection naturelle, le pourcentage d'inhibition enzymatique est globalement associé à la réponse IgA. Néanmoins à certaines périodes de l'expérience, les Ac IgG semble aussi contribuer à cette fonction inhibitrice.

D'autre part il est intéressant de noter, l'évolution opposée des profils de corrélation pour IgG et IgA, où la diminution de la valeur de corrélation pour un isotype coïncide avec l'augmentation du même paramètre pour l'autre isotype à l'exception de la période comprise entre la 21ème semaine et la 25ème semaine où les réponses IgG et IgA sont positivement associées avec le niveau d'inhibition enzymatique. Ceci suggère que contrairement à la schistosomiase humaine, chez les bovins étudiés les IgG pourraient aussi jouer un rôle dans l'inhibition ou dans la modulation de la fonction des IgA à certaines périodes de l'expérience. Les interactions entre les IgG et les IgA (qui nécessitent des investigations plus approfondies dans notre modèle d'étude avec des fractions purifiées) ont été rapportées dans différents modèles expérimentaux. Les IgA dirigés contre l'Ag capsulaire de Neisseria menigitidis sont capables d'inhiber la lyse de ce germe induite par l'IgG (Griffis et coll., 1975). Dans le modèle murin, l'IgA est capable d'inhiber l'hémolyse in vitro induite par l'IgG et la réaction d'Arthus in vivo (Russell-Jones et coll., 1980; 1981); d'autre part, les IgA humain sont capable d'inhiber l'activation dépendante d'IgG de la voie classique du complément (Russell et coll., 1989). Une autre explication pour la participation d'IgG dans l'inhibition de l'activité enzymatique des GST pourrait être liée au fait que chez les ruminants l'immunoglobuline dominante au niveau muqueux est la sous-classe IgG1 qui est transportée séléctivement dans les sécrétions par le mécanisme lié au composant sécrétoire. Chez les ruminants, les fonctions opsonisation de la sous-classe l'IgG1 sont moins efficaces que les autres sousclasse (IgG2). L'IgG1présente des propriétés comparables à l'IgA (Mogens et Russell, 1994).

Nos observations ont démontré l'existence de la réaction croisée entre la rSb28 GST et la 28GST native de *S.mattheei*. Ce ci n'est pas surprenant puisque des études précédentes

avaient déjà révélé des homologies importantes au niveau de la structure primaire des 28GST dans les différents espèces de schistosome (S.mansoni, S.haematobium et S.bovis) (Trottein et coll., 1992). L'analyse plus précise de la molécule indique que le domaine central (peptide 115-131) est lié à la spécificité de l'espèce (substitution de 2 à 3 acides aminés); alors que les régions de C- ou N-terminales de la molécule qui constituent le site catalytique de l'enzyme sont très conservées. En effet, les sérums de bovins immunisés par la Sb28 GST neutralisant la fonction enzymatique des 28GST chez les deux espèces (S.bovis et de S.mattheei). Ceci expliquerait la protection croisée observée dans cette expérience.

Des effets protecteurs induits par la vaccination hétérologue ont été obtenus chez les singes Patas où l'immunisation par la rSm28 GST a protégé les animaux contre l'infection par *S.haematobium* (Boulanger et coll., 1995). Dans ce modèle, l'effet protecteur est ciblé sur la fertilité du ver, tant au niveau qualitif et surtout au niveau quantitatif, qui s'exprime par la réduction du nombre d'oeufs tissulaires et fécaux, mais sans effet sur la charge parasitaire. Une situation similaire est observée dans notre expérience, l'effet protecteur est principalement ciblé sur la viabilité des oeufs et coïncide avec des niveaux inhibiteurs importants de l'activité catalytique de la Sb28 GST et la 28GST native de*S.mattheei*, suggérant tout au moins chez les animaux infectés naturellement une association entre ces deux paramètres. Ceci avait déjà illustré dans le modèle de souris immunisées par les peptides de N- et C-terminal de la Sm28 GST (Xu et coll., 1993).

L'observation ultrastructurale montre que l'expression de la Sm28 GST est augmentée durant la maturation des oeufs (Boulanger, 1991) indiquant que cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans le développement embryonnaire ou la maturation des œufs. La réduction de la viabilité des œufs fécaux observée dans cette expérience pourrait être une conséquence du blocage de la fonction de cette molécule. La réduction de la viabilité des œufs pourrait être aussi liée à la fixation des Acs sur la Sm28GST "libérée" à travers la coque de l'œuf (Porchet et coll., 1994), puisque cette fixation pourrait inhiber la fonction de détoxification liée à cette enzyme qui est essentielle pour la survie et l'éclosion de l'œuf. En effet, il a été rapporté qu'un Ac monoclonal de rat spécifique de la Sm28 GST possédant une fonction inhibitrice sur l'activité de cet Ag est capable de réduire la ponte de la femelle et le pourcentage d'éclosion (Xu et coll., 1991). D'autres rapports ont décrit l'existance d'Ac sur la coque de l'œuf de S.haematobium dans l'infection naturelle de l'homme (Koech et coll., 1984) et des effets anti-embryonnaires dans l'infection par S.japonicum (Garcia et coll., 1987).

Bien que l'inhibition de la fonction enzymatique des 28GSTs puissee rendre compte des effets protecteurs observés dans l'infection naturelle, l'explication de l'absence de protection enregistrée dans l'infection expérimentale reste encore spéculative sur la base de nos paramètres immunologiques. Néanmoins, une des hypothèses pourrait être liée au fait que ces mécanismes agiraient tardivement après l'infection et ne serait pas efficace dans la période précoce de l'infection. Cet effet tardif a été rapporté pour l'excrétion d'oeufs chez les singes Patas vacciné par la Sm28 GST et infectés expérimentalement par S.haematobium (Boulanger et coll., 1995). Dans cette expérience, la différence maximum entre les animaux vaccinés et contrôles a été enregistrée à la 42ème semaine, alors que aucune différence n'avait été observée pour ce paramètre à la 12ème semaine après l'infection.

D'autre part, la réponse IgA chez les bovins immunisés et infectés naturellement augmente graduellement durant l'expérience, ce qui indique que les contacts répétitifs avec les parasites pourraient jouer un rôle de rappel de la réponse IgA. Il est connu que la réponse IgA est préférentiellement induite par les antigènes présentés via la surface muqueuse. Dans la ferme, les bovins sont infectés répétitivement par la muqueuse buccale quand ils boivent, contrairement à l'infection expérimentale où les animaux sont infectés par une forte dose massive au niveau de la queue rasée (Kassuku et coll., 1985). La "qualité" de la réponse IgA induite par ces deux modes d'infection pourrait être différente, puisque on a démontré que la fonction inhibitrice dans les sérums de bovins immunisés n'est pas soutenue par le même isotype dans les deux modes d'infection. Ceci pourrait-il expliquer les différents résultats de protection obtenus dans les deux modes d'infection? Il a été rapporté dans la schistosomiase humaine que la réponse IgA associée à la fonction inhibitrice est corrélée avec la résistance à la réinfection. Ceci pose la question consernant la relation entre la réponse IgA spécifique et l'état immunitaire de l'hôte dans notre modèle. Quand on compare notre modèle à la schistosomiase humaine, il ne faut pas oublier que chez les bovins une immunisation par la Sb28 GST a été réalisée avant l'infection par S. mattheei alors que dans la population humaine étudiée, aucune vaccination n'a été effectuée.

En conclusion, cette expérience démontre les propriétés protectrices de la Sb28GST chez les bovins infectés naturellement par *S.mattheei*. Cette protection semble être liée à la réaction croisée entre la 28GST de ces deux espèces et pourrait être due au blocage de la

# 3. Approche des fonctions inhibitrices des anticorps muqueux sur l'activité enzymatique de la Sm28 GST

Le modèle du porc a été choisi pour plusieurs raisons :

- 1. Le porc est un hôte naturel de *S.japonicum* dans les régions endémiques d'Asie où il contribue au maintien du cycle parasitaire (Wu et coll., 1992).
- 2. Il existe beaucoup de similarités entre le porc et l'homme (au niveau anatomique, physiologique, immunonologique, métabolique et nutritionnel) (Swindle, 1984; Phillips et Tumbleson, 1986). Grâce à ces similarités, le modèle porcin représente un modèle pertinent à l'étude de la schistosomiase humaine (Willingham et Gibbons, 1996).
- 3. Chez le porc, très peu ou pas d'immunoglobuline traverse la barrière placentaire, l'immunité des nouveaux nés dépendant entièrement de l'absorption des Acs du colostrum et du lait (Klobasa et Werhahn, 1981). Les truies immunisées produisent des quantités importantes d'IgA spécifiques dans le colostrum et le lait, il est possible de séparer les différents formes d'IgA (Hutchens et coll., 1990; Dziaba et coll., 1986) et de les transférer aux porcelets nés de truies non immunisées (Klobasa et Werhahn, 1981). Le porc représente donc un modèle unique pour l'étude de la fonction biologique des différentes formes d'IgA spécifiques des antigènes du schistosome.

Dans nos expériences, l'immunisation par la Sm28 GST a induit une forte réponse sanguine d'isotype IgG et IgA chez la truie. Ces Acs sont retrouvés dans les sécrétions lactées au moment de la parturition suivie d'une chute rapide après 24 h. Le niveau de la réponse Ac est plus important dans le colostrum par rapport au sérum de la même truie. Ces résultats sont cohérents avec les données concernant les différents isotypes totaux ou spécifiques dans le sérum et les sécrétions lactées de truie rapportés par Curtis et Bourne (1971) et Mocsari (1980). La diminution de la réponse Ac au moment de la parturition est liée au stockage des immunoglobulines dans la glande mammaire à la fin de gestation et au début de lactation (Huang et coll., 1992).

Il existe deux sources pour les immunoglobulines des sécrétions lactées : la filtration sérique et la synthèse locale. Dans le lait, la quasi-totalité des IgA (91%) et des IgM (94%) sont de synthèse locale comparée à seulement 70% des IgG (Berthon et Salmon,, 1993). Dans notre expérience, une faible réponse IgM a été détectée dans les sécrétions lactées de la truie qui ne présente pas de réponse sanguine pour cet isotype, suggérant sa

production locale dans la glande mammaire.

Le niveau de la réponse IgG détecté dans les sérums de porcelets est élevé peu de temps après la naissance, cette réponse baisse graduellement et se maintient à un certain niveau jusqu'à un mois après la naissance. Un haut niveau de réponse en IgA est détecté chez les porcelets nés de la truie présentant une forte réponse IgA sérique, cette réponse chute plus rapidement par rapport au IgG, ceci pourrait être dû à la différence de la demivie de ces deux isotypes (10 jours pour IgG et 2 jours pour IgA) (Klobasa et Werhahn, 1981). La cinétique de la réponse IgG et IgA spécifiques de la Sm28 GST enregistrée chez les porcelets est similaire à celle des IgG et des IgA totales précédemment décrite par Klobasa et coll. (1981). L'absence de réponse IgM dans les sérums de porcelets pourrait s'expliquée par la quantité trop faible d'IgM spécifique présente dans le colostrum.

Cette expérience a confirmé la fonction inhibitrice portée par les immunoglobulines spécifiques de Sm28 GST. Il semble que l'IgA et IgG participent à cette fonction inhibitrice, toutefois, il nous reste à démontrer le rôle respectif des différents isotypes et des différentes formes moléculaires dans ce phénomène sur des fractions purifiées. Ces études sont en cours de réalisation.

En 1965, Haelterman observa que le transfert des porcelets nés de mères non immunisées à des mères immunisées contre les virus de la gastro-entérite transmissible (GET) sont protégés vis-à-vis de l'infection aussi longtemps qu'ils ingéraient le lait immun. Ce phénomène a été décrit sous le terme d'immunité lactogène qui a ouvert la voies au développement d'un vaccin lactogène contre le GET ou d'autres pathogènes (Evans et coll., 1980; Fu et coll., 1990; Vancott et coll., 1994; Snodgrass et coll., 1995). Dans ces études, il a été rapporté que les IgA sécrétoires sont plus efficaces que les IgG dans la protection (Stone et coll., 1977; De Diego et coll., 1994, Lanza, I. et coll., 1995), et qu'il existe une corrélation entre la prédominance d'IgA neutralisantes dans les laits et la protection (Bohl et Saif, 1975, Lanza, I. et coll., 1995). Les mêmes auteurs ont découvrent le lien immun entre intestin et mamelle, où d'une façon générale, les IgA des sécrétions lactées sont spécifiques des agents hébergés par l'intestin (Salmon, 1995). L'origine des lymphocytes dans la glande mammaire de la truie a été ensuite démontrée par Salmon (1987). En effet, chez la truie, les lymphocytes ségrègent en un pool somatique et un pool intestinal. Durant la gestation autant de lymphocytes, notamment des plasmocytes de ces deux pools, migrent dans la mamelle, alors que pendant la lactation les plasmocytes à IgA (d'origine intestinale) migrent en plus grand nombre que ceux à IgG

(d'origine vraisemblablement somatique). La production d'IgA locale dans les sécrétions lactées nécessite une stimulation intestinale. Dans notre expérience, les truies ont été

immunisées par la voie intramusculaire. Les Acs spécifiques de la Sm28 GST dans les sécrétions lactées ont chuté après 24 h et disparaissent au 14ème jour après la parturition. Selon les études réalisées précédemment, la majorité des Acs au début de la lactation proviennent de la filtration sérique (Porter, 1973). L'étude comparative des voies d'immunisation dans l'EGT démontre que contrairement à l'immunisation par la voie orale, l'immunisation intramusculaire n'induit pas de réponse d'IgA sécrétoire (Mocsari, 1980). Il a été démontré par la technique d'immunohistochimie qu'au début de la lactation, seulement 10% et 20% de cellules épithéliales de la glande mammaire sont marquées par des antisérums dirigés contre l'IgA et SC respectivement, 80% et 100% de cellules sont positives pour IgA et SC respectivement quelques jours après (Lejan, 1993). Bien que les expériences de purification sont en cours, la connaissance sur la cinétique de la sécrétion lactée indique dans notre expérience que peu d'IgA sécrétoires spécifiques sont produites par l'immunisation sous-cutanée. Cependant, les IgA dont nous disposerons pourraient être utilisées pour l'analyse de la fonction d'inhibition enzymatique. Nous envisageons donc dans nos prochaines expériences, l'utilisation des voies d'inoculation orale ou mammaire (Salmon, 1989) à la fin de la gestation pour favoriser la production d'IgA sécrétoires spécifiques de l'Ag Sm28 GST.

L'efficacité de l'immunité lactogène a été démontrée par le transfert oral du colostrum et de lait de bovins immunisés aux porcelets dans l'infection par des rétrovirus humains. Une corrélation dose dépendante d'Ac spécifique ingéré et de la réduction des virus excrétés ou la diarrhée a été observée (Schaller et coll., 1992). Suite aux études dans le modèle porcin, la protection contre des infections parasitaires (*Toxocara vitulorum*) via l'immunité lactogène a été rapportée chez la souris (Rajapakse et coll., 1994a), le bufle (Rajapakse et coll., 1994b) et le chèvre (Jacobs et coll., 1994).

Des expériences réalisées chez la souris ont démontré que l'immunisation orale par la Sm28 GST associée au liposome induit une réponse spécifique IgA dans les sécrétions intestinales (Ivanoff et coll., 1996). Utilisant la même technique d'immunisation chez le porc, l'étude des fonctions inhibitrices des IgA spécifiques sur l'activité enzymatique des GSTs pourra être envisagée pour définir leur signification dans l'infection par le schistosome dans le modèle porcin.

En conclusion, nos travaux de thèse ont permis d'analyser la localisation de 4

antigènes de *S.mansoni* à potentialité vaccinale dans différents stades du parasite. Chacun de ces antigènes possède des caractères spéciaux concernant sa localisation. Cette étude a donné des indications sur leurs fonctions biologiques chez le parasite et a ouvert la voie de recherche sur leur rôle dans la stratégie contre la schistosomiase.

L'analyse des réponses Acs et de l'inhibition sur la fonction catalytique des 28GSTs par des sérums de bovins immunisés par Sb28 GST a donné une base moléculaire d'expliquer la protection croisée contre l'infection naturelle par *S.mattheei* et a révélé une association positive entre la réponse Acs spécifique et l'inhibition de la fonction catalytique des 28GSTs.

Ce résultat a été confirmé par l'analyse de la réponse Acs spécifiques de l'Ag Sm28GST au niveau sérique et muqueux (sécrétion lactée) et l'inhibition sur l'activité enzymatique de la Sm28 GST dans le modèle porcin. Cette réponse Acs et la fonction inhibitrice a été retrouvée dans les sérums de porcelets nés de truies immunisées. Ces résultats ont ouverent des nouvelles perspectives dans l'étude des fonctions biologiques d'IgA et leur rôle dans l'instalation de l'immunité contre la schistosomiase.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Ghazaleh, R. I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R. A. and Gleich, G. J. (1989). IgA- induced eosinophil degranulation. J. Immunol., 142, 2393-2400.
- Alley, C. D., Nash, G. S. and MacDermott, R. P. (1982). Marked in vitro spontaneous secretion of IgA by human rib bone marrow mononuclear cells. J. Immunol., 128, 2604-2608.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H. (1992). Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 356, 604-607.
- Amory Soisson, L. M., Masterson, C. P., Tom, T. D., McNally, M. T., Lowell, G. H. and Strand, M. (1992). Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schitosoma mansoni* surface antigne. J. Immunol., 149, 3612-3620.
- Armstrong, J. C. (1965). Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. J. Parasitol., 5, 605-616.
- Aronstein, W. S. and Strand, M. (1984). Gender-specific and pair dependent glycoprotein antigens of Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 70, 545-557.
- Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J. P. and Capron, A. (1981). Interaction between macrophage and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of  $\beta$ -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.*, 62, 15-19.
- Auriault, C., Capron, M., Cesari, I. M. and Capron, A. (1983a). Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni*: role of proteases. *J. Immunol.*, 131, 464-470.
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A. and Capron, A. (1983b). Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of IgG. FEBS Lett., 153, 11-15.
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A., Bout, D., Tonnel, A. B. and Capron, A. (1985). Regulatory role of tripeptide (TKP) from the constant domain of immunoglobulin G. Int. J. Immunopharmacol., 7(1), 73.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R. J., Butterworth, A. E., Wolowczuck, I., Capron, M., Ouma, J. H., Balloul, J. M., Khalife, J., Nryrinck, 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.
- Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1974a). Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. I. Composition, glycopeptide isolation and structure of the asparagine-linked oligosaccharide units. J. Biol. Chem., 249, 7260-7269.
- Baenziger, J. (1974b). Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglbulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. J. Biol. Chem., 249, 7270-7281.
- **Baenziger**, J. (1979). Structure of the oligosaccharide of human J chain. J. Biol. Chem., 254, 4063-4071.

- **Baksh, S. and Michalak, M.** (1991). Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca<sup>2+</sup> binding domains. *J. Biol. Chem.*, **266**(32), 21458-65.
- Balk, M. W. (1987). Animal Models: Assessing the Scope of Their Use in Biomedical Research. Alan, R. Liss.
- Balloul, J. M., Pierce, R. J., Grzych, J. M. and Capron, A. (1985). In vitro synthesis of a 28-Kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 17, 105-114.
- Balloul, J. M., Boulanger, D., Soudermeyer, 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). New York: Alan R.Liss Inc.
- Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvallo, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1987b). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, 326, 149-153.
- Balloul, J. M., Grzych, J. M., Pierce, R. J. and Capron, A. (1987c). A purified 28, 000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 138, 3448-3453.
- Barberi, A., Superti, G. and Busslinger, M. (1987). Mutually exclusive interaction of the CCAAT-binding factor and of a displacement protein with overlapping sequences of a histone gene promoter. *Cell*, **50**, 347-359.
- Barrett, J. M., Abramoff, P., Kumaran, A. K. and Millington, W. F. (1986). Biology, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Basch, P. F. and Rhine, W. D. (1983). Schistosoma mansoni: reproductive potential of male and female worms cultured in vitro. J. Parasitol., 69, 567-569.
- Basch, P. F. and Basch, N. (1984). Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. Parasitology, 89, 369-376.
- Basch, P. F. (1990). Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol. Today*, 6, 160-163.
- Becker, M. M., Kalinna, B. H., Waine G. J. and McManus, D. P. (1994). Gene clonig, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPc) from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. Gene, 148, 321-325.
- Becker, M. M., Kalinna, B. H., Yang, W., Harrop, S. A., Scott, J. C., Waine G. J., Kurtis, J. D. and McManus, D. P. (1995). Gene cloning and complete nucleotide sequence of Philippine Schistosoma japonicum paramyosin. Acta Tropica, 59, 143-147.
- Bergelson, S., Pinkus, R. and Naniel, V. (1994). Induction of AP-1 (Fos/Jun) by chemical agents mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. Oncogene, 9, 565-571.
- Berthon, P., Bernard, S., Salmon, H., Binns, R. M. (1990). Kinetics of the *in vitro* antibody response to transmissible gastroenteritis (TGE) virus from pig mesenteric lymph node cells, using the ELISAPOT and ELISA test. *J. Immunol. Methods*, 131, 173-182.

- Berthon, P. and Salmon, H. (1993). Facteurs immunitaires des sécrétions mammaires. In: Biologie de la lactation. Martinet, J. and Houdebine, L.M. (Eds.), (pp. 389-414), INSERM et INRA.
- Bickle, Q. D., Taylor, M. G., Doenhoff, M. J. and Nelson, G. S. (1979). Immunization of mice with gamma-irradiated intra-muscularly-injected schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitologie*, 79, 209-222.
- **Bjerke, K. and Brandtzaeg, P.** (1990a). Terminally differentiated human intestinal B cells. IgA and IgG subclass-producing immunocytes in the distal ileum, including Peyer's patches, compared with lymph nodes and palatine tonsils. *Scand. J. Immunol.*, 32, 61-67.
- **Bjerke, K. and Brandtzaeg, P.** (1990b). Terminally differentiated human intestinal B cells. J chain expression of IgA and IgG subclass-producing immunocytes in the distal ileum compared with mesenteric and peripheral lymph nodes. *Clin. Exp. Immunol.*, 82, 411-415.
- Bohl, P. and Saif, L. J. (1975). Passive immunity to transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.*, 11, 23-32.
- Boros, D. L. (1994). The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiol.*, 191, 441-450.
- Boulanger, D., Reid, G. D. F., Sturrock, R. F., Wolowczuck, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Butterworth, A. E. and Capron, A. (1991). Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects bith worm viability and fecundity after experimental infection with Schistosoma mansoni. Parasit. Immunol., 13, 473-490.
- Boulanger, D., Trottein, F., Mauny, F., Brenmond, P., Couret, D., Pierce, R. J., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Lecocq, J. P., Sellin, B. and Capron A. (1994). Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione *S*-transferase. *Parasite Immunol.*, 16, 399-406.
- Boulanger, D., Warter, A., Trottein, F., Mauny, F., Brenmond, P., Audibert, F., Couret, D., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Pierce, R. J., Lecocq, J. P., Sellin, B. and Capron, A. (1995). Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from S.mansoni. Parasite Immunol., 17, 361-369.
- **Brandtzaeg, P.** (1985). The role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand. J. Immunol.*, 22, 111-146.
- Brigelius-Flohé, R., Klaus-Dieter, A., Blöcker, H., Gross, G., Kiess, M., Klauss-Dieter, K., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Ursini, F., Wingender, E. and Flohé, L. (1994). Phospholipide hydroperoxyde glutathione peroxidase. J. Bio. Chem., 269(10), 7342-7348.
- Brindley, P. J. and Sher, A. (1990). Immunological involvement in the efficacy of praziquantel. *Exp. Parasitol.*, 71, 245-248.
- Brophy, P. M. and Barret, J. (1990a). Glutathione transferase in helminths. *Parasitology*, 100, 345-349.

- Brophy, P. M. and Barrett, J. (1990b). Blocking factors and the purification of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta*. Parasitology, 100, 137-142.
- Brophy, P. M. and Barrett, J. (1990c). Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in Helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42, 205-212.
- Brophy, P. M., Crowley, P. and Barrett, J. (1990d). Detoxification reactions of Fasciola hepatica glutathione transferases. Mol. Biochem. Parasitol., 39, 155-162.
- **Brophy, P. M. and Pritchard, D. I.** (1994). Parasitic helminth glutathione Stransferases: An update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. Exp. Parasitol., 79, 89-96.
- Brown, W. R., Borthisle, B. K. and Chen, S. T. (1975). Immunoglobulin E (IgE) and IgE-containing cells in human gastrointestinal fluids and tissues. *Clin. Exp. Immunol.*, 20, 227-237.
- **Brown, T. A. and Mestecky, J.** (1985). Immunoglobulin A subclasse distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. *Infect. Immun.*, **49**, 459-462.
- Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukariotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. J. Mol. Biol., 212, 563-578.
- Burk, R. F. and Lawrence, R. A. (1978). Non-selenium-dependent glutathione peroxidase. In: Fonctions of glutathione in liver and kidney, Sies, H., Wendel, A. (Eds.), (pp. 114-119). Berlin: Springer Verlag.
- Burnett, R. C., Hanley, W. C., Zhai, S. K. and Knight, K. L. (1989). The IgA heavy-chain gene family in rabbit: cloning and sequence analysis of 13 C $\alpha$  genes. *EMBO J.*, **8**, 4041-4047.
- Burns, K., Helgason, C. D., Bleackley, R. C. and Michalak, M. (1992). Calreticulin in T lymphocytes and demonstration that activation of T cells correlates with increased levels of calreticulin mRNA and protein. J. Biol. Chem., 267, 19039-19042.
- Burns, K., Duggan, B., Atkinson, E. A., Famulski, K. S., Nemer, M., Bleackley, R. C. and Michalak, M. (1994). Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, 367, 476-480.
- Bushara, H. O., Bashir, M. E. N., Malik, K. H. E., Mukhtar, M. M., Trottein, F., Capron, A. and Taylor, M. G. (1993). Suppression of Schistosoma bovis egg production in cattle by vaccination with either glutathione Stransferase or keyhole limpet haemocyanin. Parasit. Immunol., 15, 383-390.
- Butler, J. E. (1983). Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet. Immunol. Immunopathol., 4, 43-152.
- Butterworth, A. E., Strurrock, R. F., Houba, V. and Rees, P. H. (1974). Antibody dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. Nature, 252, 503.
- 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 Singok, 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, 393-408.

- Butterworth, A. E., Bensted-Smith, R., Capron, A. Capron, M., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Grzych, J. M., Kariuki, H. C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Arap, Siongok, T. K and Sturrock, R. F. (1987). Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*, 94, 269.
- Butterworth, A. E. (1992). Vaccines against schistosomiasis: where do we stand? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 86, 1-2.
- Buttner, A. (1950). Curieux cas d'hérmaphroditisme chez une souche Africaine de Schistosoma mansoni. Comptes Rendus des séances de l'Académie des Sciences 230, 1420-1422.
- Byram, J. E. and Von Lichtenberg, F. (1977). Altered schistosome granuloma formation in nude mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 944-956.
- Campbell, J. A. H., Corrigall, A. V., Guy A, and Kirsch, R. E. (1991). Immunohistologic localization of Alpha, Mu and Pi class glutathione S-transferases in human tissues. *Cancer*, 67, 1608-1613.
- Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. and Afchain, D. (1968). Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Pathol. Biol.*, 16, 121.
- Capron, A., Biguet, J., Tran Van Ky, P. and Moschetto, Y. (1969). Immunological studies in various types of schistosomiasis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 160, 863.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. and Bazin, H. (1975). Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 253, 474-475.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Joseph, M. and Pestel. J. (1980). Role of anaphylactic antibodies in immunity of schistosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 849.
- Capron, A., Balloul, J. M., Grezel, D., Grzych, J. M., Wolowczuk, I., Auriault, C., Boulanger, D., Capron, M., and Pierce, R. J. (1990). Progress towards vaccine against schistosomiasis. In: Molecular Aspests of Immune Response and Infectious Diseases. Kiyono, H., Jirillo, E. and DeSimone, C. (eds), (pp.183-191), New York: Raven Press.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. and Pierce, R. J. (1992). Vaccine strategies against schistosomiasis. *Immunobiol.*, 184, 282-294.
- 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, 1270.
- Capron, M., Torpier, G. and Capron, A. (1979). In vitro killing of S.mansoni schistosomunla by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. J. Immunol., 123, 2220.
- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A. (1981). Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. J. Immunol., 126, 1764.
- Capron, M., Spiegelberg, H. L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A., Pierce, R., Ouassi, M. A. and Capron, A. (1984). Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. J. Immunol., 132, 462-468.

- Capron, M. and Capron, A. (1986). Rats, mice and men. Models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 2, 69-75.
- Carlier, Y., Nzeyimana, H., Bout, D., Capron, A. (1980). Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassey and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-infected african parturients and their new-born children. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 74-81.
- Chappell, C. L. and Dresden, M. H. (1986). Schistosoma mansoni: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms. Exp. Parasitol., 61, 160-167.
- Cheever, A. W. and Deb, S. (1989). Persistance of hepatic fibrosis and tissue eggs following treatment of S. japonicum infected mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 40, 620.
- Chensue, S. W., Otterness, I. G., Higashi, G. I., Forsch, C. S. and Kunkel, S. L. (1989). Monokine production by hypersensitivity (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign body (sephades bead) type granuloma macrophages. Evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 142, 1281-1286.
- Cherwinski, H. M., Schumacher, J. H., Brown, K. D. and Mosmann, T. R. (1987). Two types of mouse help 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.
- Chien, K. and Lia, S. T. (1960). A note on hermaphodism of female Schistosoma japonicum. Acta. Zoo. Sinica (Pekin), 12, 9.
- Chodosh, L. A., Olesen, J., Hahn, S., Baldwin, A. S., Guarente, L. and Sharp, P. (1988). A yeast and human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are funtionally interchangeable. *Cell*, 53, 25-35.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L. and Archer, S. (1993). Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today*, 9, 162-166.
- Clegg, J. A., Smithers, S. R. and Terry, R. J. (1971). Concomittant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasit.*, 1, 43.
- Clough, E. R. (1981). Morphology of reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J. Parasitology*, 67, 535-539.
- Collins, J. H., Xi, Z. J., Alderson Lang, B. H., Treves, S. and Volpe, P. (1989). Sequence homology of a canine brain calcium-binding protein with calregulin and the human Ro/SS-A antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164(1), 575-9.
- Conley, M. E. and Delacroix, D. L. (1987). Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defence? *Ann. Int. Med.*, 106, 892-899.
- Cornford, E. M. and Fitzpatrick, A. M. (1985). The mechanism and rate of glucose transfer from male to femaleschistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 17, 131-141.

- Correa-Oliviera, R., Pearce, E. J., Oliviera, D. B., Golgher, N., Katz, N., Bahia, L. G., Carvalho, O. S., Gazinelli, G. and Sher, A. (1989). The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83, 798-804.
- Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L. H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P. and Lecocq, J. P. (1984). High-level production of biologically active human gamma 1-antitrypsin in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(3), 669-673.
- Crabtree, J. E., Pullar, C. E., Trejdosiewicz, L. K. and Wilson, R. A. (1992). Murin intestinal humoral responses in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Scand. J. Immunol.*, 35, 361-367.
- Crago, S. S., Kutteh, W. H., Moro, I., Allansmith, M. R., Radl, J., Haaijman, J. J. and Mestecky, J. (1984). Distribution of IgA1-, IgA2- and J chain-containing cells in human tissues. J. Immunol., 132, 16-18.
- Creaney, J., Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Sandeman, R. M., Spithill, T. W. and Parsons, J. C. (1995). Fasciola hepatica: localization of glutathione Stransferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. Exp. Parasitol., 81, 106-111.
- Cripps, A. W. and Lascelles, A. K. (1976). The origin of immunoglobulins in salivary secretion of sheep. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 54, 191-194.
- Curtis, J. and Bourne, F. J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochem. Biophy. Acta*, 236, 319-332.
- **Dalton, J. P., Tom, T. D. and Strand, M.** (1987). Cloning of a cDNA encoding a surface antigen of *Schistosoma mansoni* schistosomula recognized by sera of vaccinated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4268-4272.
- Damian, R. T., Green, N. D. and Hubbart, W. J. (1973). Occurrence of mouse α-macroglobulin antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults, with evidence on their nature. *J. Parasitol.*, **59**, 64-73.
- Damiani, E., Heilmann, C., Salvatori, S. and Margreth, A. (1989). Characterization of high-capacity low-affinity calcium binding protein of liver endoplasmic reticulum: calsequestrin-like and divergent properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165(3), 973-80.
- **Danielson, U. H., Esterbauer, H. and Mannervik, B.** (1987). Structure-activity relationship of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem. J.*, **247**, 707-713.
- Davern, K. M., Tiu, W. H., Samaras, N., Gearing, D. P., Hall, B. E., Garcia, E. G. and Mitchell, G. F. (1990). Schistosoma japonicum: monoclonal antibodies to the Mr26 000 schistosome glutathione S-transferase (Sj26) in an assay for the circulation antigen in infected individuals. Exp. Parasitol., 70, 293-304.
- Davis, P. A. and Porter, P. (1979). A mechanism for secretory IgA-mediated inhibition of the cell penetration and intracellular development of *Eimeria tenella*. *Immunology*, 36, 471-477.
- Davis, A. (1986). Recent advances in schistosomiasis. Quat. J. Medecine, 58, 95.

- De Bont, J., Vercruysse, J., Sabbe, F., Southgate, V. R. and Rollinson, D. (1995a). Schistosoma mattheei infections in cattle: changes associated with season and age. Vet. Parasitol., 57, 299-307.
- De Bont, J., Vercruysse, J., Sabbe, F. and Ysebaert, M. T. (1995b). Observations on worm population dynamics in calves naturally infected with *Schistosoma mattheei*. Parasitology, 111, 485-491.
- De Bont, J., Vercruysse, J., Grzych, J. M., Meeus, P. F. M. and Capron, A. (sousmis). A recombinant Schistosoma bovis- derived glutathione Stransferase protects cattle against natural infection: I. Parasitological results.
- De Diego, M., Rodriguez, F., Alcaraz, C., Gomez, N., Alonso, C. and Escribano, J. M. (1994). Characterization of the IgA and subclass IgG responses to neutralizing epitopes after infection of pregnant sows with the transmissible gastroenteritis virus or the antigenically related porcine respiratory coronavirus. J. General Virol., 75, 2585-2593.
- **Dean, D. A.** (1974). Schistosoma mansoni: adsorption of human blood group A and B antigens by schistosomula. J. Parasitol., **60**, 260-263.
- Dedhar, S., Rennie, P. S., Shago, M., Leung Hagesteijn, C.-Y., Yang, H., Filmus, J., Hawley, R. G., Bruchovsky, N., Cheng, H., Matusik, R. J. and Giguère, V. (1994). Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*, 367, 480-483.
- **Dessaint, J. P., Camus, D., Fisher, E. and Capron, A.** (1977). Inhibition of lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. Eur. J. *Immunol.*, 7, 624-629.
- Dessein, A., Rihet, P., Demevre, C., Cuissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Patra, A., Goudot, V., Bourgeois, A. and Abel, L. (1992). Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Méd. Sci.*, 8, 108-118.
- **Diamond, M., Miner, J., Yoshinaga, S. and Yamamoto, K.** (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*, **249**, 1266-1272.
- Diaw, O. T., Vassiliadès, G. and Sarr, Y. (1990). Prolifération de mollusques après la construction du barrage de Diama au Sénégal. Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 8, 772.
- **Doenhoff, M. J., Saban, A. A., Flatcher, C., Webbe, G. and Bain, J.** (1987). Evidence for immunodependent action of praziquantel on *S.mansoni* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**, 947-951.
- Dunne, D. W., Butterworth, A. E., Fulford, A. J., 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(6), 1483-94.
- Dupuis, M., Schaerer, E., Krause, K.-H. and Tschopp, J. (1993). The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. J. Exp. Med., 177, 1-7.

- Duvaux-Miret, O., Stefano, G. B., Smith, E. M., Dissous, C. and Capron, A. (1992). Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 778-781.
- **Dziaba, K., Gerlach, G. F. and Petzoldt, K.** (1986). Comparative isolation and characterization of secretory IgA immunoglobulin from sow milk. *J. Vet. Med. B.*, 33, 670-675.
- Erasmus, D. A. (1973). A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female Schistosoma mansoni. Parasitology, 67, 165-183.
- Erasmus, A. D. (1987). The adulte schistosome: structure and reproductive biology. In: The biology of schistosomes. From genes to latrinse. Rollison, D. and Simpson, A. J. G. (Eds.), (pp. 51-82). New York: Acdamic press.
- Esworthy, R. S., Doan, K., Doroshow, J. H. and Chu, F. F. (1994). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene.*, 144, 317-318.
- Euzeby, J. (1970). Les Maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine. Vigot Frères.
- Evans, P. A., Newby, T. J., Stokes, C. R., Pate, D. and Bourne, F. J. (1980). Antibody response of the lactating sow to oral immunization with *Escherichia coli*. Scand. J. Immunol., 11, 419-429.
- Fallon, P. G. Cooper, R. O., Probert, A. J. and Doenhoff, M. J. (1992). Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology*, **105**, 41-48.
- Fallon, P. G. and Doenhoff, M. J. (1994). Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am. J. Trop. Med. Hyg., 51, 83-88.
- Finken, M., Sobek, A., Symmons, P. and Kunz W. (1994). Characterization of the complete protein disulfide isomerase gene of *Schistosoma mansoni* and identification of the tissues of its expression. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 640, 135-144.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. and Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T 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+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. J. Immunol., 143, 518.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A. and Michalak, M. (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 264(36), 21522-8
- Fried, B. and Haseeb, M. A. (1991). Plathyhelminthes: Aspidogastrea, Monogenea and Digenea. In: Microscopic anatomy of invertebrates. Harrison, F. W. and Bogitsh, B. J. (Eds.), (pp. 141-209).
- Frutiger, S., Hughes, G. J., Hanly, W. C., Kingzette, M. and Jaton, J. C. (1986). The amino-terminal domain of rabbit secretory component is responsible for noncovalent binding to immunoglobulin A dimers. J. Biol. Chem., 261, 16673-16681.

- Fu, Z. F., Hampson, D. J. and Wilks, C. R. (1990). Transfer of maternal antibody against group A rotavirus from sows to piglets and serological responses following natural infection. *Res. Vet. Sci.*, 48, 365-373.
- Furlong, S. T. and Caulfield, J. P. (1989). Schistosoma mansoni: Synthesis and release of phospholipids, lysophospholipids and neutral lipids by schistosomula. Exp. Parasitol., 69, 65-77.
- Gilbert, J. V., Plaut, A. G., Fishman, Y. and Wright, A. (1988). Cloning of the gene encoding streptococcal immunoglobulin A protease and its expression in *Escherichia coli. Infect. Immun.*, 56, 1961-1966.
- Glatz, J. F. C. and van der Vusse, G. J. (1989). Intracellular transport of lipids. Mol. Cell Biochem., 88(1-2), 37-44.
- Glatz, J. F. C. and van der Vusse, G. J. (1990). Cellular fatty acide-binding proteins: current, concepts and futuer directions. *Mol. Cell Biochem.*, 98, 237-251.
- Goldring, O. L., Clegg, J. A., Smithers, S. R. and Terry, R. J. (1976). Acquisition of human blood group antigens by Schistosoma mansoni. Clin. Exp. Immunol., 26, 181-187.
- Golvan, Y. (1990). Atlas de parasitologie. Le Léopard d'Or, (pp.107).
- Gorillot, I. (1990). Clonage moléculaire des glutathion-S-transferase de Schistosoma haematobium. *Mémoire de DEA Sciences de la vie et de la santé*. Université de Lille I. Septembre 1990.
- 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, 454-460.
- Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1982). In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S.mansoni antibodies. J. Immunol., 129, 2739-2743.
- Grzych, J. M., Capron, J. M., Dissous, C. and Capron, A. (1984). Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 133, 998-1004.
- 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, 1322-1327.
- 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(2), 527-535.
- 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, 243-245.
- Hammarstrom, S., Murphy, R. C., Samuelsson, B., Clark, D. A., Mioskowski, C. and Corey, E. J. (1979). Structure of leukotriene C identification of the amino acid part. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91, 1266-1272.

- Harn, D. A., Mitsuyama, M., Huguenel, E. D., Oligino, L. and David, J. R. (1985a). Identification by monoclonal antibody of a major (28 kDa) surface membrane antigen of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasit.*, 16, 345-354.
- Harn, D. A., Mitsuyama, M., Huguenel, E. D. and David, J. R. (1985b). Schistosoma mansoni: detection by monoclonal antibody of a 22,000-dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites. J. Immunol., 135, 2115-2120.
- Harn, D. A., Oligino, L. D., Ko, A. and Stein, L. D. (1987). Candidate Epitopes for Vaccination against *Schistosoma mansoni*. New York: Liss, A. R.
- Harn, D. A., Gu, W., Oligino, L. D., Mitsuyama, M., Gebremichael, A. and Richter, D. (1992). A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.*, 148, 562-567.
- Hatamochi, A., Golumbeck, P., Van Shaftingen, E. and DeCrombrugghe, B. (1988). A CCAAT DNA binding factor consisting of two different components that are both required for DNA binding. J. Biol. Chem., 263, 5940-5947.
- Henkle, K. J., Cook, G. A., Foster, L., Engman, D. M., Bobek, L. A., Cain, G. D. and Donelson, G. E. (1990a). The gene family encoding eggshell proteins of *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42, 69-82.
- Henkle, K. J., Davern, K. M., Wright, M. D., Ramos, A. J. and Mitchell, G. F. (1990b). Comparison of the cloned genes of the 26- and 28-kilodalton glutathione S-transferases of Schistosoma japonicum and Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 40, 23-24.
- Hiley, C., Fryer, A., Bell, J., Hume, R. and Strange, R. C. (1988). The human glutathione S-transferases. Immunohistochemical studies of the developmental expression of Alpha- and Pi-class isoenzymes in liver. Biochem. J., 254, 255-259.
- Hockley, D. J. (1973). Ultrastructure of the tegument of Schistosoma. Adv. Parasitol., 11, 233-305.
- Holy, J. M., O'Leary, K., Oaks, J. A. and Tracy, J. W. (1989). Immunocytochemical localization of the major glutathione S-transferase in adult Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 75, 181-190.
- Hooft Van Huijsduijnen, R. A., Bollekens, J., Dorn, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1987). Properties of a CCAAT box-binding protein. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 7265-7273.
- Hooker, C. W., Yang, W., Bekcer, M. M., Waine, G. J., Kalinna, B. H., Nimmo, K. A., McManus, D. P. and Brindley, P. J. (1995). Schistosoma japonicum: herterogeneity in paramyosin genes. Acta Tropica, 59, 131-141.
- Horejsi, V. and Vlcek, C. (1991). Novel stucturally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 288, 1-4.
- Horemans, A. M. C., Tielens, A. G. M. and Van Den Bergh, S. G. (1991). The transition from an aerobic to an anaerobic energy metabolism in transforming *Schistosoma mansoni* cercariae occurs exclusively in the head. *Parasitology*, 102, 259-265.

- Horemans, A. M. C., Tielens, A. G. M. and Van Den Bergh, S. G. (1992). The reversible effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomula. *Parasitology*, 51, 73-80.
- Huang, S. C., Hu, Z., Hasler-Rapacz, J. and Rapacz, J. (1992). Preferential mammary storage and secretion of immunoglobulin gamma (IgG) subclasses in swine. J. Reprod. Immunol., 21, 15-28.
- Huggins, M. C., Gibbs, J. and Moloney, N. A. (1995). Cloning of a Schistosoma japonicum gene encoding an antigen with homology to calreticulin. Mol. Biochem. Parasitol., 71(1), 81-87.
- Hutchens, T. W., Magnuson, J. S. and Yip, T. T. (1990). Secretory IgA, IgG and IgM immunoglobulins isolated simultaneously from colostral whey by selective thiophilic adsorption. J. Immunol. Methods, 128, 89-99.
- Ivanoff, N., Phillips, N., Schacht, A.-M., Heydari, C., Capron, A. and Riveau, G. (1996). Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm28 kDa glutathione S-transferase. Vaccine sous presse
- Jacobs, H. J., Moriarty, K. M., Charleston, W. A. G. and Heath, D. D. (1994). Resistance against *Taenia hydatigena* in sheep after passive transfer of serum or colostrum. *Parasit. Immunol.*, 16, 351-359.
- James, S. L. and Sher, A. (1990). Cell-mediated immune response to schistosomiasis. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 155(21), 21-31.
- Jonard, P. P., Rambaud, J. C., Dive, C., Vaerman, J. P., Galian, A. and Delacroix, D. L. (1984). Secretion of immunglobulins and plasma proteins from jejunal mucosa. J. Clin. Invest., 74, 525-535.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vomgt, H. and Viens, P. (1983). A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 303, 810-811.
- 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.
- Jourdane, J., Imbert-Establet D. and Tchuem Tchuenté, L. A. (1995). Parthenogenesis in Schistosomatidae. *Parasitol. Today*, 11(11), 427-430.
- Kagan, I. G. (1958). Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice. Inst. Pamph.*, 45, 151.
- Kaikaus, R. M., Bass, N. M. and Ockner, R. K. (1990). Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia*, 46(6), 617-630.
- Kassuku, A., Nansen, P. and Chritensen, N. O. (1985) A comparison of the efficiency of percutaneous and per-oral routes of infection in caprine Schistosoma bovis infections. J. Helminthol. 59, 23-28
- Kemp, W. M., Merritt, S. C., Bogucki, M. S., Rosier, J. G. and Seed, J. R. (1977). Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., 119, 1849-1854.

- Kett, K., Brandtzaeg, P., Radl, J. and Haaijman, J. J. (1986). Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secreting tissues. J. Immunol., 136, 3631-3635.
- Ketterer, B., Tan, K. H., Meyer, D. J. and coles, B. (1987). Glutathione Stransferases and carcinogenesis. Mantle, T. J., Pickett, C. B. and Hayes, J. D. (Eds.). (pp.149-163). London: Taylor and Francis.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. W. and Ouma, J. H. (1986). Immunity in human schistosomiasis. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. J. Exp. Med., 166, 1626.
- Khalife, J., Dunne, D. W., Richardson, B. A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A. and A.E., B. (1989). Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., 142, 4422-4427.
- Khalife, J., Grzych, J. M., Pierce, R., Ameisen, J. C., Schacht, A. M., Gras-Masse, H., Tartar, A., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1990). Immunological crossreactivity between the human immunodeficiency virus type 1 virion infectivity factor and a 170-kD surface antigen of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med., 172, 1001-1004.
- Khalife, J., Trottein, F., Schacht, A. M., Godin, C., Pierce, R. J. and Capron, A. (1993a). Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57, 193-202.
- Khalife, J., Pierce, R. J., Godin, C. and Capron, A. (1993b). Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 62(2), 313-315.
- Khalife, J., Liu, J. L., Pierce, R., Porchet, E., Godin, C. and Capron, A. (1994). Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology*, 108(5), 527-32.
- Khalife, J., Godin, C. and Capron, A. (1995). Transcriptional regulation of Schistosoma mansoni calreticulin: possible role of AP-1. Parasitology, 111, 469-475.
- Khalil, S. B. and Mansour, N. S. (1995). Worm development in hamsters infected with unisex and cross-mated *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. J. Parasitol., 81(1), 8-11.
- Kim, C. and Sheffery, M. (1990). Physical characterization of the purified CCAAT transcription factor-α-CP1. J. Biol. Chem., 265, 13362-13369.
- Klinkert, M. Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A. and Beck, E. (1989). Primary structures of Sm 31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33, 113-122.
- Klobasa, F., Werhahn, E. and Butler, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Res. Vet. Sci.*, 31, 195-206.
- Knopf, P. M., Cioli, D., Mangold, B. L. and Dean, D. A. (1986). Migration of Schistosoma mansoni in normal and passively immunized laboratory rats. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35, 1173-1184.

- Komiyama, K., Crago, S. S., Itoh, K., Moro, I. and Mestecky, J. (1986). Inhibition of natural killer cell activity by IgA. Cell. Immunol., 101, 143-155.
- Koster, B., Hall, M. R. and Strand, M. (1993). Schistosoma mansoni: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. Exp. Parasitol., 77(3), 282-94.
- Kraehenbuhl, J. P. and Neutra, M. R. (1992). Physiological reviews. Am. Physiol. Soc., 72, 853-879.
- 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(10), 3264-70.
- Kusel, J. R. and Mackenzie, P. E. (1975). The measurement of the relative turnover rates of proteins of the surface membranes and other fractions of *Schistosoma mansoni* in culture. *Parasitology*, 71(2), 261-73.
- Kutteh, W. H., Hatch, K. D., Blackwell, R. E. and Mestecky, J. (1988). Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. *Obstet. Gynecol.*, 71, 56-60.
- Ladjeva, I., Peterman, J. H. and Mestecky, J. (1989). IgA subclasses of human colostrol antibodies specific for microbiol and food antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, 78, 85-90.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.
- Lamkhioued, B. (1992) Intéractions de l'eosiophile avec le composant sécrétoire. D.E.A., Université de Lille I.
- Lamkhioued, B., Soussi, G. A., Gruart, V., Pierce, A., Capron, A. and Capron, M. (1995). Human eosinophils express a receptor for IgA-dependent activation. Eur. J. Immunol., 25, 117-125.
- Lanar, D. E., Pearce, E. J., James, S. L. and Sher, A. (1986). Identification of paramyosin as schistosome antigen recognised by intradermally vaccinated mice. *Science*, 234, 593-596.
- Landsberger, N. and Wolffe, A. (1995). Role of chromatin and Xenopus laevis heat shock transcription factor in regulation of transcription from the X. laevis hsp promoter in vivo. Mol. Cell. Biol., 15, 6013-6024.
- Lanza, I., Shoup, D. I. and Saif, L. J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. Am. J. Vet. Res., 56, 739-748.
- Laude, V. and Stehelin, D. (1992). Nuclear receptors: flexible friends. Curr. Biol., 2, 293-295.
- Laudet, V. and Adelmant, G. (1995). Lonesome orphans. Curr. Biol., 5, 124-127.
- Lawrence, J. D. (1973). The ingestion of red blood cells by Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 59, 60-63.
- Le Jan, C. (1993). Secretory component and IgA expression by epithelial cells in sow mammary gland and mammary secretions. Res. Vet. Sci., 55, 265-270.

- Leid, R. W. and Williams, J. F. (1974). The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. I. Immunoglobulin classes involved in passive transfer of resistance. *Immunology*, 27, 195-208.
- Leslie, G. A. and Teramura, G. (1977). Structrure and biological functions of human IgD. XIV. The development of a solid-phase radioimmunoassay for the quantitation of IgD in human sera and secretions. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.*, 54, 451-456.
- Lindh, E. (1975). Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. J. Immunol., 14, 284-286.
- Lioyd, S. and Soulsby, E. J. L. (1978). The role of immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology*, 34, 939-945.
- Loker, R. S. (1983). A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology*, 87, 343-369.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. N., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Macer, D. R. and Koch, G. L. (1988). Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, 91(1), 61-70.
- 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, 1058-1065.
- Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J. A., Doroshon, J. H. and Esworthy, R. S. (1991). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. J. Biol. Chem., 266(12), 7728-7732.
- Maiorino, M. R., C., Kieb, M. König, K., Gawlik, D., Matthes, M. Naldini, E., Pierce, R. and Flohe, L. (1996). The product of the *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase gene is a selenium containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase sharing molecular weight, catalytic efficiency and substrate specificity with its mammalian counterpart. *Eur. J. Biochem.*, sous press.
- Mannervik, B. (1985). Isoenzymes of glutathione transferase. In: Advances in Enzymology and Ralated Areas of Molecular Biology (pp. 357-417).
- Mantovani, R., Superti Furga, G., Gilman, J. and Ottolenghi, S. (1989). The deletion of the distal CCAAT box region of the A gamma-globin gene in black HPFH abolishes the binding of the erythroid specific protein NFE3 and of the CCAAT displacement protein. *Nucleic Acids Res.*, 17(16), 6681-91.
- Mazanec, M. B., Nedrud, J. G. and Lamm, M. E. (1987). Immunoglobulin A monoclonal antibodies protect against Sendai virus IgA nephropathy: pathogenesis of the most common form of glomerulonephritis. J. Virol., 61, 2624-2626.
- Mazingue, C., Dessaint, J. P., Schmitt-Verhulst, A. M., Cerottini, J. C. and Capron, A. (1983). Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosomederived inhibitory factor is dependent of an inhibition of the production of interleukin 2. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, 72, 22-29.

- Mazingue, C., Stadler, B., Quatannens, B., Capron, A. and De Weck, A. (1986). Schistosome-derived inhibitory factor: an immunosuppressive agent preferentially active on T-lymphocytes. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, 80, 347-354.
- McNair, A., Dissous, C., Duvaux-Miret, O. and Capron, A. (1993). Cloning and characterization of the gene encoding the 28 kDa glutathione S-transferase fo Schistosoma mansoni. Gene, 124, 245-249.
- McCauliffe, D. P., Lux, F. A., Lieu, T. S., Sanz, I., Hanke, J., Newkirk, M. M., Bachinski, L. L., Itoh, Y., Siciliano, M. J., Reichlin, M., Sontheimer, R. D. and Capra, J. D. (1990a). Molecular cloning, expression and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. J. Clin. Invest., 85, 1379-1391.
- McCauliffe, D. P., Zeppi, E., Lien, T. S., Michalak, M., Sontheimer, R. D. and Capa, D. (1990b). A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with *Onchocercal* RAL-1 antigen and aplysia 'memory molecule'. J. Clin. Invest., 86, 332-335.
- McCune, J. M., Fu, S. M. and Kunkel, H. G. (1981). J chain biosynthesis in pre-B cells and other possible precursor B cells. J. Exp. Med., 154, 138-145.
- McLean, I. W. and Nakane, P. K. (1974). Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixiative. A new fixiative for immunoelectron microscopy. J. Histochem. Cytochem., 22, 1077-1083.
- McManus, D. P., Waine G. J., Yang, W., Bekcer, M. M., Kalinna, B. H., Liu, X. and Wu, T. (1993). Towards vaccine against Asian schistosomiasis. *Today's Life Science*, 24-43.
- McTigue, M. A., Williams, D. R. and Tainer, J. A. (1995). Crystal structrure of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione-S-transferase from Schistosoma japonicum and its complex with the leading antischistosomal drug Praziquantel. J. Mol. Biol., 246, 21-27.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. J. Bio. Chem., 263(33), 17205-17208.
- Mestecky, J. and Russell, M. W. (1986). IgA subclasses. Monogr. Allergy., 19, 277-301.
- Mestecky, J. and McGhee, J. R. (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. Adv. Immunol., 40, 153-245.
- Mestecky, J., Lue, C. and Russell, M. W. (1991). Selective transport of IgA: cellular and molecular aspects. Gastroenterol. Clin. North. Am., 20, 441-471.
- Metwali, A., Elliott, D., Mathew, R., Blum, A. and Weinstock, J. V. (1993). IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with S.mansoni. J. Immunol., 150, 536.
- Meyer, F., Meyer, H. and Bueding, E. (1970). Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat worms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. Biochim. Biophys. Acta., 210, 256-266.
- Meyer, T. F., Halter, R. and Pohlner, J. (1987). Mechanism of extracellular secretion of an IgA protease by gram-negative host cells. Adv. Exp. Med. Biol., 216B, 1271-1281.

- Michalak, M., Milner, R. E., Burns, K. and Opas, M. (1992). Calreticulin. *Biochem. J.*, 285, 681-692.
- Mills, G. C. (1957). Glutathione peroxydase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Bio. Chem., 229, 189-197.
- Minard, P. L., Dean, D. P., Jacobson, R. H., Vannier, W. E. and Murrell, K. D. (1978). Immunization of mice with cobalt-60-irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 76-86.
- Mirault, M. E., Tremblay, A., Beauchain, N. and Tremblay, M. (1991). Overexpression of seleno-glutathione peroxydase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants. J. Biol. Chem., 266(31), 20752-20760.
- Mitchell, G. F., Garcia, E. G., Davern, K. M., Tiu, W. U., and Smith, D. B. (1988). Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to Schistosoma japonicum in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 885-889.
- Mizoguchi, A., Mizuochi, T. and Kobata, A. (1982). Structures of the carbohydrates moieties of secretory component purified from human milk. J. Biol. Chem., 257, 9612-9621.
- Mocsari, E. (1980). Vaccination experiments against transmissible gastroenteritis (TGE) of swine VII. Immunoglobulin characteristics of antibodies in milk of sows vaccinated with the "CKp" strain of TGE virus. Acta. Vet. Acad. Sci. Hung., 28(2), 131-145.
- Moeremans, M., Daneels, G., Van Dijck, A., Langanger, G. and De Mey, J. (1988). Sensitive visualization of antigen-antibody reaction in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold / silver staining. J. Immunol. Methods, 74, 353-360.
- Mogens, K. and. Russell, M. W. (1994). Fuction of mucosal Immunoglobulins. In: Handbook of mucosal immunology. M. Ogra P.L., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee, J. R., Bienenstock, J. (Eds.), (pp. 643). Academic Press.
- Moloney, N. A., Hinchcliffe, P. and Webbe, G. (1987). Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japomicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81, 247-254.
- Morgenstern, R. and DePierre, J. W. (1983). Microsomal glutathione S-transferase: Purification in unactivated form and further characterization: activation process, substrat specificity and amino acid composition. J. Biochem., 134, 597-602.
- Morgenstern, R., and DePierre, J. W. (1988). Membrane-bound glutathione transferases. In: Glutathione conjugation: Its Mechanisms and Biological Significance (Sies, H and Ketterer, B., eds.), (pp. 157-174), London: Academic press.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G. and Klinkert, M. Q. (1991). A 14-kDa Schistosoma mansoni polypeptide is homologous to a gene family of fatty acide binding proteins. J. Biol. Chem., 266, 8447-8454.
- Mosmann, T. R. and Coffman, L. R. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immunol., 46, 111.

- Mostafa, M. H., Badawi, A. F. and O'Connor, P. J. (1995). Bladder cancer associated with schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 11, 87-89.
- Mygind, N., Weeke, B. and Ullman, S. (1975). Quantitive determination of immunoglobulins in nasal secretion. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immun.*, 49, 99-107.
- Nara, T., Matsumoto, N., Janecharut, T., Matsuda, H., Yamamoto, K., Irimura, T., Nakamura, K., Aikawa, M., Oswald, I., Sher, A., Kita, K. and Köjima, S. (1994). Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int. J. Immunol.*, 6, 963-971.
- Nare, B., Smith, J. M. and Prichard, R. K. (1990). Schistosoma mansoni: levels of antioxydants and resistance to oxidants increase during development. Exp. Parasitol., 70, 389-397.
- Neumann, S., Ziv, E., Lantner, F. and Schechter, I. (1992). Cloning and sequencing of an hsp70 gene of Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 56, 357-360.
- Niedermeier, W., Tomana, M. and Mestecky, J. (1972). The carbohydrate composition of J chain from human serum and secretory IgA. *Biochem. Biophys. Acta.*, 257, 527-530.
- Noiva, R. and Lennarz, W. J. (1992). Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 267, 3553-3556.
- Nojima, H. and Sato, A. (1982). Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium emergence of schistosome cercairiae from snails with darkness and illumination. Exp. Parasitol., 53, 189-198.
- O'Leary, K. A. and Tracy, J. W. (1988). Purification of three cytosolique glutathione S-transferase from adult Schistosoma mansoni. Arch. Biochem. Biophys., 264, 1-12.
- O'Leary, K. A. and Tracy, J. W. (1991). Schistosoma mansoni: glutathione Stransferase catalyzed detoxification of dichlorvos. Exp. Parasitol., 72, 355-361.
- O'Leary, K. A., Hathaway, K. M. and Tracy, J. W. (1992). Schistosoma mansoni: Single step purification and characterisation of glutathione S-transferase isoenzyme 4. Exp. Parasitol., 75, 47-55.
- Ockner, R. K. (1990). Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol. Cell Biochem.*, 98, 3-9.
- Oldes, G. R. and Mahmoud A. A. F. (1980). Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni. Eosinophil mediated destruction of eggs. J. Clin. Invest., 66, 1191-1199.
- Oligino, L. D., Percy, A. J. and Harn, D. A. (1988). Purification and immunochemical characterization of a 22 kilodalton surface antigen from *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasit., 28, 95-104.
- Opas, M. D., E., Fliegel, L.and Michalak, M. (1991). Regulation of expression and intracellular distribution of calreticulin, a major calcium binding protein of nonmuscle cells. J. Cell. Physiol., 149, 160-171.

- Ostwald, T. J. and MacLennan, D. H. (1974). Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 249(3), 974-979.
- Oswald, I. P., Eltoum, 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 USA*, 91(3), 999-1003.
- Otubanjo, O. A. (1980). Schistosoma mansoni: the ultrastructure of the ducts of the male reproductive system. Parasitology, 81, 565-571.
- Ouaissi, M. A., Cornette, J. and Capron, A. (1984). Occurence of fibronectin antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* lung schistosomula and adult worms. *Parasitolog*, 88, 85-96.
- 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. (1994). Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infect. Immun.*, 62(9), 3723-3730.
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Bossus, M., Gras-Masse H., Guerret, S., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. (1994). Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Mol. Immunol.*, 31(16), 1247-56.
- Parkhouse, R. M. E. and Della Corte, E. (1973). Biosynthesis of immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM). Control of polymerization by J chain. *Biochem. J.*, 136, 607-609.
- Pearce, E. J., James, S. L., Dalton, J., Barrall, A., Ramos, C., Strand, M. and Sher, A. (1986). Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. *J. Immunol.*, 137, 3593-3600.
- Pearce, E. J., James, S. L., Hieny, S., Lanar, D. E. and Sher, A. (1988). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5678-5682.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med., 173, 159.
- Peeters, R. A. and Veerkamp, J. H. (1989). Does fatty acid-binding protein play a role in fatty acid transport? *Mol. Cell Biochem.*, 88, 45-49.
- **Pelham, H. R.** (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 5, 1-23.
- Phillips, R. W. and Tumbleso, M. E. (1986). Swine in Biolmedical Research. Plenum Press.
- Picot, H. (1993). La lutte contre les schistosomiases. Rev. Prat. (Paris), 43(4), 462-465.

- Pierce, R. J., Khalife, J., Williams, D. L., Kanno, R., Trottein, F., LePresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T. and Capron, A. (1994). Schistosoma mansoni: Characterization of sequence variants of the 28-kDa glutathione Stransferase. Exp. Parasitol., 79, 81-84.
- Pike, M. C. (1986). Association épidémiologique entre infection à Schistosoma haematobium et cancer de la vessie. Bulletin OMS.
- Pino-Heiss, S., Brown, M. and McKerrow, J. H. (1985). S.mansoni: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. Exp. Prasitology, 59, 217-221.
- Plebani, A., Mira, E., Mevio, E., Monafo, V., Notarangelo, L. D., Avanzini, A. and Ugazio, A. G. (1983). IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective IgA deficiency. Clin. Exp. Immunol., 53, 689-696.
- **Popiel, I. and Basch, P. F.** (1984). Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *J. Exp. Zool.*, 232, 141-150.
- Porchet, E., McNair, A., Caron, A., Kusnierz, J. P., Zemzoumi, K. and Capron, A. (1994). Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*, 109(5), 565-572.
- **Porter, P.** (1973). Studies of porcine secretory IgA and its component chains in relation to intestinal absorption of colostral immunoglobulins by the neonatal pig. *Immunology*, **24**, 163-176.
- Poulain-Godefroy, O., Gaubert, S., Lafitte, S., Capron, A. and Grzych, J. M. (1996). Immunoglobulin A response in murine Schistosomiasis: stimulation role of egg antigens. *Infec. Immun.*, 64(3), 763-768.
- Precious, W. Y. and Barret, J. (1989). The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem. Biophys. Acta*, 992, 215-222.
- **Prohaska**, J. R. (1980). The glutathione peroxidase activity of glutathione Stransferases. *Biochim. Biophys. Acta*, 611, 87-98.
- **Pumphrey, R. S. H.** (1986). Computer models of the human immunoglobulins. Binding sites and molecular interactions. *Immunol. Today*, 7, 206-211.
- Quitschke, W., Lin, Z. Y., DePonti-Zilli, L. and Paterson, B. M. (1989). The β actin promoter. High levels of transcription depend upon a CCAAT binding factor. J. Biol. Chem., 264, 9539-9546.
- Rajapakse, R. P. V. J., Lioyd, S. and Fernando, S. T. (1994a). The effect of serum and colostrum immunoglobulins from buffaloes infected with *Toxocara vitulorum* on *T. vitulorum* larvae in vitro and in vivo in mice. Parasitol. Res., 80, 426-430.
- **Rajapakse, R. P. V. J.** (1994b). *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (Bubalis bubalis) to calves and levels of infection with T vitulorum in the calves. *Res. Vet. Sci.*, 57, 81-87.
- Ramirez, B. L., Kurtis, J. D., Weist, P. M. Arias, P. Aligui, F. E. Acosta, L., Peters, P. and Olds, G. R. (1996). Paramyosin: a candidate vaccine antigne against *Schistosoma japonicom*. Parasite Immunol., 18, 49-52.

- Redemann, N., Gaul, U. and Jackle, H. (1988). Several distinct "CCAAT" box binding proteins coexist in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 757-761.
- Reeder, M. M. and Palmer, P. E. S. (1981). The radiology of Tropical Diseases with epidermiological, radiological and clinical correlation"., Williams & Wilkins (eds.), Baltimore, London, (pp.1030)
- Reissig, M. (1970). Characterization of cell types in the parenchyma of Schistosoma mansoni. Parasitology, 60, 273-279.
- Reith, W., Siegrist, C-A., Barras E. and Mach, B. (1994). Function of major histocompatibility complex class II promoters requires cooperative binding between factors RFX and NF-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 554-558.
- Renegar, K. B. and Small, P. A. J. (1991). Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. J. Immunol., 146, 1972-1978.
- Reynolds, S. R., Shoemaker, C. B. and Harn, D. A. (1992). T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosma mansoni*. J. *Immunol.*, 149, 3995-4001.
- Reynolds, S. R., Dahl, C. E. and Harn, D. A. (1994). T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine Triose-Phosphate Isomerase. J. Immunol., 152, 193-200.
- Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A. and Dessein, A. J. (1991). Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.*, 21(11), 2679-2686.
- Roche, C. (1995) Caractérisation génétique et moléculaire d'une glutathion peroxidase séléno-dépendante de Schistosoma mansoni. Thèse de Doctorat, Université de Lille I.
- Rokeach, L. A., Haselby, J. A., Meilof, J. F., Smeenk, R. J., Unnasch, T. R., Greene, B. M. and Hoch, S. O. (1991). Characterization of the autoantigen calreticulin. J. Immunol., 147(9), 3031-3039.
- Rollinson, D. and Southgate, V. R. (1987). The genus schistosoma: a taxonomic appraisal. In: The biology of schistosomes. Rollinson, D., Simpson, A. J. G. (Eds.), (pp. 1-49), New York: Academic Press.
- Ronchi, A., Bellorini, M., Mongelli, N. and Mantovani, R. (1995). CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distors DNA. *Nucl. Acid. Res.*, 23, 4565-4572.
- Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1978). II. Quantitive determination of specific IgE antibodies against *S.mansoni*: a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology*, 35, 33.
- Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligar and Ursini, F. (1992). Phospholipid hydroperoxide hydroperoxida glutathione peroxidase of rat testis: gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.*, 267(9), 6142-6146.
- Russell, M. W., Reinholdt, J. and Kilian, M. (1989). Anti-inflamatory activity of human IgA antibodies and their Fab fragments: Inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur. J. Immunol.*, 19, 2243-2249.

- Russell-Jones, G. J., Ey, P. L. and Reynolds, B. L. (1980). The ability of IgA to inhibit the complement-mediated lysis of target red blood cells sensitized with IgG antibody. *Mol. Immunol.*, 17, 1173-1180.
- Russell-Jones, G. J., Ey, P.L. and Reynolds, B.L. (1981). Inhibition of cutaneous anaphylaxis and Arthus reactios in mouse by antigen specific IgA. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 66, 316-325.
- Salmon, H. (1987). The intestinal and mammary immune system in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol., 17, 367-388.
- Salmon, H. (1995). Lactogenic immunity and vaccinal protection in swine. Vet. Res., 26(3), 232-237.
- Salvator, L., Wijffels, I., G., Sexton, J. L., Panaccio, M., Mailer, S., McCauley, I. and Spithil, T. W. (1995). Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of Fasciola hepatica. Mol. Biochem. Parasitol., 69, 281-288.
- Schaerer, E., Neutra, M. R. and Kraehenbuhl, J. P. (1991). Molecular and cellular mechanisms involved in transepithelial transport. J. Membr. Biol., 123, 93-103.
- Schaller, J. P., Saif, L. J., Cordle, C. T., Candler, E., Winship, T. R. and Smith, K. L. (1992). Prevention of human rotavirus-induced diarrher in gnotobiotic piglets using bovin antibody. J. Infect. Dis., 165, 623-630.
- Seilles, E., Vuitton, D., Sava, P., Claude, P., Panouse Perrin, J., Roche and D. L. Delacroix (1985). IgA and its different molecular forms in the mesenteric, portal and periferal venous blood in man. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 9, 607-613.
- Serra, E., Zemzoumi, K., Trolet, J. Capron, A. and Dissous, C. Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase gene promoter: involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. sousmis.
- Shaw, J. R. (1977). Schistosoma mansoni: pairing in vitro and development of females from single sex infection. Exp. Parasitol., 41, 54-65.
- Sher, A., Hall, B. F. and Vadas, M. A. (1978). Acquisition of murine major histocompatibility genius products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med., 148, 46.
- Sher, A., James, S. L., Correa-Oliveira, R., Hieny, S. and Pearce, E. (1989). Schistosomes vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology*, 98, 61-68.
- Shoemaker, C., Gross, A., Gebremichael, A. and Harn, D. (1992). cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1842-1846.
- Short, R. B. (1983). Sex and the single Schistosome. J. Parasitol., 69, 4-22.
- Skvaril, F. and Morell, A. (1974). Distribution of IgA subclasses in sera and bone marrow plasma cells of 21 normal individuals. Adv. Exp. Med. Biol., 45, 433-435.
- Smith, M. D. (1977). The ultrastructural development of the schistosome egg granuloma in mice. *Parasitology*, 75, 119-123.

- 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. USA, 83, 8703-8707.
- Smith, M. J. and Koch, G. L. (1989). Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.*, 8(12), 3581-3586.
- Snodgrass, D. R., Campbell, I., Mwenda, J. M., Chege, G., Suleman, M. A., Morein, B. and Hart, C. A. (1995). Stimulation of rotavirus IgA, IgG and neutralising antibodies in baboon milk by parenteral vaccination. *Vaccine*, 13(4), 408-413.
- Sollid, L. M., Kvale, D., Brandtzaeg, P., Markussen, G. and Thorsby, E. (1987). Interferon-gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins. *J. Immunol.*, 138, 4303-4306. Spence, I. M. and Silk, M. H. (1971) Ultrastructural studies of the blood fluke-Schistosoma mansoni. V. The female reproductive system-A preliminary report. S. Afr. Med. Sci. 36, 41-50.
- Stone, S., Kemeny, J. L., Wood, R. D. and Jensen, M. T. (1977). Efficacy of isolated colostral IgA, IgG and IgM to protect neonatal pigs against the coronavirus of transmissible gastroenteritis. Am. J. Vet. Res., 38, 1285-1288.
- Swindle, M. M. (1984). Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. *Lab. Anim. Sci.*, 34(4), 383-385.
- Szabo, S., Gold, J., Murphy, T. and Murphy, K. (1993). Identification of cisacting regulatory elements controlling interleukine-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4793-4805.
- Talla, I., Belot, J., Verlé, P., Kongs, A., Sarr, S. and Coll., A. M. (1990). Observations sur un nouveau foyer de schistosome à Schistosoma mansoni dans la vallée du fleuve Sénégal. Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 8, 802.
- Tan, K. H., Meyer, D. J. and Ketterer, B. (1984). Inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione and glutathione transferases B and AA. *Biochem. J.*, 220, 243-252.
- Taylor, M. G. and Bickle, Q. D. (1986). Towards a schistosomiasis vaccine: irradiated schistsomes vaccines. *Parasitol. Today*, 2, 132-134.
- 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 gluthathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. EMBO J., 7, 465-472.
- Tendler, M., Brito, C., A., Vilar, M. M., Serra-Freire, N., Diogo, C. M., Almeida, M. S., Delbem, A. C. B., Da Silva, J. F., Savino, W., Garratt, R. C., Katz, N. and Simpson, A. J. G. (1996). A Schistosoma mansoni fatty acide-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 269-273.
- Terrier, P., Townsend, A. J., Coindre, J. M., Triche, T. J. and Cowan, K. H. (1990). An immunohistochemical study of Pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. Am. J. Pathol., 137, 845-853.

- Thomas, J. P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A. W. (1990a). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation: in situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. J. Biol. Chem., 265, 454-461.
- Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A. W. (1990b). Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1045, 252-260.
- Tielens, A. G. M., Hormans, A.M.C., Dunnewijk, R., Van de Meer, P. and Van de Bergh, S. G. (1992). The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 56, 49-58.
- Tom, T. D., Dalton, J. P. and Strand, M. (1987). Cloning of cDNAs encoding schistosomular antigens. *Mol. Parad. Erad. Helm. Parasites*, 60, 105.
- Tomana, M., Mestecky, J. and Niedermeier, W. (1972). Studies on human secretory immunoglobulin A. IV. Carbohydrate composition. J. Immunol., 108, 1631-1636.
- Tomana, M., Niedermeier, W., Mestecky, J. and Skvaril, F. (1976). The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins. *Immunochemistry*, 13, 325-328.
- Tomana, M., Kulhavy, R. and Mestecky, J. (1988). Receptor-mediated bining and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology*, 94, 762-770.
- Tomasi, T. B. J. (1983). Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces. Rev. Infect. Dis., 5 (Suppl. 4), S784-S792.
- Tomasi, T. B. (1994). Introduction: An overview of the Mucosal System. In: Handbook of Mucosal Immunology. Ogra, P. L., Strober, W., Mestecky, J., McGhee, J. R., Lamm, M. E., Bienenstock, J. (eds), (pp. 3-8), Academic Press Inc.
- Torano, A., Tsuzukida, Y., Liu, Y.-S. V. and Putnam, F. W. (1977). Location and structrural significance of the oligosaccharides in human IgA1 and IgA2 immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2301-2305.
- 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, 309-324.
- Torpier, G., Capron, A. and Ouaissi, M. A. (1979). Receptor of IgG (Fc) and human β2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature*, 278, 447-449.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfert of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350.
- Treves, S., De Mattei, M., Landfredi, M., Villa, A., Green, N. M., MacLennan, D. H., Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1990). Calreticulin is a candidate for a calsequestrin-like function in Ca<sup>2+</sup>-storage compartments (calciosomes) of liver and brain. *Biochem. J.*, 271(2), 473-80.

- 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 kDa glutathione S-transferase from Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 41, 35-44.
- Trottein, F., Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B., Taylor, M. G., Gorillot, I., Sampaio, S. M., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1992a). Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 54, 63-72.
- Underdown, B. J. and Schiff, J. M. (1986). Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. Ann. Rev. Immunol., 4, 389-417.
- Unnasch, T. R., Gallin, M. Y., Soboslay, P. T., Erttmann, K. D. and Greene, B. M. (1988). Isolation and characterization of expression cDNA clones encoding antigens of *Onchocerca volvulus* infective larvae. J. Clin. Invest., 82(1), 262-9.
- Van Cott, J. L., Brim, T. A., Lunney, J. K. and Linda, J. S. (1994). Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pig inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. J. Immunol., 152, 3980.
- Van de Waa, E. A., Campbell, C. K., O'Leary, K. A. and Tracy, J. W. (1993). Induction of *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase by xenobiotics. Archs. Biochem. Biophys., 303, 15-21.
- Velupillai, P. and Harn, D. A. (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 18-22.
- Verwaerde, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R. J., Damonneville, M., Velge, F., Auriault, C. and Capron, A. (1987). Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. J. Immunol., 138, 4441-4446.
- Walker, J., Morman, A. D., Crowley, P. and Barrett, J. (1993). Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum. Mol. Biochem. Parasitol., 61, 255-264.
- Weltzin, R. A., Lucia Jandris, P., Mitchetti, P., Fields, B. N., Kraehenbuhl, J. P. and Neutra, M. R. (1989). Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. J. Cell Biol., 108, 1673-1685.
- Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Salvatore, L., Pettitt, J. M., Humphris, D. C., Panaccio, M. and Spithill, T. W. (1992). Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferase of Fasciola hepatica. Exp. Parasitol., 74, 87-99.
- Williams, R. C. and Gibbons, R. J. (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science*, 177, 697-699.
- Williams, D. L., Pierce, R. J., Cookson, E. and Capron, A. (1992). Molecular cloning and sequencing of glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **52**, 127-130.
- Willingham, A. L. and Hurst, M. (1996). The pig as unique host model for Schistosoma japonicum infection. Parasitol. Today, 12(4), 132-134.

- Winner, L. S., III, Mack, J., Weltzin, R. A., Mekalanos, J. J., Kraehenbuhl, J. P. and Neutra, M. R. (1991). New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect. Immun.*, 59, 977-982.
- Wold, A. E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T. and Svanborg-Edén, C. (1990). Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.*, 58, 3073-3077.
- 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* Sm28 GST antigen in rat, mouse and monkey. Partial protection of Fischer rats after active immunization. J. Immunol., 146, 1987-1995.
- Wright, M. D., Henkle, K. J. and Mitchell, G. F. (1990). An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J. Immunol.*, 144, 3195-3200.
- Wright, M. D., Harrison, R. A., Melder, A; M., Newport, G. R. and Mitchell, G. F. (1991a). Another 26-kilodalton glutathione S-transferase of Schistosoma mansoni. Mol. Biochem. Parasitol., 49, 177-180.
- Wright, M. D., Melder, A. M., Davern, K. M. and Mitchell, G. F. (1991b). Serologic reactivities of the 23-kDa integral membrane proteins of schistosomes. J. Immunol., 147, 4338-4342.
- Wright, K., Moore, T., Vilen, B., Brown, A. and Ting, J. (1995). Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is upregulated by cooperative interactions of Sp1 and NF-Y. J. Biol. Chem., 270, 20978-20986.
- Wu, Z. et al. (1992). Chin. J. Parasitol. Parasitic Dis., 10, 194-197.
- Wynn, T. A., Eltoum, 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, 1430-1440.
- 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, 1801-1807.
- 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, 940-949.
- Yang, W., Waine G. J. and McManus, D. P. (1995). Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, 212(3), 1029-1039.

Zemzoumi, K., Dissous, C., Cochu, A., Trolet, J., Capron, A. and McNair, A. (1995). Schistosoma mansoni: interaction of nuclear extracts with the CCAAT binding site revealed by the gel shift assay. Exp. Parasitol., 80, 149-154.

Zemzoumi, K., Serra, E., Mantovani, R., Trolet, J., Capron, C. and Dissous, C. (1996). Cloning of *Schistosoma mansoni* transcription factor NF-YA subunit: phylogenic conservation of the HAP-2 homology domain. *Mol. Biochem. Parasitol.*, sous press.

## TABLE DES MATIERES

Introduction	p11
A. Le schistosome et la schistosomiase	p15
1. Place des schistosomes dans le règne animal	p16
2. Cycle évolutif	p18
2.1. Stade adulte	
2.2. Le miracidium	
2.3. Le sporocyste	
2.4. La cercaire	p20
2.5. Le schistosomule	
3. Biologie du schistosome	
3.1. Nutrition	p22
3.2. Excrétion	
3.3. Respiration	
3.4. Reproduction	p24
4. Pathologie et manifestation(s) clinique(s)	p27
4.1. Symptômes généraux	
4.2. Dermatite	
4.3. Symptômes liés à l'excrétion des oeufs	
4.4. Manifestations granulomateuses	p28
5. Immunologie des schistosomiases	p29
5.1. Immunité naturelle	
5.2. Immunité acquise	p30
5.2.1. La réponse humorale	
5.2.2. La réponse cellulaire	p32
6. Mécanismes d'échappement du parasite	p34
6.1. Rémaniement des antigènes de surfaces	
6.2. Les anticorps bloquants	p35
6.3. Immunosuppression induite	
7. Diagnostic	p36
8. Lutte contre la schistosomiase	
8.1.Traitement	
8.2. Prophylaxie sanitaire	p37
8.3 Prophylavie médicale	

B. Les antigènes à potentialité vaccinale	p38
1. La paramyosine	p40
2. L'antigène IrV5	p41
3. L'antigène Sm23	p42
4. L'antigène Sm14	p43
5. La Triose-Phosphate-Isomérase (TPI)	p44
<ul><li>6. La Sm28 GST</li><li>6.1. Pouvoir protecteur contre la Schistosomiase.</li></ul>	p45
6.2. Les fonctions biologiques des GSTs	p49
6.3. Les GSTs du schistosome et les isoenzymes de Sm28 GST	p52
6.4. Les sites d'expression	p53
6.5. La régulation de l'expression du gène codant pour GST du schistosome	e p54
7. Les glutathion peroxydases 7.1. La phospholipide glutathion peroxydase du schistosome 7.2. Les généralités sur les glutathion peroxydases (GSHpxs)	p55
7.3. La phospholipide glutathion peroxydase (PHGSHpx)	p57
8. Les Calréticulines 8.1. La calréticuline du schistosome (SmCaR)	p58
<ul> <li>8.2. La distribution et localisation cellulaire de la calréticuline</li> <li>8.3. Les fonctions biologiques de la calréticuline</li> <li>8.3.1. Stockage du calcium</li> </ul>	p59
8.3.2. Inhibition d'activité du récepteur hormonal 8.3.3. Autres fonctions	p60
C. Propriétés des immunoglobulines A	p62
1. Les immunoglobulines dans les sécrétions muqueuses	p63
2. La structure des immunoglobulines A sécrétoires	p64
<ul> <li>3. Les sous-classes d'IgA chez l'homme</li> <li>3.1. La distribution des sous-classes d'IgA</li> <li>3.2. Les différences fonctionnelles des sous-classes d'IgA</li> </ul>	p66
4. Le transport transépithélial des IgA	p68

5. Les mécanismes de protection liés à l'IgA	p70
6. IgA et la schistosomiase	p71
Matériels et méthodes	p72
1. Les parasites	p73
<ul> <li>2. Les antigènes</li> <li>2.1. L'antigène Sm28 GST</li> <li>2.2. L'antigène Sb28 GST</li> <li>2.3. La 28 GST native de S.mattheei</li> <li>2.4. Le facteur nucléaire NF-YA de S.mansoni (SmNF-YA)</li> <li>2.5. La calaréticuline de S.mansoni (SmCaR)</li> <li>2.6. Le phospholipide hydropéroxyde glutathion péroxydase de S.mansoni (SmPHGSHpx)</li> </ul>	p74
3. Modèles d'études 3.1. Modèle d'infection 3.2. L'immunisation de porc	p75
4. Les anticorps	p76
<ul> <li>4.1. La production d'immunsérums</li> <li>4.2. La purification d'immunoglobuline dans les sécrétions lactées porcines</li> <li>4.2.1. La délipidation et la décaséination du lait et du lactosérum</li> <li>4.2.2. Traitement par la sépharose 4B couplée à la protéine A</li> </ul>	p77
5. Techniques d'immunomarquage 5.1. Méthode immunohistochimique 5.1.1.Traitement du tissus	
5.1.2. Immunomarquages	p78
<ul><li>5.1.3. Technique de double marquage</li><li>5.2. Les techniques de microscopie électronique</li><li>5.2.1. Etape d'inclusion</li><li>5.2.2. Immunomarquage</li></ul>	p79
6. Dosage des anticorps spécifiques : technique immuno-enz (ELISA)	zymatiqu
7. Technique d'inhibition enzymatique	p80
8. Technique d'immuno-electrotransfert	p81

Resultats p84

A. Localisation des antigènes à potentialité vaccinale sur S.mansoni p85

- 1. Localisation ultrastructurale de la Sm28 GST chez les vers adultes de S.mansoni
  - 1.1. Immunohistochimie
  - 1.2. Microscopie électronique

p87

- 2. L'expression du facteur SmNF-YA dans les différents stades de S.mansoni, colocalisation avec l'Ag Sm28 GST p98
  - 2.1. La localisation du facteur SmNF-YA
  - 2.2. La colocalisation avec l'Ag Sm28 GST
- 3. La localisation de la calréticuline de S.mansoni et la colocalisation avec l'Ag Sm28 GST chez les vers adultes p102
  - 3.1. Observation optique
  - 3.2. Observation ultrastructurale

p105

- 4. Observation histologique de la localisation de la phospholipide hydropéroxyde glutathion péroxydase de S.mansoni (SmPHGSHpx) p111
- B. Analyse de la protection croisée induite par la Sb28 GST recombinante (rSb28 GST) dans l'infection par S. mattheei p113
- 1. La réponse anticorps spécifique de Sb28 GST
- 2. Inhibition de la fonction enzymatique de l'Ag Sb28 GST p115
- 3. L'analyse de la corrélation entre la réponse anticorps spécifique et l'inhibition de l'activité enzymatique de Sb28 GST
- 4. Etude des réactions croisées entre Sb28 GST et la 28 GST native de S.mattheei p118
- C. Etude comparative des anticorps sériques et des sécrétions lactées sur l'activité enzymatique de l'antigène Sm28 GST p121
- 1. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inhibitrice dans les sérums de truies
- 2. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inhibitrice dans les sécrétions lactées de truies

3. Evaluation de la réponse anticorps et de la fonction inh sérums de porcelets	nibitrice des
4. Abolition de la fonction inhibitrice	p126
Discussion et perspectives	p130
1. L'analyse de la localisation de différents antigènes de S.man	soni p131
La Sm28 GST	
Le facteur nucléaire YA du S.mansoni (SmNF-YA)	p135
La calréticuline du S.mansoni (SmCaR)	p137
La phospholipide hydropéroxyde glutathion péroxydase de S.mansoni	p139
2. La protection croisée induite par la Sb28 GST contre l'in S.mattheei dans l'infection naturelle	nfection par
Simulation dails I infection materials	Prin
3. Approche des fonctions inhibitrices des anticorps m	uqueux sur
l'activité enzymatique de la Sm28 GST	p145
Références bibliographiques	p149

