

N° d'ordre :

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

**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

Chrystelle ASSEMAN

**Contribution à la mise en évidence de mécanismes immunorégulateurs  
intervenant dans le contexte de l'infection par *Schistosoma mansoni***

soutenue le 2 juillet 1996 devant la commission d'examen

Membres du jury

**Président**

Professeur A. DHAINAUT

**Rapporteurs**

Docteur G. JAUREGUIBERRY

**Examineurs**

Professeur E. DEI CAS

Docteur A. TSICOPOULOS

Docteur C. AURIAULT



Je dédie cette thèse

à Côme ,

et à Anne ,

ainsi qu'à tous mes amis.

Ce travail a été réalisé

au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

de l'Institut Pasteur de Lille

dirigé par le Professeur André Capron, dans le groupe du Docteur Claude Auriault

puis

dans l'URA CNRS 1854

de l'Institut Pasteur de Lille

dirigée par le Docteur C. Auriault

Je tiens à remercier très vivement

Monsieur le Professeur André CAPRON,

Pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Soyez assuré de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Claude AURIAULT,

Pour votre chaleureuse bienveillance et votre confiance. Qu'il me soit permis de vous exprimer mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur André DHAINAUT,

Qui me fait l'honneur de présider ce jury. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Ginette JAUREGUIBERRY et Monsieur le Professeur Edouardo DEL CAS,

Pour avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance.

Mademoiselle le Docteur Anne TSICOPOULOS,

Vous avez spontanément, et à mon grand plaisir, accepté de participer à ce jury. Soyez en chaleureusement remerciée.

Madame le Docteur Véronique PANCRE,

A chaque étape de ce délicat périple vous avez su m'accompagner et me conseiller avec une patience, une gentillesse et une disponibilité inaltérables. Soyez assurée de toute ma sympathie.

Un grand merci à

Anne, Bertrand, Bilel, Brigitte, Claire, Claudie, Dominique, Estelle, Françoise  
(dite Fanfan) et Françoise, Gerhild, Hélène, Hervé, Jean-Loup, Kader, Myriam,  
Monique, Olivier, Raphaële, Zaza ...

*pour votre soutien, vos conseils, votre disponibilité et les éclats de rire partagés.*

**Je remercie également les membres des secrétariats, de la bibliothèque, de l'animalerie et de la laverie qui participent au fonctionnement de cet institut.**

Nos travaux ont donné lieu aux publications suivantes:

**Asseman C.**, V. Pancré, A. Delannoye, A. Capron, and C. Auriault. (1994). A radioimmunoassay for the quantification of human ubiquitin in biological fluids: Application to parasitic and allergic diseases. J. Immunol. Methods. 173: 93-101.

**Asseman, C.**, V. Pancré, B. Quatennens, and C. Auriault. (1996). Effect of Natural Killer cell depletion on immunity and pathology in murine schistosomiasis. Soumis pour publication.

# ABREVIATIONS

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Fc : Fragment constant (d'une chaîne d'immunoglobuline)

GST : Glutathion-S-transférase

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

H-2 : système d'histocompatibilité murin

HLA : Human Leucocyte Antigène (système d'histocompatibilité humain)

HVH : Hypersensibilité au Venin d'Hyménoptère

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LAK : Lymphokine Activated Killer

LGL : Large Granular Lymphocyte

NK : Natural Killer

PASL : Platelet Activity Suppressive Lymphokine

PBL : Peripheral Blood Leucocyte

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

SEA: Soluble Egg Antigen

SWAP : Soluble Worm Antigen Preparation

*S. mansoni* : *Schistosoma mansoni*

TGF : Tumor Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

# SOMMAIRE

Introduction.....	9
Résumé.....	11
Généralités.....	13
Travaux personnels.....	77
Discussion, Conclusion.....	132
Références bibliographiques.....	137
Table des matières.....	156

# INTRODUCTION

Bien que la caractérisation des mécanismes d'acquisition de l'immunité soit récente, on sait depuis longtemps comment celle-ci s'acquiert. Les épidémies fréquentes avaient permis aux médecins de remarquer, dès l'Antiquité, qu'une personne guérie d'une maladie infectieuse était rarement frappée de nouveau par la même infection. C'est au siècle dernier, grâce à Jenner puis Pasteur, que l'on commence à exploiter ces propriétés pour prémunir les individus contre certaines infections. L'injection de pathogènes atténués protège contre une réinfection par le même pathogène virulent, de façon spécifique et durable. Dans certain cas, la protection peut être obtenue par transfert de serums d'animaux immuns et les protéines solubles qui assurent cette protection, les anticorps, forment la réponse humorale. La seconde composante de l'immunité, découverte plus récemment et sur laquelle se concentre une majorité de travaux concerne la réponse cellulaire. Un nombre croissant de types cellulaires et de cytokines ont été caractérisés; chaque cellule est adaptée à une fonction donnée et les cytokines forment un réseau de communication reliant les différents constituants.

Précédant l'établissement de la réponse immune spécifique, des défenses dites non-spécifiques faisant intervenir des cellules inflammatoires et des médiateurs solubles, permettent généralement de contrôler la propagation des pathogènes. Parmi ces cellules (dont l'action non-spécifique est liée à l'absence de récepteurs pour l'antigène), on inclut les cellules Natural Killer (NK) qui nous ont plus particulièrement intéressés au cours de ce travail. De la destruction de cellules anormales (transformées ou infectées par des virus) à l'orientation de la réponse spécifique, la fonction des cellules NK s'est diversifiée, montrant par ailleurs que les défenses non-spécifiques et spécifiques sont étroitement liées.

L'organisation complexe du système immunitaire est conditionnée par l'existence de pathogènes élaborés, capables dans une certaine mesure de contourner les défenses immunitaires. A ce titre, les maladies parasitaires constituent un exemple d'adaptation particulièrement poussée. Les schistosomiasis (ou bilharzioses) sont des infections provoquées par des vers trématodes installés dans les organes inférieurs (système digestif ou urinaire) de l'homme. Largement répandues dans les pays en voie de développement, cette

parasitose touchait déjà il y a 3500 ans certaines régions de l'Egypte actuelle (FIG. 1.). L'efficacité des mécanismes effecteurs développés par l'hôte infecté est diminuée par les mécanismes d'échappement élaborés par le parasite qui ont pour cible les éléments de la réponse immunitaire non-spécifique et spécifique. La résistance du parasite se traduit par une "surenchère" du système immunitaire qui, mal contrôlée, conduit à la pathologie bilharzienne. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des éléments intervenant à chaque niveau de la régulation du système hôte-parasite est essentielle.

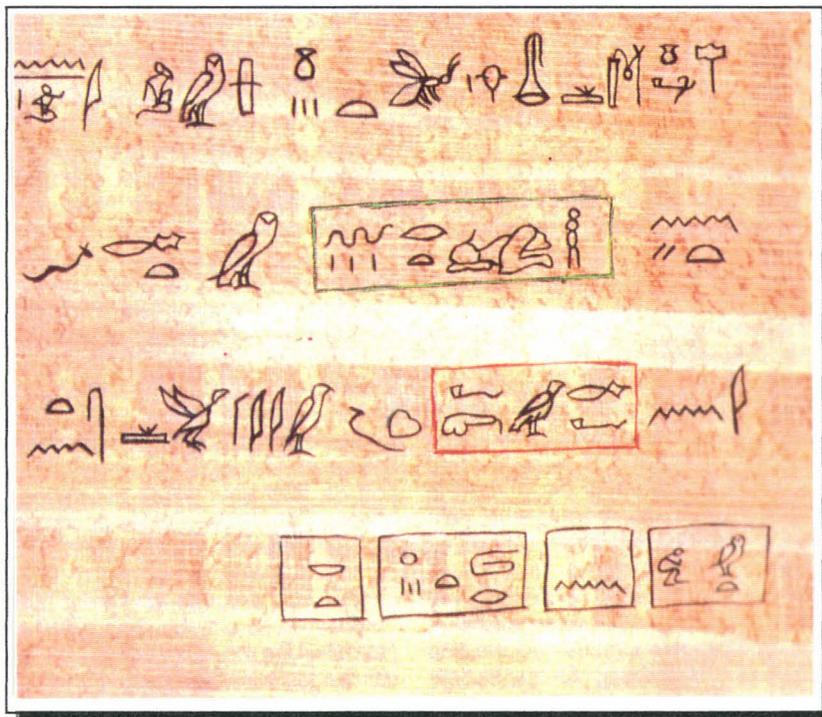


FIG. 1. La bilharziose humaine était connue des anciens Egyptiens qui ont associé sur ce papyrus vieux de 3500 ans, la forme vésicale de la maladie caractérisée par la présence de sang dans l'urine (rouge) et le ver parasite responsable (*Schistosoma haematobium*) (en vert).

D'après **Capron, A.** Les espoirs de vaccin contre la bilharziose. Pour la Science. n° 178. Août 1992.

RÉSUMÉ

Notre travail se divise en deux parties dont le fil directeur est l'étude des mécanismes de coopération cellulaire qui s'établissent au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni*.

La première partie faisait suite à la caractérisation de la PASL (Platelet Activity Suppressive Lymphokine), une lymphokine inhibant la cytotoxicité des plaquettes sanguines activées lors de l'infection par *S. mansoni* et également exprimé lors de la désensibilisation de patients allergiques au venin d'Hyménoptères (guêpe ou abeille), un traitement qui permet de réduire la réactivité plaquettaire spécifique de l'allergène. Le clonage de ce facteur a conduit à l'identification de l'ubiquitine qui possède des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques identiques à la PASL. Un dosage radioimmunologique permettant de vérifier la présence d'ubiquitine dans les serums et les plasmas de personnes infectées par *S. mansoni* ou en cours de désensibilisation a été mis au point. La sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la précision de ce dosage ont permis de l'appliquer aux liquides biologiques voulus. Nous avons observé que les quantités d'ubiquitine étaient élevées chez les patients bilharziens et les personnes désensibilisées (de 150 à 300 ng/ml) alors que les taux présents chez les individus sains n'excèdent pas 50 ng/ml.

La présence extracellulaire d'ubiquitine qui n'avait jamais été décrite ainsi que sa libération progressive et transitoire dans les plasmas au cours de la désensibilisation renforcent l'hypothèse que cette protéine participe à des mécanismes immunorégulateurs.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle des cellules Natural Killer (NK) en tant que cellules productrices d'IFN- $\gamma$ , dans l'infection expérimentale à *S. mansoni*. Des travaux réalisés dans différents modèles montrent que l'IFN- $\gamma$  peut induire indirectement une réduction de la charge parasitaire et diminuer l'intensité de la réaction granulomateuse et de la fibrose générées dans le foie par le dépôt des œufs du parasite. En particulier, un modèle d'injection de la protéine parasitaire Sm28 GST induisant la production d'IFN- $\gamma$  est associé à une diminution de la charge parasitaire, du nombre d'œufs piégés dans le foie et de la fibrose hépatique. Pour déterminer la fonction des cellules NK, nous avons adopté une approche indirecte qui consiste à évaluer l'effet de la déplétion *in vivo* des cellules exprimant le marqueur NK1.1 spécifique des cellules NK murines. Les conséquences de la déplétion,

commencée avant l'infection et poursuivie jusqu'en phase chronique (environ 17 semaines post-infection) ont été étudiées au niveau de la réponse immune systémique et localement, au niveau du foie. La déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> entraîne, dans cet organe, une augmentation du taux de collagène (assimilé à la fibrose) et une abolition de l'expression des ARN messagers spécifiques de l'IL-7 et de la sous-unité p40 de l'IL-12. L'absence de ces cytokines persiste tout au long de l'infection, en parallèle avec l'élimination des cellules NK tandis que l'augmentation de la fibrose n'apparaît significative que dans les stades tardifs de la réaction. L'absence des cellules NK cependant ne modifie pas l'expression des cytokines communément impliquées dans la régulation des granulomes et n'a pas d'incidence sur la réponse immunitaire systémique.

Ainsi, le modèle de déplétion spécifique adopté a permis de mettre en évidence l'intervention locale des cellules NK au cours de l'infection par *S. mansoni* sans altération de la réponse immunitaire des animaux.

GÉNÉRALITÉS

## Les cellules Natural-Killer (NK)

### 1- Généralités

Les cellules NK ont été découvertes indirectement il y a une vingtaine d'années lors d'expériences visant à obtenir des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de tumeurs. En effet, des lymphocytes de souris-contrôle étaient capables de lyser certaines tumeurs en absence de toute sensibilisation préalable (Herberman et coll. 1975) et la présence de cette activité chez des souris SCID indiquait qu'une population cellulaire distincte des lymphocytes T était impliquée.

**Les cellules NK présentent une morphologie de type LGL (large granular lymphocyte);** elles possèdent de nombreux granules cytoplasmiques azurophiles et ont une taille légèrement supérieure à celle des lymphocytes (FIG. 2). Par ailleurs, **les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques pour l'antigène tels qu'ils sont présents sur les lymphocytes T et B.** Elles sont actuellement définies chez l'homme par le phénotype  $CD3^- CD56^+ CD16^{+/-1}$  (la population  $CD56^+ CD16^-$  est minoritaire parmi les cellules  $CD56^+$ ) et chez la souris C57BL/6 par le phénotype  $NK1.1^+ CD3^-$  (les cellules NK murines expriment le gène codant pour la chaîne  $CD3\epsilon$  dans le cytoplasme mais ne présentent pas la protéine à la membrane, Biassoni et coll. 1988).

Plusieurs observations concernant la morphologie, les mécanismes lytiques et l'expression de récepteurs membranaires suggèrent néanmoins que les cellules NK et les cellules T pourraient dériver d'un précurseur commun. Chez la souris, des thymocytes triple-négatifs  $CD3^- CD4^- CD8^-$  peuvent engendrer des cellules T ou des cellules NK selon les conditions de culture *in vitro*. Dans ce modèle, le développement des cellules NK peut être également indépendant du thymus, comme le révèle la présence de ces cellules dans le modèle nude (athymique). Des travaux réalisés sur des thymocytes humains  $CD34^+$  ont montré que

---

<sup>1</sup> La désignation du marqueur de différenciation  $CD56$  est également Leu-19 et NKH-1 (d'après les anticorps qui le reconnaissent) ou N-CAM (neural- cell adhesion molecule). Le marqueur  $CD16$  est reconnu par l'anticorps Leu-11.

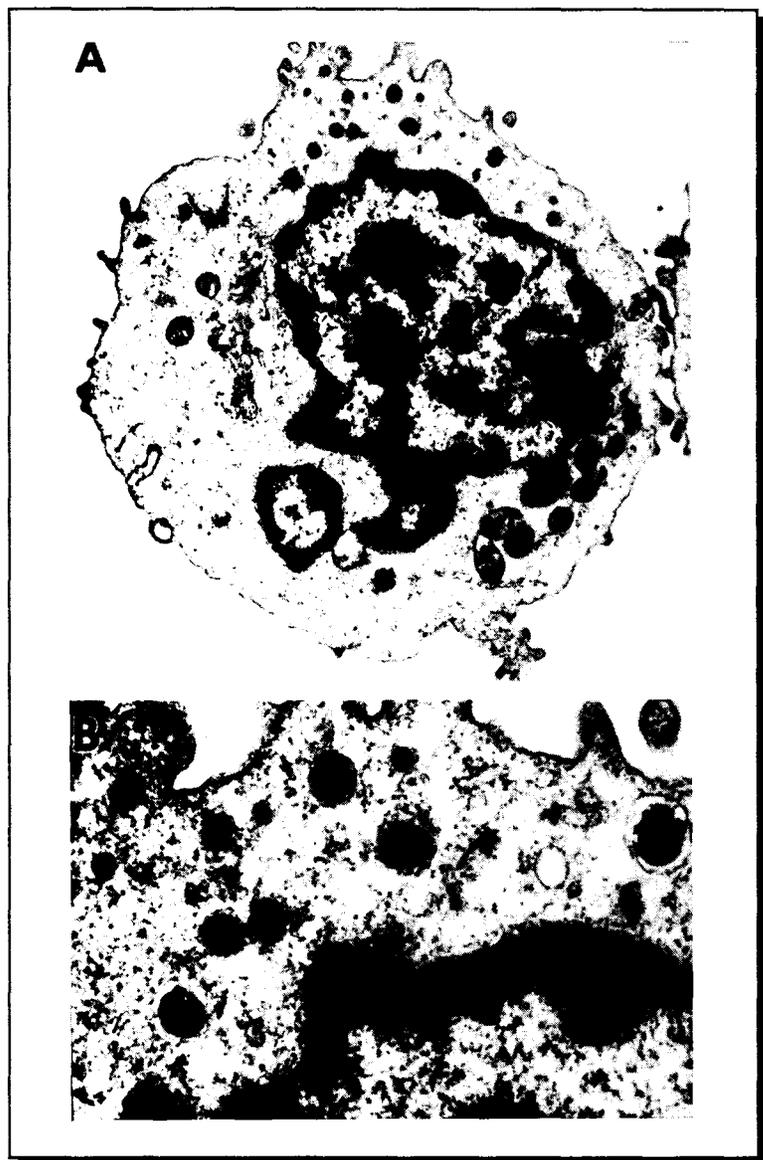


FIG. 2. (A) Caractéristiques ultrastructurales d'une cellule NK humaine.  
(B) Détails des granules.  
D'après Trinchieri, G. *Biology of Natural Killer Cells*. 1989.  
*Adv. Immunol.* 47: 187.

l'expression du marqueur CD1 associée au réarrangement du complexe récepteur T-CD3 conduit à la lignée T de façon majoritaire tandis que l'absence de CD1 et la diminution de l'expression des récepteurs CD2, CD5 et CD28 entraînent les clones vers un profil NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (Sanchez et coll. 1994).

Les cellules NK expriment également des récepteurs communs aux cellules T et aux monocytes tels que le CD8 (généralement l'homodimère  $\alpha/\alpha$ ), le CD69 (ou VEA, Very Early Antigen), le CD11b (récepteur au C3b) et le CD11c. Les récepteurs CD4, CD14, CD19 et CD20 n'ont jamais été détectés.

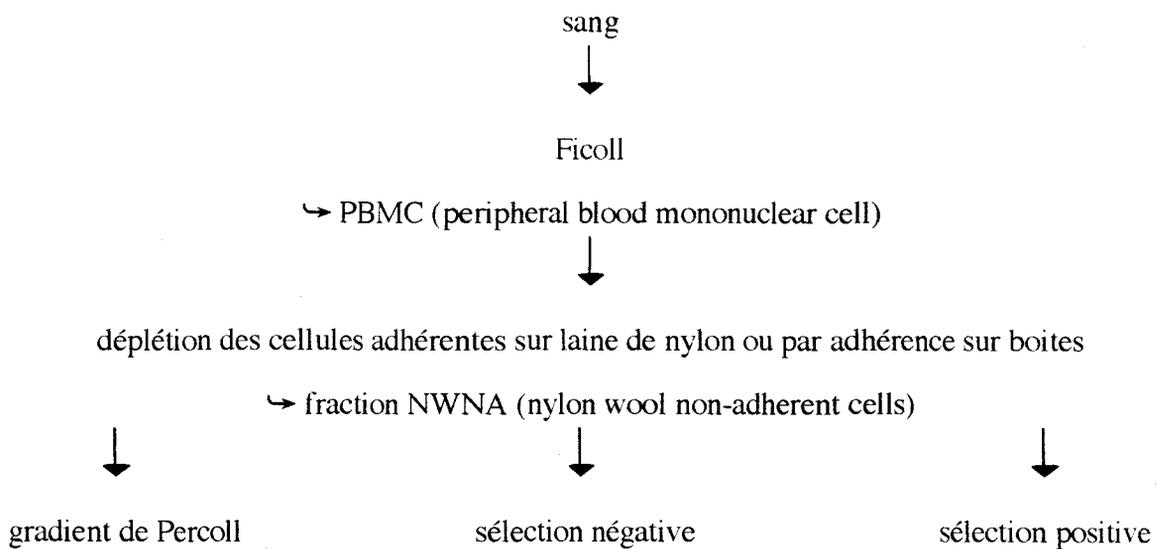
Il existe une minorité de cellules T CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> présentant certaines caractéristiques de cellules NK et désignées sous le terme "non-MHC restricted T cells". Enfin, un nombre croissant de récepteurs considérés comme spécifiques des cellules NK sont également exprimés sur les cellules T. La distinction entre les cellules T et les cellules NK est donc, dans certain cas, assez relative.

De nombreux travaux s'intéressant aux cellules NK ont été réalisés depuis leur mise en évidence. Il est donc important de préciser que, selon les auteurs et l'année de publication du travail, ces études peuvent concerner des populations cellulaires de compositions sensiblement différentes, et ce, en raison de l'évolution des techniques de préparation utilisées (présentées rapidement dans le paragraphe suivant) et des marqueurs de sélection disponibles.

## 2- Techniques d'isolement

### Modèles expérimentaux

Le sang humain compte 10 à 15 % de cellules NK. Les procédés d'isolement comportent les étapes suivantes :



La préparation Nwana peut être utilisée à ce stade d'enrichissement pour les réactions de cytotoxicité *in vitro* en 4 heures contre des cibles marquées au chrome 51. Sur gradient discontinu de Percoll, les fractions les moins denses (situées à la limite 40-42.5%) sont enrichies en LGL (large granular lymphocytes) (Timonen et coll. 1980); ces cellules contiennent environ 50% de cellules NK Leu19<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup>, 24% de cellules Leu19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> et 14% de cellules T Leu19<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup> (Phillips et coll. 1986).

L'enrichissement peut également être obtenu par sélection négative : les cellules T (CD3<sup>+</sup>) et B (Ig<sup>+</sup>) sont éliminées par billes magnétiques, adhérence, lyse par complément. Les cellules obtenues sont alors fortement enrichies en cellules NK.

La sélection peut être positive; on isole des cellules NK sur billes ou à l'aide d'un trieur de cellules, sur la base de l'expression d'un marqueur, généralement le récepteur CD56 (le marqueur CD57<sup>2</sup> utilisé pendant quelques années a été montré comme non-spécifique des cellules NK).

D'autre part, l'activation par l'IL-2 réalisée pendant quelques jours à quelques semaines sur la population PBMC permet l'obtention de cellules LAK (lymphokine-activated killers) définies comme des cellules cytotoxiques vis-à-vis de cibles normalement résistantes à la

---

<sup>2</sup> Leu-7, HNK-1

lyse NK (comme les lignées P815 et Daudi), et constituées à la fois de cellules NK et de cellules T cytotoxiques.

Chez la souris, les méthodes d'isolement sont semblables. Seules les sources de cellules varient, le sang périphérique étant rarement utilisé. Les cellules proviennent généralement d'organes (rate, ganglions...), ou de moëlle osseuse. Les lignées de cellules NK activées par l'IL-2 sont généralement produites à partir de moëlle osseuse. Les colonnes de nylon éliminent à la fois les monocytes et les lymphocytes B. Les fractions du gradient de Percoll sont différentes; les cellules murines étant plus denses, l'enrichissement en LGL est obtenu dans la limite 50-55% (Luini et coll. 1981). Les marqueurs de sélection les plus couramment utilisés sont le récepteur NK1.1 exprimé par les souris C57BL/6 et le marqueur asialo-GM1 pour les souris BALB/c, CB17 (F1 C57BL/6 x BALB/c), SCID (fond CB17) ou CBA/J.

Le modèle murin peut être manipulé ou présenter naturellement des déficiences immunitaires. La souris beige possède un déficit lysosomal, les cellules NK (et également les macrophages et les neutrophiles) sont non-fonctionnelles sur le plan de la cytotoxicité mais produisent de l'IFN- $\gamma$ . Les souris dépourvues de molécules de classe I ( $\beta$ 2-microglobuline knock-out) présentent des cellules NK également moins fonctionnelles du point de vue cytotoxicité mais capables de produire de l'IFN- $\gamma$ . La souris SCID, dépourvue de cellules T et B, et la souris nude dépourvue de cellules T sont "enrichies" en cellules NK qui ont un potentiel cytotoxique et une production d'IFN- $\gamma$  plus élevés. Une lignée murine transgénique pour la chaîne CD3 $\epsilon$  humaine présente un déficit en cellules NK et en cellules T (Wang et coll. 1994). Par contre, il n'existe pas de souris uniquement déficientes en cellules NK.

Les fonctions physiologiques des cellules NK recouvrent 2 domaines essentiels.

Le premier, caractérisé depuis de nombreuses années, concerne les propriétés cytotoxiques de ces cellules vis-à-vis des cellules tumorales ou infectées par des virus. La compréhension des mécanismes impliqués a conduit à la caractérisation d'un nombre croissant de récepteurs associés à la lyse et également à l'inhibition des processus cytotoxiques.

Le second domaine, développé plus récemment, concerne le rôle des cellules NK dans diverses infections par l'intermédiaire des cytokines qu'elles produisent.

### 3- Caractérisation des récepteurs exprimés par les cellules NK

Les cellules NK ne possèdent pas de récepteurs spécifiques d'antigènes (de type récepteur T ou immunoglobuline de surface), qui garantissent une activation contrôlée des lymphocytes T et B.

Les signaux d'activation transitent par diverses molécules d'activation qui seront sollicitées différemment selon les ligands présentés par la cellule cible potentielle, tandis qu'une variété de récepteurs inhibiteurs également engagés différemment selon les ligands exprimés par la cellule-cible, ont pour fonction de "museler" ces cellules potentiellement cytotoxiques envers n'importe quelles cibles.

\* Les mécanismes de reconnaissance cellule-cellule nécessitent l'expression de **molécules** dites **d'adhésion**. Le marqueur CD56 semble posséder une telle fonction. Les cellules NK expriment également les molécules d'adhésion CD2 et LFA-1 (CD11a) (Lotzova. 1993).

\* Chez l'homme, 2 types de récepteurs ont été isolés.

Les premiers, hNKR-P1 (Lanier et coll. 1994) et CD94/KP43 (Moretta et coll. 1994) présentent des homologies de structure avec la **famille des lectines** de type C (calcium-dépendante) et forment des homodimères reliés par des ponts disulfures. Ils sont codés par le chromosome 12. CD94 pourrait être associée à l'inhibition de la cytotoxicité. La fonction de hNKR-P1 n'est pas définie.

Les seconds, p58 (Moretta et coll. 1993) et NKB1 (Litwin et coll. 1994), associés à l'inhibition de la cytotoxicité possèdent une structure apparentée à la **famille des**

**immunoglobulines** et forment des monomères. Codés par le chromosome 19, ils appartiennent à des familles de récepteurs multigéniques (Gumperz et coll. 1995). Un polymorphisme allélique important ainsi que des possibilités d'épissage alternatif assurent une **diversité importante des récepteurs**.

\* Chez la souris, les récepteurs liés à la cytotoxicité, NKR-P1 (Giorda et coll. 1990) ou à son inhibition, Ly-49 (Yokoyama et coll. 1989), possèdent plusieurs caractéristiques communes. Ils appartiennent à des familles de gènes présents sur le chromosome 6 qui forment le complexe des récepteurs NK [NKC] (Yokoyama et coll. 1991), présentent une structure de type **lectine** et forment des homodimères. Le **polymorphisme** des récepteurs NKR-P1 (Giorda et coll. 1992) et Ly-49 (Smith et coll. 1994) est très élevé. Le récepteur NK1.1 caractérisé sérologiquement chez la souris C57BL/6 est codé par le gène NKR-P1C (Ryan et coll. 1992).

D'autres récepteurs récepteurs murins et humains ont été clonés à ce jour; on possède peu d'informations concernant leur propriétés fonctionnelles (Yokoyama. 1995).

#### 4- Fonctions cytotoxiques des cellules NK

\* On connaît actuellement 3 voies capables d'initier la **cytotoxicité des cellules NK** (FIG. 3). Les cellules NK expriment la molécule CD16, récepteur de faible affinité pour le fragment constant des IgG, associée à la cytotoxicité dépendante d'anticorps (**ADCC**). La **lyse redirigée** touche les cellules-cibles présentant des récepteurs aux fragments constants et implique les récepteurs CD16, CD69 et NKR-P1. L'association *in vitro* entre des anticorps anti-récepteurs et les cellules-cibles par le récepteur aux Fc active les cellules NK (Karlhofer et coll. 1991; Yokoyama. 1995).

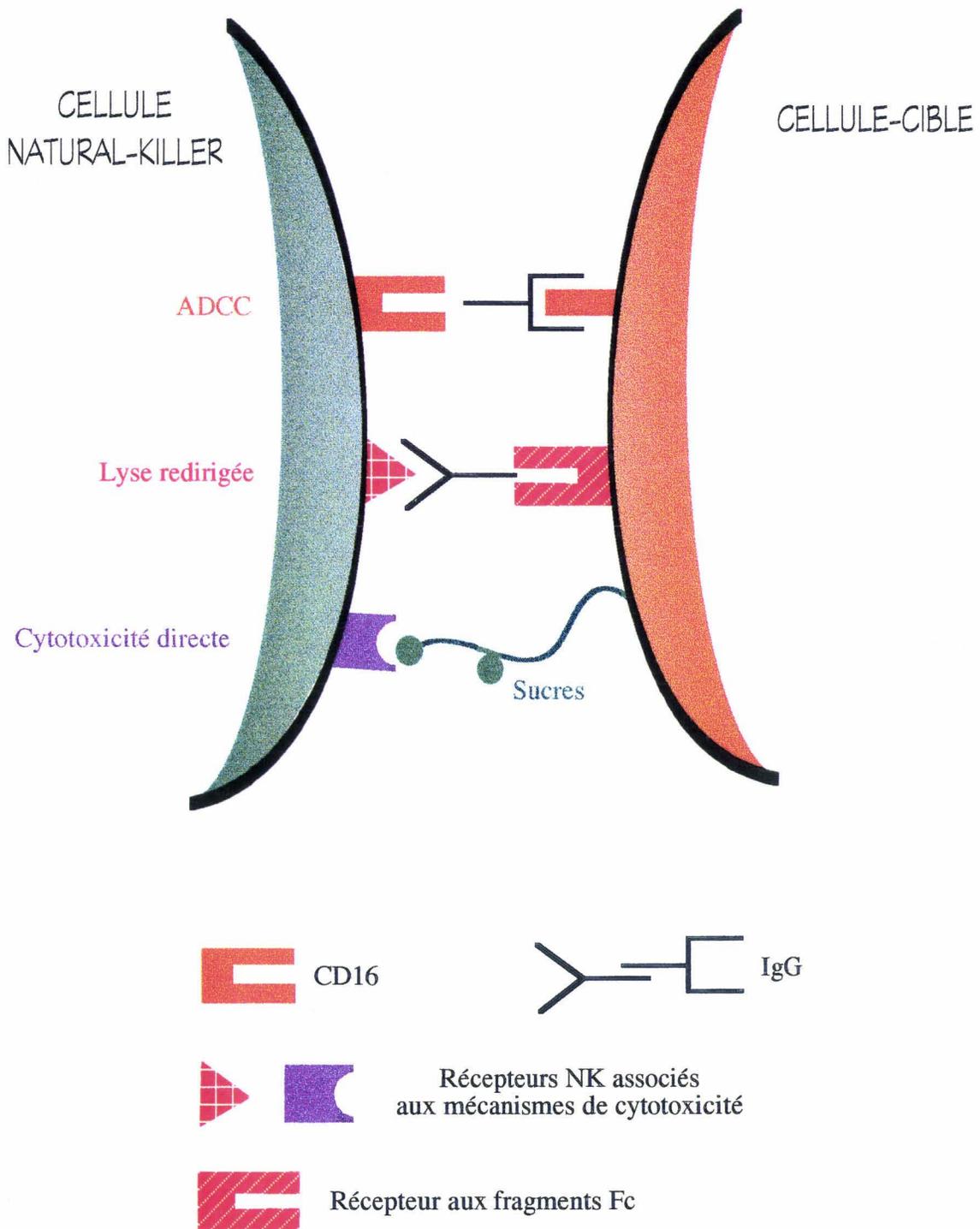


FIG. 3. Voies d'activation de la cytotoxicité des cellules NK.

De nombreux récepteurs NK clonés chez l'homme et chez la souris possèdent une **structure de type lectine**. La recherche de ce type de récepteurs était justifiée par l'observation que certains sucres régulent la cytotoxicité des cellules NK, propriété intéressante sachant que la glycosylation des protéines exprimées par des cellules transformées ou infectées par des virus peut être profondément modifiée. Un travail récent a permis de mesurer la fixation d'un répertoire impressionnant de sucres (neutres, sialylés, sulphatés et phosphorylés) sur le récepteur NKR-P1 du rat (le premier récepteur de type lectine identifié, Chambers et coll. 1989) exprimé sous forme soluble. Les auteurs (Bezouska et coll. 1994) ont montré l'affinité élevée de ce récepteur pour l'héparine et le chondroïtine sulfate, 2 glycoprotéines abondantes dans le tissu extracellulaire; cette affinité pourrait faciliter la migration des cellules NK dans le tissu conjonctif. Les cellules P815 (normalement résistantes à la lyse par les cellules NK) deviennent sensibles lorsqu'elles sont préincubées avec des liposomes exprimant des ligands de NKR-P1. Par contre, les ligands sous forme soluble inhibent la lyse de cibles sensibles; la sécrétion, par les cellules NK activées, de protéoglycannes solubles pourrait agir comme des inhibiteurs contre un excès de cytotoxicité et éviter des phénomènes d'auto-lyse (Yokoyama. 1995).

Ce travail excepté, on note assez peu de résultats relatifs aux ligands associés à l'activation de la cytotoxicité.

\* Les cellules NK présentent des granules cytoplasmiques contenant de la **perforine** et diverses enzymes de dégradation dont les **granzymes** qui sont sécrétées par les cellules activées (Liu et coll. 1995). L'expression constitutive de perforine et de granzymes est augmentée par l'IL-2 et l'IL-12 (Salcedo et coll. 1993).

La perforine forme des pores membranaires, par association de ses monomères qui entraînent une lyse osmotique et permettent également l'entrée de composés toxiques. Les granzymes sont des sérine-estérases qui participent à l'activation de DNases, elles-mêmes conduisant à la fragmentation de l'ADN des cellules-cibles (Smyth et coll. 1995; Shresta et coll. 1995).

L'activité cytotoxique des cellules NK peut également être médiée par la production de cytokines comme le TNF- $\alpha$ .

## 5- Mécanismes d'inhibition de la cytotoxicité

☼ Les récepteurs et les ligands à l'origine des réactions d'inhibition de la cytotoxicité sont mieux définis. Kärre et coll. (1986) ont proposé que **l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface de cellules-cibles régule la cytotoxicité des cellules NK** (FIG. 4). Cette hypothèse a été vérifiée dans les modèles humain et souris.

La lignée humaine CR1 sensible à la cytotoxicité NK n'exprime pas de molécules de classe I. La résistance à la lyse apparaît si ces cellules sont transfectées par des gènes de classe I et est corrélée au taux d'expression des protéines à la membrane (Storkus et coll. 1989). Des observations identiques ont été obtenues avec d'autres lignées (C4.4.25 et RMA-S) (Glas et coll. 1992; Frankson et coll. 1993).

Le système des cellules CR1 transfectées a permis de montrer que la reconnaissance des molécules de classe I s'effectue sur quelques acides aminés au niveau du **domaine  $\alpha 1$**  (Storkus et coll. 1991). Des études ont révélé que la reconnaissance par différents clones NK ne concerne pas des formes individuelles de molécules de classe I mais des ensembles de molécules qui présentent des **motifs** dits **publics communs**. Ainsi, certains clones NK sont spécifiquement inhibés par les molécules HLA-Cw3 (Cicone et coll. 1992) et le récepteur NKB1 reconnaît la spécificité publique Bw4 (Gumperz et coll. 1995).

Enfin, la reconnaissance des molécules de classe I est influencée par la présence de peptides donnés, indépendamment de la stabilité du complexe CMH / peptide à la membrane (Malnati et coll. 1995). Le récepteur NK peut reconnaître à la fois la molécule de CMH et un peptide donné (de façon analogue aux cellules T) ou **percevoir des modifications de**

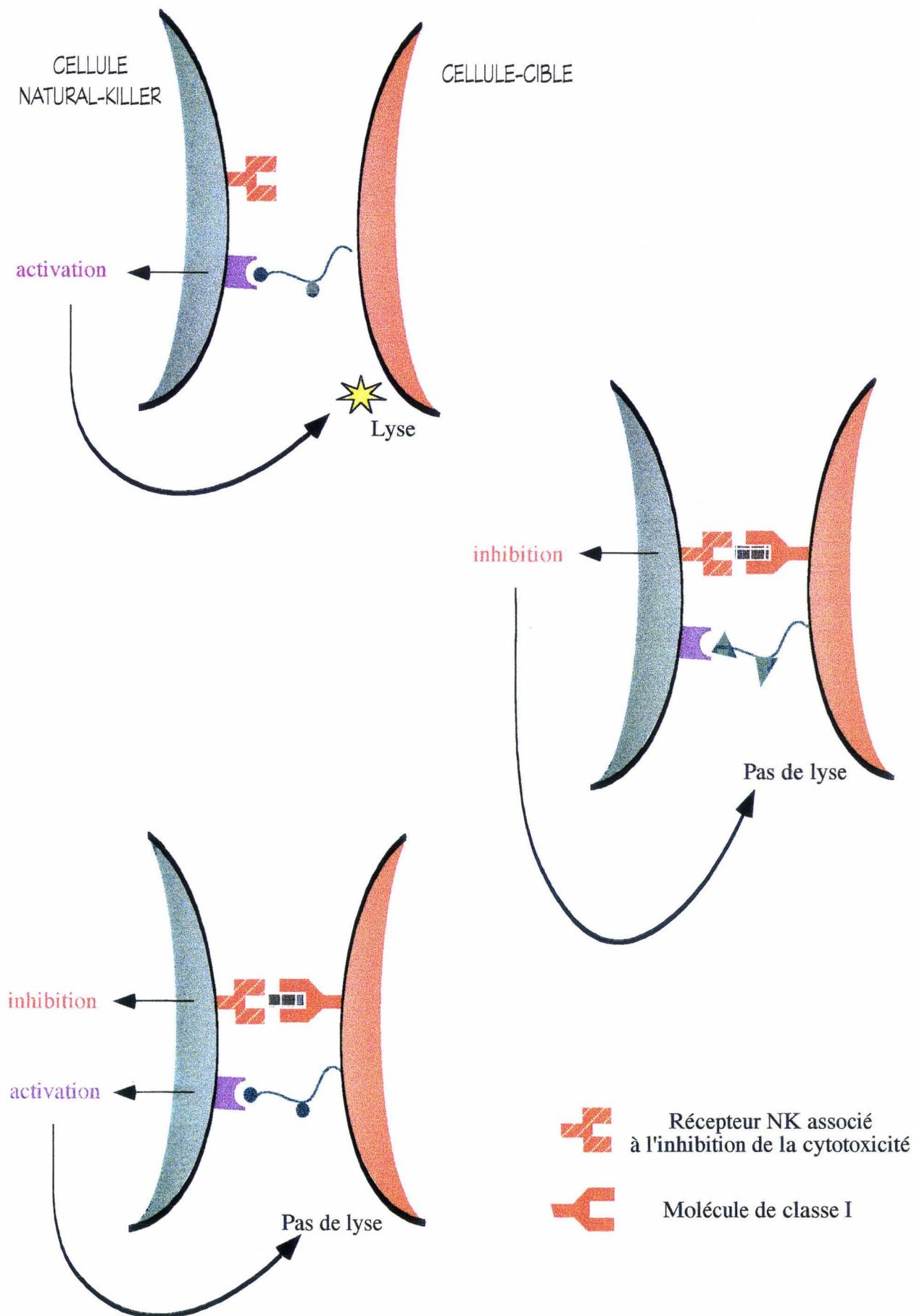


FIG. 4. Mécanismes d'activation et d'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK.

**conformation de la molécule de CMH consécutive à la fixation d'un peptide.**

Cette dernière hypothèse, suite à des études faites sur le modèle souris, semble la plus probable.

Chez la souris, les cellules NK Ly-49A<sup>+</sup> sont incapables de lyser des cellules exprimant des molécules de classe I d'haplotype d ou k [H-2D<sup>d,k</sup>] (Karlhofer et coll. 1992). La zone d'interaction de Ly-49A a été localisée sur les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du CMH qui correspondent à la poche de fixation du peptide. Une étude a précisé que la présence de peptides, quelle que soit leur origine, induit une inhibition de la cytotoxicité des cellules NK, suggérant que le changement de conformation associé à la fixation d'un peptide suffit à la reconnaissance (Correa et coll. 1995).

Les cellules NK capables de détruire des cellules n'exprimant pas de molécules de classe I ont donc une fonction complémentaire des cellules T cytotoxiques (dont l'activation nécessite une présentation des antigènes étrangers par des molécules de CMH de classe I), importante dans le contexte d'une transformation tumorale ou d'une infection virale qui diminuerait l'expression des molécules de classe I et échapperait ainsi aux cellules T.

Par ailleurs, l'inhibition par des molécules de classe I, dans un environnement où les cellules T sont « opérationnelles », est un système de sécurité qui évite une sur-activation inutile des cellules NK et des cellules T cytotoxiques. Ce système de contrôle des cellules NK semble également actif sur les cellules T qui expriment quelques-uns des récepteurs inhibiteurs décrits (Ly-49, p58 et NKB1) et dont l'activité, dans certaines conditions de stimulation, peut être inhibée par l'expression des molécules de classe I correspondant aux récepteurs (Lanier et coll. 1996).

✿ **L'inhibition** de la cytotoxicité médiée par les molécules de classe I **touche également la production de cytokines et les mécanismes d'ADCC à l'égard des mêmes cibles**, mais ne s'applique pas à d'autres cellules sensibles (inhibition directionnelle) (Karlhofer et coll. 1992).

**Les évènements moléculaires liés à l'inhibition des cellules ne sont pas connus**; la formation de conjugués et les réactions précoces d'activation (flux calcique et formation d'inositol tri-phosphate) ne sont pas bloquées (Kaufman et coll. 1993).

Nous avons signalé que la reconnaissance des molécules de classe I par les cellules NK est relativement large; d'autre part, toutes les cellules NK isolées d'un même individu ne reconnaissent pas les mêmes molécules de classe I. Cette hétérogénéité est liée au **polymorphisme des récepteurs inhibiteurs**.

## 6- Hétérogénéité des cellules NK et sélection

\* Ciconne et coll. (1992) ont cloné des cellules NK CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> et utilisé comme cellules-cibles des blastes PHA allogènes établis à partir de 6 donneurs différents. Sur 400 clones NK provenant d'un même individu, ils ont observé que **seuls 36% des clones présentent une activité cytotoxique vis-à-vis des blastes allogènes**. Ces clones réactifs se répartissent en 4 groupes en fonction du profil de réactivité obtenu vis-à-vis des cibles allogènes testées (FIG. 5). La reconnaissance de cellules étrangères par les cellules NK d'un individu est donc hétérogène; dans ce modèle, il faut noter qu'aucun des clones ne détruit des blastes autologues. Les cellules cibles co-expriment chaque molécule de classe I (HLA-A, -B et -C) en deux exemplaires (maternel et paternel), la reconnaissance individuelle de chaque allèle n'est donc pas observée.

Litwin et coll. (1993) ont réalisé une étude plus précise en utilisant comme cibles des cellules CR1 transfectées par une seule molécule de classe I déterminée, autologue ou hétérologue pour le clone NK effecteur. A partir d'un individu, ils ont différencié **37 groupes de clones NK** (pour la plupart composés d'un seul clone NK) **sur la base de leur profil de reconnaissance de différentes molécules HLA données**. Les clones sont capables de reconnaître plusieurs allèles différents de molécules HLA-A,-B ou -C, qu'ils

**Table 1.** *CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> NK Clones Displaying Different Patterns of Alloreactivity Can Be Generated from Donor A*

Clones	Normal target cells (PHA blasts) from donor						
	A*	1	2	3	4	5	6
Group 1							
H12	58†	1	1	2	5	3	52
G10	65	3	2	4	6	1	70
Group 2							
AN4	0	26	24	24	2	44	0
ALE 5	0	51	54	42	0	30	2
AP27	0	41	36	43	2	35	0
N25.5	2	42	38	35	0	40	2
Group 3							
T50.4	0	54	37	8	36	5	59
AGT.2	8	22	27	9	25	7	44
AGT.11	4	34	40	8	42	8	43
AGD.5	4	44	35	9	47	6	46
Group 4							
N25.5	0	42	39	35	32	6	0
AGD.17	0	52	39	24	27	4	9
AGD.27	0	37	33	36	39	8	5
AGD.31	0	47	43	40	38	9	5
Group 5							
AGD.22	2	9	1	0	1	2	25
AGD.48	1	0	0	0	2	1	47
6.3	0	2	0	0	0	ND	65
50.42	0	2	2	0	0	0	51
25.11	0	ND	0	0	2	2	33

Les différents groupes de clones NK (group 2-5) isolés d'un individu (donor A) établis selon le profil de cytotoxicité des clones vis-à-vis des cellules-cibles (PHA blasts from donors 1-6).

Les résultats représentent des pourcentages de cytotoxicité.

(Cicccone et coll. 1992)

FIG. 5.

soient d'origine autologue ou hétérologue, **la protection n'est donc pas uniquement médiée par des allèles autologues.** Parmi ces clones, 10 ne présentent aucune spécificité HLA correspondant au sérotype de la personne dont ils sont issus. De plus **certains allèles autologues, considérés individuellement, ne sont pas protecteurs** (FIG. 6).

\* Conséquence possible de l'hétérogénéité des récepteurs NK, le phénomène de **résistance hybride** concerne les rejets de greffe de moëlle osseuse (Lanier. 1995). Une souris hybride F1 exprime de façon codominante les molécules de CMH de ses parents; les lois génétiques gouvernant les greffes de tissus stipulent qu'un tissu provenant d'un parent est accepté par l'hybride puisque le tissu exprime une partie des antigènes du CMH pour lesquels la souris F1 est tolérisée. Les greffes de moëlle osseuse, chez certaines lignées F1, n'obéissent pas à ces règles. Des souris F1(A x B) rejeteront des cellules de moëlle du parent A (par exemple) alors qu'elles accepteront les cellules du parent B. D'après des études de transmission du caractère "susceptibilité au rejet", les antigènes Hh (Hybrid histocompatibilité) concernés dans la reconnaissance sont présents sur le chromosome 17, dans une région liée aux molécules de CMH. On peut supposer que si un sous-groupe de cellules NK n'exprime pas le récepteur spécifique de l'antigène Hh transmettant le signal d'inhibition, les cellules de moëlle correspondantes seront détruites. On ignore cependant pourquoi cette réaction de rejet ne concerne que les cellules hématopoiétiques de la moëlle, les greffes de peau ou d'organes du parent A (dans notre exemple) étant normalement acceptées par l'hybride.

\* A ce titre, **les critères de sélection positive et négative des cellules NK sont assez mal connus.** *In vivo*, les cellules NK qui expriment des récepteurs spécifiques de molécules de CMH différentes de l'haplotype de l'organisme ne sont pas pour autant éliminées (Lanier et coll. 1996). La sélection positive des récepteurs NK est donc indépendante, contrairement aux récepteurs T, de leur capacité à reconnaître les molécules du

Table 4. HLA Specificities of NK Clones from a Single Donor (315)

No. of clones per group	Targets protected from NK cell lysis										
	C1R. A*0101	* C1R. A*0201	* C1R. A*0301	C1R. A*6801	C1R. A*6901	* C1R. B*0702	C1R. B*2705	C1R. B*3701	C1R. B*5801	.221. B*5101	* .221. Cw*0301
1								X*			
1									X		
3								X	X		
1									X		X
1										X	X
1	X										X
3								X	X		X
1								X	X	X	X
2	X							X	X		
3			X					X	X		
1	X						X	X			
1	X						X		X		
1									X	X	X
2							X		X	X	
1	X						X			X	X
1	X						X		X	X	
2						X			X	X	X
1	X				X				X	X	X
1	X				X				X	X	X
1	X								X	X	X
2							X		X	X	X
6							X		X	X	X
1	X		X		X				X	X	
2	X					X			X	X	X
1	X				X				X	X	
1			X				X		X	X	X
1			X				X		X	X	X
1	X	X	X						X	X	X
2	X		X						X	X	X
1						X	X		X	X	X
2	X				X		X		X	X	X
4	X	X	X		X				X	X	X
2	X	X					X		X	X	X
1	X	X	X		X	X			X	X	X
1	X		X		X	X			X	X	X
1	X	X	X				X		X	X	X
1	X			X	X	X			X	X	X

soit 37 groupes.

Les cellules-cibles sont des cellules C1R. ou .221. (HLA déficientes) transfectées par différents allèles HLA -A, -B et -C. Le donneur (315) dont dérivent les clones exprime le sérotype A2, A3, B7, B62, Cw3 et Cw7 (les allèles correspondants sont signalés par un astérisque). X indique que les cellules-cibles sont protégées.

(Litwin et coll. 1993)

CMH exprimées sur les cellules de l'organisme. Ainsi, les cellules NKB1<sup>+</sup> (reconnaissant les molécules HLA-Bw4) sont présentes chez un individu homozygote pour HLA-Bw6 et le récepteur Ly-49A (spécifique des molécules H-2D<sup>d, k</sup>) est exprimé sur 15-20% des cellules de la souris C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>). Par ailleurs, l'expression de Ly-49A est faible chez les lignées H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>k</sup>, suggérant que la présence du ligand protecteur pourrait diminuer l'expression du récepteur. Enfin, une "éducation" des cellules NK en absence de molécules inhibitrices peut expliquer que leur potentiel cytotoxique soit diminué chez les souris déficientes en  $\beta$ 2-microglobuline (Bix et coll. 1991).

## 7- Cellules NK et cytokines

Les cellules NK produisent de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , du GM-CSF, de l'IL-3, de l'IL-8 et du TGF- $\beta$  (Naume et coll. 1993).

La production de ces cytokines dépend de l'activateur utilisé. Actuellement, l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-7 sont les 3 facteurs associés à l'activation des cellules NK. Les études les plus complètes ont été réalisées sur des **cellules humaines CD56<sup>+</sup> purifiées** sur billes magnétiques (Naume et coll. 1993). L'**IFN- $\gamma$**  est produit après activation par l'IL-2 et l'IL-12, l'IL-7 n'ayant pas d'effet. Le **TNF- $\alpha$**  est exprimé après stimulation par ces trois cytokines, l'IL-2 ayant l'effet le plus important. Le **GM-CSF** est inductible par l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-12 par ordre décroissant d'efficacité. L'**IL-3** est exprimée, en faible quantité, uniquement après activation par l'IL-7. La production d' **IL-8** et de **TGF- $\beta$**  est constitutive.

La **prolifération** et la **cytotoxicité** des cellules NK sont également régulées par ces 3 cytokines. Chez l'homme, l'activation par l'**IL-2** induit une adhérence rapide d'une partie des cellules (cellules NK adhérentes [A-NK]) qui prolifèrent plus rapidement et sont plus cytotoxiques que les cellules non-adhérentes. Ces cellules A-NK sont également plus fonctionnelles *in vivo* (Whiteside et coll. 1995). L'expression du récepteur pour l'IL-2 (IL-

2R) d'affinité intermédiaire (IL-2R p75 ou IL-2R $\beta$ ) est constitutive sur les cellules NK. La chaîne de faible affinité p55 (ou  $\alpha$ ) qui associée à la chaîne  $\beta$  forme le récepteur de forte affinité, est exprimée après stimulation par l'IL-2. La sous-classe CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> exprime constitutivement les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur et répond à des doses faibles d'IL-2. L'augmentation de la prolifération nécessite l'expression de la chaîne  $\alpha$  tandis que l'activité LAK passe par le récepteur  $\beta$  (Naume et coll. 1994). L'IL-12 et l'IL-7 augmentent modérément la prolifération et la cytotoxicité, et agissent plus efficacement en synergie avec l'IL-2 (Naume et coll. 1992). L'activation par l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-7, dans ce modèle, est dépendante de la présence de TNF- $\alpha$  et indépendante de l'IFN- $\gamma$ . Les **interférons** ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) augmentent la cytotoxicité des cellules NK de façon transitoire, mais peuvent également, selon les conditions expérimentales, inhiber l'activité cytotoxique et la prolifération des cellules (Naume et coll. 1994). L'IL-4 a également des effets différents suivant l'état d'activation préalable des cellules (Naume et coll. 1994). L'activité LAK induite par l'IL-2 et l'IL-7 est inhibée par l'IL-4. Par contre, l'activité induite par l'IL-12 n'est pas altérée. L'IL-12 et l'IL-4 augmentent d'ailleurs en synergie la prolifération des cellules NK. Le TGF- $\beta$  est un inhibiteur de l'activité LAK, de la prolifération et de la production de cytokines. L'IL-10 enfin inhibe la production d'IFN- $\gamma$  par effet indirect, en réprimant les cellules productrices d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  (D'Andrea et coll. 1993).

**Chez la souris**, l'IL-2 (Biron et coll. 1990) et l'IL-12 (Schoenhaut et coll. 1992) sont également associées à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK et à la production d'IFN- $\gamma$ . Le TNF- $\alpha$  semble nécessaire à la production d'IFN- $\gamma$  quand l'activation est médiée par l'IL-12 (Wherry et coll. 1991; Tripp et coll. 1993; Hunter et coll. 1994). L'IL-7 stimule l'activité LAK (Lynch et coll. 1990) et également la production d'IFN- $\gamma$  (Kasper et coll. 1995). L'IL-4 a différentes propriétés: elle induit une activité LAK (Pearce et coll. 1988) mais inhibe la production d'IFN- $\gamma$  induite par l'IL-12 (Hsieh et coll. 1993). L'IL-10 est également un facteur inhibiteur de la production d'IFN- $\gamma$ , mais par effet indirect (Tripp et coll. 1993). Le TGF- $\beta$  est un inhibiteur de la cytotoxicité NK; à ce titre, Su et coll. (1993)

proposent que le nombre et l'activité plus élevés des cellules NK chez les souris T-déficientes (SCID et nude) pourraient s'expliquer par une absence de production basale de TGF- $\beta$  par les lymphocytes T.

## 8- Intéraction des cellules NK avec d'autres populations cellulaires

Au-delà des interactions "générales" qui se mettent en place par le réseau de cytokines, certains auteurs se sont intéressés à des interactions plus spécialisées.

Itoh et coll. (1988) montrent que chez la souris, la prolifération des **hépatocytes** suite à une hépatectomie partielle est, pour une part, contrôlée par des cellules NK (asialo-GM1<sup>+</sup>) et qu'elles interviennent également dans la régulation de la croissance physiologique, dans des conditions normales.

L'effet des cellules NK sur les **lymphocytes B** et la production d'anticorps est variable selon les modèles envisagés (Yuan et coll. 1994). Les cellules NK en produisant de l'IFN- $\gamma$  peuvent initier une réponse humorale de type 1<sup>3</sup>. Une étude récente montre cependant que la déplétion *in vivo* des cellules NK ne modifie pas les productions d'IgG1, d'IgG3 et d'IgG2a induites après stimulation par des antigènes T-indépendant (LPS) ou T-dépendant (TNP-KLH) (Wilder et coll. 1996).

Récemment, Kos et coll. (1995) ont montré que chez l'homme et la souris, les cellules NK sont nécessaires à la maturation des **cellules CD8<sup>+</sup>** en cellules cytotoxiques, dans des réactions de cytotoxicité mixte (MLC mixed lymphocyte cytotoxicity).

---

<sup>3</sup> L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  sont des cytokines de type 1; l'IL-4 et l'IL-5 des cytokines de type 2 (Mosman et coll. 1996).

L'IFN- $\gamma$  est associé à la production d'IgG2a et IgG2b. L'IL-4 est associée à l'IgG1 et l'IgG3 (Finkelman et coll. 1990).

## 9- Cellules NK et pathologies

Après avoir présenté les récepteurs exprimés par les cellules NK, les mécanismes de cytotoxicité, les cytokines produites et les interactions documentées de ces cellules avec d'autres populations, nous allons situer leur rôle *in vivo* dans certaines pathologies.

Les cellules NK ont été caractérisées initialement par leur activité cytotoxique *in vitro* vis-à-vis des **cellules tumorales**.

De nombreuses études ont été réalisées chez la souris dans différents modèles. Les travaux les plus spécifiques *in vivo* ont montré que la déplétion des cellules NK1.1 modifie la localisation et augmente la croissance de tumeurs pulmonaires (Seaman et coll. 1987). Ce type de tumeurs induit la cytotoxicité des cellules NK et la production d'IFN- $\gamma$ , la déplétion de ces cellules augmentant la sensibilité des animaux (Kurosawa et coll. 1993).

L'efficacité anti-tumorale des cellules NK a été testée, d'abord sur le modèle souris puis en thérapeutique humaine, par l'injection de cellules périphériques autologues activées *in vitro* par de l'IL-2 (cellules LAK). En particulier, deux essais cliniques ont été conduits, réunissant 25 et 108 patients (Rosenberg et coll. 1985; 1987) à qui ont été co-injectées de l'IL-2 et des cellules LAK. Divers types de tumeurs (mélanome, cancer du côlon, du rein) pour lesquelles les traitements classiques (chirurgie, chimio- et radio-thérapie) n'avaient pas fourni d'amélioration ont été traités; les injections simultanées d'IL-2 recombinante (de  $10 \cdot 10^3$  à  $100 \cdot 10^3$  U/kg) et de cellules LAK ( $0.4$  à  $2 \cdot 10^{11}$  cellules activées) ont permis la régression partielle de certaines tumeurs métastasées. Cependant, pour la majorité des personnes soignées, aucune amélioration objective n'a été observée. De plus, les effets secondaires liés à l'injection de doses élevées d'IL-2 sont nombreux. L'intérêt de tels traitements reste donc faible, compte-tenu de leur efficacité moyenne et de la lourdeur des techniques nécessaires.

L'utilisation de la fraction adhérente des cellules périphériques stimulées à l'IL-2 ou de cellules NK purifiées et activées est à l'étude sur des modèles animaux (Robertson et coll.

1990). Ces cellules, plus actives que la population totale adhérente et non-adhérente, pourraient permettre d'injecter des quantités de cellules et d'IL-2 moins importantes. Une étude (Vujanovic et coll. 1995) réalisée sur des souris nude et immunodéprimées par des injections d'anti-asialo GM1 et de cyclophosphamide auxquelles sont injectées des cellules tumorales d'origine humaine puis quelques jours plus tard de d'IL-2 et des cellules activées montre que les cellules NK purifiées adhérentes réduisent efficacement les tumeurs testées (une tumeur primaire et des métastases).

L'efficacité de la surveillance par les cellules NK des cellules cancéreuses circulantes reste néanmoins incertaine, en particulier comparée à l'activité des cellules T cytotoxiques. La nature exacte des ligands tumoraux responsables de l'activation des cellules NK reste en particulier à déterminer, afin de pouvoir envisager des techniques de stimulation plus spécifiques que celle par l'IL-2.

Les mécanismes par lesquels les cellules NK participent au contrôle des **infections virales** sont assez mal compris. L'infection murine par le cytomégalovirus murin (MCMV) est en partie contrôlée *in vivo* par les cellules NK tandis que la multiplication du lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) est indépendante de ces cellules (Bukowski et coll. 1988). La cytotoxicité des cellules NK est cependant augmentée dans les deux cas, indiquant que ce mécanisme à lui seul n'est pas suffisant pour éliminer une infection par LCMV. Le MCMV modifie l'expression des molécules de classe I, ce qui activerait les cellules NK (De Val et coll. 1992) tandis que le virus LCMV ne modifiant pas cette expression, resterait "invisible" aux cellules NK. Pourtant, l'infection réalisée dans le modèle murin déficient en classe I montre que la résistance et la susceptibilité sont indépendantes de l'expression de ces molécules (Tay et coll. 1995). Une étude récente montre que l'infection par MCMV induit la production précoce (2 jours après infection) d'IFN- $\gamma$ , assurée en partie par les cellules NK, et dépendante de l'IL-12. Au contraire le LCMV n'active pas cette production

immédiatement, ce qui pourrait expliquer que le virus ait le temps de disséminer (Orange et coll. 1996).

Les nombreux travaux réalisés ces dernières années dans des modèles d'**infection par des parasites et des bactéries intracellulaires** se sont essentiellement intéressés au rôle des cellules NK via la production d'IFN- $\gamma$ , notamment après activation par l'IL-12. On associe ainsi les résultats obtenus par l'injection ou la neutralisation d'IL-12 au rôle potentiel des cellules NK. Il convient néanmoins de garder à l'esprit que:

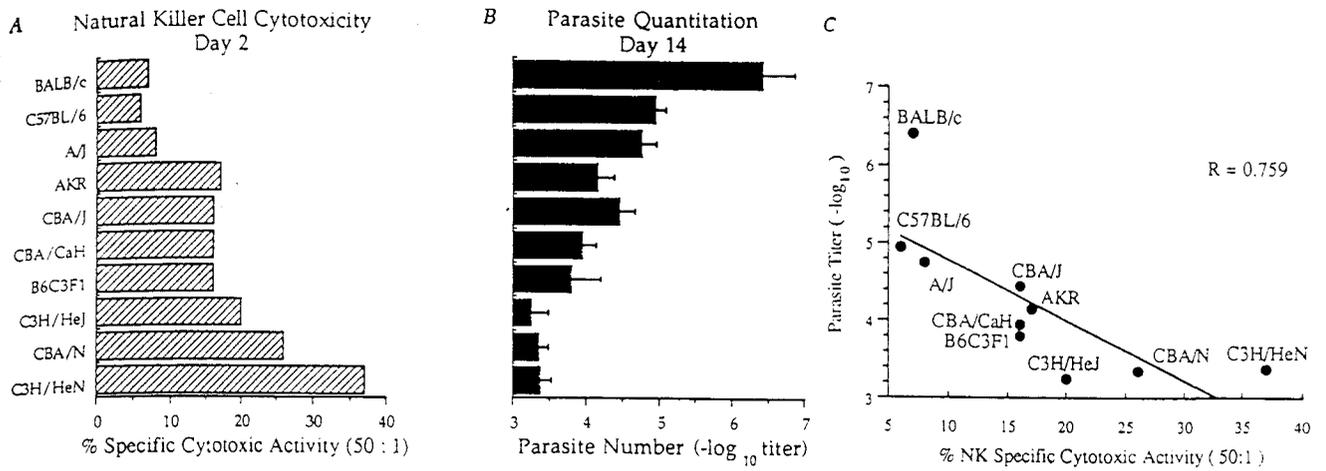
- 1- l'IL-12 augmente également la cytotoxicité et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T cytotoxiques ;
- 2- l'activation des cellules NK peut être indépendante de l'IL-12 (Orange et coll. 1996) ;
- 3- dans certain cas, l'effet de l'IL-12 est davantage lié à une diminution de l'expression de l'IL-4, la production d'IFN- $\gamma$  étant peu modifiée (Heinzel et coll. ) ;
- 4- l'activation des cellules NK induite artificiellement ne permet pas de présumer le rôle de ces cellules en condition normale.

Par ailleurs, les cellules NK étant minoritaires parmi les cellules lymphoïdes, de nombreux auteurs utilisent par commodité le modèle SCID. Les résultats ne sont cependant pas toujours vérifiés dans des modèles de souris immunocompétentes et ne permettent en aucun cas une généralisation au modèle humain. Ainsi, **malgré la littérature relativement abondante à ce sujet, de nombreuses incertitudes demeurent concernant le rôle exact des cellules NK dans diverses maladies infectieuses.**

L'intervention des cellules NK au cours de l'infection par **Schistosoma mansoni** a été étudiée au niveau de la régulation de la réponse granulomateuse, dans le modèle pulmonaire. La déplétion des cellules asialo GM1<sup>+</sup> ou NK1.1<sup>+</sup> augmente la taille des granulomes et cet effet est lié à une expression diminuée d'IFN- $\gamma$  (Wynn et coll. 1994). L'effet modulateur de l'IL-12, par l'action conjuguée de la production d'IFN- $\gamma$  et de l'inhibition de la production

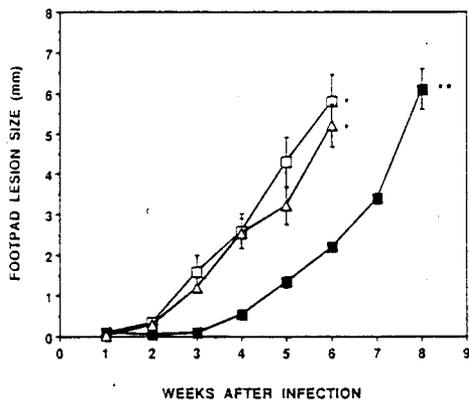
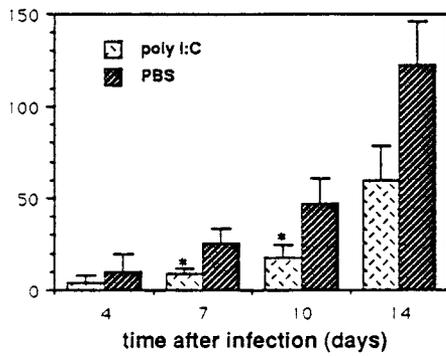
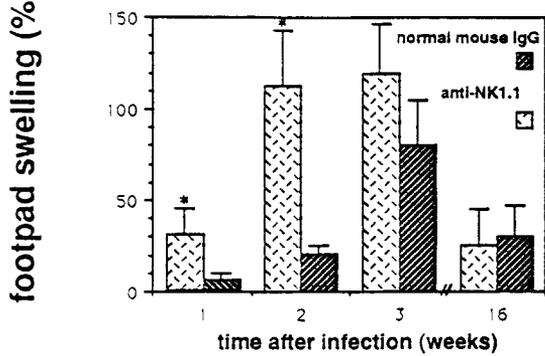
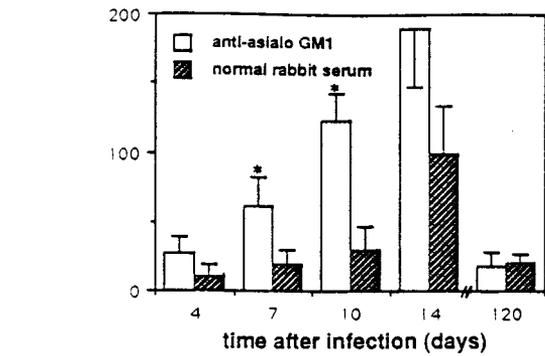
d'IL-4, a été montré dans le modèle pulmonaire (Wynn et coll. 1994), l'hypersensibilité immédiate (sensibilisation de la patte) (Oswald et coll. 1994) et enfin dans l'infection (Wynn et coll. 1995). La cytotoxicité (mesurée vis-à-vis de cibles tumorales YAC) des cellules spléniques isolées d'animaux infectés augmente les 4 premiers jours suivant l'infection puis revient à un taux normal dès le septième jour, et ne varie plus par la suite (Abe et coll. 1983). Aucune activation des cellules NK dans l'infection humaine n'a été rapportée.

**Leishmania major**, agent parasitaire responsable de la leishmaniose cutanée, est un modèle d'infection particulièrement étudié. L'IFN- $\gamma$  joue un rôle essentiel dans la protection en activant la cytotoxicité des macrophages. Les niveaux de résistance à l'infection varient selon la lignée de souris utilisée. La BALB/c est susceptible à l'infection, la C57BL/6 est relativement résistante dans la mesure où les lésions se développent mais n'entraînent pas de nécrose fatale, et la C3H/J est résistante. Le rôle des cellules NK dans ces différentes lignées a donc été étudié. Scharon et coll. (1993) observent une activation de la cytotoxicité des cellules NK chez les souris C3H/J, 2 jours après l'infection, qu'ils ne mettent pas en évidence chez les souris BALB/c et C57BL/6 (FIG. 7). Chez les souris C57BL/6, la déplétion des cellules NK1.1 augmente cependant la taille des lésions, tandis que leur activation par le poly IC les diminue. Ces effets médiés par l'IFN- $\gamma$ , ne sont visibles que dans les 15 premiers jours de l'infection, le développement et la résorption de la maladie n'étant pas à long terme modifiés (Laskay et coll. 1993) (FIG. 8). Les cellules NK contrôlent vraisemblablement la charge parasitaire et facilitent le développement d'une réponse cellulaire T de type 1 associée à la résistance, mais elles ne déterminent pas la guérison. Comme en témoignent les souris SCID "enrichies" en cellules NK fonctionnelles qui développent une infection semblable aux souris BALB/c et CB17 immunocompétentes (un retard de la cinétique est observé chez les souris SCID mais cet effet n'est pas lié à l'IFN- $\gamma$ ) (Varkila et coll. 1993). Enfin, les souris BALB/c sont efficacement protégées par une injection d'IL-12 (Heinzel et coll. 1993) et cet effet résulte, comme nous l'avons signalé

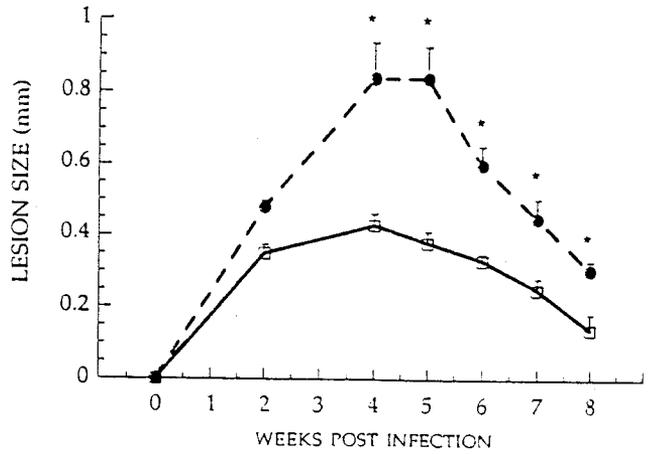


Infection par *L. major*: Relation inverse entre la cytotoxicité NK de cellules de ganglions drainants et la charge parasitaire, déterminée pour différentes lignées murines. (Scharton et coll. 1993)

FIG. 7.



A



B

C

Ci-contre: Evolution des lésions associées à l'infection par *L. major* chez des souris C57BL/6 traitées par des anticorps anti-asialo GM1 (A) ou anti-NK1.1 (B) ou des injections de poly I:C (C). (Laskay et coll. 1993)

Ci-dessus: Chez des animaux C3H/HeN infectés par *L. major* et traités par anti-asialo GM1 (●) (□ traitement-contrôle), les lésions sont plus importantes mais l'absence des cellules asialo-GM1<sup>+</sup> n'empêche pas leur cicatrisation naturelle. (Scharton et coll. 1993)

Evolution des lésions chez des souris □ BALB/c, △ C.B-17 et ■ SCID. (Varkila et coll. 1993)

FIG. 8.

au début de ce chapitre, de l'inhibition de la production d'IL-4 plus que de l'augmentation de la synthèse d'IFN- $\gamma$ .

La résistance au parasite **Toxoplasma gondii** est également liée à la production d'IFN- $\gamma$ . Chez des souris normales, Hauser et coll. (1986) montrent que des cellules spléniques prélevées à des animaux infectés depuis 3 jours (phase aiguë) et enrichies en cellules NK par Percoll sont cytotoxiques vis-à-vis de tachyzoïtes. Cependant, aucune expérience de déplétion ne confirme le rôle des cellules NK *in vitro* ou *in vivo*. Indirectement, l'injection d'IL-12 (Khan et coll. 1994) ou d'IL-7 (Kasper et coll. 1995) stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et les cellules T, améliorant la résistance des animaux. Chez la souris SCID, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK activées par l'IL-12 permet de prolonger la survie des animaux (Gazzinelli et coll. 1993).

Chez l'homme, les cellules LAK sont toxiques *in vitro* vis-à-vis de cellules infectées par des tachyzoïtes (Subauste et coll. 1992) et vis-à-vis des tachyzoïtes eux-mêmes (Dannemann et coll. 1989); cette activité directe est augmentée si les cellules et les parasites sont incubés en présence d'anticorps anti-toxoplasme (réaction d'ADCC). Par contre des cellules NK enrichies et activées par l'IL-2 ne présentent pas cette cytotoxicité. Ni les LAK, ni les NK ne sont par ailleurs cytotoxiques vis-à-vis des kystes du parasite. Enfin, la préincubation des cellules LAK et de tachyzoïtes avant injection à des souris, n'apporte pas une protection significative des animaux, ce qui tend à réduire l'impact *in vivo* de l'effet observé *in vitro*.

Une série de travaux a montré que l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK dans les 2 premiers jours suivant l'infection à **Listeria monocytogenes** est important pour la protection des souris. Ces études réalisées dans les modèles SCID et CB17 (Wherry et coll. 1991; Dunn et coll. 1991), confirmées par l'injection d'IL-12 (Tripp et coll. 1994) utilisent un protocole d'infection au niveau de la patte, en sous-cutané. Par contre, la résistance des souris est

améliorée par l'élimination des cellules NK1.1 lors d'infections par voie intrapéritonéale (Takada et coll. 1994) ou intra-veineuse (Teixeira et coll. 1994) dans un modèle C57BL/6. Dans le modèle d'infection en intra-veineuse, l'injection d'anti-IL-4 augmente également la résistance des souris. Ce modèle semble faire intervenir la sous-population T CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>, décrite dans le chapitre suivant, capable de produire de l'IL-4 après activation.

L'IFN- $\gamma$  est impliqué dans les mécanismes de résistance à **Salmonella typhimurium**. Des préparations de bactéries atténuées sont capables d'induire la production de quantités importantes d'IFN- $\gamma$  par les cellules spléniques de souris SCID en présence de cellules adhérentes (Ramarathinam et coll. 1993). Cependant, *in vivo*, on observe que la déplétion des cellules NK1.1 est associée à une diminution de la charge bactérienne dans la rate des animaux (Griggs et coll. 1991).

L'incidence des cellules NK dans les infections bactériennes en pathologie humaine est peu connue. Des travaux réalisés *in vitro* ont montré qu'une population enrichie en cellules Leu-11<sup>+</sup> Leu-19<sup>+</sup> et stimulée présente une activité cytotoxique à l'égard des bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus epidermidis* (Penarrubia et coll. 1989).

Pour finir, c'est le rôle néfaste des cellules NK (par la production d'IFN- $\gamma$ ) qui semble le mieux établi. Dans la **réaction généralisée de Shwartzman**, provoquée par 2 injections consécutives de LPS, l'une en intra-dermale, la seconde 24 heures plus tard en intra-veineuse, la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> permet de protéger les souris du choc léthal (Heremans et coll. 1994).

## 10- Les cellules T NK1.1<sup>+</sup>

En marge des cellules NK définies par l'absence de récepteur spécifique de l'antigène et la production d'IFN- $\gamma$ , le modèle souris C57BL/6 a permis de mettre en évidence une **sous population de lymphocytes T  $\alpha/\beta$  CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>**. Ces cellules sont présentes dans le thymus, la moëlle osseuse, la rate (1%) et le foie; la moitié des cellules T  $\alpha/\beta$  du foie (soit 29% de la population non-parenchymateuse totale) exprime le marqueur NK1.1 (Ohteki et coll. 1994). L'activation des thymocytes CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> par un anti-récepteur  $\alpha/\beta$  conduit à la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  (Arase et coll. 1993). Par contre, l'activation brève de cellules spléniques T CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> par des anticorps anti-CD3 entraine la production exclusive d'IL-4 (Yoshimoto et coll. 1994; 1995). L'importance de ces cellules *in vivo* est suggérée par l'étude de la lignée murine SJL (Yoshimoto et coll. 1995) qui produit peu d'IgE et d'IL-4 après activation. Cette déficience pourrait être liée à l'absence de cellules T CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> spléniques constatée par ces auteurs.

## LA SCHISTOSOMIASE

### 1- Généralités

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

Les agents responsables, les schistosomes, sont des vers appartenant à l'embranchement des plathelminthes (vers plats non-segmentés), à la classe des trématodes, à la sous-classe des digènes, à l'ordre des distomes, à la famille des Schistosomatidae et au genre *Schistosoma* qui rassemble dix-neuf espèces.

Les principales **espèces infectant l'homme** sont *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma japonicum*, associées aux bilharzioses intestinales et *Schistosoma haematobium*, responsable de la bilharziose uro-génitale. *Schistosoma intercalatum* (bilharziose rectale) et *Schistosoma mekongi* (bilharziose intestinale) ont une prévalence (proportion d'individus infectés) moins importante. Les diverses pathologies citées sont dues à une localisation des espèces différente chez l'hôte définitif. *S. haematobium* s'établit dans l'appareil uro-génital, *S. mansoni* dans les veines mésentériques supérieures et *S. japonicum* au niveau des veines mésentériques inférieures. Cette localisation préférentielle peut néanmoins varier en fonction de l'hôte infecté (par exemple *S. haematobium* s'établit principalement dans les veines mésentériques chez le babouin) ou de l'importance des atteintes organiques (*S. mansoni*, dans les cas de splénomégalie importante, s'établit au niveau du système porte hépatique).

Il existe enfin un nombre important d'**espèces zoophiles** parmi lesquelles *Schistosoma bovis* et *Schistosoma matthei* qui infectent le bétail entraînant des pertes économiques importantes.

## 2- Répartition géographique

**Les schistosomiases sont endémiques dans 74 pays.** 200 millions de personnes, d'après le dernier rapport de l'OMS (1993), sont infectées et 600 millions sont exposées. La répartition sur les différents continents concernés est décrite FIG. 9. Dans certains pays dont le Brésil, la Chine, l'Egypte, les Philippines, le Soudan et le Vénézuéla, la lutte contre la schistosomiase est une priorité des programmes de santé.

Il faut noter que *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum* cohabitent dans certaines régions. Cela pose le problème de l'apparition d'hybrides, avec des conséquences possibles sur le pouvoir infectieux. Une étude a montré que les mâles et les femelles de *S. haematobium* et *S. intercalatum* peuvent s'apparier lors d'infections expérimentales chez la souris (Tchuem-Tchuente et coll. 1995); si la descendance est stérile, ces appariements permettent néanmoins aux femelles de parvenir à leur maturité sexuelle.

## 3- Cycle

**Le mâle et la femelle vivent généralement accouplés:** la face ventrale du mâle forme un canal gynécophore dans lequel la femelle se loge (FIG. 10. A). La maturité sexuelle de la femelle dépend d'ailleurs de cette interaction. La longueur des vers varie de 6 à 26 mm, la femelle plus fine que le mâle étant généralement plus longue. Au microscope, le corps du mâle apparaît gris clair et aplati tandis que la femelle a une forme cylindrique et présente une couleur noire due à la présence dans le tractus intestinal des globules rouges ingérés. Le mâle et la femelle possèdent deux ventouses latérales chacun, qui leur permettent de se fixer à la paroi des vaisseaux sanguins.

Les femelles, une fois la maturité sexuelle atteinte, vont produire des œufs en continu; on estime que la femelle de *S. mansoni* pond environ 300 œufs par jour (FIG. 11). Les

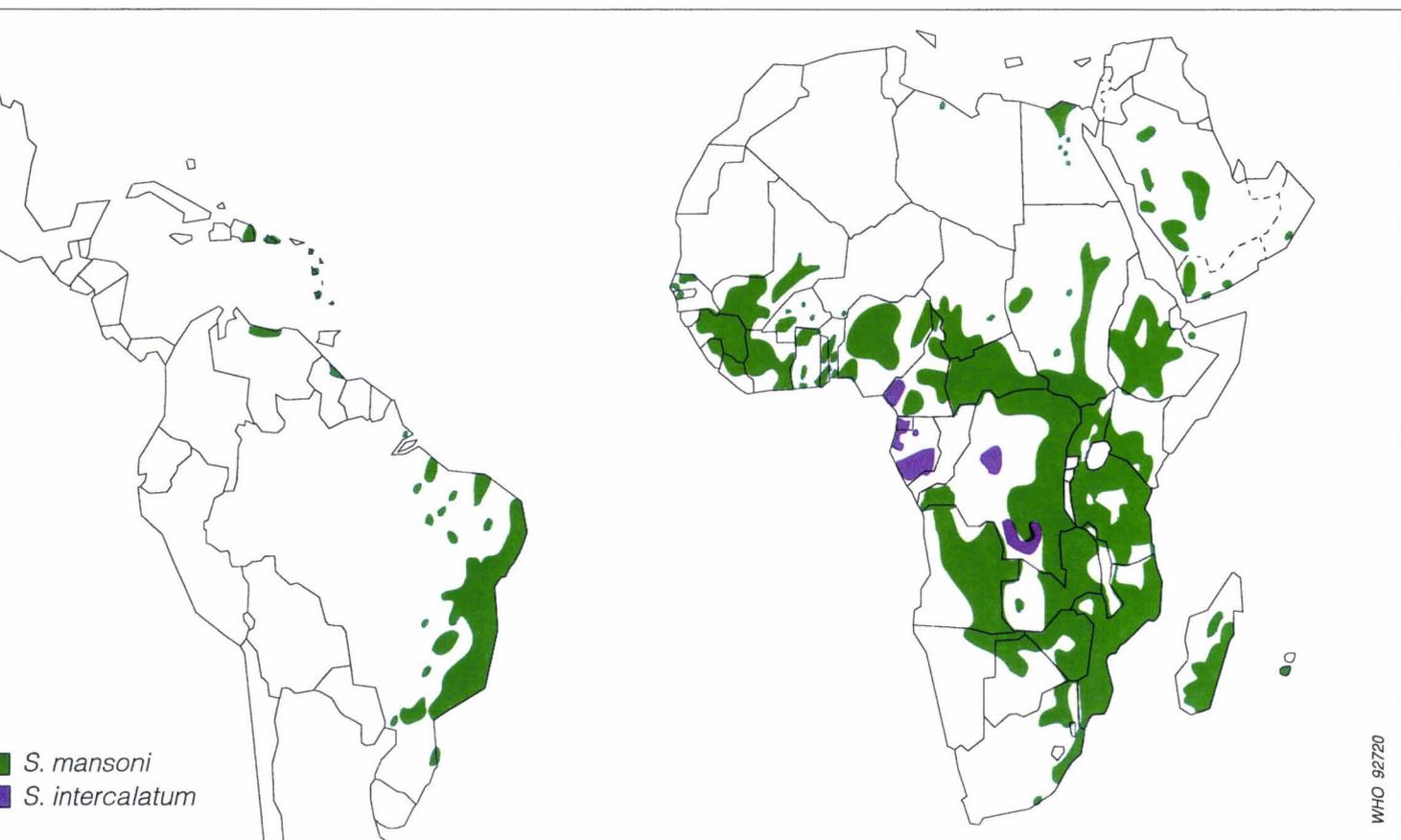
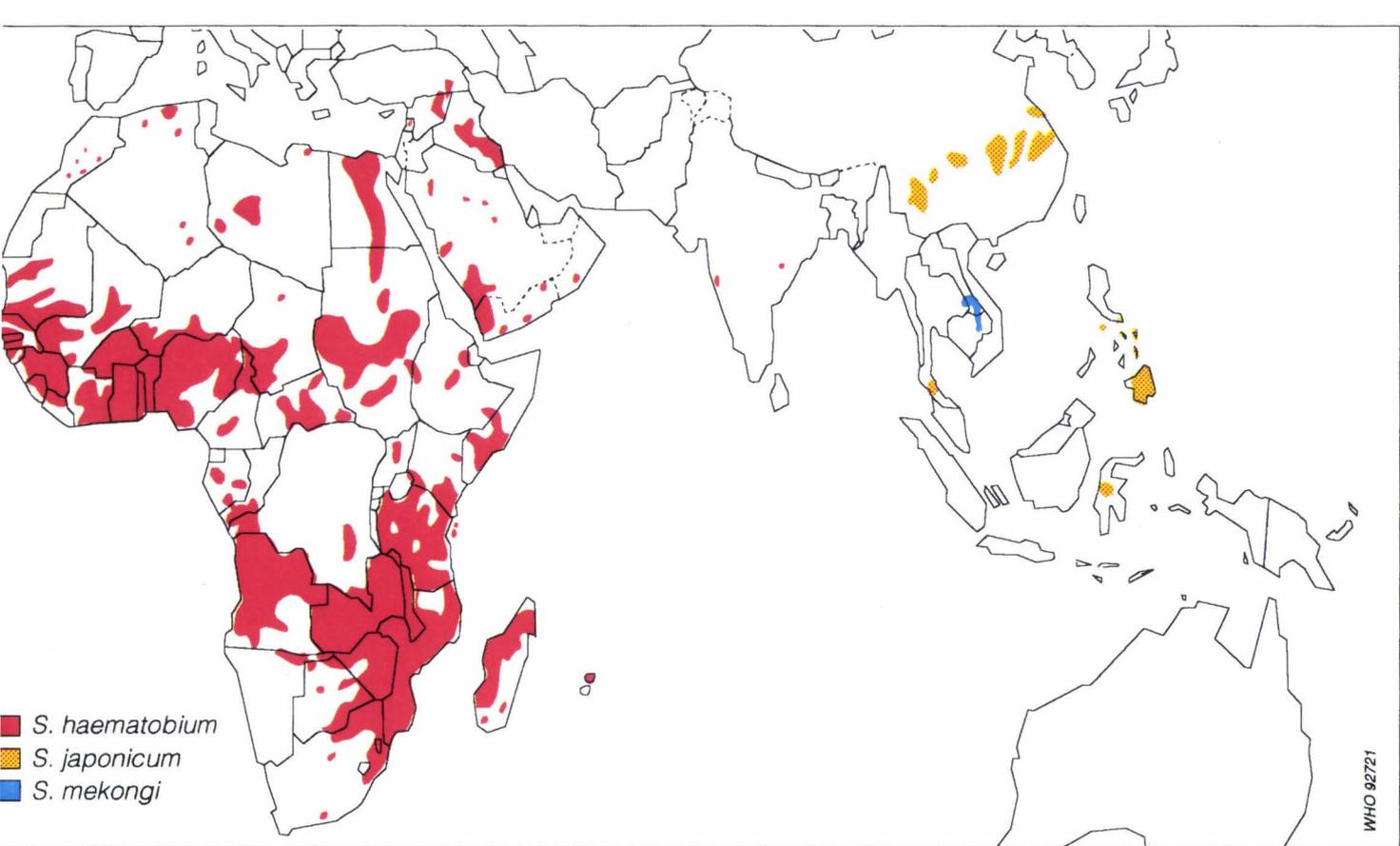


FIG. 9. Répartition géographique des schistosomiasis, d'après le rapport de l'OMS:  
 The control of schistosomiasis (WHO Technical Report Series n°830.1993).

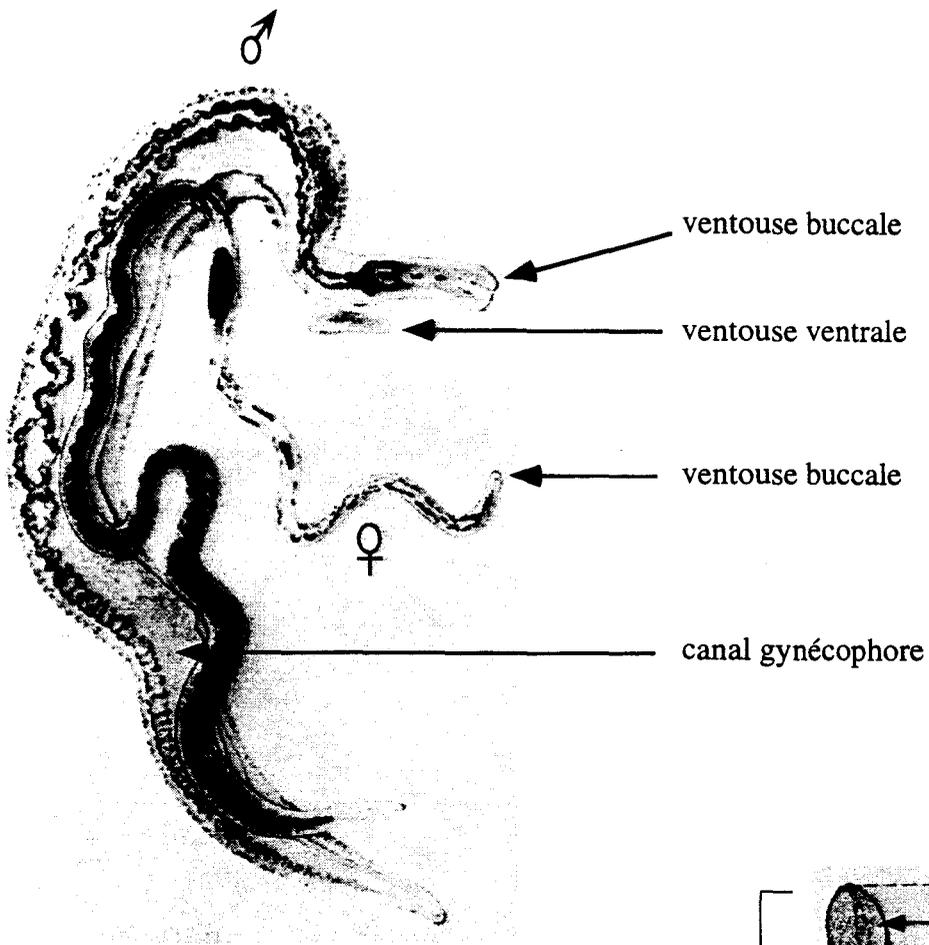
**œufs sont responsables de la pathologie associée à l'infection et permettent la poursuite du cycle parasitaire.**

Dans le cas des schistosomiasés à *S. mansoni* et *S. japonicum*, une part importante des œufs pondus dissémine dans divers organes internes (en particulier le foie) où, à la faveur du rétrécissement des vaisseaux sanguins, ils se trouvent bloqués: leur présence conditionne une forte réponse inflammatoire désignée sous le terme de **réaction granulomateuse**, sur laquelle nous reviendrons en détail par la suite.

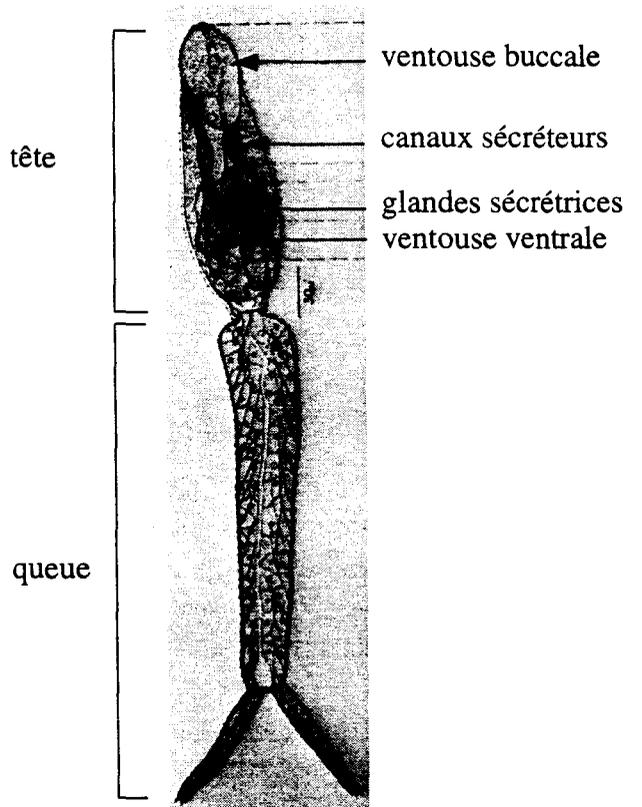
D'autre part, les œufs qui franchissent les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*) et sont éliminés dans les urines ou les fèces vont donner naissance en une dizaine de jours (si les conditions de température, de luminosité et d'hydrométrie sont favorables) à un miracidium mature. Le cycle parasitaire se poursuit alors par l'infection d'un hôte aquatique intermédiaire. Les **miracidia**, extrêmement mobiles, sont vraisemblablement attirés vers les mollusques-hôtes par des facteurs chimiotactiques. Les mollusques vecteurs sont spécifiques pour chaque espèce: *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum* infectent respectivement les genres *Biomphalaria*, *Bulinus* et *Oncomelania*.

A l'intérieur du mollusque-hôte, le miracidium se transforme en sporocyste qui contient les cellules germinales. Le sporocyste (dit primaire) se développe à son tour jusqu'à se rompre, libérant une seconde génération de 200 à 400 sporocystes. Les **furcocercaires** (FIG. 10. B), **formes infectantes pour les mammifères**, se développent à l'intérieur de ces sporocystes. Un miracidium donne donc naissance à des centaines de furcocercaires, qui, à maturité, quittent le mollusque et contaminent les plans d'eau.

La pénétration des furcocercaires dans l'hôte définitif commence par une étape de fixation à la peau par des ventouses munies d'épines. Par des mouvements vibratoires et la sécrétion d'enzymes au niveau des glandes céphaliques, la cercaire pénètre à l'intérieur de l'épiderme en quelques minutes. Au cours de la pénétration, les cercaires perdent leur queue; c'est la première des modifications que subit le parasite, que l'on appelle alors **schistosomule**,



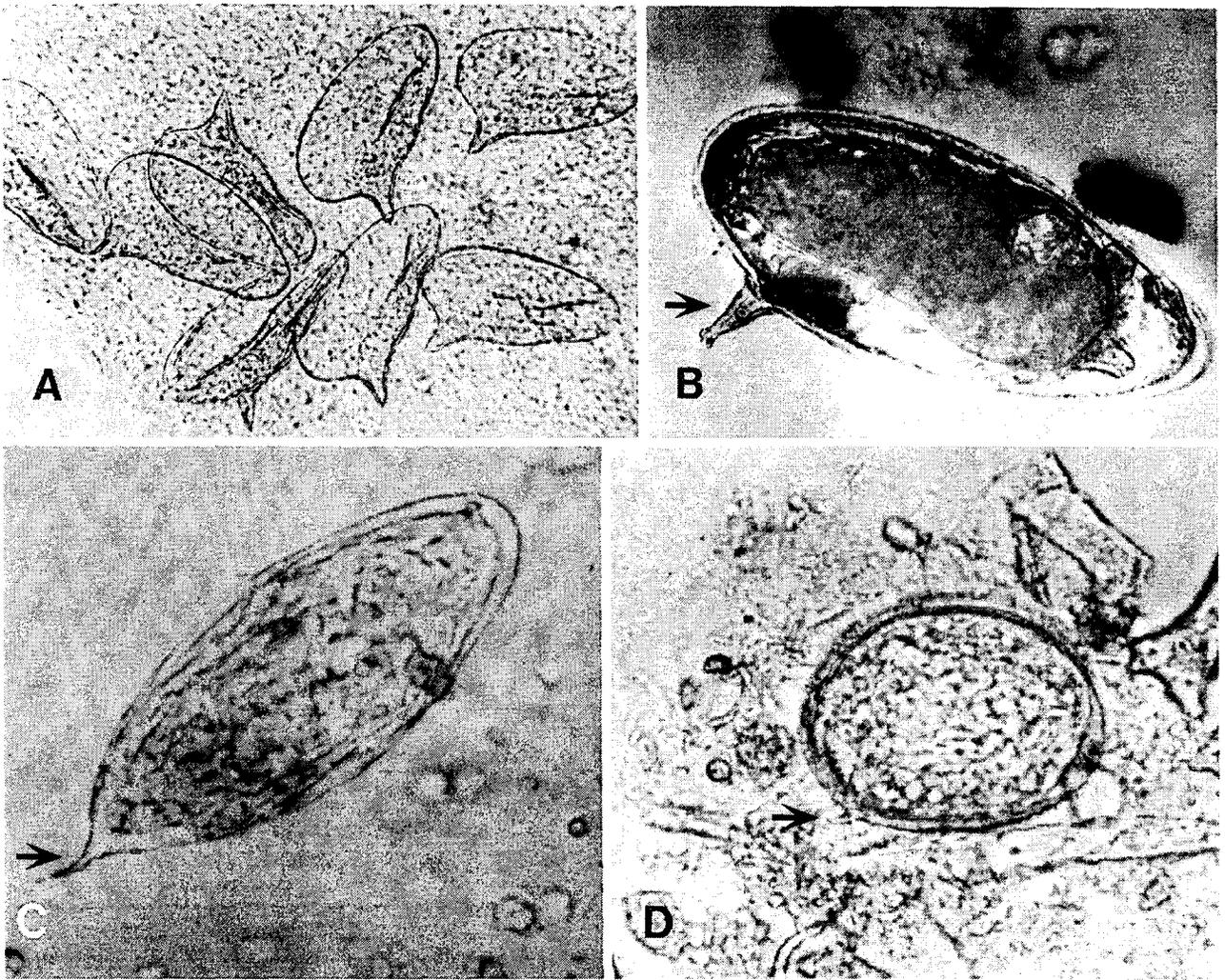
A



B

FIG. 10. (A) Vers adultes et (B) Cercaire de *Schistosoma mansoni*.

D'après Marcial-Rojas, R. A. (ed). 1971. Pathology of Protozoal and Helminthic Diseases.



**Morphologie des œufs de schistosomes.**

(A) et (B) Œufs de *Schistosoma mansoni* présentant un éperon latéral (flèche). (C) Œuf de *Schistosoma haematobium* caractérisé par un éperon terminal court. (D) Œuf de *Schistosoma japonicum* à l'éperon latéral minuscule.

D'après Reeder, M. M., and P. E. S. Palmer. 1981. *The Radiology of Tropical Diseases, with epidemiological, pathological and clinical correlation.*

FIG. 11.

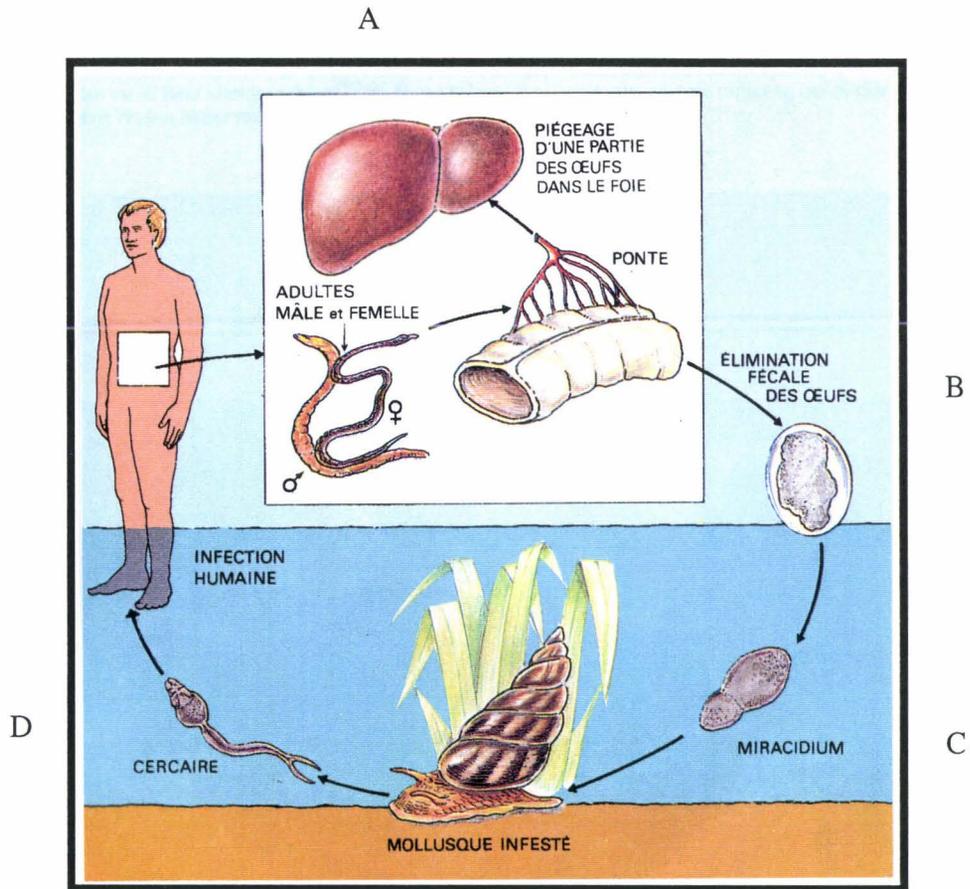
pour assurer son adaptation au milieu interne de son hôte. Tout en poursuivant ses processus de maturation, le schistosomule va quitter le derme et migrer jusqu'aux poumons puis jusqu'au foie. A la maturité sexuelle, les vers vont s'établir dans le système mésentérique ou urinaire (FIG. 12). Leur longévité est assez variable suivant les populations humaines considérées. Pour l'infection par *S. mansoni*, on estime qu'elle se situe entre 2 et 10 ans.

#### 4- Biologie

Un certain nombre de thèmes abordés dans la suite (biologie du parasite, génétique, épidémiologie, vaccinologie, prophylaxie etc...) ont fait l'objet de communications lors du IV symposium international sur la schistosomiase à Rio de Janeiro, fin 1993. Ces communications sont présentées dans la revue Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz (special issue vol 90, mar / apr. 1995).

Les schistosomes possèdent 7 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels (ZZ pour le mâle et ZW pour la femelle). Environ 35% du génome nucléaire est constitué de séquences répétées de 62 bp. Ces mêmes séquences répétées sont également présentes, en proportions variables, dans l'ADN mitochondrial (Pena et coll. 1995). Par la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), on ne distingue pas de polymorphisme entre les souches d'une même espèce isolées de zones géographiques distinctes (Simpson et coll. 1995)

L'identification des gènes exprimés par les schistosomes, en particulier *S. mansoni*, a été initiée par la recherche de protéines à potentiel vaccinal. Les premières protéines clonées sont des enzymes: une enzyme de détoxification, la glutathion-S-transférase de 28 kDa (Sm28 GST) (Balloul et coll. 1987; Taylor et coll. 1988) et une enzyme du métabolisme glucidique, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) (Goudot-Crozel et coll. 1989). On connaît actuellement une centaine de produits impliqués dans la destruction des radicaux oxygénés, le métabolisme glucidique (Skelly et coll. 1995), la dégradation de l'hémoglobine



**Le cycle de développement des schistosomes (*S. mansoni* et *S. japonicum*).**

Les parasites accouplés se trouvent dans le système veineux de l'intestin grêle. Les femelles produisent une quantité importante d'œufs qui sont entraînés vers le foie (A) ou sont éliminés dans les fèces (B).

L'éclosion des œufs donne naissance aux miracidia qui vont infecter des mollusques (C) dans lesquels le parasite poursuit son développement jusqu'à la forme cercaire, capable d'infecter l'homme (D).

D'après **Capron, A.** Les espoirs de vaccin contre la bilharziose. Pour la Science. n° 178. Août 1992.

FIG. 12.

(cathepsines) (Dalton et coll. 1995), diverses protéases ainsi que des protéines de choc thermique (Newport et coll. 1988), de membrane, de structure et de régulation. Le potentiel vaccinal de quelques-unes de ces protéines sera discuté dans un chapitre suivant (*Approches vaccinales*).

Les **enzymes de détoxication** exprimés par le parasite sont nombreux et interviennent vraisemblablement dans la protection contre les dérivés oxydatifs émis par le système immunitaire. On a isolé des glutathion-transférases de 26 et 28 kDa (Trottein et coll. 1990; Balloul et coll. 1987), une glutathion-péroxydase (Williams et coll. 1992), des superoxydes dismutases (Simurda et coll. 1988; Da Silva et coll. 1992).

Le **métabolisme glucidique** concerne des transporteurs, des enzymes de glycolyse (hexokinase), des protéines intervenant dans le cycle de Krebs (triose phosphate isomérase).

Les **protéases** interviennent lors de la pénétration de la cercaire au travers de la peau, dans les réactions de catabolisme protéique et également pour échapper au système immunitaire. Ce dernier point sur lequel nous reviendrons par la suite (*Régulation de la réponse immunitaire par le parasite*) implique également des **inhibiteurs de protéases** synthétisés par le parasite (Fishelson. 1995).

Les protéines Sm23 (Wright et coll. 1990) et Sm25/gp22 (El Sherbeini et coll. 1990) ont été détectées à la **membrane** du parasite. Il faut noter que de nombreuses protéines internes sont également exprimées de façon transitoire à la surface des vers, sans que l'on sache pour quelles raisons.

D'autres protéines, dont la protéine F-10 (Moraes et coll. 1995), interviennent dans la structure de la coquille de l'œuf du parasite. Elles ne sont produites que par la femelle mature (associée à un mâle). On pense que l'expression de ces protéines est régulée par des hormones produites par le mâle.

Des **protéines de régulation** participant à la voie d'activation par l'AMPc (Iltzsch et coll. 1992) et à la voie de l'inositol-tri-phosphate ont été isolées (Espinoza et coll. 1991). Des protéines fixant le calcium intracellulaire telles que la calreticuline ont également été clonées (Khalife et coll. 1993).

Les transformations morphologiques du parasite au cours du cycle, l'adaptation du métabolisme énergétique aux différents milieux fréquentés (Tielens. 1994), la maturation sexuelle de la femelle, entre autres exemples de la biologie complexe des schistosomes, sont finement régulées par l'expression de gènes de stade et de genre. Récemment, la technique EST (Expressed Sequence Tags) appliquée à une banque d'ADN complémentaires de ver adulte a permis de caractériser une quarantaine de fragments de gènes présentant des homologies significatives avec des gènes connus, isolés chez d'autres organismes, codant pour des enzymes, des protéines structurales, de régulation et des facteurs nucléaires (Franco et coll.1995). Le clonage des gènes complets reste à effectuer. Une meilleure connaissance du génome du parasite permettra de mieux comprendre les mécanismes évoqués plus haut et de caractériser également des protéines cibles potentielles d'agents thérapeutiques.

## 5- Pathologies associées aux schistosomiasés

Selon la localisation des vers et la circulation des œufs, on distingue des atteintes urogénitales (*S. haematobium*) et des atteintes hépato-intestinales (*S. mansoni* et *S. japonicum*). **Les manifestations cliniques, à l'intérieur d'une population infectée, sont extrêmement variables.** Elles sont corrélées à l'intensité de l'infection, à la virulence du parasite, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire de l'individu infecté et à des facteurs génétiques. Les prévalences les plus élevées et les infections les plus intenses sont observées chez les enfants entre 5 et 15 ans.

*S. haematobium* provoque des lésions symptomatiques au niveau de l'appareil urinaire (dysurie, hématurie). L'infection peut à terme toucher les reins et provoquer des déficiences graves.

L'infection par *S. mansoni* se manifeste, pour les formes les plus "bénignes", par une gêne intestinale (**forme chronique intestinale**) due à la présence des œufs. Le franchissement de la muqueuse intestinale provoque des lésions qui peuvent conduire à des diarrhées

sanglantes et à la formation de polypes. Les atteintes cliniques les plus graves concernent le foie. Les œufs bloqués dans les capillaires hépatiques altèrent la circulation du sang arrivant au foie qui ne peut être évacué et stagne dans la veine-porte, entraînant une hypertension portale. Des voies de dérivation se mettent en place vers d'autres veines telles que celles de l'œsophage, y créant des varices. Le risque majeur est la rupture de ces varices associée à des hémorragies. L'hypertension présente dans les vaisseaux peut être responsable d'une fuite de plasma sanguin dans la cavité abdominale (ascite) ou dans les tissus (œdèmes). Les œufs provoquent également une réaction inflammatoire associée à une fibrose cicatricielle, qui, si elle n'est pas correctement régulée, perturbe le fonctionnement hépatique (dont la synthèse de protéines plasmatiques et les fonctions d'épuration) et conduit à des problèmes de coagulation, un amaigrissement, une jaunisse et parfois des troubles de conscience. Ces problèmes n'apparaissent qu'à un stade avancé de la fibrose, une période importante de l'infection pouvant être asymptomatique. **Environ 10% des personnes infectées développent des formes sévères hépato-spléniques. La forme hépatointestinale correspond à une pathologie modérée.**

*S. japonicum* provoque un tableau clinique pratiquement identique: les lésions semblent néanmoins plus précoces. Il peut également y avoir des atteintes neurologiques.

Des épisodes fébriles nécessitant une hospitalisation peuvent également se manifester lors de la pénétration des cercaires chez l'hôte. Cette pathologie appelée fièvre de Katayama est principalement associée à l'infection par *S. japonicum*.

**Dans les pays en voie de développement, les schistosomiasés sont fréquemment associées à d'autres infections, aggravant le tableau clinique.** Ainsi, la co-infection *S. mansoni*-virus de l'hépatite B entraîne un dysfonctionnement hépatique plus important.

*S. haematobium* est fréquemment associé au développement d'une certaine forme de cancer de la vessie. Des travaux réalisés sur des babouins semblent indiquer que le parasite jouerait un rôle promoteur dans la carcinogénèse (Mostafa et coll. 1995).

De plus, d'un point de vue plus général, des travaux réalisés chez la souris ont montré que l'altération de la réponse immunitaire provoquée par le parasite entraîne une diminution de la capacité d'élimination de divers pathogènes (Actor et coll. 1993; Actor et coll. 1994).

## 6- Traitements

**Il existe des traitements chimiothérapeutiques efficaces contre les schistosomiasis.** Le praziquantel est actuellement le composé le plus utilisé. Le traitement est relativement simple à réaliser puisqu'une seule dose de 40 mg/kg est suffisante pour éliminer les parasites des 3 espèces *haematobium*, *mansoni* et *japonicum* ou, à défaut d'une élimination complète, pour diminuer le nombre d'œufs émis dans les urines et les fécès. Le praziquantel entraîne également la régression des lésions et de la fibrose périportale. Ce traitement diminue donc à la fois les taux de transmission et la morbidité.

Quoiqu'aucune forme de résistance ou de tolérance n'ait été relevée en zone d'infection endémique, le traitement semble moins efficace au Sénégal où sévit une épidémie récente (1988). En effet, 82% des personnes traitées au praziquantel sont toujours positives aux tests de détection, 10 jours après traitement, quelque soit la charge parasitaire avant traitement (Gryseels et coll. 1995). Bien que cette relative résistance des parasites soit inquiétante, Gryseels remarque néanmoins que les intensités d'infection ont fortement diminué et que les taux de réinfection restent bas. Si des modifications du parasite peuvent être à l'origine de cette résistance, les caractéristiques particulières du foyer sénégalais (intensité de l'infection et de la transmission élevée, faible immunité des individus vis-à-vis des schistosomes) peuvent également être en cause.

**Par ailleurs, quelque soit l'efficacité d'un traitement chimiothérapeutique, il ne prévient pas les réinfections.** Pour être réellement efficaces à long terme, les

traitements doivent donc être répétés régulièrement, en particulier chez les enfants qui sont les plus exposés et les moins aptes à élaborer une réponse immunitaire contre les parasites.

## 7- Prophylaxie

La prophylaxie sanitaire est basée sur l'**interruption du cycle parasitaire**. Elle peut intervenir à plusieurs niveaux: élimination des formes infectantes par l'éradication des mollusques vecteurs; diminution de la contamination des plans d'eau par les excréments humains; diminution des contacts de la population avec le biotope contaminé.

Sur le terrain, ces dispositions s'avèrent difficiles à mettre en place et à perpétuer.

## 8- Réponse du système immunitaire à l'infection par *Schistosoma- mansoni* Modèles animaux et populations humaines

Des serums d'individus infectés par *S. mansoni* induisent *in vitro* la lyse des schistosomules en présence de cellules leucocytaires d'individus sains. Ces mécanismes de cytotoxicité impliquant des anticorps d'isotype IgG (les serums étant chauffés à 56°C, c'est l'isotype principal résistant au chauffage) et des éosinophiles (Butterworth et coll. 1975) sont désignées sous le terme **ADCC** (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity).

L'étude détaillée de ces réactions a été réalisée chez le rat, hôte non-permissif pour l'infection par les schistosomes, qui expulse spontanément une partie des larves 3 semaines après l'infection. Les mécanismes d'ADCC font intervenir dans ce modèle des **cellules inflammatoires** (éosinophiles, macrophages et plaquettes) et des **anticorps anaphylactiques** (IgG2a et IgE) (Capron et coll. 1986). Les réactions de cytotoxicité observées *in vitro* correspondent à des mécanismes effecteurs *in vivo* puisque des animaux non-immuns développent une résistance notable à l'infection si est associé un transfert passif

de cellules ou de serums d'animaux infectés. L'injection d'anticorps monoclonaux d'isotype IgG2a (Grzych et coll. 1982) et IgE (Verwaerde et coll. 1987) spécifiques de protéines de schistosome protège également contre l'infection.

Ces expériences ont permis d'attribuer un rôle nouveau aux IgE (autre que la participation à des phénomènes allergiques) dans des réactions de défense anti-parasitaire. Différents récepteurs aux fragments constants des IgE ont été décrits, dont dernièrement le récepteur aux IgE des éosinophiles (Soussi-Gouni et coll. 1995), ainsi que les mécanismes d'activation associée à la fixation d'immuns complexes IgE sur les cellules effectrices.

Ces travaux ont été confortés par 3 études épidémiologiques de communautés humaines touchées par la bilharziose. L'une concerne l'infection par *S. haematobium* touchant des populations en Gambie (Hagan et coll. 1991) et les 2 autres s'intéressent à l'infection par *S. mansoni* de populations kenyenne (Dunne et coll. 1992) et brésilienne (Rihet et coll. 1991). Chacune montre une **corrélation positive entre la réponse IgE dirigée contre les vers et le maintien d'une résistance à la réinfection** (après chimiothérapie), indépendante de facteurs tels que l'âge, le sexe ou l'intensité de l'exposition aux parasites.

Par contre, l'existence d'une relation entre le statut immunitaire des individus (avant ou après traitement) et la réponse des cellules périphériques à l'égard d'antigènes parasitaires de différents stades est difficile à établir, que ce soit en terme de prolifération (Colley et coll. 1986) ou de production de cytokines particulières [IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ] (Roberts et coll. 1993).

**Dans les conditions naturelles**, ces mécanismes d'ADCC contribuent, au moins pour partie à l'établissement d'une résistance à l'infection qui n'est cependant pas véritablement efficace avant la puberté.

La prévalence de l'infection et la charge parasitaire atteignent des valeurs maximales chez les enfants entre 10 et 15 ans et sont diminuées chez les adultes. Cette résistance corrélée à l'âge

est généralement associée à une "expérience de l'infection" que les adultes ont pu acquérir au fil des années par un contact quotidien avec les agents parasitaires.

Cependant, selon Gryseels (1994), le même profil d'infection (maxima avant la puberté et diminution ensuite) étant observé quelles que soient les conditions d'exposition des individus, cette explication à elle seule est sans doute insuffisante. Ainsi, en région endémique les adultes exposés depuis moins de 10 ans et les personnes de même âge exposées depuis plus de 20 ans ont des charges parasitaires identiques. Les adultes sont moins lourdement ré-infectés, après traitement, que les enfants même lorsque les intensités de contact avec le biotope contaminé sont équivalentes. L'épidémie récente qui affecte le Sénégal a également fourni plusieurs éléments nouveaux propres au contexte de l'infection aiguë. Dans une situation où tous les individus sont en contact depuis le même laps de temps avec des foyers parasitaires identiques et où les taux de prévalence sont proches de 100% quelque soit l'âge, les adultes sont moins infectés que les enfants. Ces observations suggèrent que la résistance associée à l'âge pourrait également dépendre de facteurs propres à l'âge et indépendants de l'immunité acquise.

Parallèlement aux mécanismes effecteurs mis en place par l'hôte pour éliminer les organismes pathogènes, ceux-ci élaborent des stratégies de défense qui leur permettent de se maintenir en place. Dans le cas des parasites en général, et des schistosomes en particulier, ces stratégies sont particulièrement élaborées.

## 9- Régulation de la réponse immunitaire par le parasite

L'étude de l'infection chez le rat a montré que le parasite induit la production d'**anticorps** dits **neutralisants** qui inhibent la formation des complexes cellules effectrices - anticorps - schistosomules. Les structures glycaniques semblent être impliquées dans cette production,

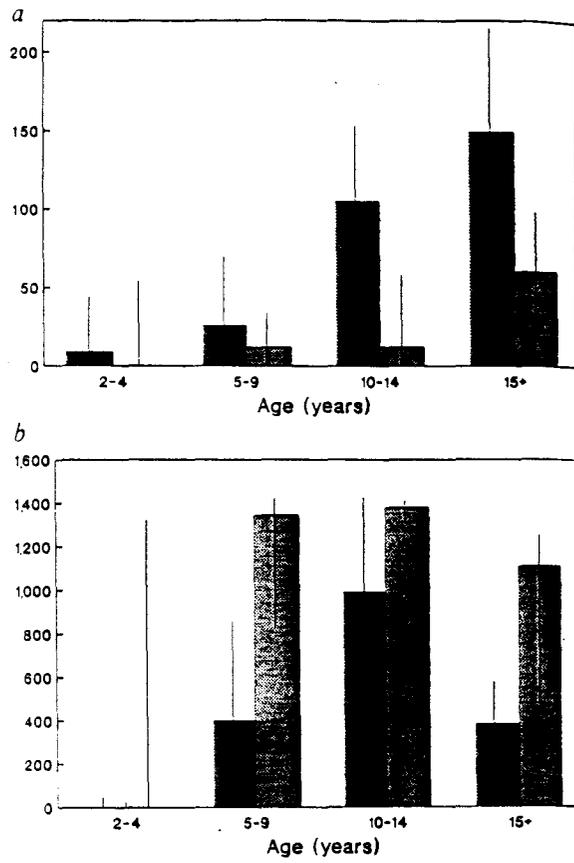
comme c'est le cas pour la glycoprotéine de surface gp38 qui génère chez le rat à la fois des IgG2a effecteurs et des IgG2c neutralisants (Grzych et coll. 1984).

Dans les populations humaines, la gp38 et d'autres glycoconjugués de surface induisent la production d'IgM (Khalife et coll. 1986) et d'IgG2 neutralisants (Butterworth et coll. 1988) capables d'inhiber la cytotoxicité des éosinophiles. L'antigène excrété-secrété Sm28 GST (sur lequel nous reviendrons dans le chapitre *Approches vaccinales*) induit chez les individus infectés la production d'anticorps spécifiques d'isotype IgE, IgA et IgG4, cette dernière classe étant fortement exprimée chez les individus les plus susceptibles à la réinfection (Auriault et coll. 1990). Hagan et coll. (1991) ont également observé dans l'infection par *S. haematobium* que la réponse IgG4 spécifique des vers est diminuée chez les adultes résistants par comparaison aux individus susceptibles (FIG. 13).

Le parasite a développé d'autres mécanismes de contrôle ayant pour cible le système immunitaire de l'hôte auquel il est continuellement exposé. Il s'agit de mécanismes de "recouvrement", de **détournement** ou de **régulation** de la réponse immunitaire (Capron. 1995), qui sont liés à l'acquisition passive de protéines de l'hôte ou à l'expression de produits particuliers par le parasite.

L'acquisition d'antigènes de l'hôte comme des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité ou des protéines de groupes sanguins permet aux parasites d'échapper à la détection du système immunitaire (Damian. 1987).

L'utilisation de facteurs de croissance de l'hôte par les parasites à des fins personnelles est connu (Capron. 1995). En ce qui concerne *S. mansoni*, Amiri et coll. (1992) ont montré que la ponte des femelles, très faible chez les souris SCID, augmente considérablement quand ces souris reçoivent des injections de TNF- $\alpha$ . De telles propriétés impliquent que le parasite est capable d'exprimer des protéines identiques, ou tout au moins très semblables, aux récepteurs originaux. L'expression de protéines parasitaires présentant de fortes homologies avec les protéines de l'hôte est connue sous le terme de mimétisme moléculaire. Elle peut



Réponses IgE (a) et IgG4 (b) spécifiques d'antigènes de vers (■) ou d'antigènes d'œufs (▨) en fonction de l'âge, observées chez des individus infectés par *S. haematobium*.  
(Hagan et coll. 1991)

FIG. 13.

s'expliquer soit par une pression de sélection qui maintient une structure conservée adaptée à une fonction donnée, soit par la capture et l'expression de molécules d'hôte.

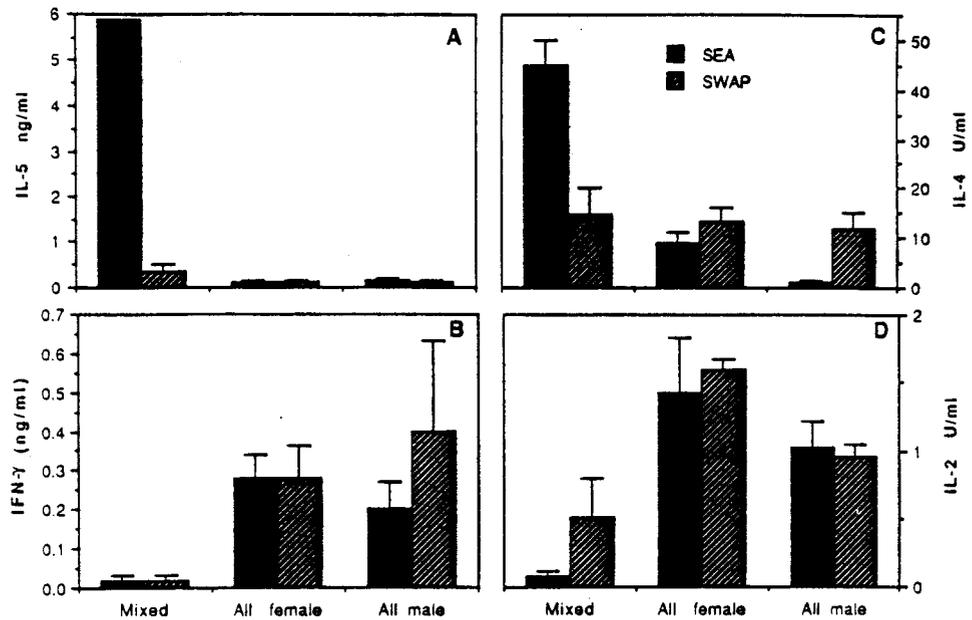
Le parasite fixe ou exprime différents facteurs tels que le SCIP-1 (schistosome complement inhibitor) ou des protéases (m28) qui altèrent l'efficacité des réactions de défense non-spécifique médiées par les voies du complément (Fishelson. 1995). L'expression de serpins (serine protease inhibitor) permet au parasite de neutraliser certains composants de la réaction inflammatoire, tels que l'élastase produite par les neutrophiles qui est inactivée par la protéine parasitaire Smpi 56.

La composante cellulaire est également une cible pour le parasite. Les protéases du parasite peuvent dégrader les IgG fixés sur les vers, donnant naissance à des peptides qui possèdent des fonctions immunomodulatrices *in vitro* sur les macrophages (Auriault et coll. 1981). Le SDIF, produit par le parasite, possède des propriétés immunomodulatrices sur les lymphocytes T (Mazingue et coll. 1983). L'expression par le parasite de dérivés du précurseur POMC (ProOpiMelanoCortine), actifs sur les monocytes inhibe la réponse immunitaire du mollusque et de l'hôte vertébré (Duvaux-Miret et coll. 1992).

Enfin, chez la souris (hôte permissif pour le développement complet du cycle parasitaire), l'émission d'œufs par le parasite modifie le profil des cytokines produites après activation par les cellules spléniques ou les cellules de granulomes (Grzych et coll. 1991). La production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  laisse place à la synthèse d'IL-4 et d'IL-5, directement associée à la présence d'œufs puisque ces cytokines sont peu exprimées lors d'une infection unisexuée (FIG. 14). Or la production d'IFN- $\gamma$  induite par certains protocoles de vaccination (James et coll. 1988; Smythies et coll. 1992; Pancré et coll. 1994) étant protectrice chez la souris, les œufs inhibent les mécanismes protecteurs de la réponse immunitaire. Chez l'homme et chez le rat cependant, la protection est médiée par des anticorps associés à une réponse cellulaire de type 2<sup>1</sup> et les œufs en tant que facteurs immunomodulateurs de la résistance sont donc *a priori* une caractéristique du modèle souris.

---

<sup>1</sup> Les commutations isotypiques IgE et IgG4 sont induites par l'IL-4 et la commutation IgA par l'IL-5.



Cytokines produites par des cellules spléniques stimulées par du SEA ou du SWAP. Les cellules proviennent d'animaux infectés par des cercaires de *S. mansoni* mâles et femelles (mixed), uniquement femelles ou uniquement mâles. (A) IL-5. (B) IFN- $\gamma$ . (C) IL-4 et (D) IL-2.

(Grzych et coll. 1991)

FIG. 14.

Ils n'en représentent pas moins la cause essentielle de la pathologie dans les populations humaines. Le modèle souris permet à ce titre d'étudier les perturbations engendrées par l'accumulation d'œufs dans le foie et les intestins.

## 10- La réponse granulomateuse et sa régulation

### \* Généralités et modèles expérimentaux

La **réaction granulomateuse hépatique** se traduit par une production élevée de protéines de la matrice extracellulaire (en particulier de collagène), principale responsable des complications cliniques associées à l'infection par *S. mansoni*.

Le **foie** est composé d'hépatocytes (70% des cellules du foie) et de cellules non-parenchymateuses (cellules de Ito ou "fat-storing cells", cellules endothéliales, cellules de Kupffer et cellules LAL [liver-associated lymphocytes] ou "pit-cells") qui assurent les fonctions physiologiques de cet organe (Bouwens et coll. 1992). Les cellules non-parenchymateuses sont également capables de produire des cytokines inflammatoires et de développer des mécanismes de phagocytose et de cytolyse. Le foie forme un système de surveillance immunitaire ayant la possibilité de réagir rapidement à la présence de cellules anormales (tumeurs), d'organismes pathogènes (bactéries, virus) ou étrangers (œufs). La synthèse de collagène et d'autres composés de la matrice externe est assurée *in situ* par les cellules de Ito activées (myofibroblastes).

Dès qu'il pénètre dans le foie, l'œuf est la cible d'une réaction inflammatoire comprenant initialement des cellules mononuclées (granulome primaire) puis, à la maturité du granulome (granulome secondaire vigoureux), une majorité d'éosinophiles et en proportion plus faible des lymphocytes T et B, des macrophages, des mastocytes, des neutrophiles et des fibroblastes (Weinstock et coll. 1983). Ces cellules ne détruisent pas directement l'œuf mais

empêchent la diffusion de substances hépatotoxiques produites par le miracidium. La réponse initiale qui s'accompagne d'une production massive des constituants de la matrice externe constitue la **phase aiguë** (7 à 10 semaines post-infection chez la souris). Puis la réponse inflammatoire tend à diminuer spontanément conduisant à la formation, autour des œufs, de granulomes de taille plus réduite (granulome secondaire modulé) où les cellules sont peu à peu remplacées par du collagène. Ce phénomène, appelé **immunomodulation**, intervient dans la phase chronique de l'infection (à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine d'infection chez la souris) (FIG. 15. Structure du foie et circulation sanguine; FIG. 16. Granulomes).

Ces différentes étapes (initiation, développement et modulation) sont les manifestations visibles de mécanismes de régulation précis et complexes que de nombreuses équipes tentent de comprendre.

Une approche fréquente consiste à utiliser des systèmes approchés plus simples. Ainsi, les granulomes obtenus artificiellement par l'injection dans les poumons (par voie intraveineuse) ou dans le foie (par la veine porte) d'œufs ou de billes couvertes d'antigènes parasitaires fournissent un modèle qui remplace fréquemment l'étude des granulomes hépatiques "naturels" non-synchronisés et longs à se mettre en place. Les variantes rencontrées dans la littérature sont nombreuses.

Les souris auxquelles les œufs ou les billes sont injectés sont saines, infectées ou préalablement sensibilisées. La sensibilisation est souvent utilisée puisque les animaux sains (donc naïfs pour les antigènes parasitaires) développent une réaction faible tandis que la présence des granulomes hépatiques chez les animaux infectés peut perturber la formation des granulomes pulmonaires. La sensibilisation est obtenue par injection d'œufs (en i.p.) ou de cellules (en i.v.) prélevés à des animaux infectés, en phase aiguë ou chronique. Selon le stade de l'infection des souris donneuses, les granulomes pulmonaires qui se forment varient en taille et en réactivité.

Les résultats, nombreux, obtenus à partir de ces différents modèles sont également parfois contradictoires et l'ensemble s'avère difficile à harmoniser.

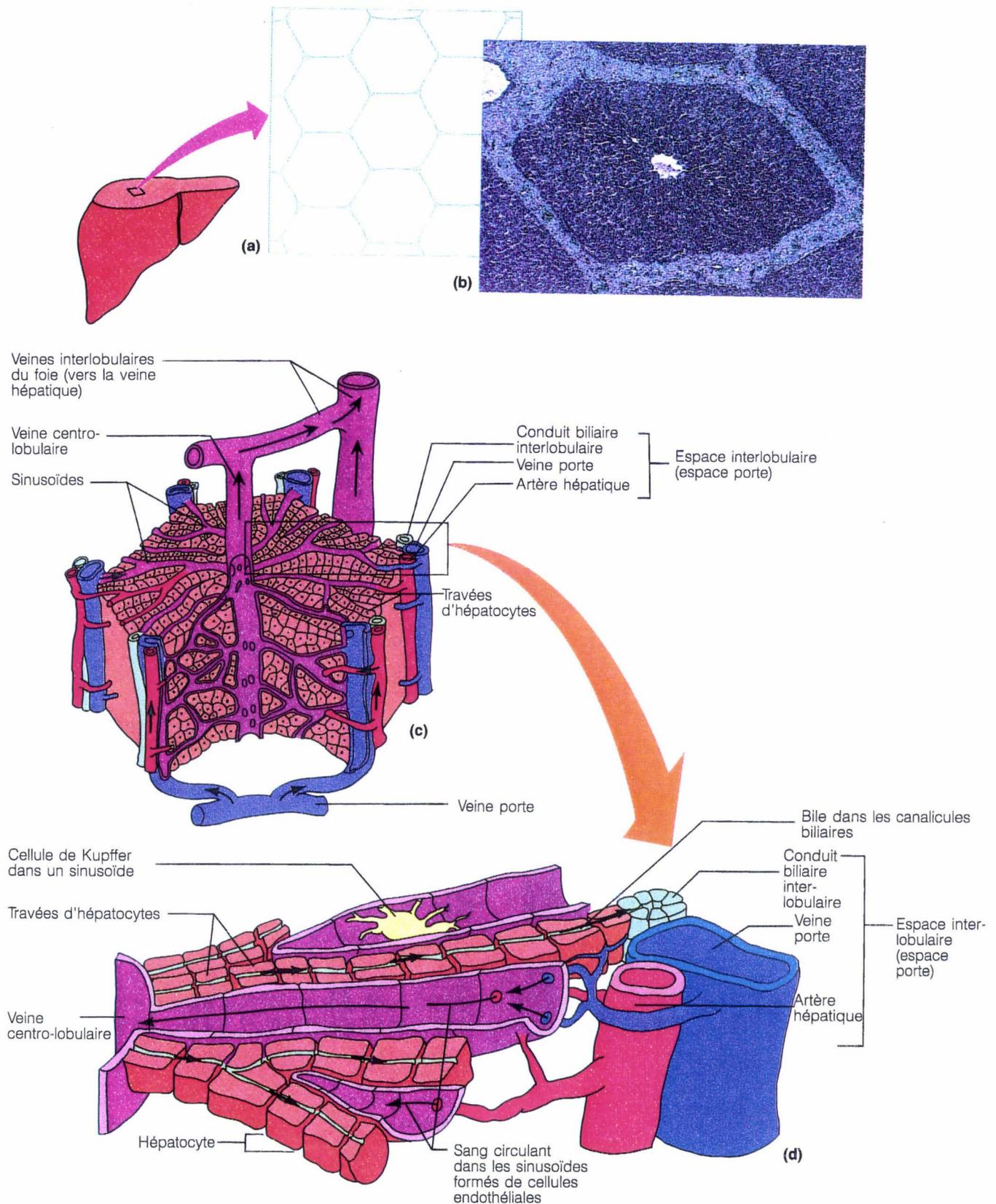
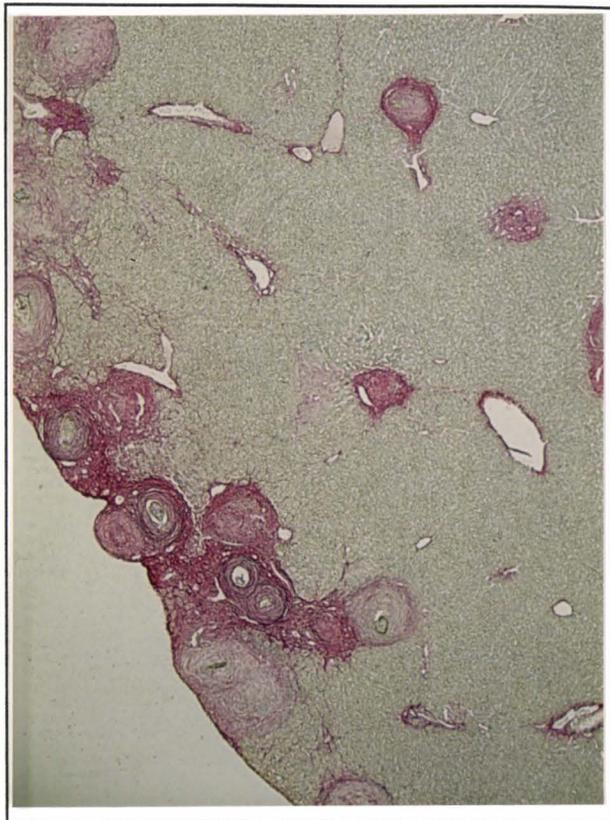


FIG. 15. Anatomie du foie. (a) Structure hexagonale des lobules hépatiques. (b) Photographie (x 50). (c) Schéma d'un lobule hépatique. A chacun des pôles de l'hexagone se trouve l'espace interlobulaire composé du conduit biliaire, de l'artère hépatique et de la veine porte. Le sang circule de l'artère hépatique et de la veine porte vers la veine centrolobulaire (au centre des lobules), à travers les sinusoides. (d) Schéma agrandi.

D'après Marieb, E. N. 1992. Anatomie et physiologie humaines.

A



B

C

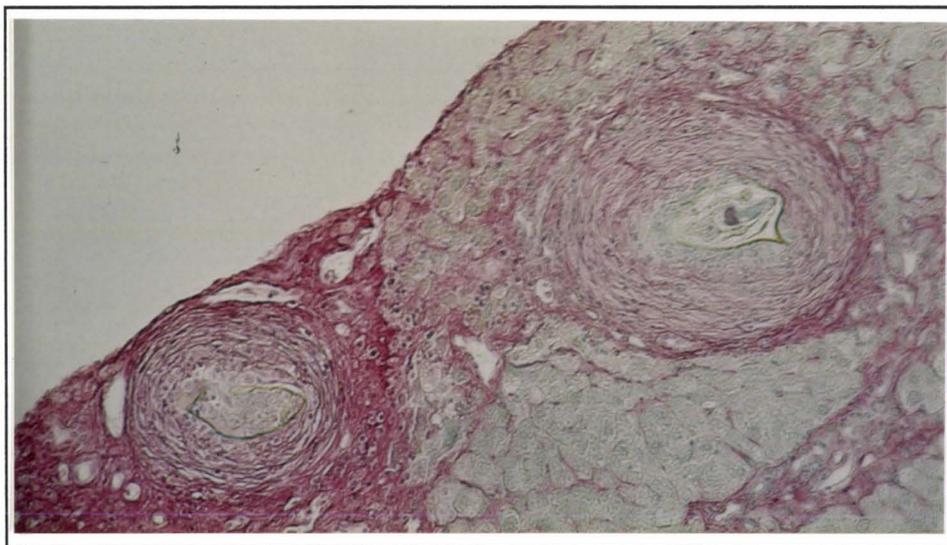


FIG. 16. **Granulomes hépatiques associés à l'infection murine par *S. mansoni*.**

(A) Granulome (x 200) observé 60 jours après infection (Coloration picro indigo carmin). La réaction, très vigoureuse à ce stade de l'infection, est essentiellement cellulaire; peu de collagène, coloré en bleu, est déposé en périphérie du granulome.

(B) Granulomes (x 25) à 120 jours d'infection (Coloration de Rojkind). Les dépôts de collagène apparaissent en rose et les noyaux des cellules sont colorés en vert. On distingue des granulomes à différents stades d'évolution (de cellulaire à fibreux).

(C) Même image au grossissement supérieur (x 200). A gauche, un granulome mixte (fibreux et cellulaire) dont la taille est réduite (immunomodulation) comparée à la réaction figurée en (A). L'éperon latéral est bien visible. A droite, les fibres de collagène entourant l'œuf ont remplacé les cellules.

Par ailleurs, l'étude des mécanismes de régulation de la réaction granulomateuse s'est principalement concentrée, comme nous allons le voir, sur l'expression de différentes cytokines. Là encore, sachant que l'expression d'une cytokine peut être détectée par ELISA ou test d'activité biologique (en ce qui concerne la protéine), Northern-blot ou RT-PCR (pour l'ARNm), les résultats obtenus peuvent différer selon les protocoles et les techniques expérimentales utilisés par chaque équipe.

### \* Initiation et phase aiguë de la réaction

La **composante cellulaire** de la réaction chez la souris est bien déterminée.

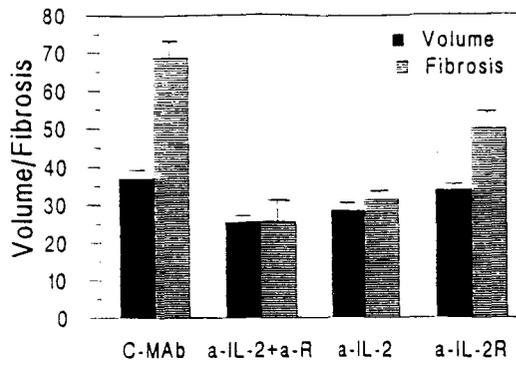
Le granulome, dans le modèle murin, est initialement une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH) nécessitant la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Mathew et coll. 1986); les lignées de souris athymiques déficientes en lymphocytes T (nude) et les souris dépourvues de lymphocytes T et B (SCID, RAG-1) n'élaborent pas (ou très faiblement) de réaction granulomateuse. Il a été également montré que les lymphocytes T présentant le récepteur  $\gamma\delta$  ne sont pas nécessaires à l'élaboration de la réaction granulomateuse et sont incapables de la générer en absence de lymphocytes T  $\alpha\beta$  (Iacomini et coll. 1995). Enfin, des souris déplétées en lymphocytes B présentent, par rapport aux souris-contrôle, une réponse granulomateuse initiale identique qui tend cependant à être plus intense au cours de l'infection (Cheever et coll. 1985).

La **participation des cytokines** à la régulation de la réponse granulomateuse constitue un autre pôle d'intérêt. Les cytokines les plus étudiées sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$ . Chez la souris SCID, l'injection de TNF- $\alpha$  est suffisante pour induire la formation de granulomes normaux (Amiri et coll. 1992). Chez la souris immunocompétente, l'injection d'anticorps neutralisant l'activité du TNF- $\alpha$  en phase aiguë de la réponse diminue la surface des granulomes hépatiques tandis que la réaction normalement immunomodulée en phase

chronique se trouve exacerbée lorsque les souris reçoivent des injections de TNF- $\alpha$  recombinant (Joseph et coll. 1993).

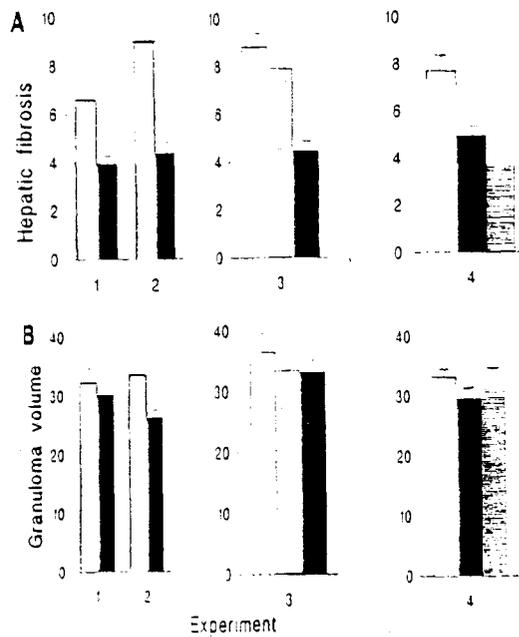
Il faut noter que **la taille (exprimée en surface ou en volume) du granulome est un indicateur du recrutement cellulaire autour de l'œuf (donc de l'intensité de la réponse inflammatoire) mais ne fournit pas de renseignement concernant la fibrose.**

Les travaux s'intéressant aux rôles de l'IL-4 et de l'IL-2 illustrent cette dissociation entre la taille et la fibrose et montrent également que **les résultats obtenus dans le modèle pulmonaire ne sont pas exactement applicables au modèle hépatique.** En effet, l'injection d'anticorps anti-IL-4 ou anti-IL-2 diminue la taille des granulomes pulmonaires induits autour d'œufs (Chensue et coll. 1992; Cheever et coll. 1994) ou autour de billes recouvertes d'antigènes d'œufs (Lukacs et coll. 1993). Cet effet est beaucoup moins prononcé sur les granulomes hépatiques générés par les œufs pondus, bien que la fibrose soit diminuée par ces traitements (Cheever et coll. 1992; 1994) (FIG. 17 et 18). Selon cette équipe, la différence concernant l'effet des traitements sur la taille des granulomes est liée à la qualité des œufs injectés, indépendamment de l'organe dans lequel la réaction se développe (Eltoum et coll. 1995). Les œufs, prélevés à des souris infectées 7 semaines auparavant et donc probablement altérés par la réaction de l'hôte puis lavés et réinjectés seraient moins sensibilisants que les œufs déposés au cours de l'infection normale. Les granulomes induits, plus petits seraient plus facilement régulés que les granulomes normaux hépatiques. Pour preuve, le traitement anti-IL-4 a peu d'effet sur la taille des granulomes hépatiques et pulmonaires induits par des œufs déposés naturellement (il convient de noter que la présence synchrone d'œufs pondus dans les poumons et dans le foie nécessite une opération chirurgicale permettant de détourner une partie des œufs vers les poumons). Le nombre et les temps d'injections d'anticorps neutralisant l'activité d'une cytokine donnée sont également des paramètres importants et variables qui peuvent conduire à des modifications différentes de la réponse granulomateuse (pour illustration, voir l'article de Cheever et coll. 1994).



Effets de traitements anti-IL-2 (a-IL-2) et/ou anti-IL-2 récepteur (a-IL-2R), comparés au traitement-contrôle (C-MAb), sur la taille des granulomes et la fibrose hépatique d'animaux à 8 semaines d'infection.

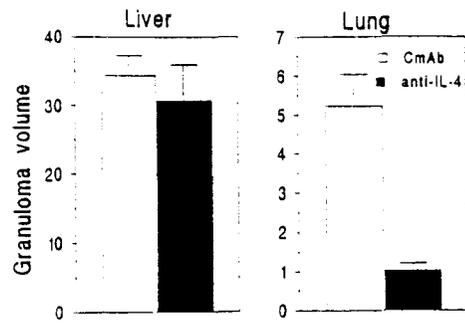
(Cheever et coll. 1992)



Effets d'un traitement anti-IL-4 réalisé durant 1.5 semaine , 3 semaines  et 7 semaines , comparés au traitement-contrôle , sur la fibrose hépatique (A) et la taille des granulomes (B). Les résultats de 4 expériences sont montrés.

(Cheever et coll. 1994)

FIG. 17.



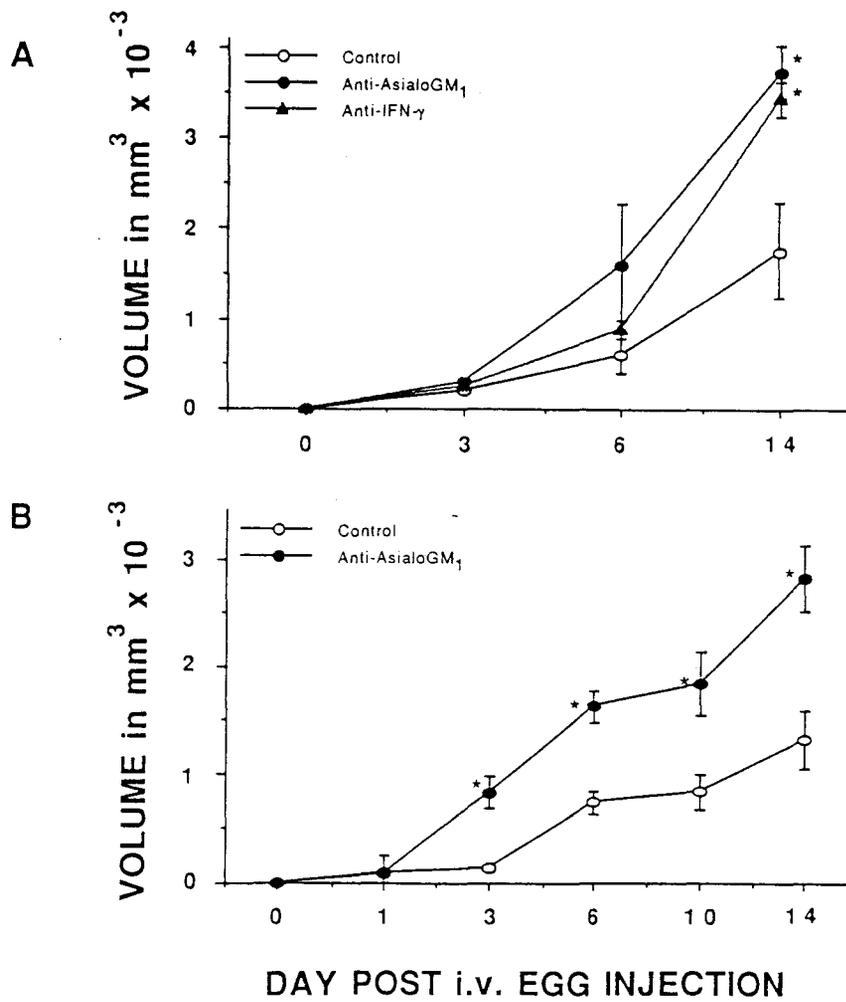
Effet d'un traitement anti-IL-4 et d'un traitement-contrôle sur la taille de granulomes hépatiques "naturels" et de granulomes pulmonaires induits par injection d'œufs.  
(Cheever et coll. 1994)

FIG. 18.

De façon assez inattendue, la neutralisation de l'IL-2, dans les modèles foie et poumon (Cheever et coll. 1992; Metwali et coll. 1993), entraîne une diminution du pourcentage d'éosinophiles en périphérie et dans les granulomes. Cet effet est également observé par la neutralisation de l'IL-5, une cytokine qui active la prolifération et la différenciation des éosinophiles. Cette similitude concernant l'éosinophilie est liée à la régulation de la production d'IL-5 par l'IL-2, l'absence de cette dernière inhibant la production d'IL-5 (et la maturation des éosinophiles), alors que la production d'IL-4 ou d'IFN- $\gamma$  reste inchangée. Par contre, à la différence des traitements anti-IL-2, la neutralisation de l'IL-5 ne modifie pas la fibrose hépatique.

Les différentes approches mentionnées (modèle [poumon vs foie], antigène [billes, œufs injectés, œufs pondus], phénomène observé [fibrose vs taille des granulomes], fréquence des traitements) ont fourni des résultats contradictoires concernant la fonction de l'IFN- $\gamma$  dans la régulation de la réponse granulomateuse. Cependant, si on se réfère à des travaux récents, la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12 conduit à une augmentation de la taille des granulomes pulmonaires (Wynn et coll. 1994). Par contre, l'injection d'IL-12 réduit la taille de ces granulomes et les auteurs montrent que cet effet est directement médié par l'IFN- $\gamma$ . Ces résultats corroborent une étude antérieure qui montre une diminution de la production de protéines matricielles suite à l'injection d'IFN- $\gamma$  au cours de l'infection (Czaja et coll. 1989). Par ailleurs, un protocole d'injection de la protéine parasitaire Sm28 GST inducteur d'IFN- $\gamma$  (Pancre et coll. 1994) entraîne une diminution de la fibrose hépatique associée à une survie prolongée des animaux (FIG. 19).

Il n'est cependant pas exclu que l'IFN- $\gamma$  puisse participer à l'initiation de la réaction granulomateuse comme le suggère une étude des ARNm exprimés au cours de la formation du granulome hépatique (Henderson et coll. 1992) et pulmonaire (Wynn et coll. 1994). En modulant l'expression de molécules d'adhésion sur diverses cellules, l'IFN- $\gamma$  peut, selon l'environnement, favoriser le recrutement de cellules inflammatoires dans un premier temps,



Effet des traitements anti-IFN- $\gamma$  et anti-asialoGM1 sur la taille des granulomes pulmonaires induits chez des souris de lignée C3H/HeN (A) et C57BL/6 (B). (Wynn et coll. 1994)

TABLE 6. Ab to IFN- $\gamma$  abrogates immunity to *S. mansoni* conferred by immunization with rSm28GST<sup>a</sup>

Immunization status	No. of hepatic granulomas	Amt of collagen ( $\mu$ g)/mg of protein
Infected	268 $\pm$ 40	17.7 $\pm$ 1.4
IFN- $\gamma$ treated and infected	160 $\pm$ 05	11.8 $\pm$ 0.9
Anti-IFN- $\gamma$ treated and infected	305 $\pm$ 10	25.5 $\pm$ 1.4
Sm28GST immunized and infected	166 $\pm$ 17	9.4 $\pm$ 0.9
Sm28GST immunized + anti-IFN- $\gamma$ and infected	242 $\pm$ 23	15.4 $\pm$ 1.0

Effet d'un traitement anti-IFN- $\gamma$  sur le nombre de granulomes hépatiques et les taux de collagène présentés par des souris infectées ou immunisées par la protéine Sm28 GST et infectées. (Pancre et coll. 1994)

puis au fur et à mesure que la réaction se développe, permettre l'installation de cellules immunomodulatrices.

### \* Immunomodulation

Le modèle souris a également permis d'étudier les réactions d'**immunomodulation** qui se mettent en place vers la 16<sup>ème</sup> semaine d'infection. Une diminution générale de l'expression de toutes les cytokines en terme d'ARNm a été observée (Henderson et coll. 1992). Les théories explicatives sont, là encore, diverses. Elles ne sont certainement pas exclusives, puisque le système immunitaire peut s'être ménagé différentes voies de régulation. L'observation par Colley et coll. (1979) que l'immunomodulation pouvait être obtenue par transfert des cellules spléniques d'animaux en phase chronique d'infection indique que la modulation est vraisemblablement médiée par voie cellulaire.

Certains y voient l'expression de lymphocytes T suppresseurs (Fidel et coll. 1990), de phénotype CD8<sup>+</sup> (Chensue et coll. 1993). Ces cellules présentes précocement, dès la phase aiguë, élimineraient progressivement les cellules T mémoires et diminueraient la production d'IL-4, régulant les processus inflammatoires.

D'autres estiment que l'immunomodulation n'est pas le fait d'une participation active et directe des cellules T mais le résultat de l'anergie de ces cellules. Cette anergie serait provoquée par les macrophages du granulome qui, en produisant de l'IL-10 au contact des antigènes d'œufs, réguleraient leur propre capacité à présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T (Flores Villanueva et coll. 1993; 1994a). En effet, ces macrophages n'expriment pas de molécules de classe II (qui présentent l'antigène aux cellules T CD4<sup>+</sup>) ni les protéines B7-1 et B7-2 (qui interviennent comme seconds signaux lors de l'interaction lymphocyte / cellule présentatrice d'antigène) (Flores Villanueva et coll. 1994b). Cette anergie s'exerce sur une lignée T de type 1 spécifique d'antigènes d'œufs (SEA) mais pas sur une lignée SEA-spécifique de type 2. Cette étude souligne comme la précédente que les

mécanismes d'immunomodulation se mettent en place très tôt, dès la phase aiguë de l'infection, et atteignent progressivement leur seuil d'efficacité.

✱ Pour clore ce chapitre concernant la régulation de la réaction granulomateuse dans le modèle murin, d'autres axes d'investigation plus spécifiques seront rapidement mentionnés.

Le premier concerne l'activation des **fibroblastes** par les œufs *in vitro*, soit par action directe, soit en stimulant la production de facteurs fibrogéniques par les lymphocytes du granulome (Prakash et coll. 1992).

Le second point étudié par l'équipe de Weinstock s'intéresse aux **neuropeptides** (substance P, vasoactive intestinal peptide, somatostatine) produits dans le granulome et à l'expression de leurs récepteurs respectifs (Cook et coll. 1994). La substance P sécrétée par les éosinophiles est capable d'induire la synthèse d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T du granulome (Blum et coll. 1993). Le VIP également synthétisé par les éosinophiles stimule la production d'IL-5. Enfin, la somatostatine exprimée par les macrophages du granulome diminue la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes.

Paradoxalement, bien que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire soient essentielles pour la cohésion du granulome, très peu d'études ont été réalisées dans le domaine des **molécules d'adhésion**. La seule donnée actuelle, à ma connaissance, est l'expression à 6 semaines d'infection de la molécule ICAM-1 sur les cellules endothéliales hépatiques permettant vraisemblablement aux cellules lymphoïdes de se fixer et de traverser l'endothélium des vaisseaux sanguins (Ritter et coll. 1993).

✱ Les **granulomes intestinaux** sont peu étudiés. Ils ne sont pas associés à des réactions fibrotiques intenses et leur incidence en terme de pathologie est réduite (De Oliveira et coll. 1992). Au niveau du côlon et des plaques de Peyer, les granulomes sont moins développés en phase aiguë et immunomodulés plus précocement que les granulomes hépatiques. Les granulomes de l'iléum, de taille également inférieure semblent être régulés

par des mécanismes particuliers, différents du côlon et du foie. La composition cellulaire est également différente, les macrophages étant en nombre supérieur et les éosinophiles en quantité moindre dans l'iléum et le côlon (Weinstock et coll. 1981).

\* Les connaissances que nous avons de la **réaction granulomateuse au cours de l'infection humaine** sont plus parcellaires. Les patients atteints de bilharziose intestinale (pour laquelle les atteintes hépatiques sont faibles) présentent dans l'ensemble une prolifération modérée des cellules sanguines périphériques en présence de SEA et d'antigènes de vers adultes (Colley et coll. 1986). Cette faible réactivité des cellules pourrait expliquer qu'au niveau du foie les œufs ne suscitent pas une réaction inflammatoire excessive. Par ailleurs, la synthèse de prostaglandines par des macrophages mis en présence de complexes immuns inhibe la formation de granulomes *in vitro* (Goes et col. 1994). Ces mécanismes pourraient également intervenir *in vivo* puisque ces complexes sont détectés dans les serums d'individus infectés (Butterworth et coll. 1977).

L'ensemble des connaissances que nous avons concernant la pathologie, le développement du parasite, les mécanismes effecteurs et d'échappement permettent d'envisager la mise au point de stratégies vaccinales qui idéalement pourraient améliorer l'efficacité des réactions de défense et diminuer la pathologie.

## 11- Approches vaccinales

□ L'injection de parasites atténués permet d'induire des taux de résistance élevés associés à la production d'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  active la cytotoxicité des macrophages à l'égard des schistosomules (James et coll. 1988) et initie des réactions inflammatoires au niveau du poumon qui bloquent leur migration (Smythies et coll. 1992). En dépit de l'efficacité de ces protocoles, l'injection de pathogènes, même atténués, chez l'homme est irréalisable.

□ La seule protéine clonée à partir d'anticorps spécifiques présents dans les serums des individus les plus résistants à la réinfection (Dessein et coll. 1988) est la glycéraldéhyde déshydrogénase (GAPDH). Les autres protéines parasitaires ont généralement été caractérisées dans des modèles animaux à partir de la réponse anticorps obtenue après injection de cercaires, de schistosomules ou d'extraits membranaires dérivés des stades larvaires (Pierce et coll. 1994). Le potentiel protecteur de ces protéines vis-à-vis de l'infection n'est cependant pas toujours connu. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec les protéines présentées dans le tableau ci-dessous. Ils ont été résumés récemment par Bergquist (1995).

	Fonction	Référence
<b>Sm28 GST</b>	glutathion-S-transférase	Balloul et coll. (1987)
<b>GAPDH</b>	glyceraldéhyde deshydrogénase	Goudot-Crozel et coll. (1989)
<b>Irv5</b>	chaîne lourde de la $\beta$ -myosine	Amory-Soisson et coll. (1992)
<b>Sm97</b>	paramyosine	Pearce et coll. (1988)
<b>Sm25/gp22</b>	protéine de membrane	El Sherbeini et coll. (1990)
<b>Sm14</b>	fatty-acid binding protein	Moser et coll. (1991)
<b>TPI</b>	triose phosphate isomérase	Shoemaker et coll. (1992)

□ Les études d'immunisation et de protection les plus poussées ont été réalisées avec la glutathion-transférase **Sm28 GST** (Capron et coll. 1995). L'injection de cette protéine par différents protocoles donne des niveaux de protection intéressants dans les **modèles rat, souris et babouins** (Wolowczuk et coll. 1989; Boulanger et coll. 1991; Grezel et coll. 1993). La diminution de la charge parasitaire fait intervenir en particulier des anticorps IgE spécifiques à potentiel cytotoxique. Par ailleurs, le modèle babouin a permis de mettre en évidence que la protection peut être liée à une diminution de la quantité d'œufs pondus par les vers femelles indépendamment d'une réduction de la charge parasitaire, très variable dans ce modèle animal. Chez la souris, la diminution du nombre d'œufs après immunisation est

liée à l'expression d'anticorps spécifiques inhibant l'activité enzymatique de la glutathion-transférase (Xu et coll. 1991). La présence de cette protéine dans l'appareil génital de la femelle suggère que l'activité GST pourrait agir sur la fécondité de la femelle ou la formation d'œufs viables (Porchet et coll. 1994). Une diminution du nombre de vers et d'œufs associée à une réduction de la fibrose hépatique ont été obtenues, après injection de la Sm28 GST en hydroxide d'alun, par l'activation d'une réponse T spécifique et la production d'IFN- $\gamma$  (Pancré et coll. 1994).

Dans les **populations humaines infectées**, la réponse IgA dirigée contre la glutathion-transférase augmente avec l'âge des individus. Ces anticorps sont par ailleurs capables d'inhiber l'activité enzymatique de la protéine, réduisant la fécondité des vers femelles et la viabilité des oeufs produits (Grzych et coll. 1993) (FIG. 20).

Des **essais de vaccination** spécifique (parasite - hôte naturel) ont été entrepris sur le **bétail** en utilisant une fraction purifiée de la glutathion-transférase de *S. bovis* (Bushara et coll. 1993). Les résultats montrent que la protection des animaux est liée à une réduction de la fécondité des femelles. Par contre, la protection de chèvres vaccinées par la GST de *S. bovis* est liée à une réduction de la charge parasitaire, indiquant qu'une même protéine peut induire des mécanismes effecteurs différents selon l'espèce infectée.

□ Par ailleurs, la protéine **Sm 14** de *S. mansoni* présente de fortes homologies avec la protéine Fh12 de *Fasciola hepatica*, un parasite trématode à l'origine d'atteintes hépatiques. L'immunisation de la souris avec la protéine Fh12 protège contre l'infection par *S. mansoni* (Tandler et coll. 1995). De telles réactions croisées permettent d'envisager une vaccination hétérologue protectrice vis-à-vis de plusieurs parasites co-endémiques.

□ Les études concernant la **vaccination contre *Schistosoma japonicum***, proche de *S. mansoni* d'un point de vue localisation chez l'hôte et pathologie, ont bénéficié

Table II  
*Inhibition of Sm28 GST enzymatic activity by sera from S. mansoni-infected patients: role of IgA antibodies*

Serum No. <sup>a</sup>	% Inhibition of Enzymatic Activity <sup>b</sup>		
	Total serum	Purified IgA <sup>c</sup>	IgA depleted <sup>c</sup>
305 B	28 ± 3	29 ± 4	<10
309 B	52.5 ± 2.5	27 ± 2.5	<10
311 B	56 ± 2	25 ± 5	<10
316 B	<10	<10	<10
326 B	63 ± 3	56 ± 4	<10
347 B	60 ± 10	47.5 ± 2.5	<10
349 B	40 ± 10	25 ± 5	<10
359 B	<10	<10	<10

Inhibition de l'activité enzymatique de la glutathion-transférase par les sérums d'individus infectés par *S. mansoni* et les fractions enrichies en anticorps IgA.

Table III  
*Impairment of schistosome egg laying by sera of S. mansoni-infected patients: involvement of IgA*

Antibody Sources <sup>a</sup>	No. of Eggs <sup>b</sup>	% Inhibition
IgA <sup>+</sup> sera	346.7 ± 96.1	43.5 <i>p</i> < 0.01
IgA <sup>-</sup> sera	613.3 ± 95.0	
IgA <sup>+</sup> sera after IgA depletion	543.3 ± 152.2	16.0 NS
IgA <sup>-</sup> sera after IgA depletion	650.0 ± 199.0	

La quantité d'œufs produits par des couples de vers maintenus *in vitro* est affectée par la fraction IgA présente dans les sérums d'individus infectés par *S. mansoni*.

(Grzych et coll. 1993)

FIG. 20.

des travaux réalisés sur *S. mansoni* (Brindley et coll. 1995). Répandu essentiellement en Chine et en Indonésie, *S. japonicum* (contrairement à *mansoni*) est une zoonose, les animaux domestiques contribuant à répandre la maladie. Le traitement par le praziquantel est efficace mais l'acquisition de la résistance à la réinfection est plus transitoire. L'injection de cercaires irradiées entraîne une protection intéressante dans les modèles souris, rat et lapin. De nombreuses protéines de *S. japonicum* ont été clonées parmi lesquelles la paramyosine (utilisée avec succès dans des protocoles de vaccination de bétail et de moutons) et la glutathion S-transferase de 26 kDa (dont l'injection est également associée à une diminution du nombre d'œufs pondus par les vers).

*S. haematobium* est l'espèce pour laquelle les travaux semblent les moins avancés.

L'une des difficultés majeures auxquelles se heurte toute approche vaccinale est liée à la variabilité génétique qui distingue chaque individu. Cette variabilité a pour conséquence qu'un même antigène, administré de façon identique à plusieurs individus peut être "vu" différemment par le système immunitaire et induire une protection variable.

Dans le cas des schistosomiasis il faut ajouter l'adaptation particulière du parasite à son hôte. On sait que certains antigènes engendrent des anticorps effecteurs et neutralisants; l'étude de la régulation des granulomes suggère également que des antigènes (dans ce cas, émis par l'œuf) pourraient induire une immunomodulation de la réponse immunitaire. Deux exemples de réactions parmi d'autres qu'il convient d'éviter dans le cadre d'une vaccination.

TRAVAUX PERSONNELS

Les mécanismes effecteurs dirigés contre les larves de schistosome mis en évidence chez les individus infectés par *S. mansoni* et chez le rat au cours d'infections expérimentales, impliquent des éosinophiles, des macrophages et des plaquettes sanguines (voir Chapitre Schistosomiase, Mécanismes effecteurs).

Diverses études se sont intéressées à la régulation des fonctions plaquettaires dans le contexte de l'infection. Les IgE (Joseph et coll. 1983), l'IFN- $\gamma$  (Pancré et coll. 1987), le TNF- $\alpha$  (Damonville et coll. 1988) et l'IL-6 (Pancré et coll. 1990) sont des promoteurs de la cytotoxicité des plaquettes vis-à-vis des schistosomules tandis que la PASL (Platelet Activity Suppressive Lymphokine) est un facteur inhibiteur (Pancré et coll. 1986). Cette cytokine est produite par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés par des antigènes ou par mitogène. Chez le rat, l'expression de la PASL est maximale 60 jours après infection (Pancré et coll. 1989) à une période où la cytotoxicité des plaquettes est diminuée. Par ailleurs, dans l'hypersensibilité au venin d'Hyménoptères (HVH), les plaquettes des personnes ayant été piquées présentent une activation spécifique de l'allergène qu'une désensibilisation dite rapide (rush desensitization) permet de réduire (Tsicopoulos et coll. 1988). Le principe de la désensibilisation rapide est d'injecter des doses croissantes d'allergène à intervalles réguliers, pendant 3 jours, suivies de quelques injections de rappel à la dose maximale (100 ou 200  $\mu$ g) jusqu'à disparition de la sensibilité. L'identification d'un facteur correspondant à la PASL chez les patients désensibilisés (Tsicopoulos et coll. 1989) suggère une participation de cette lymphokine dans plusieurs modèles impliquant une réactivité plaquettaire .

La PASL a été clonée à partir d'une lignée cellulaire Jurkat exprimant une activité PASL identique à celle présente dans les surnageants lymphocytaires T. L'ARN correspondant a été isolé et le séquençage a révélé que le facteur obtenu était homologue à l'ubiquitine humaine (Pancré et coll. 1991). L'ubiquitine purifiée est en effet capable d'inhiber l'activation des plaquettes, ce qui est inattendu pour une protéine décrite dans la littérature comme intracellulaire et essentiellement associée aux mécanismes de dégradation des protéines endogènes (Finley et col. 1991). Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques proches de l'ubiquitine et de la PASL renforçaient l'hypothèse de l'identité de ces deux facteurs. On ne

pouvait cependant pas écarter l'hypothèse que l'ubiquitine ait été isolée parce qu'elle présentait une activité de type PASL mais que le facteur exprimé dans la schistosomiase et au cours de la désensibilisation soit de nature différente.

Pour éclaircir ce point, nous avons voulu vérifier la présence d'ubiquitine dans les pathologies où l'activité PASL est exprimée et son absence là où cette activité n'est pas définie. Nous avons donc mis au point un dosage radioimmunologique permettant de quantifier les taux d'ubiquitine dans des serums d'individus infectés par *S. mansoni* et chez les patients HVH désensibilisés. Avant d'appliquer ce test, nous avons contrôlé qu'il était spécifique et que les mesures n'étaient pas perturbées par la présence de substances propres aux milieux dosés. Le dosage de divers liquides biologiques a montré que :

1) les quantités d'ubiquitine détectées dans les serums d'individus sains n'excèdent pas 50 ng/ml et sont stables ;

2) les concentrations obtenues chez les individus infectés chroniquement par *S. mansoni* et chez les personnes HVH désensibilisées atteignent 250 à 300 ng/ml ;

3) au cours de la désensibilisation, la présence d'ubiquitine n'est pas détectée immédiatement mais quelques jours après le début de l'immunothérapie et est transitoire, ce qui pourrait effectivement correspondre à une fonction régulatrice ;

4) dans un contexte pathologique différent (lupus érythémateux ou polyarthrite rhumatoïde) où aucune activité PASL n'est reportée, les concentrations d'ubiquitine se situent entre 50 et 100 ng/ml, valeurs proches de celles présentes dans des serums d'individus sains.

**En conclusion, les résultats obtenus au moyen du dosage mis au point apportent un argument supplémentaire concernant l'identité de l'ubiquitine et de la PASL.**



ELSEVIER

Journal of Immunological Methods 173 (1994) 93–101

**JOURNAL OF  
IMMUNOLOGICAL  
METHODS**

## A radioimmunoassay for the quantification of human ubiquitin in biological fluids: application to parasitic and allergic diseases

Chrystel Asseman \*, Véronique Pancré, Anne Delanoye, André Capron,  
Claude Auriault

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France*

Received 25 October 1993; revised received 24 January 1994; accepted 30 March 1994

### Abstract

Purified ubiquitin has been shown to share similar biological and physicochemical properties with a previously characterized lymphokine, platelet activity suppressive lymphokine (PASL). This lymphokine, which inhibits the cytotoxic function of activated platelets, is produced during schistosomiasis and *Hymenoptera* venom hypersensitivity (HVH). We have developed a radioimmunoassay specific for ubiquitin, in order to determine the ubiquitin levels in human sera and plasma from patients with these pathologies. The working range of the assay was between 60 and 500 ng/ml, and the sensitivity was 8–10 ng/ml. The reproducibility, specificity and accuracy were determined under standard condition (PBS-0.3% BSA) and using different biological fluids (human serum, plasma and T lymphocyte supernatant). Using this assay, we found that the ubiquitin concentrations were higher in both schistosomiasis and HVH (up to 150–300 ng/ml) compared with sera and plasma from healthy donors where the ubiquitin levels did not exceed 50 ng/ml.

**Key words:** Ubiquitin; Radioimmunoassay; Schistosomiasis; *Hymenoptera* venom hypersensitivity; Desensitization

### 1. Introduction

Ubiquitin is a highly conserved 76-amino acid protein originally isolated by Goldstein et al.

(1975) and abundantly expressed in all eukaryotic cells. Ubiquitin has been shown to play a key role in a variety of cellular processes (for review, see Finley et al., 1991) including the selective degradation of cellular proteins (Hershko et al., 1983), control of cell cycle (Glutzer et al., 1991), DNA repair (Sung et al., 1990) and stress-response (Finley et al., 1987). An unexpected effect of ubiquitin was described when we demonstrated that purified ubiquitin could act as an

*Abbreviations:* HVH, *Hymenoptera* venom hypersensitivity; PASL, platelet activity suppressive lymphokine; RIA, radioimmunoassay.

\* Corresponding author. Tel.: 20877800; Fax: 20877888.

0022-1759/94/\$07.00 © 1994 Elsevier Science B.V. All rights reserved  
SSDI 0022-1759(94)00091-A

immunoregulatory factor for activated platelets (Pancré et al., 1991). Platelets, which normally promote clotting and tissue healing at the site of a wound, can be activated by IgE antibodies (Joseph et al., 1986) or by cytokines (Pancré et al., 1986a; Damonville et al., 1988; Pancré et al., 1990). Once activated, platelets can produce cytotoxic metabolites against parasitic worms such as schistosomes (Joseph et al., 1983) and microfilariae (Haque et al., 1985). A lymphokine, platelet activity suppressive lymphokine (PASL), produced by concanavalin A- or antigen-activated CD8 T cells, was found to inhibit the activation of platelets (Pancré et al., 1986b; Pancré et al., 1989). The molecular cloning of this factor was carried out using the human cell line Jurkat (Pancré et al., 1991). This cell line was shown to produce an inhibitor of platelet cytotoxicity that shared similar physicochemical properties with PASL. The mRNA from Jurkat cells were injected into *Xenopus laevis* oocytes and the culture supernatants were tested for PASL activity. After isolating the mRNA that encoded this activity, we found that its nucleic acid and predicted amino acid sequence was identical to human ubiquitin. We also confirmed that purified ubiquitin was able to inhibit platelet cytotoxicity (Pancré et al., 1991).

Platelet activation also occurs in some allergic disorders such as *Hymenoptera* venom hypersensitivity (HVH) (Tsicopoulos et al., 1988). This reactivity was decreased after immunotherapy and a factor similar to PASL was identified in sera (Tsicopoulos et al., 1989) and T lymphocyte supernatants (Tsicopoulos et al., 1990) from desensitized patients, suggesting that the lymphokine may be implicated in the mechanisms of rush desensitization.

However, since we were unable to purify PASL from activated T lymphocyte supernatants, it was not possible to assert that PASL was actually ubiquitin. In this sense, it was interesting to confirm that ubiquitin was found in biological fluids such as sera, plasma and supernatants that express PASL activity. Accordingly we have developed a specific radioimmunoassay for ubiquitin and describe here the methodology, validation and possible applications of this assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Ubiquitin isolated from bovine red blood cells was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyclonal antiserum (Sigma) was derived from rabbits immunized with bovine red blood cell ubiquitin conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH). The antiserum was reconstituted in 5 ml of PBS (phosphate buffer saline 10 mM, 0.9% NaCl) before use. Human IgG and anti-human IgG antibodies were provided by Sigma and ICN (Costa Mesa, CA, USA) respectively. Sheep anti-(rabbit  $\gamma$ -globulin) coupled to cellulose (DASP) was obtained from Organon Teknika (Oss, Netherlands).

### 2.2. Patients samples

Plasma and sera from HVH patients (11 women, 13 men) were a gift from Ph. Lassalle (Service de Pneumologie et d'Immunoallergologie, Hôpital Calmette, Lille, France). The clinical and biological data of these patients will not be detailed here, but all had a typical history of anaphylactic reactions after *Hymenoptera* stings, with positive cutaneous and radioallergosorbent tests. The method used for immunotherapy was rush desensitization as described by Nataf et al. (1984). Briefly, this procedure consists in injections of increasing doses of allergen each hour for 3 days to achieve a 100  $\mu$ g venom dose. Two booster injections are then given at 15 days and 1 month, and the immunotherapy is continued with a 100  $\mu$ g monthly maintenance dose, until allergic symptoms disappear. During the first three days, the samples were collected within 12 h of the injections. The samples were then collected before the booster injections. Sera from *S. mansoni*-infected patients were provided by I. Kimani (Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya). Sera from patients suffering from lupus erythematosus were given by Dr H. Watier (Service d'Immunologie, Hôpital Bretonneau, Tours). As a control group, sera from 20 healthy individuals prepared by the Centre d'Examen de Santé (Institut Pasteur, Lille, France) were tested. We also prepared plasma from 20 healthy donors;

blood samples treated with calciparine (Sanofi, Paris, France) were immediately centrifuged at  $1500 \times g$ , filtered and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.3. Preparation of T lymphocyte supernatants

Venous blood from healthy donors (CRTS, Lille, France) was diluted with an equal volume of PBS, layered on a Ficoll-Paque gradient (J.Bio, Les Ulis, France) and centrifuged for 30 min at  $800 \times g$ . The peripheral blood mononuclear cells were washed three times with PBS and were enriched in T cells by passage through an IgG-anti-IgG-coated glass beads and nylon wool column. For all cultures, RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) was supplemented with 20 mM of HEPES (Sigma), antibiotics: 100 U/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Specia, Paris, France),  $5 \times 10^{-5}\text{M}$   $\beta_2$ -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco). T cells ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) were stimulated or not with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concanavalin A (ConA) (Sigma) for 24 h in a humidified atmosphere. The supernatants were then recovered, filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Radioiodination

Ubiquitin was radiolabelled by the chloramine T procedure. 10  $\mu\text{g}$  of ubiquitin in 5  $\mu\text{l}$  of PBS were mixed with  $10 \times 10^6$  Bq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (Amersham International, Amersham, UK) and 10  $\mu\text{l}$  of fresh chloramine T (1 mg/ml in PBS). After gently mixing for 1 min, sodium metabisulfite (20  $\mu\text{g}/10$   $\mu\text{l}$ ) was added to stop the reaction. Separation of free iodine and the labelled fraction was carried out by gel filtration through a Sephadex G-25 column (PD10) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated with 25 ml of PBS supplemented with 0.3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma). The specific activity of the protein was about  $13 \times 10^5$  Bq/ $\mu\text{g}$ .

### 2.5. Titration of polyclonal rabbit anti-ubiquitin

$^{125}\text{I}$ -ubiquitin was diluted to 2 ng/100  $\mu\text{l}$  (approximately 60 000–80 000 cpm) in assay buffer

(PBS containing 0.3% BSA). 100  $\mu\text{l}$  aliquots of various dilutions of rabbit antibody were incubated overnight at room temperature, under agitation with 100  $\mu\text{l}$  of labelled ubiquitin and 100  $\mu\text{l}$  of assay buffer to achieve a final volume of 300  $\mu\text{l}$ . Immune complexes were precipitated for 2 h using DASP according to manufacturer's instructions, then washed twice with 1 ml of PBS. The pellets were counted in a gamma counter (Automatic Gamma Counter LKB Wallac).

### 2.6. Assay protocol

All dilutions of  $^{125}\text{I}$ -ubiquitin, antibody, standards and test samples were made in assay buffer and used in a 100  $\mu\text{l}$  volume. Since ubiquitin exhibits the same highly conserved amino-acid sequence among mammals (Ozkaynak et al., 1987), we have assumed that human ubiquitin could be measured using this assay.

Standard ubiquitin in a range of concentrations between 1000 ng/ml and 1 ng/ml was titrated in a competitive format using rabbit antibody at 1/20 and an input of  $^{125}\text{I}$ -ubiquitin of about 2 ng/100  $\mu\text{l}$ .

The competition of labelled and unlabelled ubiquitin for antibody was performed as described above.

### 2.7. Validation of the RIA: specificity, sensitivity, precision, reproducibility and accuracy

The cross-reactivity of the antiserum was tested with proteins of culture medium, BSA, IL-2 (10, 50 and 100 ng/ml) (Roussel Uclaf, Romainville, France), ConA (1, 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and calciparin. Sensitivity was defined as the lowest ubiquitin value which was at least three standard deviations above the value of the buffer. Precision was estimated from the error profile of the whole working range of the assay. The coefficient of variation of each ubiquitin concentration was calculated from 12 different assays.

Reproducibility was measured by the coefficient of variation calculated for five determinations of the same sample within and between assays.

Accuracy was estimated by the recovery of known amounts of ubiquitin (100, 200, and 400

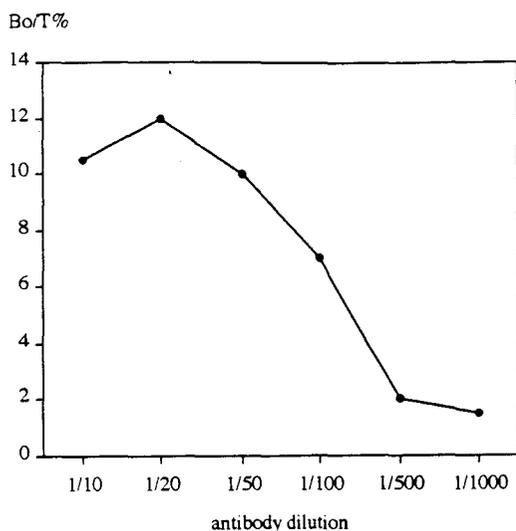


Fig. 1. Titration of polyclonal anti-ubiquitin serum.  $^{125}\text{I}$ -ubiquitin (70000 cpm) was incubated with increasing dilutions of rabbit antiserum.  $B_0/T\%$  denotes bound over total amount of radioactivity ( $\times 100$ ).

ng/ml) added to human sera, plasma, and T lymphocyte supernatant, and by the parallelism between the dilution curves of ubiquitin rich biological fluids and the standard curve.

### 2.8. Calculation of results

$B/B_0$  is the ratio between the amount of tracer bound to antibody in the presence ( $B$ ) and in the absence ( $B_0$ ) of unlabelled ubiquitin.

A linear regression analysis of the standard curve was performed using the logarithm of unlabelled ubiquitin concentrations and the logit transformation of the  $B/B_0$  percentage according to the equation:  $\text{logit}(B/B_0) = \log\{(B/B_0)/(100 - B/B_0)\}$ . This representation was used for determining the ubiquitin concentrations in biological fluids.

The coefficients of variation were calculated using the formula  $CV(x) = s/x$  where  $s$  is the standard deviation and  $x$  is the mean value of the measurements.

## 3. Results

### 3.1. Ubiquitin RIA

The titration of the polyclonal anti-ubiquitin serum is shown on Fig. 1. A dilution between 1/20 and 1/50 of the antiserum gave maximal binding (12–14%). This range of dilution was chosen for further testing.

Using the procedure described, the assay exhibited a linear dose-response between 60 and 500 ng/ml ( $r^2 = 0.983$ ). The sensitivity was 8–10 ng/ml and the concentration required to inhibit 50% of the tracer binding ( $IC_{50}$ ) was about 100 ng/ml. The error profile (Fig. 2) indicated good reproducibility for unlabelled ubiquitin concentrations ranging between 1 and 200 ng/ml with a coefficient of variation (CV) less than 2%.

Standard curves for ubiquitin in plasma, sera and T lymphocyte supernatants were superimposable over that obtained with PBS-BSA, indicating that the proteins present in human biological fluids did not interfere with the analysis (Fig. 3). We detected assay cross-reactivity using cell-culture medium with a shift in the  $B/B_0$  ratio rang-

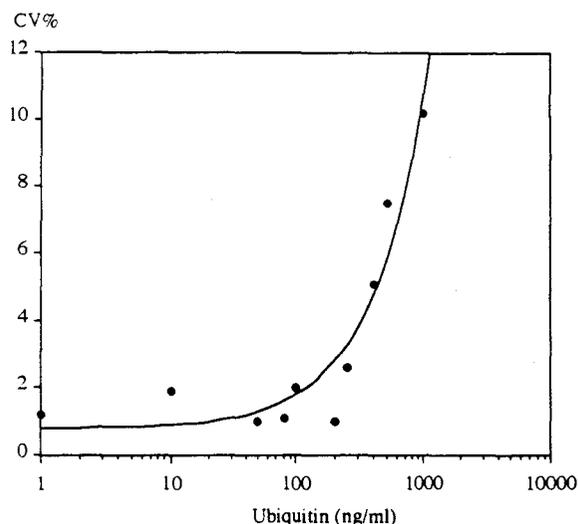


Fig. 2. Error profile of the ubiquitin assay. Each coefficient of variation (CV) value was the mean of 12 assays of duplicate ubiquitin standards.

Table 1  
Percentage of recovery upon addition of ubiquitin

Ubiquitin added (ng/ml)	Plasma		Serum		Supernatant	
	Measured	Recovery (%)	Measured	Recovery (%)	Measured	Recovery (%)
400	385 ± 36	96 ± 9	436 ± 68	109 ± 17	437 ± 54	109 ± 13
200	219 ± 20	109 ± 10	225 ± 41	112 ± 20	225 ± 24	112 ± 12
100	131 ± 16	131 ± 16	124 ± 16	124 ± 16	138 ± 22	138 ± 22

The total mean value of recovery is (mean ± SD) 112% ± 18% for plasma, 115% ± 16% for serum and 119% ± 19% for supernatant.

ing from 65 to 80%, but no cross-reactivity was found using the others controls mentioned in the materials and methods section. Amounts of ubiquitin (100, 200, and 400 ng/ml) added to the different media studied were correctly measured, with recoveries between 96% and 138% (Table 1). This accuracy was confirmed by the parallelism between the standard curve and the dilution curves of ubiquitin rich media (Fig. 4). To determine the intra- and inter-assay coefficients of variation, samples of sera, plasma and T lymphocyte supernatants containing different concentrations of ubiquitin were analysed in quintu-

plet on three different occasions. The intra-assay variation was around 6% for ubiquitin concentrations ranging from 25 to 400 ng/ml. Similar results were obtained for the inter-assay coefficient of variation.

### 3.2. Application of the ubiquitin assay

We tested human sera from healthy donors to determine the standard concentration of ubiquitin. We found that it was always less than 50 ng/ml (Fig. 5). In contrast, sera from *S. mansoni*-infected individuals exhibited high concentrations of ubiquitin (mean ± SD: 215 ± 25 ng/ml). This observation correlated with the previous report of

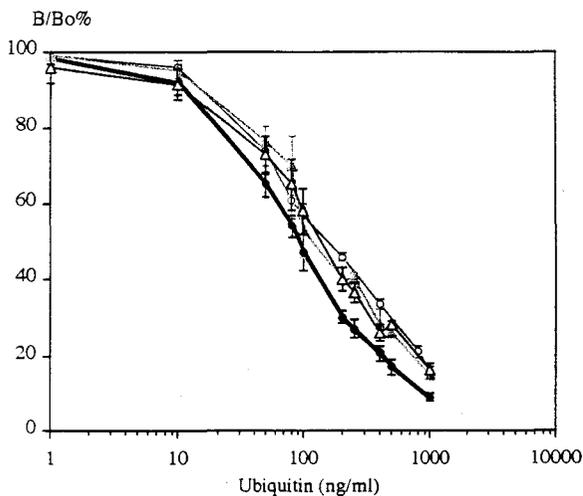


Fig. 3. Comparison of dose-response curves obtained in buffer (PBS-0.3% BSA) (●) and in various biological fluids: plasma (▲), serum (△) from healthy donors (1/2 dilution) and undiluted non-activated T lymphocyte supernatant (○). Various amounts of unlabelled ubiquitin were incubated overnight with 2 ng/100 μl of <sup>125</sup>I-ubiquitin and a 1/20 dilution of the antiserum. Immune complexes were recovered as described in the materials and methods section.

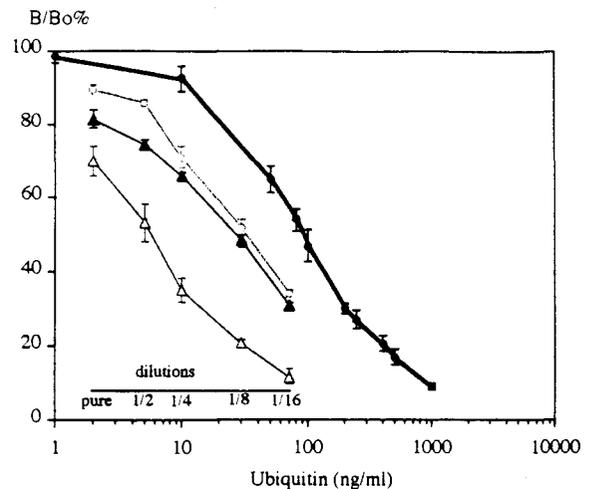


Fig. 4. Dilution studies of biological fluids containing endogenous ubiquitin: plasma (▲), serum (△) and activated T lymphocyte supernatant (○). The dose-response curves are compared with standard curve of RIA for ubiquitin (●). Mean values from two different assays are shown for each representative sample.

the production of PASL in schistosomiasis (Pancré et al., 1989). The levels of ubiquitin in sera from lupus erythematosus patients (where no platelet activation or PASL production is reported) were heterogeneous, but lower ( $55 \pm 28$  ng/ml) than that observed in schistosomiasis (Fig. 5). The mean values were shown to be statistically different using Student's *t* test ( $p < 0.01$ ).

We then investigated the variations of ubiquitin levels in plasma of HVH subjects during desensitization. This treatment led to an inhibition of platelet reactivity through the production of inhibitory cytokines, including a factor similar to PASL (Tsicopoulos et al., 1989). Most of the desensitized patients gave a similar response: the levels of ubiquitin remained constant for the 2 first days of desensitization and then increased on the third day or during the first booster injection (day 15); finally the levels returned to initial amounts at the second booster injection (day 30). Data from two representative patients are shown in Fig. 6. Each patient was tested in duplicate in at least two different occasions. A one-way analysis of variance indicated that the differences were significant ( $p < 5.10^{-4}$ ). Ubiquitin levels in plasma from healthy donors were comparable

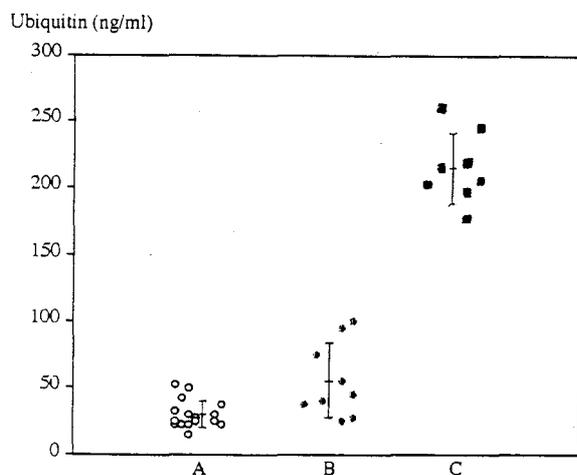


Fig. 5. Ubiquitin levels in sera (1/2 dilution) from healthy individuals ( $n = 20$ ) (A), patients with lupus erythematosus ( $n = 9$ ) (B), *S. mansoni*-infected subjects ( $n = 8$ ) (C). Each point is the mean of at least two determinations. Ubiquitin concentrations were determined using the logit ( $B/B_0$ ) conversion.

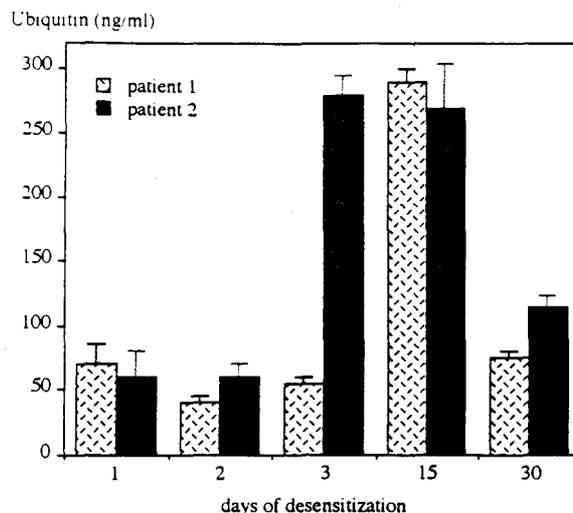


Fig. 6. Ubiquitin expression in plasma from HVH patients during specific desensitization. Profiles of two representative donors are shown. The samples were recovered as described in the materials and methods section.

with that detected in control sera (less than 50 ng/ml). We did not observe variations of ubiquitin concentrations in plasma samples that were regularly collected from healthy donors, during a 30-day period (data not shown).

### 3.3. Alternative protocol for ubiquitin RIA

Because we did not detect any differences of ubiquitin levels between ConA-activated T lymphocyte supernatants that express PASL activity, and non-activated T lymphocyte supernatants, we attempted to improve the sensitivity of the assay. Sensitivity depends on the equilibrium constant ( $K$ ) of the reaction mixture, the highest equilibrium constant giving the best sensitivity.  $K$  is determined by the following equation:  $K = (AgAb)/(Ag)(Ab)$ , where antigen (Ag), antibody (Ab) and the antigen-antibody complex (AgAb) are expressed in molar concentrations. Sensitivity may be improved by reducing the amount of labelled antigen. The specific activity of the tracer was increased ( $55 \times 10^5$  Bq/ $\mu$ g) so that an input of 80 000 cpm corresponded to about 450 pg/100  $\mu$ l of ubiquitin. Under these conditions, the curve was slightly shifted and the  $IC_{50}$  was about 50

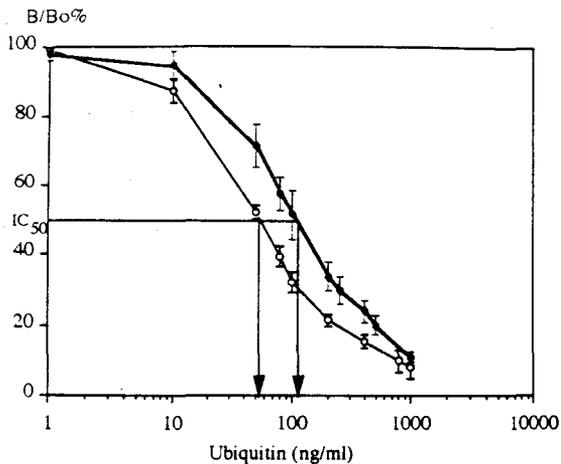


Fig. 7. Comparison of standard curves obtained with an input of 2 ng/100  $\mu$ l (●) and 0.4 ng/100  $\mu$ l (○) of labelled ubiquitin (equivalent to 90000 cpm). To increase the specific activity of the protein, an alternative labelling protocol was performed using 2.5  $\mu$ g of ubiquitin and  $15 \times 10^6$  Bq  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . A 1/50 dilution of the antiserum was used for this assay.

ng/ml (Fig. 7). This particular protocol for ubiquitin detection is now under investigation using T lymphocyte supernatants.

#### 4. Discussion

We have described the development and the application of a radioimmunoassay specific for ubiquitin. This test was demonstrated to be sensitive, reproducible and accurate under standard conditions and using plasma, serum or supernatant. Our purpose was to compare the values of ubiquitin found in plasma and sera from healthy individuals with that present in pathological conditions where PASL activity was described. The significant differences we obtained between the controls and samples from *S. mansoni*-infected or HVH patients encourages us to pursue the hypothesis that PASL could be a ubiquitin-related protein. We have controlled for the possibility that the extracellular localisation of high levels of ubiquitin was associated with abnormal amounts of  $\beta_2$  microglobulin, a common marker of cell lysis that could occur during sample preparations (data not shown).

The alternative protocol we set up for evaluation of ubiquitin levels in cell-culture supernatants, only gave a slight shift of the linear dose-response curve towards lower concentrations ( $\text{IC}_{50} = 50$  ng/ml instead of 100 ng/ml for the current protocol). The specific activity of ubiquitin was notably increased, but the limiting factor for diminishing the total amount of  $^{125}\text{I}$ -ubiquitin was the poor fixation capacity of the anti-ubiquitin serum. Since it was raised against ubiquitin coupled to KLH, we may hypothesize that the antiserum was mainly directed against the carrier (which is a strong immunogen) and recognized only few epitopes of ubiquitin. This was confirmed by dot-blot experiments in which, with dilutions of the antiserum from 1/10 to 1/500, KLH was found to be better recognized than ubiquitin (data not shown). Thus, further improvement of this assay would appear to be difficult.

Ubiquitin, whose relevance as a marker for proteolysis is largely demonstrated, is also involved in post-translational modifications. Through its capacity to form stable conjugates with proteins such as histones (Mueller et al., 1985) or membrane receptors (St. John et al., 1986; Yardin et al., 1986; Leung et al., 1987), ubiquitin may have a regulatory role during the cell cycle, signal transduction (Mori et al., 1992; Paolini et al., 1993) and cellular recognition (St. John et al., 1986; Parakh et al., 1993). An extracellular localisation of ubiquitin was recently described in human seminal fluid but the function of ubiquitin in this biological fluid remains unclear (Lippert et al., 1993). The unexpected pharmacological properties of ubiquitin that we described and its possible implication in cellular cooperation mechanisms were reinforced by additional results. For example, we have previously demonstrated that purified ubiquitin acts on platelets as a proaggregating factor, in the presence of suboptimal concentrations of various aggregating agents (Pancre' et al., 1991), is an inhibitor of activated monocyte cytotoxicity and has a potentiating effect for the presentation of antigen to T cells (V. Pancre', unpublished data). The possibility to detect and quantify the levels of ubiquitin in different biological media will allow

to explore the extracellular functions of this protein.

### Acknowledgements

The authors are grateful to J.L. Neyrinck for very helpful discussions and Dr. S. Giannini for reviewing the manuscript. This work was supported by INSERM (U167)-CNRS (U624) and received financial assistance from UNDP/World bank/WHO special program for research and training in tropical diseases.

### References

- Damonville, M., Wietzerbin, J., Pancré, V., Joseph, M., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. (1988) Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 140, 3962.
- Finley, D. and Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 7, 25.
- Finley, D., Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell* 48, 1035.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Boyre, E.A., Schlesinger, D.H. and Niall, H.D. (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 11.
- Haque, A., Cuna, W., Bonnel, B., Capron, A. and Joseph, M. (1985) Platelet-mediated killing of larvae from different filarial species in the presence of *Dipetalonema viteae*-stimulated IgE antibodies. *Parasite Immunol.* 7, 517.
- Hershko, A., Heller, H. and Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258, 8206.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. and Viens, P. (1983). A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 810.
- Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J.C., Capron, M., Vorng, H., Pancré, V., Kusnierz, J.P. and Auriault, C. (1986) The receptor for IgE on blood platelets. *Eur. J. Immunol.* 16, 306.
- Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J. and Wood, W.I. (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330, 537.
- Lippert, T.H., Seeger, H., Schieferstein, G. and Voelter, W. (1993) Immunoreactive ubiquitin in human seminal plasma. *J. Androl.* 14, 130.
- Mori, S., Heldin, C.H. and Claesson-Welsh, L. (1992) Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor B-receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 6429.
- Mueller, R.D., Yasuda, H., Hatch, C.L., Bonner, W.M. and Bradbury, E.M. (1985) Identification of ubiquitinated histones H2A and H2B in *Physarum polycephalum*: disappearance of these proteins at metaphase and reappearance at anaphase. *J. Biol. Chem.* 260, 5147.
- Nataf, P., Guinneau, M.T. and Herman, D. (1984) Rush venom immunotherapy: A 3-day programme for Hymenoptera sting allergy. *Clin. Allergy* 14, 269.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J. and Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6, 1429.
- Pancré, V., Joseph, M., Mazingue, C., Wietzerbin, J., Capron, A. and Auriault, C. (1986a) Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon  $\gamma$ . *J. Immunol.* 138, 4490.
- Pancré, V., Auriault, C., Joseph, M., Cesbron, J.Y., Kusnierz, J.P. and Capron, A. (1986b) A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* 137, 585.
- Pancré, V., Joseph, M., Capron, A., Delanoye, A., Vorng, H. and Auriault, C. (1989) Characterization of a suppressive factor of platelet cytotoxic functions in human and rat schistosomiasis mansoni. *Clin. Exp. Immunol.* 76, 417.
- Pancré, V., Monté, D., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. (1990) Interleukine-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., Pierce, R., Fournier, F., Mehtali, M., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. (1991) Effect of ubiquitin on platelet functions: possible identity with platelet activity suppressive lymphokine (PASL). *Eur. J. Immunol.* 21, 2735.
- Paolini, R. and Kinet, J.P. (1993) Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin-E receptors. *EMBO J.* 12, 779.
- Parakh, K.A. and Kannan, K. (1993) Demonstration of a ubiquitin binding site on murine haemopoietic progenitor cells: implication of ubiquitin in homing and adhesion. *Br. J. Haematol.* 84, 212.
- St. John, T., Gallatin, W.M., Siegelman, M., Smith, H.T., Fried, V.A. and Weissman, I.L. (1986) Expression cloning of a lymphocyte homing receptor cDNA: ubiquitin is the reactive species. *Science* 241, 845.
- Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1990) Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD 6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2695.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A.B., Wallaert, B., Joseph, M., Ameisen, J.C., Ramon, P., Dessaint, J.P. and Capron, A. (1988) Decrease of IgE-dependent platelet activation in *Hymenoptera* hypersensitivity after specific rush desensitization. *Clin. Exp. Immunol.* 71, 433.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A.B., Wallaert, B., Joseph, M., Ra-

- mon, P. and Capron, A. (1989) A circulating suppressive factor of platelet cytotoxic functions after rush immunotherapy in *Hymenoptera* venom hypersensitivity. *J. Immunol.* 142, 2683.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A.B., Vorng, H., Joseph, M., Wallaert, B., Kusnierz, J.P., Pestel, J. and Capron, A. (1990) Lymphocyte-mediated inhibition of platelet cytotoxic function during *Hymenoptera* venom desensitization: characterization of a suppressive lymphokine. *Eur. J. Immunol.* 20, 1201.
- Yardin, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.J., Yang-Ferng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Cheng, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U., Fried, V.A., Ullrich, A. and Williams, L.T. (1986) Structure of the receptor for platelet derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323, 226.

Il était intéressant de poursuivre cette étude en déterminant si un récepteur spécifique pour l'ubiquitine était exprimé sur les plaquettes.

Les plaquettes s'aggrègent rapidement, ce qui rend l'étude des protéines membranaires difficile; les techniques présentées par la suite ont donc été réalisées sur la lignée mégacaryocytaire DAMI (les mégacaryocytes sont les précurseurs des plaquettes) sur laquelle un récepteur pour l'IFN- $\gamma$  venait d'être caractérisé (Monté et coll. 1991).

Trois approches différentes ont été testées pour déterminer si l'ubiquitine se fixait spécifiquement à une structure membranaire.

∅ Nous avons incubé les cellules en présence de différentes concentrations d'ubiquitine marquée à l'iode<sup>125</sup> associée ou non à un excès de protéine non-marquée. Cette technique permet de déterminer la proportion de fixation spécifique de la protéine et si cette fixation répond à un phénomène de saturation liée au nombre de récepteurs et à la constante d'affinité de la protéine pour le récepteur.

∅ Des lysats membranaires de cellules DAMI ont été mis au contact d'ubiquitine marquée et fixée sur colonne de sépharose. Après lavages de la colonne afin d'éliminer les protéines de membrane non-fixées, les complexes ubiquitine marquée - protéines membranaires ont été détachés de la colonne et déposés sur gel SDS-PAGE.

∅ Des techniques de pontage (cross-linking) ont été réalisées de façon à lier de façon covalente l'ubiquitine marquée à son récepteur potentiel.

Les résultats obtenus ont montré que la fixation spécifique de l'ubiquitine aux plaquettes et aux cellules DAMI est très faible (moins de 2%). L'adsorption de protéines de lysat membranaire sur l'ubiquitine révèle plusieurs bandes protéiques, indiquant que l'ubiquitine ne se lie pas à une structure unique. Enfin, les techniques de pontage montrent que la quantité de protéine fixée en présence ou en absence d'agents liants est identique. Compte tenu de la capacité de l'ubiquitine à se fixer de façon covalente sur diverses protéines, il est

donc possible que les propriétés pharmacologiques induites par l'ubiquitine soit médiée par sa fixation extracellulaire à une ou plusieurs structures membranaires.

Si tel est le cas, déterminer quelle fixation en particulier est responsable de l'effet immunosuppresseur observé risquait d'être aléatoire. Pour cette raison, et suite à la réorientation de certains programmes de recherche décidée lors de la création de l'unité URA-CNRS 1854 dirigée par le Docteur Claude Auriault, ce programme n'a pas été davantage approfondi.

Différents éléments relatifs à l'infection par *S. mansoni* et aux cellules NK permettaient d'envisager une intervention de cette population cellulaire à différents niveaux de l'infection. Ainsi, les cellules NK sont présentes dans différents tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, en particulier dans le foie, là où la pathologie associée à l'infection se développe. Les cellules NK asialo GM1<sup>+</sup> semblent moduler l'intensité des granulomes pulmonaires synchronisés (Wynn et coll. 1994). Ce travail ainsi que d'autres modèles (Czaja et coll. 1989; Pancré et coll. 1994) mettent particulièrement en évidence le rôle régulateur de l'IFN- $\gamma$  sur la réaction granulomateuse et la fibrose hépatique. Les cellules NK produisent de l'IFN- $\gamma$ , ainsi que du TNF- $\alpha$  et de l'IL-4 qui interviennent à différents niveaux de la réaction granulomateuse hépatique.

Par ailleurs, l'activation des cellules NK à un niveau systémique est également envisageable dans la mesure où ces cellules sont régulées par des structures glycosylées qui sont abondamment exprimées sur et par tous les stades parasitaires, et également à la surface des œufs. Enfin, l'injection de la protéine parasitaire Sm28 GST *in vivo* est capable d'induire la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T et éventuellement par les cellules NK.

Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de ces cellules dans la schistosomiase murine; dans un premier temps nous avons essayé de déterminer si les antigènes parasitaires étaient capables de stimuler la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules tumorales murines (les cellules YAC) et la production d'IFN- $\gamma$  (fonctions classiquement étudiées pour ces cellules).

Le protocole de marquage des cellules YAC au chrome 51 ainsi que la technique de cytotoxicité ont été mis en place en utilisant, comme source de cellules effectrices, des préparations de cellules spléniques obtenues de souris SCID. Après adhérence des monocytes sur boîte de pétri, la population restante est constituée de cellules NK et de granulocytes. Ces préparations ont été activées pendant 18 heures par des antigènes d'œufs. Au terme de l'activation, les cellules effectrices sont incubées en présence de  $1.10^4$  cellules YAC par puits. Différents rapports effecteur / cible sont utilisés variant de 100:1 à 10:1. La

cytotoxicité spécifique est déterminée en tenant compte de la libération spontanée de radioactivité (exprimée en nombre de coups par minute - cpm -) par les cellules YAC selon la formule suivante:

$$\frac{(\text{nbre de cpm expérimental} - \text{nbre de cpm spontané})}{$$

$$(\text{nbre de cpm total} - \text{nbre de cpm spontané})$$

le nombre de cpm total correspondant à la radioactivité libérée après lyse complète des cellules YAC par un détergent (Triton).

Dans le modèle SCID, après stimulation au SEA, les valeurs de cytotoxicité spécifique se situent entre 9 et 25 % pour des rapports intermédiaires de 25, 50 et 100 cellules effectrices pour 1 cellule - cible. Dans ce modèle, les antigènes d'œufs entraînent donc une activation des cellules NK qui reste néanmoins modeste.

Nous avons employé cette technique pour étudier l'activation de cellules spléniques provenant de souris immunocompétentes. En effet, dans la perspective d'étendre notre étude à un modèle d'infection expérimentale, les souris SCID ne conviennent pas puisque seules les souris possédant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> αβ<sup>+</sup> développent la réaction granulomateuse caractéristique de l'infection. Après activation par l'IL-2 recombinante ou le poly IC, la cytotoxicité spécifique des cellules spléniques de souris normale est de 10 à 15 % pour un rapport 50 / 1. La cytotoxicité après activation au SEA n'excédant pas 9 % pour le même rapport, il était indispensable d'augmenter la proportion des cellules NK dans nos préparations. Chez la souris, la population splénique est constituée en moyenne de 45% de cellules T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), 40 % de lymphocytes B (caractérisés par des immunoglobulines de surface), 10 % de monocytes / macrophages et 5% de cellules NK (sur la base du marqueur NK1.1).

Différentes techniques d'enrichissement ont été utilisées. Quelques-unes ont été signalées dans le chapitre Cellules Natural-Killer / Techniques d'isolement. Nous avons utilisé des souris de la lignée C57BL/6 qui exprime le récepteur NK1.1, plus spécifique des cellules NK que le récepteur asialo-GM1, et pour lequel on dispose d'une lignée cellulaire (la lignée PK136) produisant l'anticorps spécifique (l'anticorps anti-NK1.1 est une IgG2a de souris).

Les résultats se sont avérés décevants, l'enrichissement restant généralement médiocre en regard des quantités de cellules éliminées et le nombre de cellules enrichies obtenu insuffisant pour envisager des expériences *in vitro* dans de bonnes conditions.

L'isolement direct (ou sélection positive) d'une population minoritaire à partir d'anticorps dirigés contre un marqueur membranaire spécifique peut être réalisé sur boîtes ("panning") ou en suspension, à l'aide de billes magnétiques. Le panning fournit peu de cellules qui, de plus, sont généralement fortement associées aux anticorps et sont difficiles à récupérer. L'isolement par billes magnétiques est plus efficace mais relativement onéreux. La présence de billes non-détachées sur les cellules peut affecter certaines fonctions cellulaires, en particulier l'interaction entre cellules-cibles et cellules effectrices. La purification directe peut également induire une activation non-spécifique des cellules suite au pontage des récepteurs. Le récepteur NK1.1 étant impliqué dans les mécanismes de cytotoxicité (Karlhofer et coll. 1991), ces techniques directes n'ont pas été retenues.

Tenant compte des méthodes utilisées dans la littérature, nous avons testé deux approches consistant soit à fractionner les différentes populations par centrifugation sur gradient, soit à éliminer les cellules non-désirées.

Les techniques de gradient consistent à séparer les cellules selon leur densité. Le gradient composé de paliers de percoll à 30, 50, 55, 60, 65 et 70 % est adapté aux cellules murines (Luini et coll. 1981). D'après la littérature, les fractions des interfaces 50-55 et 55-60 sont enrichies en cellules de type LGL (large granular lymphocyte). Pour notre part, en marquant les cellules des différentes fractions par des anticorps anti-NK1.1, anti-CD4 et anti-CD8, nous n'avons pas mis en évidence de séparation particulière des types cellulaires, ni d'enrichissement au niveau des fractions indiquées. Deux facteurs, le critère de sélection utilisé et l'hétérogénéité des cellules NK, peuvent expliquer ce résultat.; en effet, les cellules LGL présentent une cytotoxicité de type NK mais ne correspondent pas à une population cellulaire unique (FIG. 21). D'autre part, des cellules NK dite SAL (Small Agranular Lymphocyte) ayant des caractéristiques morphologiques (taille et granularité) identiques aux lymphocytes ont été décrites; ces cellules SAL sont des cellules NK dans le sens où elles

**Table 1.** *Cytofluorometric and Morphologic Analysis of S-LAK Cells and A-LAK Cells*

	Percent positive cells			
	CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	LGL
Donor 1				
S-LAK	62	4	33	63
A-LAK	97	1	1	99
Donor 2				
S-LAK	46	7	45	52
A-LAK	93	2	4	98
Donor 3				
S-LAK	32	5	62	60
A-LAK	58	1	41	97
Donor 4				
S-LAK	22	12	64	42
A-LAK	51	9	39	86
Donor 5				
S-LAK	9	13	76	31
A-LAK	20	16	62	74

Pourcentages de cellules NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), de cellules T CD56<sup>+</sup> et de cellules T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) dans des préparations de cellules périphériques stimulées par l'IL-2.

S-LAK représente la population totale et A-LAK, la fraction adhérente de la population activée.

Le parallèle entre pourcentage de cellules NK et morphologie LGL, clair pour les donneurs 1 et 2, est moins net chez les donneurs 3-5.

(Subauste et coll. 1992)

FIG. 21.

expriment les marqueurs CD16 et CD56 et présentent une activité identique à celle des LGL (Inverardi et coll. 1991). La technique de gradient, en définitive peu adaptée aux cellules NK, fournit par ailleurs des rendements cellulaires relativement médiocres. Seules 50 % des cellules déposées sont effectivement récupérées aux interfaces. Pour un dépôt de 100 millions de cellules, 2 à 4 millions de cellules se trouvent aux interfaces 50-55 et 55-60, tandis que les fractions 60-65 et 65-70 comptent 40 à 45 millions de cellules. Cette technique n'a donc pas été retenue.

La seconde approche consiste à éliminer les cellules non-désirées. L'utilisation de boîtes coatées par des anti-immunoglobulines de souris et l'adhérence sur boîte de pétri à 37°C sont des techniques efficaces pour éliminer respectivement les lymphocytes B et les monocytes. Ces deux types cellulaires sont également efficacement retenus sur colonne de laine de nylon. Les cellules T non-adhérentes à la laine de nylon peuvent être éliminées en utilisant les marqueurs CD3, CD4 ou CD8 soit sur boîtes, soit, si les anticorps utilisés sont cytotoxiques, par lyse au complément. Cette dernière technique est particulièrement efficace et a également l'avantage d'être rapide, par comparaison aux séries d'adhérence qu'il faut effectuer avant d'obtenir une déplétion satisfaisante des cellules.

En utilisant l'une ou l'autre technique, précédée généralement d'un passage sur laine de nylon, nous avons obtenu des populations composées en moyenne de 10 à 15% de cellules B résiduelles, 2% de monocytes, 17% à 20% de cellules CD3<sup>+</sup> (constitués majoritairement de cellules T CD8<sup>+</sup>) et 10 à 20% de cellules NK1.1<sup>+</sup>. Les techniques de panning permettent d'obtenir des préparations cellulaires dont la viabilité est excellente. Par contre, les nombreuses cellules mortes générées lors de la lyse au complément peuvent nuire, par l'émission de substances toxiques ou de dégradation, aux cellules voisines vivantes. Un gradient de percoll de solutions à 40 % et à 70 % permet d'éliminer les cellules mortes qui ne traversent pas le coussin à 40 % tandis que les cellules vivantes se concentrent à la limite 40 - 70 %.

Les taux de déplétion sont variables selon les réactifs utilisés mais également d'une préparation splénique à l'autre. L'enrichissement en cellules NK1.1<sup>+</sup> est évidemment

directement lié à la proportion de cellules non-NK éliminées. Cependant, nous n'avons jamais obtenu d'enrichissement en cellules NK1.1<sup>+</sup> supérieur à 25% car des déplétions plus poussées entraînent également la perte des cellules NK, par fixation non-spécifique et par altération de la viabilité.

Ces préparations cellulaires, utilisables en cytotoxicité (si ce n'est le nombre faible de cellules récupérées), étaient par contre trop peu enrichies pour permettre de distinguer la part des cellules NK dans la production d'IFN- $\gamma$  après activation.

Nous avons obtenu un meilleur enrichissement en effectuant sur des préparations semi-purifiées un tri cellulaire, à l'aide d'un cytofluoromètre, basé sur l'expression du récepteur NK1.1. La population triée contenait 98 % de cellules NK1.1<sup>+</sup>. Si une telle technique est idéale pour le clonage cellulaire, le temps requis pour l'obtention de cette population ainsi que le nombre de cellules récupérées (1 million de cellules nécessite environ 5 heures de tri) ne permettaient pas d'envisager cette approche pour réaliser des expériences de stimulation *in vitro*.

La difficulté d'obtenir une population de cellules NK1.1<sup>+</sup> en nombre suffisant et à des taux d'enrichissement satisfaisant nous a conduit à envisager l'approche opposée, c'est-à-dire l'élimination de cette population cellulaire. Les modifications observées en l'absence de cellules NK permettraient de déduire les fonctions normalement exprimées par ces cellules. Cette technique de déplétion a été appliquée *in vivo*.

Nous avons injecté régulièrement des anticorps monoclonaux anti-NK1.1 à des souris C57/BL6, avant infection par *S. mansoni*, et jusqu'en phase chronique. La réponse immune systémique et la réaction granulomateuse hépatique ont été étudiées chez les animaux déplétés et non-déplétés, à 3, 6, 9 et 17 semaines après l'infection. Ces temps correspondent à différents stades de l'infection. Environ trois semaines après l'infection, les vers atteignent leur maturité; à 6 semaines, le dépôt des œufs est amorcé, et à 9 semaines, la réaction est maximale. A 17 semaines, l'infection est en phase chronique.

Nous avons observé que des injections répétées d'anticorps anti-NK1.1 conduisent à l'élimination des cellules NK sans effet secondaire sur l'état général des animaux traités, et sans conséquence sur l'expression de base des cytokines et des anticorps présents chez les animaux non-infectés. Cette condition était nécessaire pour nous permettre d'identifier les paramètres liés à l'infection modifiés par la déplétion. L'anticorps anti-NK1.1 étant capable de stimuler la cytotoxicité des cellules NK1.1<sup>+</sup> *in vitro*, on pouvait en effet envisager que le traitement réalisé induise une activation non-spécifique des cellules.

Des dosages réalisés sur des échantillons sériques prélevés 2 ou 3 jours après l'injection d'anticorps ont montré que les quantités d'IgG2a (correspondant à l'isotype de l'anticorps anti-NK1.1) circulantes sont faibles, ce qui indique que les anticorps injectés sont rapidement complexés. Par ailleurs en utilisant une technique de marquage indirect permettant de détecter, par cytofluorométrie, les cellules NK1.1<sup>+</sup> au niveau du foie, nous avons pu contrôler l'absence de cellules NK1.1<sup>+</sup> complexées aux anticorps chez les animaux déplétés. Ces cellules sont donc de toute évidence rapidement phagocytées, sans doute par les macrophages du foie (cellules de Kupffer).

Dans le contexte de l'infection par *S. mansoni*, la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> entraîne des modifications perceptibles au niveau hépatique. Nous avons observé:

- 1- une augmentation du taux de collagène dans les stades tardifs de la réaction. La fibrose qui normalement est régulée dans le modèle d'immunisation par la Sm28 GST est également augmentée par la déplétion ;

2- une abolition de l'expression des ARN messagers spécifiques de l'IL-7 et de la sous-unité p40 de l'IL-12. Cette inhibition persiste tout au long de l'infection, en parallèle avec l'élimination des cellules NK ;

3- l'absence des cellules NK ne modifie pas, par contre, l'expression d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-4 ni dans le foie, ni dans les serums ;

4- et de la même façon, aucune incidence de la déplétion sur la réponse humorale n'est observée.

**En conclusion, la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> au cours de l'infection par *S.mansoni* a des conséquences localisées au foie et ne semble pas altérer la réponse immunitaire des animaux.**

## **FULL TITLE**

Effect of Natural Killer cell depletion on immunity and pathology in murine schistosomiasis.

## **RUNNING TITLE**

Effect of Natural Killer cell depletion in murine schistosomiasis.

CHRYSTEL ASSEMAN,<sup>1</sup> VERONIQUE PANCRE,<sup>1</sup> BRIGITTE QUATENNENS,<sup>2</sup> AND  
CLAUDE AURIAULT <sup>1\*</sup>.

URA CNRS 1854 <sup>1</sup> and URA CNRS 1160 <sup>2</sup>, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France.

\* Corresponding author. Mailing address: URA CNRS 1854, Institut Pasteur, 1 rue du Pr.  
A. Calmette, B P 245, 59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 20. 87. 78. 82. Fax: (33)  
20. 87. 78. 88.

## ABSTRACT

Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) plays an immunoregulatory role in schistosome infection by inducing cell cytotoxicity against the parasite larvae and reduction of hepatic fibrosis. The role of Natural Killer (NK) cells, a major source of IFN- $\gamma$ , has never been studied during the entire course of murine schistosomiasis. In this work, we investigated the consequences of *in vivo* NK cell depletion, maintained during 17 weeks of infection, on both hepatic granuloma development and immune response. We found that NK1.1<sup>+</sup> cell depletion caused perceptible modifications in the liver, increasing collagen content and leading to the abolition of interleukin 12 (IL-12) p40 and IL-7 mRNA expressions. Hepatic mRNA expression of other cytokines (IFN- $\gamma$ , tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ] and IL-4) as well as humoral and cytokine responses in sera were not significantly different between control monoclonal antibody (CmAb) and anti-NK1.1-treated animals. We also tested a model of immunization using *S. mansoni* 28-kDa glutathione-S-transferase (Sm28 GST) that induces IFN- $\gamma$ -mediated protection associated with diminution of hepatic fibrosis. Again, treatment with anti-NK1.1 mAb provoked a marked augmentation of hepatic fibrosis in immunized mice although no alteration of IFN- $\gamma$  production was observed. Lastly, collagen content measurement showed that NK1.1<sup>+</sup> cell depletion contributed to modifications apparent in the late stages of granuloma formation. In conclusion, we demonstrate that the absence of NK1.1<sup>+</sup> cells might induce alterations of regulatory mechanisms during a chronic infection in immunocompetent mice, that did not otherwise display any appreciable variations of cytokine production.



## INTRODUCTION

Schistosomiasis, a major tropical helminth-induced disease, affects at least 200 million people worldwide, with 500 million being exposed to the risk of infection. The adult worms settle in the mesenteric veins and the females produce numerous eggs that exit the host or are trapped in organs, especially intestine and liver. The morbidity in schistosome infection is primarily caused by hepatic fibrosis resulting from a granuloma reaction elicited around embolized eggs.

In *Schistosoma mansoni*-infected mice, worms stimulate the expression of Th1-related cytokines which are downregulated by egg deposition, that in turn induces a Th2 response (17, 31). Studies focusing on the cytokines involved in granuloma regulation show an important role for tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in granuloma induction (3) and cytokine-depletion experiments indicate that anti-interleukin 4 (IL-4) (7) and anti-IL-2 (6) treatment markedly decrease hepatic fibrosis. Other studies present evidence that gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) plays immunoregulatory functions in schistosomiasis. IFN- $\gamma$  induces the cytotoxic activation of platelets (29) and macrophages (20) against the parasite larvae and protection associated to unique injection of attenuated cercariae is correlated to IFN- $\gamma$  production (26). In our laboratory, Pancré et al. (30) showed that a single administration of *S. mansoni* 28-kDa glutathion S-transferase (Sm28GST) with aluminum hydroxide leads in mice to significant levels of protection, linked to Sm28GST elicited IFN- $\gamma$  production and diminution of hepatic fibrosis. In agreement with this observation is the diminution of fibroblast-induced collagen production in murine schistosomiasis obtained after injections of recombinant IFN- $\gamma$  (8).

Natural Killer (NK) cells represent a major source of IFN- $\gamma$  (21). The regulatory functions of these cells in schistosomiasis have been studied in the lungs using an artificial model of synchronized granulomas elicited by intravenous egg injections (44). The authors show that the depletion of asialo-GM1<sup>+</sup> cells, a surface receptor expressed by NK cells and other populations (38), leads to an augmentation of primary granuloma size and Th2 cytokine

mRNA expression, while decreasing Th1 cytokine mRNA levels. In the present study, we investigated the effects of *in vivo* NK cell depletion both on the development of conventional granulomas in the liver and on the immune response. The depletion was begun before infection and maintained throughout the chronic stage, using the monoclonal antibody (mAb) PK136 directed towards NK1.1, a surface marker of the murine NK cells (16), also expressed on a rare CD4<sup>+</sup> T cell type (24). We focused our study on possible modifications in the liver pathology and immune response parameters, in regard to the capacity of NK cells to produce IFN- $\gamma$  but also as a source of IL-4 from the CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> T cell population (46). We found that NK1.1<sup>+</sup> cell depletion caused perceptible changes in the liver, increasing hepatic collagen content and leading to the abolition of IL-12 p40 and IL-7 mRNA expressions. Interestingly, in the model presented above of rSm28 GST immunization, NK cell depletion was also associated with a marked augmentation of hepatic fibrosis, although no alteration of IFN- $\gamma$  production was observed. This indicated that NK1.1<sup>+</sup> cells might locally participate in regulatory mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and experimental infections.** Male C57BL/6 mice and nude/swiss mice were provided by Iffa Credo (L'Arbresle, France). A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was used for the experiments. Six-week-old mice were infected by percutaneous exposure to live cercariae (50 parasite per mouse). Non-infected, sex and age matched animals were used as controls.

**Reagents.** The hybridoma line PK136 produces a monoclonal antibody to the NK1.1 antigen (mouse IgG2a) expressed on the cells from C57BL/6 strain (15) and was provided by the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The mAb was produced as ascites in nude/swiss mice. Control mice were injected with irrelevant murine IgG2a mAb that was produced and recovered as for the PK136 line. This control mAb (CmAb), kindly provided by Doctor J.M. Grzych (Institut Pasteur, Lille) is directed against an antigen of *Toxoplasma gondii*. Ascites were heat-inactivated, diluted to an appropriate concentration in pyrogen-free water and filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane before injection. Monoclonal anti-mouse antibody pairs used for IL-4 detection (11B11 and biotin-conjugated BVD6-24G2) and IFN- $\gamma$  measurement (R4-6A2 and biotin-conjugated XMG1.2) were purchased from PharMingen (San Diego, CA). Standard curves were generated with recombinant murine cytokines (Genzyme, Boston, MA). Horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-mouse antibodies were provided by Southern Biotechnology Associates (SBA, Birmingham, AL). Soluble egg antigens (SEA) and soluble worm antigens (SWAP) were used at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml. Recombinant Sm28GST antigen, kindly provided by Doctor J.M. Grzych, was expressed in *E. coli* and purified on a glutathione-sepharose column.

**In vivo NK cell depletion.** Depletion of NK cells using PK136 mAb was performed on the basis of a previous study (37). Four-week-old mice were injected intraperitoneally (i.p) with 200  $\mu$ g of anti-NK1.1 mAb or an equivalent amount of CmAb 10, 6 and 2 days

before infection. Depletion was maintained by weekly administrations until 3 weeks after infection and every 10 days thereafter.

**Cytofluorometry.** The efficiency of NK cell depletion was confirmed using flow cytofluorometric analysis of liver non-parenchymal cell preparations. Livers were rapidly homogenized and the cells were further dispersed by incubation in HBSS (10ml/liver) with 500 U/ml collagenase (type I or IV from *Clostridium histolyticum*, Sigma, St-Louis, MO) and 40 U/ml DNase I (Sigma) in a water bath at 37°C for 30 min, with repeated shaking. The reaction was stopped with large volumes of cold HBSS. Dissociated cells were filtered through a nylon mesh to remove debris and centrifuged on a Ficoll gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden) to remove erythrocytes. Viability was controlled using trypan blue exclusion. Cells ( $2 \cdot 10^6$ /ml) were fixed with 2% final formaldehyde (Sigma) in culture medium for 20 min at 4°C. All staining procedures were performed at 4°C, in PBS-1% BSA-0.01%  $\text{NaN}_3$ . Cells ( $10^6$  in 100  $\mu\text{l}$ ) were incubated with 10  $\mu\text{g}$  of ascite preparations of anti-NK1.1 mAb or CmAb for 30 min, washed and then stained with FITC anti-mouse IgG2a mAb (1  $\mu\text{g}$  of mAb/ $10^6$  cells) (PharMingen). Cells were analysed using a Coulter Elite flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). In preliminary experiments, we ensured that the enzymatic treatments did not alter NK1.1 surface expression. Control antibody injections did not modify the proportion of hepatic NK1.1<sup>+</sup> cells compared to mice that receive no antibody treatment.

**Reverse transcriptase (RT)-PCR of mRNAs.** Livers were homogenized in RNazol solution (Cinna/Biotecx Laboratories International Inc., Friendswood, TX) using a tissue polytron, and total RNA extracted according to the manufacturer's directions. RT was performed as follows: 2  $\mu\text{g}$  of RNA was heat-denatured at 70°C for 10 min in the presence of 1  $\mu\text{g}$  of oligo(dT) primers and 4 U of RNAsin (Promega, Madison, WI). After annealing, mRNAs were reverse transcribed in a 25  $\mu\text{l}$  final volume containing 2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Pharmacia), 4 U of RNAsin, 4 mM DTT, 200 U of Murine Moloney Leukemia Virus RT (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and 1X buffer for 1 h at 38°C. The RT reaction mixture was diluted 1:2 and used for amplification. Two  $\mu\text{l}$  of

cDNA were added to 0.2 mM dNTP mix, 0.5  $\mu$ M sense and antisense primers, 0.625 U Taq polymerase (Bioprobe System, Montreuil, France) and buffer in a 25  $\mu$ l volume. Mineral oil was added to avoid evaporation. After an initial incubation at 94°C for 2 min, cycling temperatures were 94°C for denaturation, 60 to 64°C (see below) for annealing and 72°C for elongation; each temperature step of the PCR lasted 1 min. PCR was completed by a final elongation at 72°C for 10 min. The sequences of the primers and the length of PCR products (in brackets) were as follows:  $\beta$ -actin sense GTGGGGCGCCCCAGGCACCA, antisense CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC (539bp); NK1.1 sense ACAGAGTGCCCACAAGACTGGCT, antisense CAGTCAGGAGTCATTACTCGGGG (370bp); IFN- $\gamma$  sense GTCTGAAGTAACTATTTTAACTCAAG, antisense GTGGGTTGTTTCGACCTCGTAACTTGGC (278bp); TNF- $\alpha$  sense AGCCACGTCGTAGCAAACCACCAA, antisense ACACCCATTCCCTTCACAGAGCAAT (446bp); IL-4 sense TGATGGGTCTCAGACCCCCACGCTTAG, antisense CTTTCAGTGTTGTGAGCGTGGACTC (378bp); IL-12 p40 sense GGCAGTACACCTGCCACAAAGGAGG, antisense CCTAGGATCGGACCCTGCAGGGAA (755bp); IL-12 p35 sense TCCTGGGAAAGTCTGCCGGCTATCC, antisense TCCTATCTGTGTGAGGAGGGCGCTG (800bp); IL-7 sense AGACCATGTTCCATGTTTCT, antisense TGTTTATATACTGCCCTTCA (502 bp); fibrosin sense CCCTTGGCCTGCCTCCCCAAGGGCT, antisense GCACCCCTGTAAAAATGTACAAAAGGT (192bp). Annealing temperatures were 60°C, except for NK1.1 (62°C) and for IL-12 (p40 and p35: 64°C). The appropriate number of PCR cycles was defined for each primer pair such that a linear relationship between input RNA and final PCR product was obtained. Amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

**Cytokine measurement.** Collected sera were stored at -80°C before use. IL-4 and IFN- $\gamma$  levels were quantified by double-sandwich ELISAs. Microtitre plates (Maxisorp Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with 2  $\mu$ g/ml mAb in carbonate buffer pH 8.6 (50  $\mu$ l/well), then washed with PBS-0.1% Tween. After a blocking step with PBS-3% BSA for 2h at room temperature (RT), the serially diluted standard and the sera (1/10

dilution) in PBS-BSA (100  $\mu$ l/well) were incubated overnight at 4°C. After washing, biotinylated mAb (1  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ l/well) was added for 2 h at RT. After additional washing, peroxidase-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA) diluted in PBS-Tween (1:10,000) was added for 30 min at RT, followed by washing and OPD (o-phenylene-diamine, Sigma) substrate addition (1 mg/ml) in 0.1M phosphate-citric acid pH 5.5 and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Substrate development was stopped by the addition of 1N HCl and the absorbance was measured at 492nm, using a microELISA reader (Titertek Multiscan). The limits of detection, from the standard curves, were 160 pg/ml for IFN- $\gamma$  and 15 pg/ml for IL-4. The quantification of serum TNF was monitored by cell lytic assay on actinomycin D-treated murine L-929 fibroblasts, as described (2). The limit of detection was 5 pg/ml.

**Antigen-specific antibody assay.** Specific antibodies in the sera were measured using the SBA Clonotyping System. Parasite antigens diluted in carbonate buffer (10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ l/well) were coated onto plates overnight at 4°C. Saturation and incubation of samples (50  $\mu$ l/well) were performed as described above for cytokine measurement. Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG1 (1:500 dilution) and IgG2a (1:250 dilution) were probed for 1h30 min at RT, then the reaction was monitored with OPD substrate as above.

**Histology.** Livers were perfused with 1% heparin before fixation in Bouin's solution and processed for routine paraffin embedding. Evaluation of fibrosis was performed as previously described (30). Briefly, 6- $\mu$ m thick liver sections were deparaffinized and incubated for 2 h in aqueous picric acid solution containing 0.1% Sirius red F3B (BDH Chemicals Ltd, Poole, England) which stains collagen and 0.1% Fast Green FCF (Sigma) which stains noncollagenous proteins. Sections were extensively rinsed with water and liver coloration was eluted with 0.1N NaOH in absolute methanol (1:1 dilution). Collagen and protein content were quantified by absorbance at 605 and 540 nm respectively.

**Statistical analysis.** Student's t test was used to determined the significance (p values < 0.05) of differences between the experimental groups.

## RESULTS

**Efficacy of *in vivo* NK cell depletion.** Animals were sacrificed before worms achieve maturation (3 weeks post-infection), at the beginning of egg deposition (6 weeks p.i), at maximal acute phase (9 weeks p.i) and modulation stage (17 weeks p.i). Efficiency of depletion was tested at each time point by cytofluorometric analysis of hepatic non-parenchymal cell preparations. The liver is convenient as NK cells are readily detectable in this organ (19). NK1.1<sup>+</sup> cells represented 12.5 % ( $\pm$  2.5) of the lymphoid population in the livers of CmAb-treated non-infected mice at the beginning of the experiment. This percentage decreased with age according to observations of Itoh et al. (19) (Fig. 1A). A similar decrease occurred within the infected CmAb-treated group, indicating that egg deposition did not induce a recruitment of NK1.1<sup>+</sup> cells in liver. The three anti-NK1.1 mAb injections performed prior to experimental infection led to a residual 3% NK1.1<sup>+</sup> cells in the livers. The following injections eliminated hepatic NK1.1 cells as revealed by flow cytometry analysis.

NK1.1 expression was studied in the livers by RT-PCR. As shown in Fig. 1B. (right part of panel) NK1.1 mRNA expression was completely abrogated in NK1.1-treated mice throughout the infection period. The same results were obtained from spleen samples (not shown). In CmAb-treated mice, no decrease of mRNA expression was observed (Fig. 1B, left part). The difference of this result compared with the cytofluorometry analysis was probably due to over-amplification of cDNA performed to distinguish control from anti-NK1.1 mAb-treated animals.

**Liver cellular composition.** The non-parenchymal liver cell population from uninfected animals was composed of a major cell population with lymphoid morphology (designated L, Fig. 2A) that represented 55-60% of total analysed cells and contained NK1.1<sup>+</sup> cells. As granulomas were elicited, we observed the emergence of a population (named E, Fig. 2B), negatively stained for NK1.1 marker, which represented polymorphonuclear cells based on shape and granularity. By six weeks post-infection (as

depicted in Fig. 2B), the relative proportions were 32-36% and 43-46% respectively for population L and population E. This proportion was then shifted towards a marked predominance of population E (65-70%) over population L (15-23%) at 9 and 17 weeks p.i. This indicated, in accordance with a previous report (40), that the liver granulomas contain a majority of eosinophils and to lesser extent lymphocytes and macrophages. The kinetics of appearance of population E and the relative proportions of each population did not differ in depleted versus non-depleted mice, suggesting that NK cell depletion did not change the overall granuloma cellular composition.

**Liver pathology.** Perfusion of livers revealed that the parasite burden was identical at each time point in CmAb and anti-NK1.1-treated mice (not shown). However the hepatic fibrosis (quantified by collagen content measurement) was more elevated ( $p < 0.05$ ) in depleted-infected animals than in control animals (Fig. 3A). This increase was not linked to an augmented number of deposited eggs following parasite laying (not shown). In addition, we performed immunization with rSm28 GST prior to infection using a protocol that induces the reduction of hepatic fibrosis mediated by IFN- $\gamma$  production. We observed that NK1.1<sup>+</sup> cell depletion increased the level of collagen content and so abrogated the reduction of fibrosis normally obtained in immunized animals (Fig. 3B).

**PCR analysis.** In order to explain these differences in the amount of collagen, we examined the expression of cytokines commonly associated with granuloma formation in hepatic mRNA preparations from anti-NK1.1- and CmAb-treated mice (Fig. 4). As IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  and IL-4 are shown to be secreted by activated NK-cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells respectively, we focused primarily on these cytokines.  $\beta$ -actin-specific RT-PCR was used to be sure that equivalent amounts of cDNA were amplified in each group. IFN- $\gamma$  and TNF $\alpha$  mRNA were increased at 6 weeks post-infection and remained elevated in the livers of CmAb-treated mice. IL-4 production was maximal when the egg deposition started but then decreased at 9 and 17 weeks p.i. This pattern was identical in livers from anti-NK1.1-treated mice and variations of the number of PCR cycles did not distinguish between the two groups. We sought to determine if NK cell-activating factors such as IL-12 and IL-7 were

transcribed during granuloma development. The inductive p40 sub-unit of IL-12 was maximally produced at 6 weeks after infection. The expression was lower but detectable at 9 and 17 weeks post-infection. In NK1.1<sup>+</sup> cell-depleted animals, IL-12 p40 mRNA was significantly reduced at each time point of infection. As reported (14, 36) the IL-12 p35 sub-unit was constitutively expressed at low level and did not show any detectable variation between depleted and non-depleted groups and during infection (data not shown). IL-7 mRNA of CmAb-treated mice was increased at 6 weeks p.i and remained unchanged at 9 and 17 weeks p.i. As described for the IL-12 p40 mRNA, IL-7 expression in infected depleted-mice was also decreased (Fig. 4).

**Cytokine measurements.** As it is well documented that transcript measurements do not accurately correlate with the level of expressed proteins and because early regulatory functions are attributed to NK cells (25, 35), we first analysed the expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 in the sera of animals at each point of the study (Fig. 5). No difference was found between depleted and non-depleted mice. Contrasting to the results from liver RNA, IL-4 production in sera was still elevated at 17 weeks post-infection according to egg induced-type 2 response described previously (17). The TNF levels were determined using the L-929 lytic bioassay. No significant difference was detected between NK1.1<sup>+</sup> cell-depleted and control animals (not shown). In the immunization model using rSm28 GST administration, we noted that NK cell depletion failed also to modify expression of IFN- $\gamma$ , IL-4 and TNF- $\alpha$  (not shown).

**Antigen-specific antibodies.** Infected mice developed a predominantly IgG1 response towards adult worm antigens (SWAP) and egg antigens (SEA) whereas the IgG2a response for both antigens was lower (27 and Fig. 6). The isotype profile of antigen-specific antibody response was comparable in control and NK cell-depleted animals. Antigen-specific antibody patterns of Sm28GST-immunized mice were unaltered by NK1.1<sup>+</sup> cell depletion (not shown).

## DISCUSSION

By demonstrating that NK1.1<sup>+</sup> cell depletion increased hepatic collagen content during schistosomiasis, the present study provides evidence for NK cell regulation of liver pathology. This NK cell-induced regulation was further supported by the Sm28 GST-immunization model where hepatic fibrosis is normally reduced by Sm28 GST injection. In this context, NK1.1<sup>+</sup> cell depletion attenuated the protective effect as an increase of hepatic collagen content was observed.

The augmentation of hepatic fibrosis was not related to an increased number of parasite worms or eggs entrapped in livers as both depleted and non-depleted animals exhibited identical worm and hepatic egg burden. This observation was in accordance with a previous report showing a decrease of NK cell cytotoxicity during infection (1), that did not support a direct cytotoxic role for NK cells against the worms.

The level of fibrosis in NK1.1<sup>+</sup> cell-depleted and control animals was similar at the beginning of the granulomatous reaction but were significantly different at later stages. This observation is relevant with the current assumption that the asynchronous hepatic granulomas that form around continuously arriving eggs are less sensitive than pulmonary counterparts to immunoregulatory treatments (13). It is so conceivable that NK cell depletion might contribute to modifications reflected in the later stages of granuloma formation.

Wynn et al. (44) showed that the increase of the pulmonary granuloma size associated with anti-asialo GM1, anti-IL12 and anti-IFN- $\gamma$  treatments was linked to diminished IFN- $\gamma$  production and increased IL-4 mRNA expression. In our model, no alteration of IFN- $\gamma$  and IL-4 expressions was observed following NK1.1<sup>+</sup> cell depletion. Moreover, the lack of modification of IL-4 production in anti-NK1.1<sup>+</sup> treated mice rules out, in accordance with Sabin et al (34), the hypothesis of a participation of NK1.1<sup>+</sup> T cells as major inducers of granulomatous reaction through IL-4 production. TGF- $\beta$  expression that may cause excessive collagen synthesis (9) was also unaltered by NK cell depletion (not shown). We studied the mRNA expression of fibrosin, suspected to be the fibroblast-stimulating factor-1

(FsF-1) produced by granuloma CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and recently cloned (32). In our experimental conditions, we amplified a product that was expressed constitutively in liver and was not modified neither by infection nor by NK cell depletion (not shown). Thus, at this time, the mechanisms related to the up-regulation of collagen production in anti-NK1.1<sup>+</sup> treated mice remain unclear.

We have shown in accordance with others (14, 44) that NK cell depletion led to the down-regulation of IL-12 p40 mRNA expression. Gazzinelli et al. (14) reported that IL-12 p40 mRNA synthesis by *T. gondii* antigen-stimulated macrophages was markedly augmented with exposure to exogenous IFN- $\gamma$ . Wynn et al. (44) observed that anti-asialo-GM1 or anti-IFN- $\gamma$  treatments completely blocked the increased p40 mRNA expression in the pulmonary granuloma model. This effect was observed during the 14-day long granuloma development and despite IFN- $\gamma$  production (though diminished compared to untreated-animals). We noted that down-regulation of IL-12 p40 mRNA expression in the livers of depleted-mice was maintained during the 120-day long study, in parallel with NK1.1 cell elimination, despite IFN- $\gamma$  production by other sources. This could indicate a primary role for NK cells and/or NK cell-derived IFN- $\gamma$  in inducing IL-12 expression. This NK cell-associated regulation of p40 mRNA transcription was relevant to normal conditions as uninfected-depleted animals did not express IL-12 p40 mRNA (not shown). IL-7 mRNA expression was also down-regulated in NK cell depleted animals, indicating that NK cells might be also directly involved in IL-7 regulation. As both IL-12 (21) and IL-7 (23) are NK cell-activating factors, these observations might imply that NK cells directly controlled the expression of their own activating factors by the release of particular products and/or by direct contact with the producing cells. Absence or down-regulated expression of IL-12 p40 and/or IL-7 in NK1.1<sup>+</sup> cell-depleted mice might contribute to increase the collagen levels by modifying subsequent regulation pathways.

As NK cell depletion was maintained through infection, we investigated the consequences on systemic immune responses. NK1.1<sup>+</sup> cell depletion failed to modify the sera levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-4. Humoral response in both groups was unchanged, in agreement

with a recent work (42) which shows that *in vivo* depletion of NK cells did not alter antigen-specific antibody responses in both T-independent and T-dependent activation. These results might suggest that absence of NK cells was compensated by alternative regulatory pathways. Immune response is mainly under the control of T lymphocytes in immunocompetent mice. So NK cells that represent a minor cell population in lymphoid organs do not likely exert direct influence on systemic response but, relative to their significant number in liver (designated as pit-cells), could rather participate to local hepatic regulation. Indeed, liver NK cells have been shown to display antitumor (43) and antiviral functions (4) and control hepatocyte proliferation during regeneration after partial hepatectomy (19). We observed, in some experiments, that the collagen content from uninfected anti-NK1.1 treated mice was higher than that from uninfected CmAb-treated mice (not shown) suggesting that NK cells could also participate to the control of collagen production under normal conditions.

The study presented here was made possible as we did not observe any apparent secondary effect or health degradation related to multiple *in vivo* injections of antibodies, after more than 15 weeks of treatment. On the other hand, we had expected to investigate the effects of NK cell activation on schistosomiasis infection and in particular liver fibrosis, using poly IC treatment (11). This experiment was aborted as we noted that repeated injections of poly-IC (50 µg/mouse, 2 injections per week) provoked after 8 weeks of treatment, anemia and locomotion troubles in normal mice that were amplified by infection (C.A. unpublished results).

Numerous works have reported the role of NK cells in the control of bacterial (12, 33), protozoal (5, 22) and viral (4, 28) infections mediated by intracellular organisms. The functions of NK cells are generally assessed in acute infections and in early innate immune response before specific immunity takes place. Others studies which define the effects of IL-12 therapy (18, 45) or IL-12 neutralisation (14, 39) address indirectly the role of NK cells. Besides conventional mice, T-cell-immunodeficient mice are also frequently used (10, 41), although these mice display modified NK cell functions. The present results were provided

by a different approach. Studying a chronic infection developed in immunocompetent mice, we demonstrated a local hepatic regulatory activity for NK cells that was independent of a global modification of cytokine production.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Jean-Loup Neyrinck for advices about statistical analysis, Lucette Meunier for help with histology, and Dr. Phil Sutton for reviewing the manuscript.

This work was supported by CNRS and Institut Pasteur and received financial assistance from IFR 17.

## REFERENCES

1. Abe, T., J. T. Forbes, and D. G. Colley. 1983. Natural killer cell activity during murine schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* **69**: 1001-1005.
2. Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins. 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. **260**: 2345-2354.
3. Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Recto, D. Ritter, and J. H. McKerrow. 1992. Tumor necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature.* **356**: 604-607.
4. Bukowski, J. F., J. F. Warner, G. Dennert, and R. M. Welsch. 1983. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis *in vivo*. *J. Immunol.* **131**: 1531-1538.
5. Cardillo, F., J. C. Voltarelli, S. G. Reed, and J. S. Silva. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. *Infect. Immun.* **64**: 128-134.
6. Cheever, A. W., F. D. Finkelman, P. Caspar, S. Hieny, J. G. Macedonia, and A. Sher. 1992. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.* **148**: 3244-3248.
7. Cheever, A. W., M. E. Williams, T. A. Wynn, F. D. Finkelman, R. A. Seder, T. M. Cox, S. Hieny, P. Caspar, and A. Sher. 1994. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.* **153**: 753-759.
8. Czaja, M. J., F. R. Weiner, S. Takahashi, M. A. Giambrone, P. H. Van der Meide, H. Schellekens, L. Biempica, and M. A. Zern. 1989.  $\gamma$ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* **10**: 795-800.
9. Czaja, M. J., F. R. Weiner, K. C. Flanders, M. A. Giambrone, R. Wind, L. Biempica, and M. A. Zern. 1989. *In vitro* and *in vivo* association of transforming growth factor- $\beta$ 1 with hepatic fibrosis. *J. Cell. Biol.* **108**: 2477-2482.
10. Denkers, E. Y., R. T. Gazzinelli, D. Martin, and A. Sher. 1993. Emergence of NK1.1<sup>+</sup> cells as effectors of IFN- $\gamma$  dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J. Exp. Med.* **178**: 1465-1472.
11. Djeu, J. Y., J. A. Heinbaugh, H. T. Holden, and R. B. Herberman. 1979. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* **122**: 175-181.

12. **Dunn, P. L., and R. J. North.** 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* **59**: 2892-2900.
13. **Eltoum, I. A., T. A. Wynn, R. W. Poindexter, F. D. Finkelman, F. A. Lewis, A. Sher, and A. W. Cheever.** 1995. Suppressive effect of interleukin-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared with those around eggs laid in infected mice. *Infect. Immun.* **63**: 2532-2536.
14. **Gazzinelli, R. T., S. Hieny, T. A. Wynn, S. Wolf, and A. Sher.** 1993. Interleukine 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 6115-6119.
15. **Giorda, R., E. P. Weisberg, and M. Trucco.** 1992. Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1. *J. Immunol.* **149**: 1957-1963.
16. **Glimcher, L., F. W. Shen, and H. Cantor.** 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.* **145**: 1-9.
17. **Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Hieny, F. Lewis, and A. Sher.** 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **146**: 1322-1327.
18. **Heinzel, F. P., D. S. Schoenhaut, R. M. Rerko, L. E. Rosser, and M. K. Gately.** 1993. Recombinant interleukine 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**: 1505-1509.
19. **Itoh, H., T. Abo, S. Sugawara, A. Kanno, and K. Kumagai.** 1988. Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regenerating hepatocytes. *J. Immunol.* **141**: 315-323.
20. **James, S. L.** 1986. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *J. Immunol.* **136**: 3872-3877.
21. **Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri.** 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845.
22. **Laskay, T., M. Röllinghoff, and W. Solbach.** 1993. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2237-2241.
23. **Lynch, D. H., and R. E. Miller.** 1990. Induction of murine lymphokine-activated killer cells by recombinant IL-7. *J. Immunol.* **145**: 1983-1990.
24. **MacDonald, H. R.** 1995. NK1.1<sup>+</sup> T cell receptor- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> cells: new clues to their origin, specificity, and functions. *J. Exp. Med.* **182**: 633-638.
25. **Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani.** 1993. Natural killer cell stimulatory factor

- (interleukine 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177** : 1199-1204.
26. **Mountford, A. P., P. S. Coulson, R. M. Pemberton, L. E. Smythies, and R. A. Wilson.** 1992. The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunol.* **75**: 250-256.
  27. **Mountford, A. P., A. Fisher, and R. A. Wilson.** 1994. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **16**: 521-527.
  28. **Orange, J. S., B. P. Wang, C. Terhorst, and C. A. Biron.** 1995. Requirement for natural killer cell-produced interferon  $\gamma$  in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* **182**: 1045-1056.
  29. **Pancré, V., M. Joseph, C. Mazingue, J. Wietzerbin, A. Capron, and C. Auriault.** 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: Role of interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.* **138**: 4490-4495.
  30. **Pancré, V., I. Wolowczuk, S. Guerret, M. C. Copin, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault.** 1994. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: Role of gamma interferon. *Infect. Immun.* **62**: 3723-3730.
  31. **Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis, and A. Sher.** 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **173**: 159-166.
  32. **Prakash, S., P. W. Robbins, and D. J. Wyler.** 1995. Cloning and analysis of murine cDNA that encodes a fibrogenic lymphokine, fibrosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 2154-2158.
  33. **Ramarathinam, L., D. W. Niesel, and G. R. Klimpel.** 1993. *Salmonella typhimurium* induces IFN- $\gamma$  production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J. Immunol.* **150**: 3973-3981.
  34. **Sabin, E. A., and E. J. Pearce.** 1995. Early IL-4 production by non-CD4<sup>+</sup> cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.* **155**: 4844-4853.
  35. **Scharton, T. M., and P. Scott.** 1993. Natural killer cells are a source of interferon- $\gamma$  that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* **178**: 567-577.
  36. **Schoenhaut, D.S., A. O. Chua, A. G. Wolitzky, P. M. Quinn, C. M. Dwyer, W. McComas, P. C. Familletti, M. K. Gately, and U. Gubler.** 1992. Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* **148**: 3433-3440.
  37. **Seaman, W. E., M. Sleisenger, E. Eriksson, and G. C. Koo.** 1987. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol.* **138**: 4539-4544.

38. **Suttles, J., G. A. Schwarting, and R. D. Stout.** 1986. Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo-GM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **136**: 1586-1591.
39. **Tripp, C. S., M. K. Gately, J. Hakimi, P. Ling, and E. R. Unanue.** 1994. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. *J. Immunol.* **152**: 1883-1887.
40. **Weinstock, J. V., and D. L. Boros.** 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **130**: 418-422.
41. **Wherry, J. C., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue.** 1991. Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in *scid* mice: Roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* **59**: 1709-1715.
42. **Wilder, J. A., C. Y. Koh, and D. Yuan.** 1996. The role of NK cells during *in vivo* antigen-specific antibody responses. *J. Immunol.* **156**: 146-152.
43. **Wiltrout, R. H., R. B. Herberman, S. R. Zhang, M. A. Chirigos, J. R. Ortaldo, K. M. Green, and J. E. Talmadge.** 1985. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastasis in lung and liver. *J. Immunol.* **134**: 4267- 4275.
44. **Wynn, T. A., I. Eltoun, I. P. Oswald, A. W. Cheever, and A. Sher.** 1994. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J. Exp. Med.* **179**: 1551-1561.
45. **Wynn, T. A., A. W. Cheever, D. Jankovic, R. W. Poindexter, P. Caspar, F. A. Lewis, and A. Sher.** 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* **376**: 594-596.
46. **Yoshimoto, T., A. Bendelac, C. Watson, J. Hu-Li, and W. E. Paul.** 1995. Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a T<sub>H</sub>2 response and in immunoglobulin E production. *Science.* **270**: 1845-1847.

## LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. (A) Proportion of NK1.1<sup>+</sup> cells in the hepatic non-parenchymal cell population from uninfected or infected mice treated with control mAb (CmAb) or anti-NK1.1 mAb. Mice received repeated i.p injections throughout infection. Hepatic cells were prepared and stained for cytofluorometric analysis as described in Materials and Methods. Livers of 3-4 animals / group were pooled at each time point. Values represented the means  $\pm$  standard deviations (SD) of two experiments. (B) Hepatic NK1.1 mRNA expression in mice treated with CmAb (left) or anti-NK1.1 mAb (right). Liver samples (3-4 pooled mice / group) were recovered before and 3, 6, 9 and 17 weeks post-infection. A 37-fold amplification was selected.

FIG. 2. Scatter characteristics of the hepatic non-parenchymal cell population recovered from (A) normal mice and (B) 6-week infected animals. Lymphoid population (gate L) represented 55-60% of the analysed cells in normal mice (A) and 32-36% in 6-week infected mice (B) while polymorphonuclear cells (gate E) were 7-9% (A) and 43-46% (B) respectively.

FIG. 3. Hepatic fibrosis of infected CmAb- or anti-NK1.1-treated mice was determined by a colorimetric technique on liver sections. The results (means  $\pm$  SD of 3 -5 individual mice) were expressed as amount of collagen ( $\mu$ g) per milligram of total proteins after subtraction of normal, age-matched mice hepatic collagen content. Data shown are from (A) two infection experiments and (B) an immunization experiment. For this experiment, mice received 50  $\mu$ g of rSm28 GST in the presence of aluminum hydroxide as adjuvant and were challenged with 50 cercariae 1 day after injection, as described (30). Note that this immunization-infection experiment was realized independently of the two infection experiments represented here; hepatic fibrosis of infected versus immunized-infected mice could not be compared.

\*  $p < 0.05$

FIG. 4. Pattern of infection-induced hepatic cytokine mRNA expression. Sample recovery and presentation used are identical to FIG. 1B. Results shown were representative of four PCR reactions performed on two different RT mixtures. Liver mRNA expression of uninfected mAb-treated mice was also controlled at each time point. The baseline levels were not modified compared with those expressed before infection (designed "0" weeks after infection).  $\beta$ -actin, a housekeeping gene was used as an internal standard to confirm that equal quantities of mRNA were utilized in the RT-PCR. The number of PCR cycles performed for each product was as follows : 23 cycles ( $\beta$ -actin), 36 cycles (IL-7 and TNF- $\alpha$ ), 37 cycles (IL-4), 38 cycles (IFN- $\gamma$ ) and 42 cycles (IL-12 p40).

FIG. 5. IL-4 and IFN- $\gamma$  expression in sera from CmAb or anti-NK1.1-treated, normal or infected animals. Mice were bled before (not shown) and at 3, 6, 9 and 17 weeks post-infection. Pooled sera from 3-4 mice / group were tested using cytokine-specific two-site ELISAs. Graphs were representative of three infection experiments. Values were the means  $\pm$  SD of duplicate reactions. Maximal O.D according to standard curves represented about 600 pg/ml for IL-4 and 6 ng/ml for IFN- $\gamma$ .

FIG. 6. Serum levels of IgG1 (A) and IgG2a (B) antibodies directed against adult worm (SWAP) and egg (SEA) soluble antigens. Samples were collected as indicated for FIG. 5. 1:200 dilution or 1:1000 dilution of sera were used to assay SWAP and SEA-specific Ab respectively. Sera from uninfected CmAb or anti-NK1.1 treated-mice were recovered during the course of infection (not shown). The baseline levels were unchanged compared with values obtained from sera at the beginning of treatment ("0" weeks after infection). Results (means  $\pm$  SD of duplicate reactions) were representative of three infection experiments.

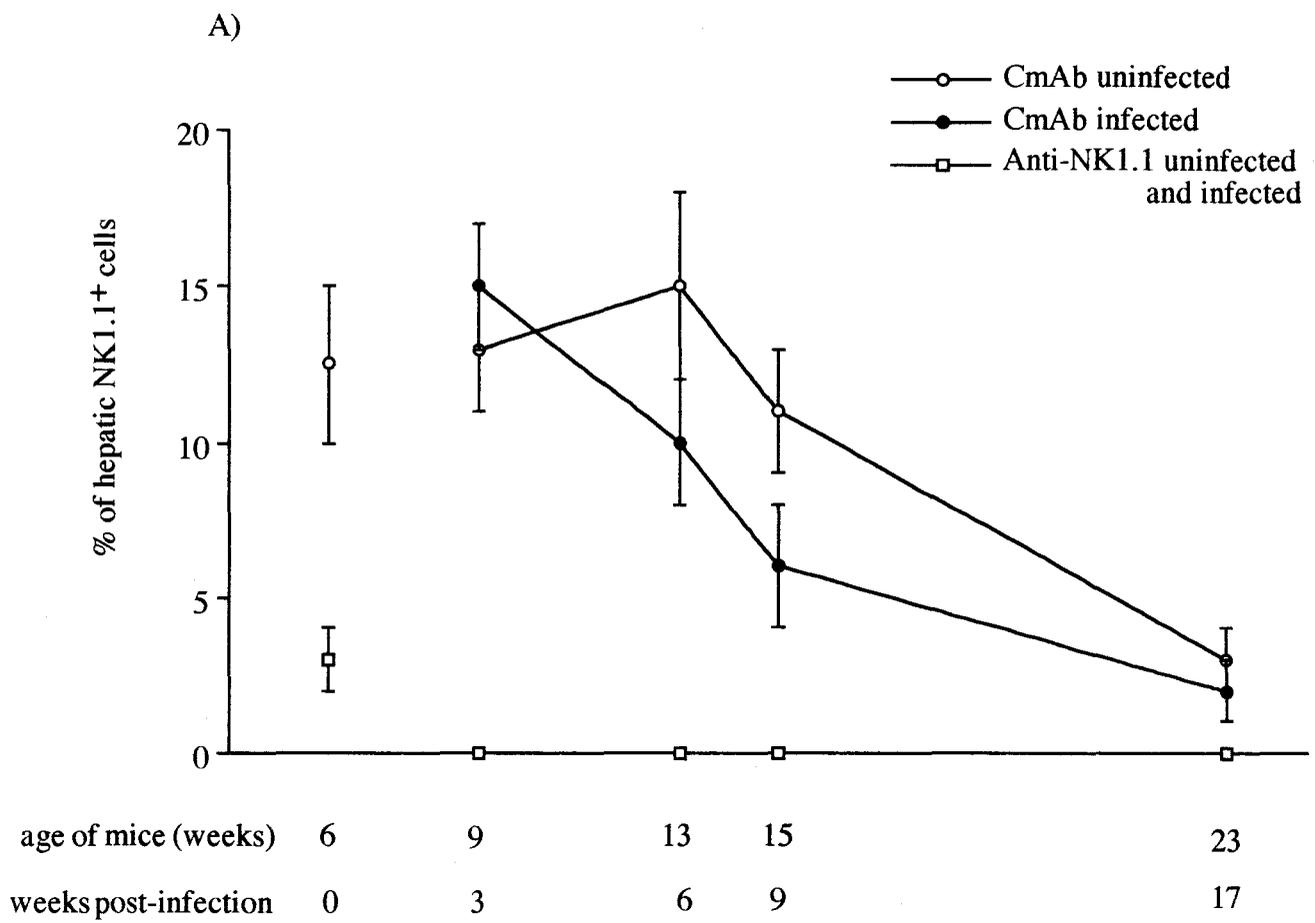


FIG. 1.

B)

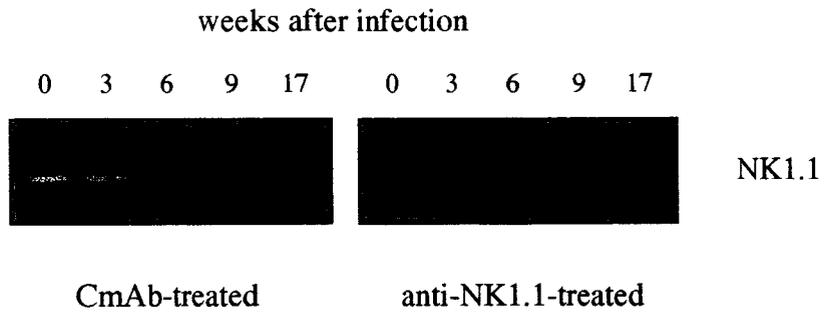
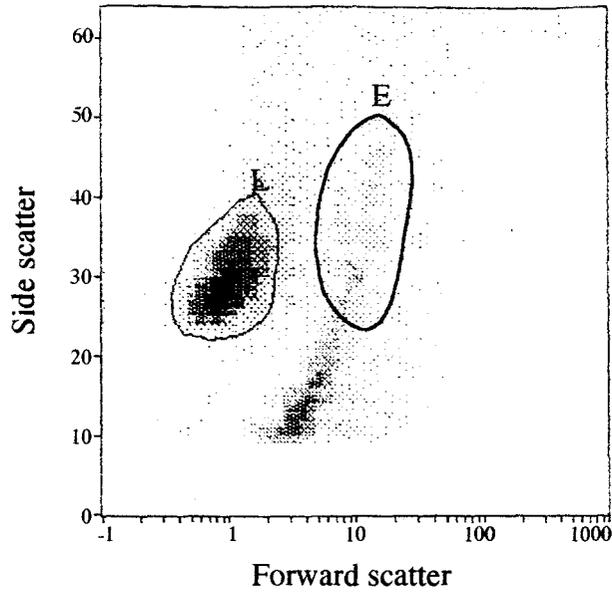


FIG. 1

A)



B)

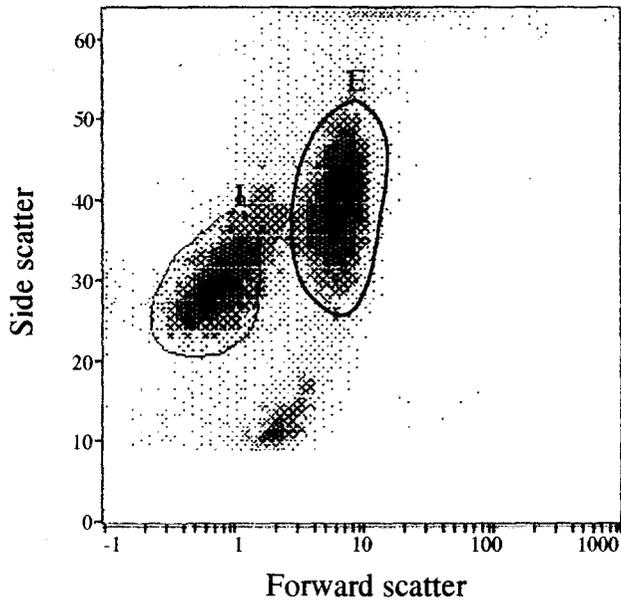


FIG. 2.

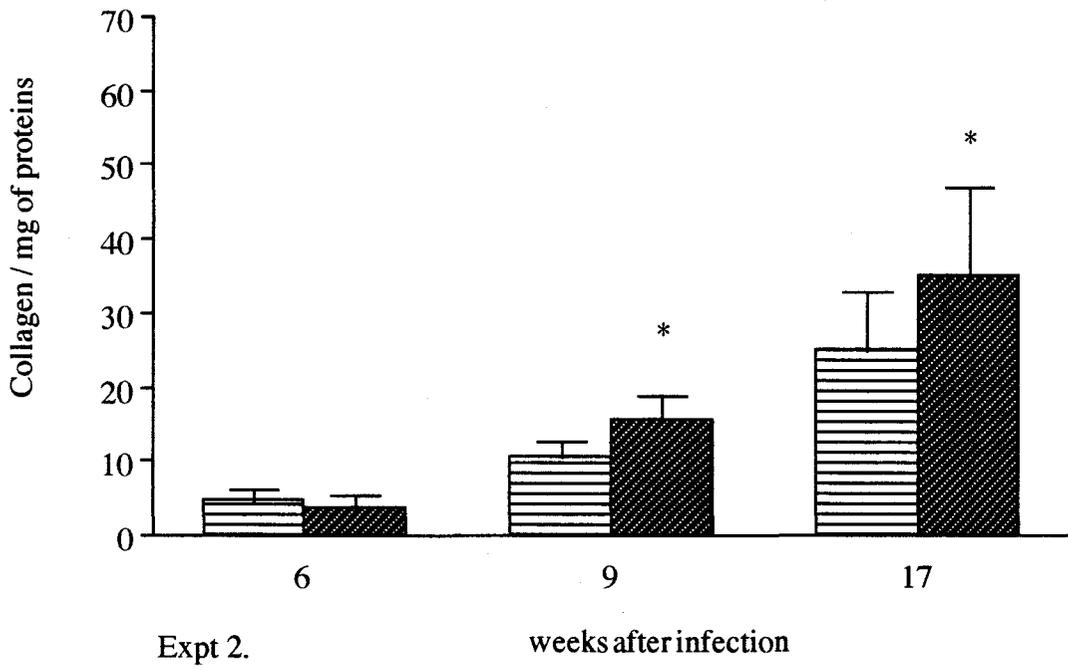
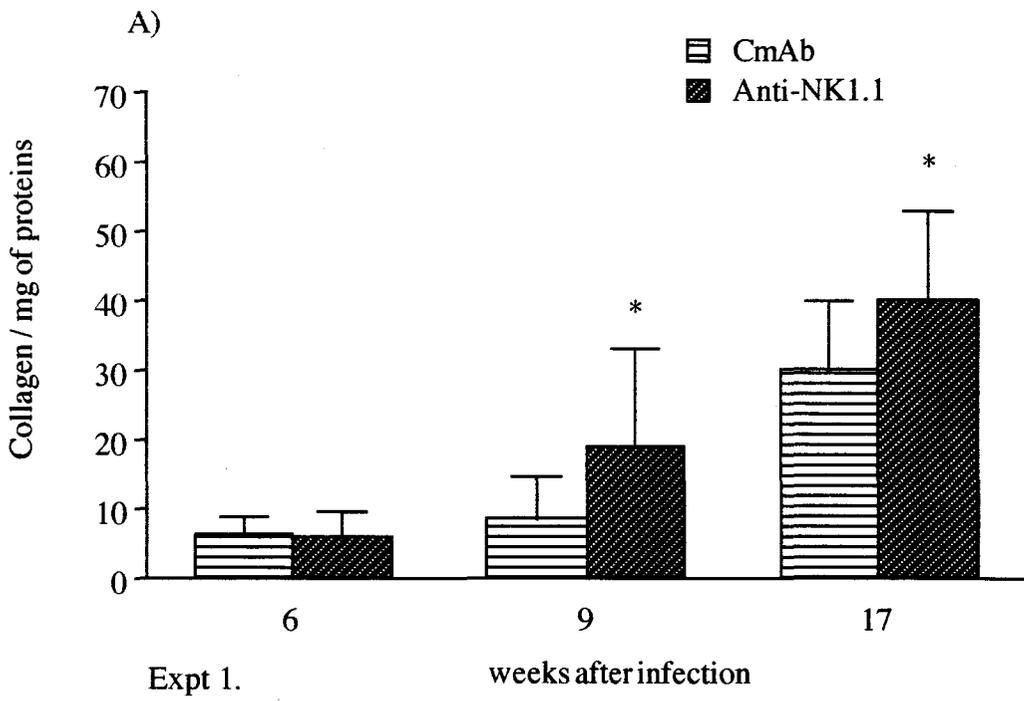


FIG. 3.

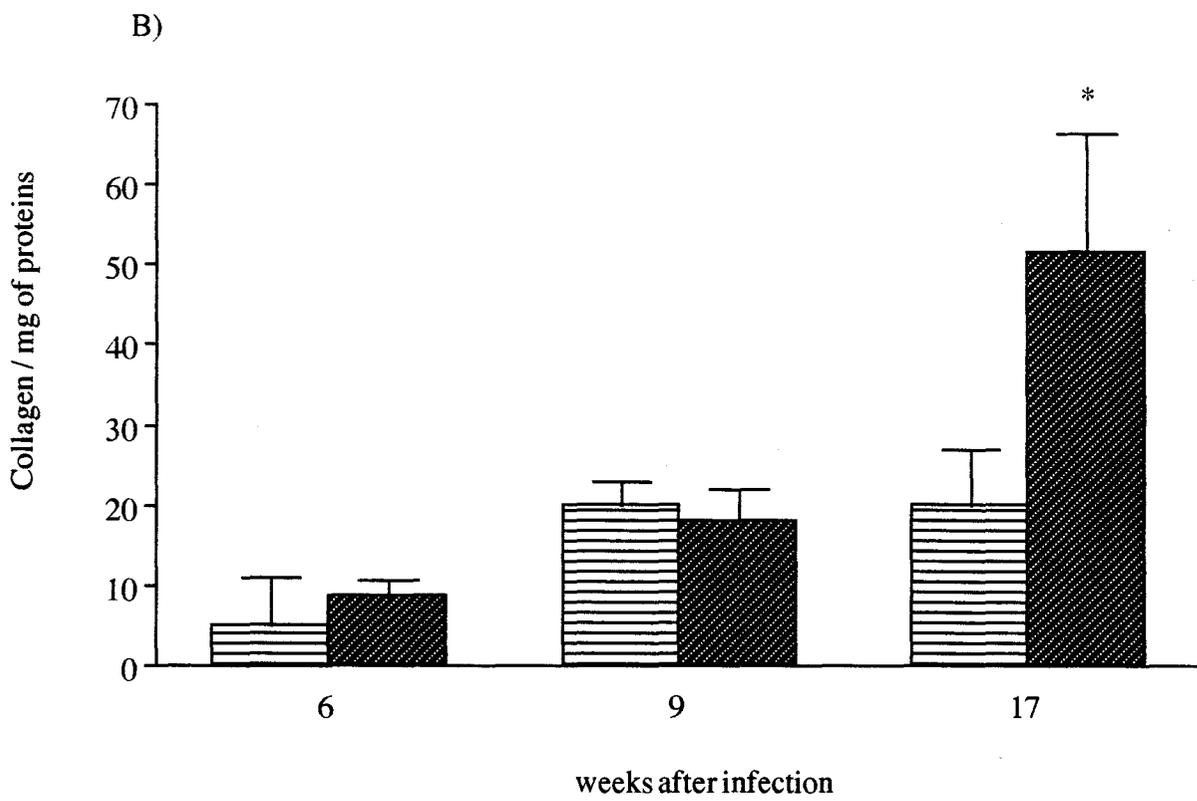


FIG. 3.

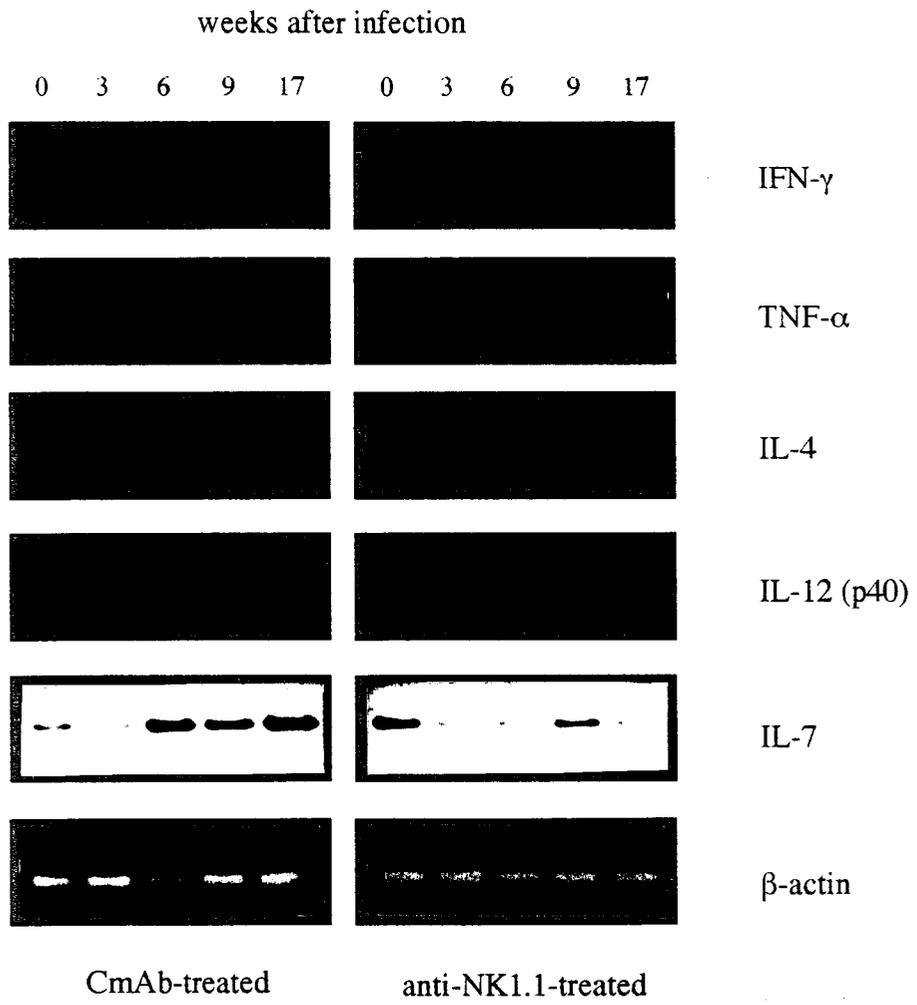


FIG. 4.

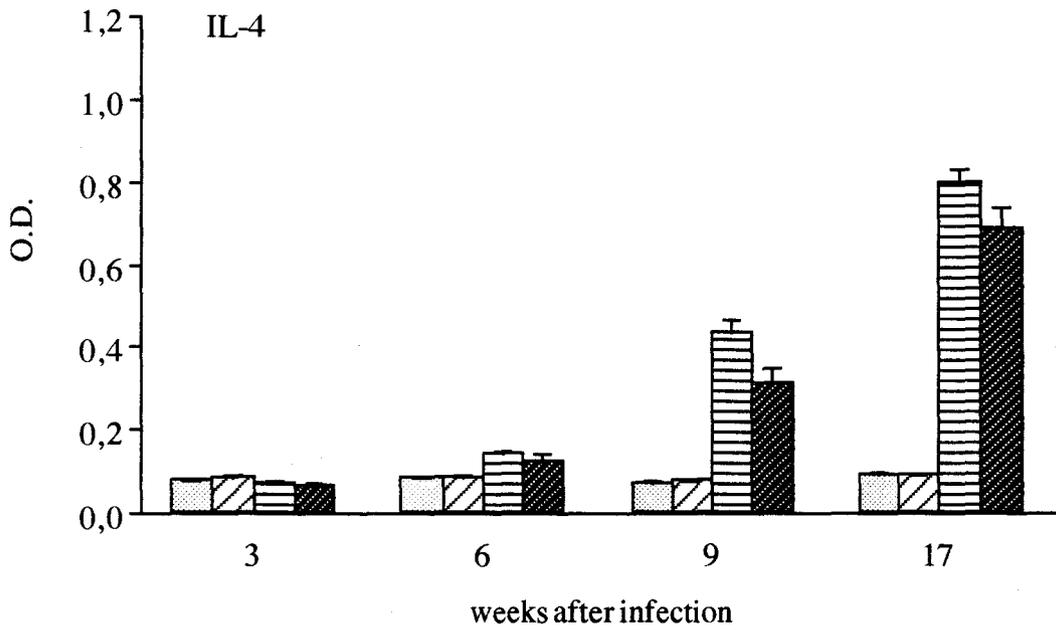
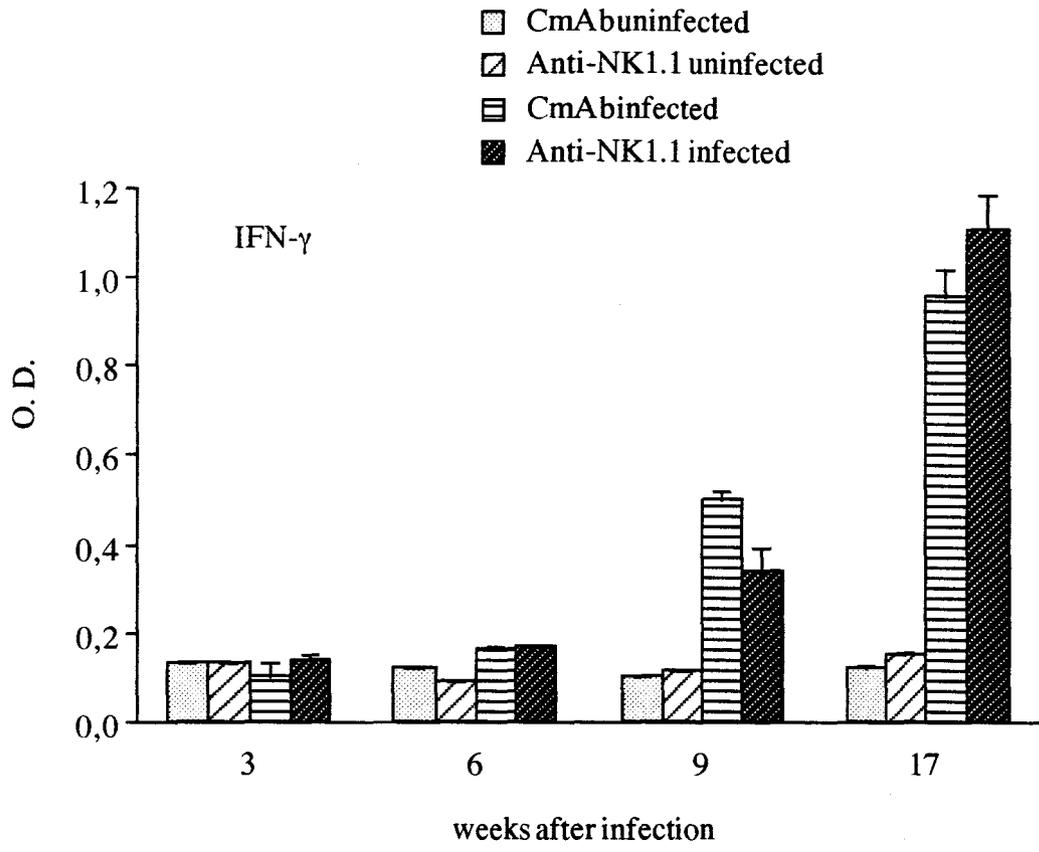


FIG. 5.

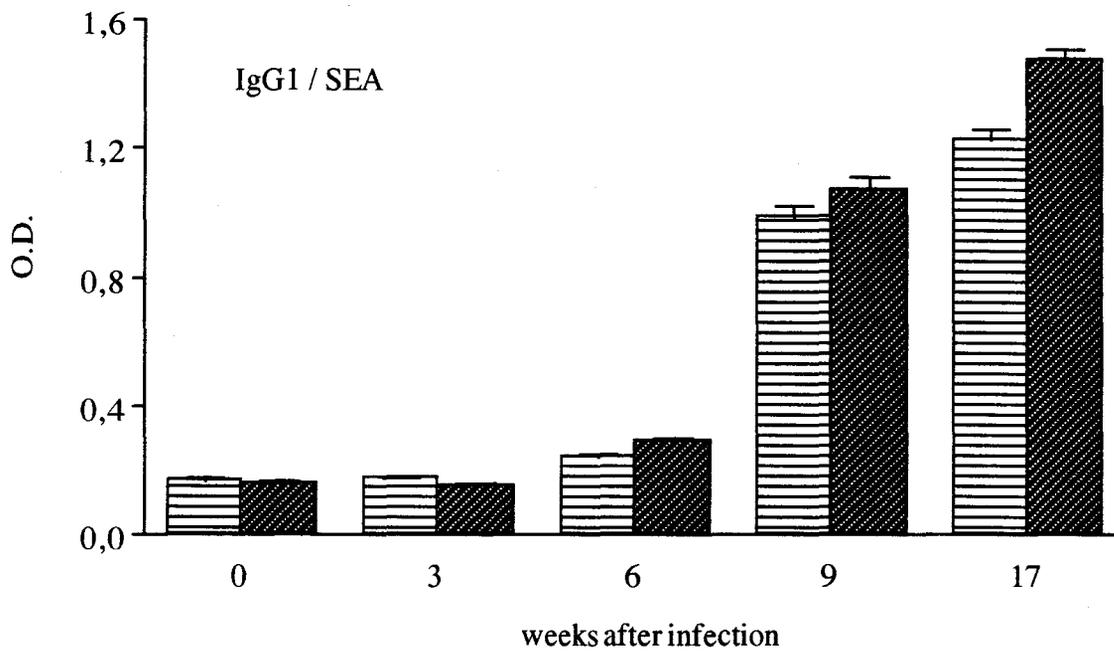
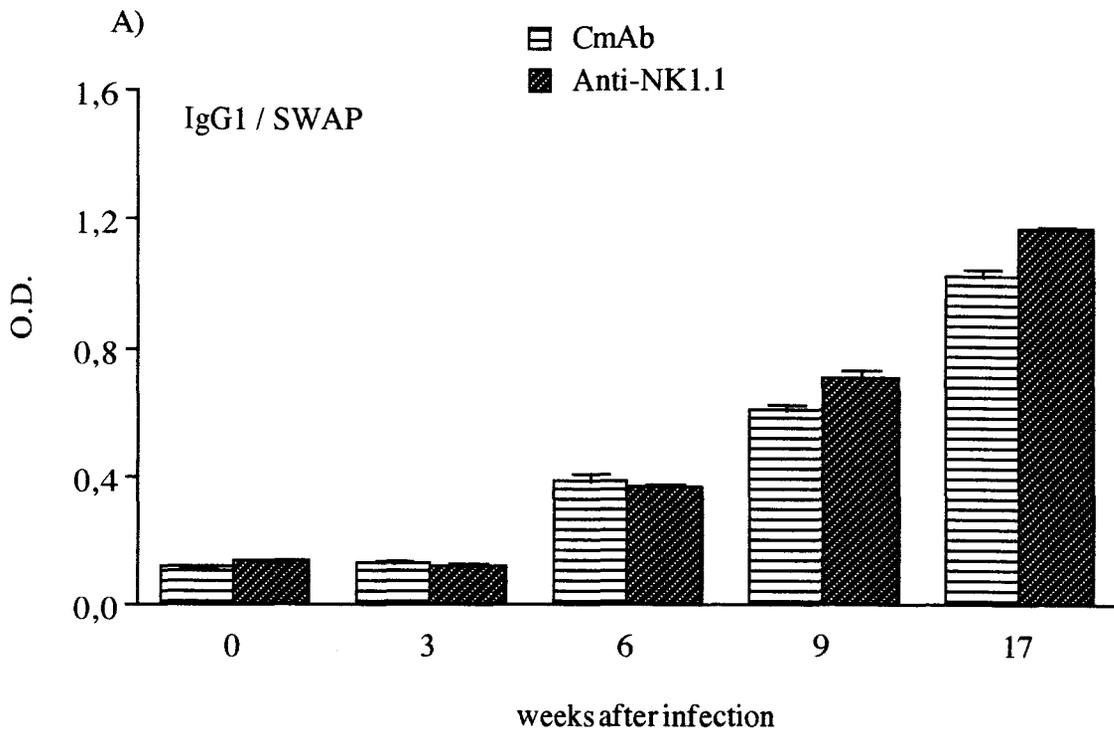


FIG. 6.

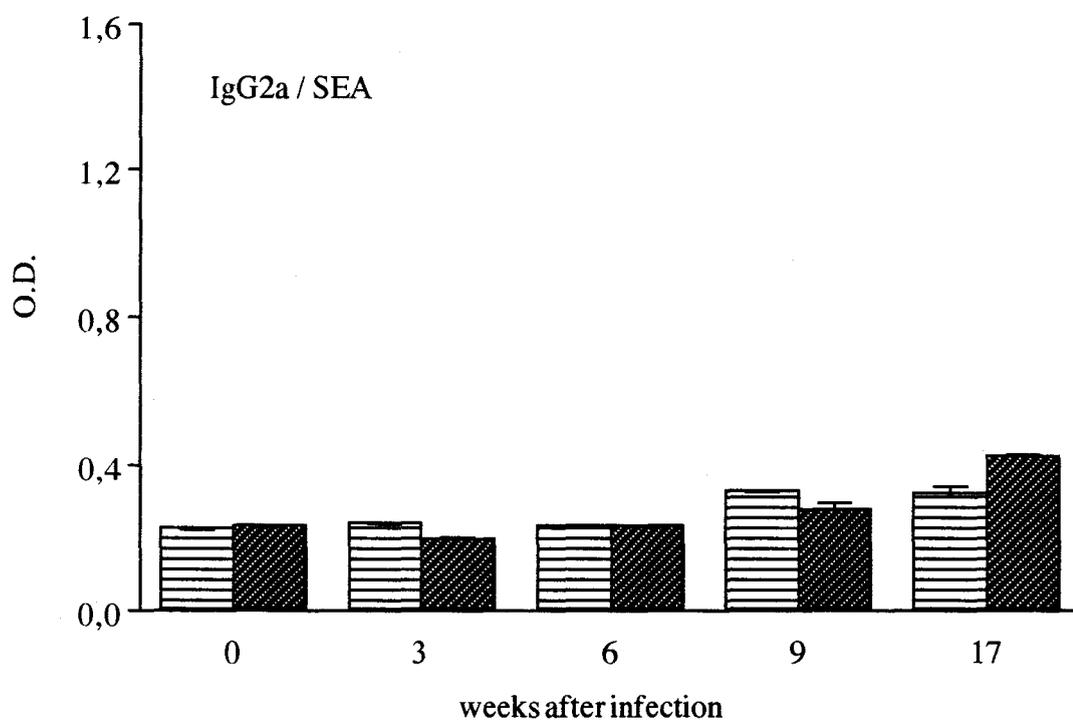
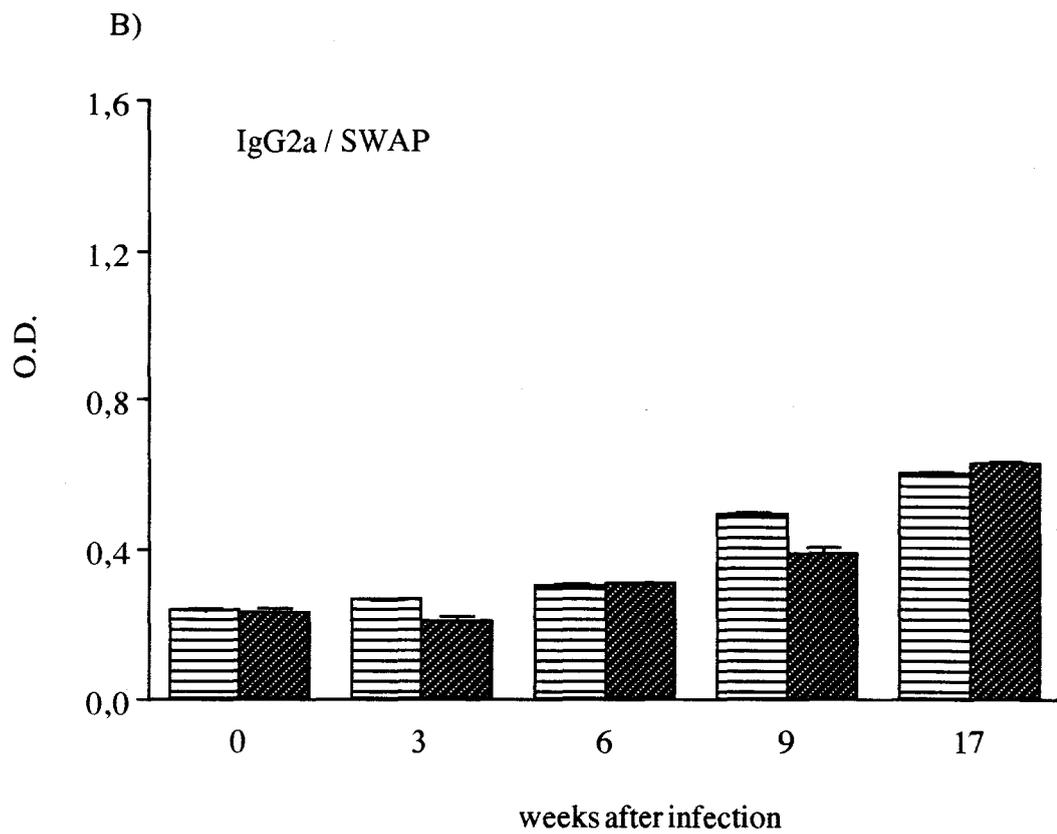


FIG. 6.

La question qui reste posée à la suite de ce travail concerne les mécanismes de régulation associés à l'augmentation de la quantité de collagène hépatique chez les animaux déplétés. Bien que la déplétion n'altère pas l'expression des ARN messagers de l'IFN- $\gamma$  dans le foie et de la protéine dans les sera, on peut légitimement envisager que la présence des autres composantes cellulaires, en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, en nombre beaucoup plus élevé, ait pu "masquer" le déficit lié à l'absence des cellules NK. L'augmentation de la fibrose associée à l'élimination des cellules NK pourrait être liée à un manque local d'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, la diminution de l'expression de l'IL-7 et de la sous-unité p40 régulatrice de l'IL-12 observée chez les animaux déplétés (par des mécanismes qui restent à définir) peut également indirectement conduire à une diminution de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T (Kasper et coll. 1995; Kobayashi et coll. 1989).

Pour tester la possibilité de production directe d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK, il était intéressant de co-localiser l'expression de la cytokine et la présence des cellules NK1.1<sup>+</sup> au niveau des granulomes hépatiques par immunomarquage. L'IFN- $\gamma$  étant une protéine instable, nous avons choisi d'utiliser des coupes réalisées à partir d'organes congelés. Les techniques d'immunomarquage, d'exécution simple, nécessitent cependant une mise au point importante tenant compte de l'organe, des anticorps et du système de révélation utilisés. En ce qui concerne ce dernier point, sachant que les oeufs du parasite émettent une fluorescence intrinsèque importante, les systèmes enzymatiques colorimétriques, dont les plus sensibles sont la phosphatase alcaline et la peroxydase, convenaient mieux. Nous avons choisi, compte-tenu des exemples fournis dans la littérature, d'utiliser le système peroxydase. Cependant, la présence de nombreuses cellules inflammatoires synthétisant des quantités importantes de cet enzyme s'est avérée préjudiciable à la spécificité des signaux obtenus. Malgré diverses techniques de fixation de la coupe (utilisant le paraformaldéhyde ou l'acétone) et des incubations prolongées en eau oxygénée de 0.3 à 3 %, nous n'avons pas réussi à limiter le bruit de fond. A ce problème, qui peut être contourné en utilisant la phosphatase alcaline, s'ajoute la fixation non-spécifique des anticorps, vraisemblablement à

la matrice extracellulaire abondante autour des oeufs, puisque l'emploi d'anticorps "épuisés" sur la souris (i.e ne reconnaissant pas d'épitopes murins) n'a pas amélioré le marquage. L'utilisation d'organes fixés dans la solution de Bouin présente le même type de marquage non-spécifique, à un degré légèrement inférieur, mais cette méthode de fixation peut dégrader les structures antigéniques et en particulier l'IFN- $\gamma$ .

Récemment nous avons noté l'existence d'une technique appliquée sur foie de souris infectées (Lazou et coll. 1993). Identique pour l'essentiel à la méthode que nous employons, ce protocole remplace l'eau oxygénée par de l'acide périodique et du borohydrure de sodium pour, respectivement, inactiver l'activité peroxydase endogène et réduire les produits d'oxydation. Cette technique est à tester.

Parallèlement à cette technique de co-localisation par immunomarquage, un protocole de double marquage {cytokine - récepteur membranaire} appliqué à l'analyse par cytofluorométrie a retenu notre attention (Assenmacher et coll. 1994). Ces auteurs détectent 20% de cellules CD4<sup>+</sup> exprimant de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par superantigène pendant 6 jours et restimulation mitogène + anti-CD3. Nous avons effectué des premiers essais sur des cellules spléniques enrichies en cellules T et stimulées par du LPS pendant 24 heures. Les marqueurs utilisés nous ont permis de déceler parmi 32% de cellules CD4<sup>+</sup>, 5 à 6% de cellules également positives pour l'IFN- $\gamma$ . Ce résultat est concordant avec les pourcentages présentés précédemment, compte-tenu du temps d'activation inférieur. Appliquée à des préparations de cellules spléniques enrichies en cellules NK, cette technique n'a pas révélé de cellules double positives NK1.1<sup>+</sup> / IFN- $\gamma$ . Le temps nécessaire à la préparation de ces cellules peut nuire à la conservation de l'IFN- $\gamma$  et expliquer ce résultat. Il est également très probable que les cellules doublement marquées soient rares (compte-tenu du pourcentage relativement faible de cellules exprimant de l'IFN- $\gamma$  dans une population pourtant activée à cet effet) et échappent à la détection du cytofluoromètre. Ces techniques réalisées sur cellules spléniques n'ont pas été effectuées sur les cellules non-parenchymateuses du foie pour les

mêmes raisons de temps de préparation des cellules auquel s'ajoutent les traitements enzymatiques nécessaires à la dispersion des cellules des granulomes.

Ces restrictions techniques expliquent pourquoi la production *in situ* d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK n'a pas été établie.

DISCUSSION, CONCLUSION

Seul le second article sera discuté dans ce chapitre puisque le travail concernant l'ubiquitine, poursuivi après l'année de DEA en vue de sa publication, n'a pas été suffisamment prolongé pour apporter des éléments nouveaux aux résultats déjà obtenus.

Les observations que nous avons réalisées suite à la déplétion des cellules NK1.1 au cours de l'infection expérimentale par *S. mansoni* permettent d'avancer les remarques suivantes.

➤ Les cellules NK ne contrôlent vraisemblablement pas la charge parasitaire dans la mesure où leur élimination n'altère pas le nombre de parasites, ni la quantité d'oeufs produits. Ceci est à mettre en parallèle avec les travaux montrant que l'infection n'augmente pas la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules-cibles YAC (Abe et coll. 1983). Par ailleurs, bien que les cellules NK participent à des réactions d'ADCC, la cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis des schistosomules *in vitro* n'a jamais été mise en évidence.

➤ La déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> au cours de la schistosomiase induit une **augmentation de la quantité de collagène hépatique**. Une régulation identique est également observée dans un modèle d'immunisation où la fibrose est normalement diminuée par l'injection de la protéine Sm28 GST. Dans ce contexte, la déplétion NK1.1 atténue l'effet protecteur de l'immunisation en augmentant la fibrose hépatique.

Dans notre étude, l'augmentation de la fibrose liée à l'injection d'anti-NK1.1 n'apparaît pas en phase précoce de la réaction granulomateuse mais 60 jours après l'infection, une fois que la réaction est parfaitement établie. Cette observation est consistante avec des travaux montrant que les granulomes hépatiques naturels sont moins sensibles aux traitements immunorégulateurs que les granulomes artificiels pulmonaires (Eltoum et coll. 1995). Wynn et coll. (1994), à ce titre, montrent que l'effet exacerbateur de l'injection d'anti-asialoGM1 dans le modèle pulmonaire est visible dès l'initiation de la réaction. L'effet tardif que nous

observons pourrait également indiquer que les cellules NK peuvent être impliquées dans des réactions autres que l'immunité précoce.

➤ **L'étude des cytokines qui interviennent dans la formation des granulomes et la fibrose** a montré que l'élimination des cellules NK1.1<sup>+</sup>, dans notre modèle, ne modifie pas de façon détectable l'expression d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-4.

Des travaux récents ont mis en évidence que la population NK1.1<sup>+</sup> hépatique contient une proportion importante de cellules T  $\alpha\beta$  (Ohteki et coll. 1994). Les cellules T CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> présentes dans la rate sont des cellules productrices d'IL-4 (Yoshimoto et coll. 1994). S'il en avait été de même pour les cellules hépatiques, la déplétion aurait pu engendrer un déficit en IL-4 et globalement une réduction de la fibrose. Dans la mesure où nous avons obtenu un effet opposé et sachant que, par ailleurs, l'injection d'IL-12 augmente la cytotoxicité des cellules T NK1.1<sup>+</sup> hépatiques (Hashimoto et coll. 1995), ces cellules présentent de toute évidence une fonction NK.

L'expression de l'IL-7 et de la sous-unité p40 régulatrice de l'IL-12 est diminuée parallèlement à la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup>. Cette observation suggère que la présence des cellules NK est nécessaire à l'expression de ces cytokines. Comme nous l'avons déjà signalé à la suite de l'article 2, l'absence de ces deux facteurs pourrait indirectement modifier des mécanismes régulateurs qui conduisent à l'augmentation de la synthèse de collagène.

➤ **La réponse systémique** étudiée dans les serums indique que la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup> n'a pas d'incidence détectable sur la production de cytokines et d'anticorps spécifiques. Ce résultat est prévisible si on considère la faible proportion de cellules NK en regard des cellules T et B qui demeurent les principaux acteurs de la réponse immune chez les animaux immunocompétents. Le profil isotypique des IgG spécifiques des antigènes de vers ou des antigènes d'œufs n'est pas non plus modifié, en accord avec une étude récente

(Wilder et coll. 1996) montrant que l'élimination des cellules NK1.1<sup>+</sup> *in vivo* n'altère pas la réponse humorale IgG2a, IgG1 et IgG3 dans deux modèles de stimulation, T-dépendant et T-indépendant.

Dans les conditions expérimentales citées, le rôle des cellules NK1.1 dans la réponse humorale n'est pas prépondérant. De plus, l'injection d'anticorps anti-NK1.1 ne modifie pas le nombre de cellules T et B spléniques (la population B (B220<sup>+</sup>) est augmentée après 4 semaines de traitement mais de façon transitoire tandis que la population T (L3T4 et Ly-2) reste inchangée; Seaman et coll. 1987); le traitement n'a donc pas de conséquences indirectes qui seraient liées non pas à l'élimination des cellules NK1.1 mais à la prolifération ou à la disparition d'autres populations cellulaires.

Notre travail met en évidence une participation locale des cellules NK au niveau du foie. Cette intervention est également vérifiée à un niveau de base, puisque nous avons observé que la quantité de collagène hépatique normalement produit par les animaux sains est dans certain cas augmentée par la déplétion des cellules NK1.1<sup>+</sup>.

Par ailleurs, bien que le traitement ait été poursuivi durant toute la période d'infection, la réponse immunitaire générale des animaux infectés n'a pas été modifiée.

D'une façon générale, il convient de noter ici que l'infection expérimentale par *S. mansoni* est relativement "insensible" aux traitements immunorégulateurs ou aux déficits immunitaires. Les exceptions observées concernent: 1- les souris dépourvues de cellules T  $\alpha\beta$  qui présentent une charge parasitaire plus élevée et un taux de survie inférieur (Amiri et coll. 1992), et 2- le traitement par des doses élevées d'anticorps anti-IgE qui au contraire entraîne chez la souris une diminution de la charge parasitaire et de la production d'œufs (Amiri et coll. 1994). Par contre, nous avons signalé que l'infection et la réaction granulomateuse se développent normalement chez les souris déficientes en cellules T  $\gamma\delta$  (Iacomini et coll. 1995). Il en est sensiblement de même avec les souris déplétées en lymphocytes B (Cheever et coll. 1985). Des observations analogues ont été rapportées

concernant l'infection par *S. mansoni* de souris génétiquement modifiées n'exprimant pas d'IFN- $\gamma$  (Amiri et coll. 1994) ou son récepteur (Akhiani et coll. 1996). Dans les deux modèles, charge parasitaire, production d'œufs et réaction granulomateuse sont identiques, après 8 semaines d'infection, à celles des animaux-contrôle. Ces résultats indiquent clairement que des mécanismes de compensation efficaces se mettent en place au cours de l'infection, maintenant l'équilibre entre la survie de l'organisme-hôte et le développement du parasite.

➡ En parallèle avec la déplétion, il était intéressant d'étudier les **conséquences de l'activation des cellules NK sur l'infection**. En absence d'activateur spécifique, le poly IC est classiquement utilisé. Cette activation relativement large, puisqu'elle induit la production d'IFN- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$  par diverses populations cellulaires, s'est avérée après plusieurs semaines d'utilisation délétère pour les animaux traités, y compris les animaux non-infectés. Cet effet est sans doute moins sensible dans les infections aiguës, généralement étudiées, où l'activation est réalisée sur de courte durée.

➡ En perspective, dans une thématique s'intéressant à l'effet de cellules NK activées sur l'infection, la seconde approche consiste à réaliser un transfert de cellules. L'obtention de **clones NK activés** est bien documentée, en particulier grâce aux modèles immunothérapeutiques. Ces travaux ont mis en évidence que les cellules réinjectées ont un tropisme préférentiel pour le foie et le poumon. L'effet sur la formation des granulomes pourrait être étudié ainsi que le rôle protecteur des cellules NK activées au niveau du poumon. En effet, le modèle d'immunisation par injection de cercaires irradiées a montré que le parasite au stade pulmonaire est une cible de choix (Smythies et coll. 1992). Les cellules NK activées pourrait favoriser ou participer à la formation des foyers inflammatoires qui s'opposent à la migration des schistosomules. Cette hypothèse serait intéressante à tester bien que, dans la mesure où la déplétion des cellules NK ne modifie pas la charge parasitaire

des animaux, l'intervention en condition normale des cellules NK pulmonaires est, semble-t-il, réduite.

En conclusion, les travaux présentés dans ce manuscrit apportent des données nouvelles à la compréhension des mécanismes généraux de régulation qui interviennent au cours de l'infection par *S. mansoni*.

Nous avons mis en évidence que les cellules NK1.1, une population cellulaire minoritaire, participent à des mécanismes de régulation discrets et localisés, au sein d'un ensemble complexe de réactions induites par le parasite et les œufs qu'il produit, et ce en dehors de toute activation exogène.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, T., J. T. Forbes, and D. G. Colley.** 1983. Natural killer cell activity during murine schistosomiasis mansoni. *J. Parasitol.* **69**: 1001.
- Actor, J. K., M. Shirai, M. C. Kullberg, R. M. L. Buller, A. Sher, and J. A. Berzofsky.** 1993. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell and Th1-cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 948.
- Actor, J. K., M. A. Marshall, I. A. Eltoun, R. M. L. Buller, J. A. Berzofsky, and A. Sher.** 1994. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: Association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur. J. Immunol.* **24**: 3050.
- Akhiani, A. A., N. Lycke, L. A. Nilsson, S. Olling, and O. Ouchterlony.** 1996. Lack of interferon- $\gamma$  receptor does not influence the outcome of infection in murine schistosomiasis mansoni. *Scand. J. Immunol.* **43**: 257.
- Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Recto, D. Ritter, and J. H. McKerrow.** 1992. Tumor necrosis factor  $\alpha$  restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature.* **356**: 604.
- Amiri, P., M. Haak-Frendscho, K. Robbins, J. H. McKerrow, T. Stewart, and P. Jardieu.** 1994. Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni*-infected normal and interferon  $\gamma$  knockout mice. *J. Exp. Med.* **180**: 43.
- Amory-Soisson, L. M., C. Masterson, T. D. Tom, M. T. McNally, G. H. Lowell, and M. Strand.** 1992. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* **149**: 3612.
- Arase, H., N. Arase, K. Nakagawa, R. A. Good, and K. Onoé.** 1993. NK1.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* **23**: 307.
- Assenmacher, M., J. Schmitz, and A. Radbruch.** 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon- $\gamma$  and in interleukin-4-expressing cells. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1097.
- Auriault, C., M. A. Ouassi, G. Torpier, H. Eisen, and A. Capron.** 1981. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* **3**: 33.
- Auriault, C., H. Gras-Masse, R. Pierce, A. E. Butterworth, I. Wolowczuk, M. Capron, J. H. Ouma, J. M. Balloul, J. Khalife, J. L. Neyrinck, A. Tartar, D. Koech, and A. Capron.** 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microb.* **28**: 1918.

- Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. Pierce, D. Carvallo, J. P. Lecocq, and A. Capron.** 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*. **326**: 149.
- Bergquist, N. R.** 1995. Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option ? *Parasitol. Today*. **11**: 191.
- Bezouska, K., C. T. Yuen, J. O'Brien, R. A. Childs, W. G. Chai, A. M. Lawson, K. Drbal, A. Fiserova, M. Pospisil, and T. Feizi.** 1994. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature*. **372**: 150.
- Biassoni, R., S. Ferrini, I. Prigione, A. Moretta, and E. O. Long.** 1988. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 $\epsilon$  gene. *J. Immunol.* **140**: 1685.
- Biron, C. A., H. A. Young, and M. T. Kasaian.** 1990. Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* **171**: 173.
- Bix, M., N. S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch, and D. Raulet.** 1991. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature*. **349**: 329.
- Blum, A. M., A. Metwali, G. Cook, R. C. Mathew, D. Elliott, and J. V. Weinstock.** 1993. Substance P modulates antigen-induced, IFN- $\gamma$  production in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* **151**: 225.
- Boulanger, D., G. D. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J. M. Balloul, D. Grezel, R. Pierce, M. F. Otieno, S. Guerret, J. A. Grimaud, A. E. Butterworth, and A. Capron.** 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28 GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **13**: 473.
- Bouwens, L., P. De Bleser, K. Vanderkerken, B. Geerts, and E. Wisse.** 1992. Liver cell heterogeneity: Functions of non-parenchymal cells. *Enzyme*. **46**: 155.
- Brindley, P. J., B. Ramirez, W. Tiu, G. Wu, H. W. Wu, and X. Yi.** 1995. Networking schistosomiasis *japonica*. *Parasitol. Today*. **11**: 163.
- Bukowski, J. F., and R. M. Welsh.** 1985. Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cell-mediated antiviral effects *in vivo*. *J. Immunol.* **135**: 3537.
- Bushara, H. O., M. E. Bashir, K. H. Malik, M. M. Mukhtar, F. Trottein, A. Capron, and M. G. Taylor.** 1993. Suppression of *S. bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol.* **15**: 383.
- Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba, and P. M. Rees.** 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*. **256**: 727.
- Butterworth, A. E., H. G. Remold, V. Houba, J. R. David, D. Franks, P. H. David, and R. F. Sturrock.** 1977. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to <sup>51</sup>Cr-

- labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* : Mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* **118**: 2230.
- Butterworth, A., D. Dunne, A. Fulford, M. Capron, J. Khalife, A. Capron, D. Koech, J. Ouma, and R. Sturrock.** 1988. Immunity in human schistosomiasis mansoni: Cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie.* **70**: 1053.
- Capron, M., and A. Capron.** 1986. Rats, mice and men- models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today.* **2**: 69.
- Capron, A., G. Riveau, J. M. Grzych, D. Boulanger, M. Capron, and R. Pierce.** 1995. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 235.
- Capron, A.** 1995. Le langage moléculaire des parasites. *Médecine & Sciences.* **11**: 431.
- Chambers, W. H., N. L. Vujanovic, A. B. DeLeo, M. W. Olszowy, R. B. Herberman, and J. C. Hiserodt.** 1989. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* **169**: 1373.
- Cheever, A. W., J. E. Byram, S. Hieny, F. Von Lichtenberg, M. N. Lunde, and A. Sher.** 1985. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B cell depleted mice. *Parasite Immunol.* **7**: 399.
- Cheever, A. W., F. D. Finkelman, P. Caspar, S. Hieny, J. G. Macedonia, and A. Sher.** 1992. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.* **148**: 3244.
- Cheever, A. W., M. E. Williams, T. A. Wynn, F. D. Finkelman, R. A. Seder, T. M. Cox, S. Hieny, P. Caspar, and A. Sher.** 1994. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.* **153**: 753.
- Chensue, S. W., P. D. Terebuh, K. S. Warmington, S. D. Hershey, H. L. Evanoff, S. L. Kunkel, and G. I. Higashi.** 1992. Role of IL-4 and IFN- $\gamma$  in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *J. Immunol.* **148**: 900.
- Chensue, S. W., K. S. Warmington, S. D. Hershey, P. D. Terebuh, M. Othman, and S. L. Kunkel.** 1993. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*. *J. Immunol.* **151**: 1391.
- Ciccione, E., D. Pende, O. Viale, C. Di Donato, G. Tripodi, A. M. Orengo, J. Guardiola, A. Moretta, and L. Moretta.** 1992. Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for

- (allo) antigen recognition: Definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J. Exp. Med.* **175**: 709.
- Ciccione, E., D. Pende, O. Viale, A. Than, C. Di Donato, A. M. Orengo, R. Biassoni, S. Verdiani, A. Amoroso, A. Moretta, and L. Moretta.** 1992. Involvement of HLA class I alleles in natural killer (NK) cell-specific functions: Expression of HLA-Cw3 confers selective protection from lysis by alloreactive NK clones displaying a defined specificity (specificity 2). *J. Exp. Med.* **176**: 963.
- Colley, D. G., F. A. Lewis, and C. W. Todd.** 1979. Adoptive suppression of granuloma formation by T lymphocytes and by lymphoid cells sensitive to cyclophosphamide. *Cell. Immunol.* **46**: 192.
- Colley, D. G., A. A. Garcia, J. R. Lambertucci, J. C. Parra, N. Katz, R. S. Rocha, and G. Gazzinelli.** 1986. Immune responses during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease. 1986. **35**: 793.
- Cook, G., D. Elliott, A. Metwali, A. M. Blum, M. Sandor, R. Lynch, and J. V. Weinstock.** 1994. Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J. Immunol.* **152**: 1830.
- Correa, I., and D. H. Raulet.** 1995. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity.* **2**: 61.
- Czaja, M. J., F. R. Weiner, S. Takahashi, M. A. Giambrone, P. H. Van der Meide, H. Schellekens, L. Biempica, and M. A. Zern.** 1989.  $\gamma$ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.* **10**: 795.
- D' Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri.** 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon  $\gamma$ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor / IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178**: 1041.
- Da Silva, A. C., T. LePresle, A. Capron, and R. Pierce.** 1992. Molecular cloning of a 16 kDa Cu/zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 275.
- Dalton, J. P., A. M. Smith, K. A. Clough, and P. J. Brindley.** 1995. Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitol. Today.* **11**: 299.
- Damian, R. T.** 1987. Molecular mimicry revisited. *Parasitol. Today.* **3**: 263.
- Dammoneville, M., J. Wietzerbin, V. Pancré, M. Joseph, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault.** 1988. Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **140**: 3962.
- Dannemann, B. R., V. A. Morris, F. G. Araujo, and J. S. Remington.** 1989. Assessment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cysts. *J. Immunol.* **143**: 2684.

- De Oliveira Santos, R., A. A. Barbosa, and Z. A. Andrade.** 1992. Dynamics of fibrosis production and resorption in intestinal schistosomiasis of mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 25.
- De Val, M., H. Hengel, H. Hacker, U. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Kozinowski.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial Golgi compartment. *J. Exp. Med.* **176**: 729.
- Dessein, A. J., M. Begley, C. Demeure, D. Caillol, J. Fueri, M. G. Dos Reis, Z. A. Andrade, A. Prata, and J. C. Bina.** 1988. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37 kDa larval surface antigen. *J. Immunol.* **140**: 2727.
- Djeu, J. Y., J. A. Heinbaugh, H. T. Holden, and R. B. Herberman.** 1979. Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* **122**: 175.
- Dunn, P. L., and R. J. North.** 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* **59**: 2892.
- Dunne, D. W., A. E. Butterworth, A. J. Fulford, H. C. Kariuki, J. G. Langley, J. H. Ouma, A. Capron, R. Pierce, and R. F. Sturrock.** 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1483.
- Duvaux-Miret, O., G. B. Stefano, E. M. Smith, C. Dissous, and A. Capron.** 1992. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 778.
- El-Sherbeini, M., N. Ramadan, K. A. Bostian, and P. M. Knopf.** 1991. Cloning and sequence analysis of the *Schistosoma-mansoni* membrane glycoprotein antigen gene GP22. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 83.
- Eltoum, I. A., T. A. Wynn, R. W. Poindexter, F. D. Finkelman, F. A. Lewis, A. Sher, and A. W. Cheever.** 1995. Suppressive effect of interleukin-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared with those around eggs laid in infected mice. *Infect. Immun.* **63**: 2532.
- Espinoza, B., I. Silman, R. Arnon, and R. Tarrab Hazdai.** 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C induces biosynthesis of acetylcholinesterase via diacylglycerol in *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Bioch.* **195**: 863.
- Fidel, P. L., and D. L. Boros.** 1990. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. IV. Antigen-induced suppressor T cells down-regulate proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.* **145**: 1257.
- Finley, D., and V. Chau.** 1991. Ubiquitination. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **7**: 25.

- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, M. P. Beckman, L. S. Park, K. A. Schodley, R. L. Coffman, J. R. Mosmann, and W. E. Paul.** 1990. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 303.
- Fishelson, Z.** 1995. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 289.
- Flores Villanueva, P. O., S. M. Chikunguwo, T. S. Harris, and M. J. Stadecker.** 1993. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **151**: 3192.
- Flores Villanueva, P. O., T. S. Harris, D. E. Ricklan, and M. J. Stadecker.** 1994a. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes *in vitro* and down-regulate schistosomal granulomatous disease *in vivo*. *J. Immunol.* **152**: 1847.
- Flores Villanueva, P. O., H. Reiser, and M. J. Stadecker.** 1994b. Regulation of T helper cell response in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. *J. Immunol.* **153**: 5190.
- Franco, G. R., M. D. Adams, M. B. Soares, A. J. Simpson, J. C. Venter, and S. D. Pena.** 1995. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. *Gene.* **152**: 141.
- Franksson, L., E. George, S. Powis, G. Butcher, J. Howard, and K. Kärre.** 1993. Tumorigenicity conferred to lymphoma mutant by major histocompatibility complex-encoded transporter gene. *J. Exp. Med.* **177**: 201.
- Garcia-Penarrubia, P., F. T. Koster, R. O. Kelley, T. D. McDowell, and A. D. Bankhurst.** 1989. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **169**: 99.
- Gazzinelli, R. T., S. Hieny, T. A. Wynn, S. Wolf, and A. Sher.** 1993. Interleukine 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 6115.
- Giannini, A. L., S. V. Linhares, E. C. Caride, V. M. Braga, and F. D. Rumjanek.** 1995. Molecular aspects of *Schistosoma mansoni* female maturation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 179.
- Giorda, R., W. A. Rudert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt, and M. Trucco.** 1990. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science.* **249**: 1298.
- Giorda, R., E. P. Weisberg, and M. Trucco.** 1992. Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1. *J. Immunol.* **149**: 1957.

- Glas, R., K. Sturmhöfel, G. J. Hämmerling, K. Kärre, and H. G. Ljunggren.** 1992. Restoration of a tumorigenic phenotype by  $\beta$ 2-microglobulin transfection to EL-4 mutant cells. *J. Exp. Med.* **175**: 843.
- Glimcher, L., F. W. Shen, and H. Cantor.** 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.* **145**: 1.
- Goes, A. M., S. A. Rezende, G. Gazzinelli, and B. L. Doughty.** 1994. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* EGG antigens in human schistosomiasis. IV. A role for prostaglandin-induced inhibition of *in vitro* granuloma formation. *Parasite Immunol.* **16**: 11.
- Goudot-Crozel, V., D. Caillol, M. Djabali, and A. J. Dessein.** 1989. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase. *J. Exp. Med.* **170**: 2065.
- Grzel, D., M. Capron, J. M. Grzych, J. Fontaine, J. P. Lecocq, and A. Capron.** 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28 GST recombinant antigen: Effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* **23**: 454.
- Griggs, N. D., and R. A. Smith.** 1991. Adoptive transfer of natural killer cell activity in B6D2F1 mice challenged with *Salmonella typhimurium*. *Cell. Immunol.* **135**: 88.
- Gryseels, B.** 1994. Human resistance to *Schistosoma* infections: Age or experience ? *Parasitol. Today.* **10**: 380.
- Gryseels, B., F. Stelma, I. Talla, K. Polman, G. Van Dam, S. Sow, M. Diaw, R. F. Sturrock, C. Decam, N. Niang, and A. M. Deelder.** 1995. Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 271.
- Grzych, J. M., M. Capron, H. Bazin, and A. Capron.** 1982. *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S.mansoni* antibodies. *J. Immunol.* **129**: 2739.
- Grzych, J. M., M. Capron, C. Dissous, and A. Capron.** 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **133**: 998.
- Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, and A. Sher.** 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **146**: 1322.
- Grzych, J. M., D. Grzel, C. B. Xu, J. L. Neyrinck, M. Capron, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and A. Capron.** 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **150**: 527.
- Gumperz, J. E., and P. Parham.** 1995. The enigma of the natural killer cell. *Nature.* **378**: 245.

- Gumperz, J. E., V. Litwin, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and P. Parham.** 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with NK cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J. Exp. Med.* **181**: 1133.
- Hagan, P., U. J. Blumenthal, D. Dunn, A. J. Simpson, and H. A. Wilkins.** 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* **349**: 243.
- Hashimoto, W., K. Takeda, R. Anzai, K. Ogasawara, H. Sakihara, K. Sugiura, S. Seki, and K. Kumagai.** 1995. Cytotoxic NK1.1 Ag<sup>+</sup> αβ T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol.* **154**: 4333.
- Hauser, W. E., and V. Tsai.** 1986. Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* *in vitro*. *J. Immunol.* **136**: 313.
- Heinzel, F. P., D. S. Schoenhaut, R. M. Rerko, L. E. Rosser, and M. K. Gately.** 1993. Recombinant interleukine 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**: 1505.
- Henderson, G. S., X. Lu, T. L. McCurley, and D. G. Colley.** 1992. In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine *Schistosoma mansoni*. II. Quantitation of IL-4 mRNA, IFN-γ mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. *J. Immunol.* **148**: 2261.
- Herberman, R. B., M. E. Nunn, H. T. Holden, and D. H. Lavrin.** 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer.* **16**: 230.
- Heremans, H., C. Dillen, J. Van Damme, and A. Billiau.** 1994. Essential role for natural killer cells in the lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like reaction in mice. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1155.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, and K. M. Murphy.** 1993. Development of T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* **260**: 547.
- Hunter, C. A., C. S. Subauste, V. H. Van Cleave, and J. S. Remington.** 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: Regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* **62**: 2818.
- Iacomini, J., D. E. Ricklan, and M. J. Stadecker.** 1995. T cells expressing the γδ T cell receptor are not required for egg granuloma formation in schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* **25**: 884.
- Iltzsch, M. H., D. Bieber, S. Vijayasarathy, P. Webster, M. Zurita, J. Ding, and T. E. Mansour.** 1992. Cloning and characterization of a cDNA coding for the alpha-subunit of a stimulatory G protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **267**: 14504.

- Inverardi, L., J. C. Witson, S. A. Fuad, R. T. Winkler-Pickett, J. R. Ortaldo, and F. H. Bach.** 1991. CD3 negative "small agranular lymphocytes" are natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 4048.
- Itoh, H., T. Abo, S. Sugawara, A. Kanno, and K. Kumagai.** 1988. Age-related variation in the proportion and activity of murine liver natural killer cells and their cytotoxicity against regenerating hepatocytes. *J. Immunol.* **141**: 315.
- James, S. L.** 1986. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non living vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *J. Immunol.* **136**: 3872.
- Joseph, M., C. Auriault, A. Capron, H. Vorng, and P. Viens.** 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* **303**: 810.
- Joseph, A. L., and D. L. Boros.** 1993. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J. Immunol.* **151**: 5461.
- Kane, K. P.** 1994. Ly-49 mediates E14 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med.* **179**: 1011.
- Karlhofer, F. M., and W. M. Yokoyama.** 1991. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J. Immunol.* **146**: 3662.
- Karlhofer, F. M., R. K. Ribaldo, and W. M. Yokoyama.** 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49<sup>+</sup> IL-2-activated natural killer cells. *Nature.* **358**: 66.
- Kasper, L. H., T. Matsuura, and I. Khan.** 1995. IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **155**: 4798.
- Kaufman, D. S., R. A. Schoon, and P. J. Leibson.** 1993. MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *J. Immunol.* **150**: 1429.
- Kärre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling.** 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature.* **319**: 675.
- Khalife, J., M. Capron, A. Capron, J. M. Grzych, A. E. Butterworth, D. Dunne, and J. Ouma.** 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J.Exp.Med.* **164**: 1626.
- Khalife, J., R. Pierce, C. Godin, and A. Capron.** 1993. Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**: 313.
- Khan, I., T. Matsuura, and L. H. Kasper.** 1994. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* **62**: 1639.
- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri.** 1989. Identification and purification of

- natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827.
- Kos, F. J., and E. G. Engleman.** 1995. Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. *J Immunol.* **155**: 578.
- Kurosawa, S., G. Matsuzaki, M. Harada, T. Ando, and K. Nomoto.** 1993. Early appearance and activation of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphoid cells during tumor development. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1029.
- Lanier, L. L., C. Chang, and J. H. Phillips.** 1994. Human NKR-P1A: A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**: 2417.
- Lanier, L. L.** 1995. The role of natural killer cells in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 626.
- Lanier, L. L., and J. H. Phillips.** 1996. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol. Today.* **17**: 86.
- Laskay, T., M. Röllinghoff, and W. Solbach.** 1993. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2237.
- Lazou, J. M., F. Zampetti-Bosseler, A. Geerts, R. Borojevic, and E. Wisse.** 1993. Tissue distribution of fat-storing cells in normal, and *Schistosoma mansoni* infected mouse liver. In: Knook, D.L., Wisse, E., eds. *Cells of the hepatic sinusoid*. Leiden (The Netherlands): The Kupffer cell foundation. **4**: 304.
- Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips, and L. L. Lanier.** 1993. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: Evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J. Exp. Med.* **178**: 1321.
- Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J. H. Phillips, and L. L. Lanier.** 1994. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. Med.* **180**: 537.
- Liu, C. C., C. M. Walsh, and J. D. E. Young.** 1995. Perforin: Structure and function. *Immunol Today.* **16**: 194.
- Lotzova, E.** 1993. Definition and functions of natural killer cells. *Nat. Immun.* **12**: 169.
- Luini, W., D. Boraschi, S. Alberti, A. Aleotti, and A. Tagliabue.** 1981. Morphological characterization of a cell population responsible for natural killer activity. *Immunology.* **43**: 663.
- Lukacs, N. W., and D. L. Boros.** 1993. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **68**: 57.
- Lynch, D. H., and R. E. Miller.** 1990. Induction of murine lymphokine-activated killer cells by recombinant IL-7. *J. Immunol.* **145**: 1983.

- MacDonald, H. R.** 1995. NK1.1<sup>+</sup> T cell receptor- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> cells: new clues to their origin, specificity, and functions. *J. Exp. Med.* **182**: 633.
- Malnati, M. S., M. Peruzzi, K. C. Parker, W. E. Biddison, E. Ciccone, A. Moretta, and E. O. Long.** 1995. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science.* **267**: 1016.
- Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani.** 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukine 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **1993**: 1199.
- Mathew, R. C., and D. L. Boros.** 1986. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin -2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* **54**: 820.
- Mazingue, C., J. P. Dessaint, A. M. Schmitt-Verhulst, J. C. Cerottini, and A. Capron.** 1983. Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome derived inhibitory factor is independent of an inhibition of the production of interleukine-2. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **72**: 22.
- Metwali, A., D. Elliott, R. Mathew, A. Blum, and J. V. Weinstock.** 1993. IL-2 contributes to the IL-5 response in the granulomas from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **150**: 536.
- Monté, D., J. Wietzerbin, V. Pancré, G. Merlin, S. M. Greenberg, J. P. Kusnierz, A. Capron, and C. Auriault.** 1991. Identification and characterization of a functional receptor for interferon- $\gamma$  on a megakaryocytic cell line. *Blood.* **78**: 2062.
- Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A. M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, and L. Moretta.** 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class-I molecules in human natural killer (NK) cells - Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class-I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med.* **178**: 597.
- Moretta, A., M. Vitale, S. Sivori, C. Bottino, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, D. Pende, E. Ciccone, M. Lopez-Botet, and L. Moretta.** 1994. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as a receptor for HLA-B alleles. *J. Exp. Med.* **180**: 545.
- Moser, D., M. Tandler, G. Griffiths, and M. Q. Klinkert.** 1991. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 8447.
- Mosman, T. R., and S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today.* **17**: 138.
- Mostafa, M. H., A. F. Badawi, and P. J. Oconnor.** 1995. Bladder cancer associated with schistosomiasis. *Parasitol. Today.* **11**: 87.

- Mountford, A. P., P. S. Coulson, R. M. Pemberton, L. E. Smythies, and R. A. Wilson.** 1992. The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunol.* **75**: 250.
- Naume, B., M. Gately, and T. Espevik.** 1992. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56<sup>+</sup> NK cells. *J. Immunol.* **148**: 2429.
- Naume, B., A. C. Johnsen, T. Espevik, and A. Sundan.** 1993. Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56<sup>+</sup> natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1831.
- Naume, B., and T. Espevik.** 1994. Immunoregulatory effects of cytokines on natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* **40**: 128.
- Newport, G., J. Culpepper, and N. Agabian.** 1988. Parasite heat-shock proteins. *Parasitol. Today.* **4**: 306.
- Ohteki, T., and H. R. MacDonald.** 1994. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> subsets of natural killer 1.1<sup>+</sup>T cell receptor- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> cells in the liver of mice. *J. Exp. Med.* **180**: 699.
- Orange, J. S., and C. A. Biron.** 1996. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- $\gamma$  production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* **156**: 1138.
- Oswald, I. P., P. Caspar, D. Jankovic, T. A. Wynn, E. J. Pearce, and A. Sher.** 1994. IL-12 inhibits Th2 cytokine responses induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **153**: 1707.
- Pancré, V., C. Auriault, M. Joseph, J. Y. Cesbron, J. P. Kusnierz, and A. Capron.** 1986. A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* **137**: 585.
- Pancré, V., M. Joseph, C. Mazingue, J. Wietzerbin, A. Capron, and C. Auriault.** 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: Role of interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.* **138**: 4490.
- Pancré, V., M. Joseph, A. Capron, A. Delanoye, H. Vorng, and C. Auriault.** 1989. Characterization of a suppressive factor of platelet cytotoxic functions in human and rat schistosomiasis mansoni. *Clin. Exp. Immunol.* **76**: 417.
- Pancré, V., D. Monté, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault.** 1990. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur. Cyt. Net.* **1**: 15.

- Pancré, V., R. Pierce, F. Fournier, M. Mehtali, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault.** 1991. Effect of ubiquitin on platelet functions: Possible identity with platelet activity suppressive lymphokine (PASL). *Eur. J. Immunol.* **21**: 2735.
- Pancré, V., I. Wolowczuk, S. Guerret, M. C. Copin, A. Delanoye, A. Capron, and C. Auriault.** 1994. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: Role of gamma interferon. *Infect. Immun.* **62**: 3723.
- Pearce, E. J., S. L. James, S. Hieny, D. E. Lanar, and A. Sher.** 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.
- Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis, and A. Sher.** 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **173**: 159.
- Pena, H. B., C. P. De Souza, A. J. Simpson, and S. D. Pena.** 1995. Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: Nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 915.
- Phillips, J. H., and L. L. Lanier.** 1986. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of the peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J. Exp. Med.* **164**: 814.
- Pierce, R., and A. Capron.** 1994. Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. In: Kurstak, E., ed. *Modern vaccinology*. Chapter 18: 357.
- Porchet, E., A. McNair, A. Caron, J. P. Kusnierz, K. Zemzoumi, and A. Capron.** 1994. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology.* **109**: 565.
- Prakash, S., and D. J. Wyler.** 1992. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. XII. Identification of CD4<sup>+</sup> lymphocytes within schistosomal egg granulomas as a source of an apparently novel fibroblast growth factor (FsF-1). *J. Immunol.* **148**: 3583.
- Ramarathinam, L., D. W. Niesel, and G. R. Klimpel.** 1993. *Salmonella typhimurium* induces IFN- $\gamma$  production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J. Immunol.* **150**: 3973.
- Rihet, P., C. Demeure, A. Bourgois, A. Prata, and A. J. Dessein.** 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* **21**: 2679.
- Ritter, D. M., S. Rosen, M. Singer, and J. H. McKerrow.** 1993. ICAM-1 expression is upregulated during egg deposition in *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* **150**: Suppl. Index. 6.
- Roberts, M., A. E. Butterworth, G. Kimani, T. Kamau, A. J. Fulford, D. W. Dunne, J. H. Ouma, and R. F. Sturrock.** 1993. Immunity after treatment of human

- schistosomiasis: Association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immun.* **61**: 4984.
- Robertson, M. J.,** and J. Ritz. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* **76**: 2421.
- Rosenberg, S. A.,** M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, J. T. Vetto, C. A. Seipp, C. G. Simpson, and C. M. Reichert. 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **313**: 1485.
- Rosenberg, S. A.,** M. T. Lotze, L. M. Muul, A. E. Chang, F. P. Avis, S. Leitman, W. M. Linehan, G. N. Robertson, R. E. Lee, J. T. Rubin, C. A. Seipp, C. G. Simpson, and D. E. White. 1987. Progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* **316**: 889.
- Ryan, J. C.,** J. Turck, E. C. Niemi, W. M. Yokoyama, and W. E. Seaman. 1992. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J. Immunol.* **149**: 1631.
- Salcedo, T. W.,** L. Azzoni, S. F. Wolf, and B. Perussia. 1993. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J. Immunol.* **151**: 2511.
- Sanchez, M. J.,** M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1994. Identification of a common T/Natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J. Exp. Med.* **180**: 569.
- Scharton, T. M.,** and P. Scott. 1993. Natural killer cells are a source of interferon- $\gamma$  that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* **178**: 567.
- Schoenhaut, D. S.,** A. O. Chua, A. G. Wolitzky, P. M. Quinn, C. M. Dwyer, W. McComas, P. C. Familletti, M. K. Gately, and U. Gubler. 1992. Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* **148**: 3433.
- Seaman, W. E.,** M. Sleisenger, E. Eriksson, and G. C. Koo. 1987. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol.* **138**: 4539.
- Sher, A.,** I. P. Oswald, S. Hieny, and R. T. Gazzinelli. 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- $\gamma$  response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **150**: 3982.

- Shoemaker, C., A. Gross, A. Gebremichael, and D. A. Harn.** 1992. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1842.**
- Shresta, S., D. M. Macivor, J. W. Heusel, J. H. Russell, and T. J. Ley.** 1995. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92: 5679.**
- Simpson, A., E. Dias Neto, T. Vidigal, H. Pena, O. Carvalho, and S. Pena.** 1995. DNA polymorphism of schistosomes and their snail hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90: 211.**
- Simurda, M. C., H. van Keulen, D. Rekosh, and P. T. Lo Verde.** 1988. *Schistosoma mansoni*: Identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* **67: 73.**
- Skelly, P. J., and C. B. Shoemaker.** 1995. A molecular genetic study of the variations in metabolic function during schistosome development. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90: 281.**
- Smith, H. R., F. M. Karlhofer, and W. M. Yokoyama.** 1994. The Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated natural killer cells. *J. Immunol.* **153: 1068.**
- Smyth, M. J., and J. A. Trapani.** 1995. Granzymes: Exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* **16: 202.**
- Smythies, L. E., P. S. Coulson, and R. A. Wilson.** 1992. Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.* **149: 3654.**
- Soussi-Gouni, A., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron.** 1995. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature.* **367: 183.**
- Storkus, W. J., J. Alexander, J. A. Payne, J. R. Dawson, and P. Cresswell.** 1989. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86: 2361.**
- Storkus, W. J., R. D. Salter, J. Alexander, F. E. Ward, R. E. Ruiz, P. Cresswell, and J. R. Dawson.** 1991. Class-I-induced resistance to natural killing: Identification of nonpermissive residues in HLA-A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88: 5989.**
- Su, H. C., R. Ishikawa, and C. A. Biron.** 1993. Transforming growth factor- $\beta$  expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J. Immunol.* **151: 4874.**
- Subauste, C. S., L. Dawson, and J. S. Remington.** 1992. Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **176: 1511.**

- Suttles, J., G. A. Schwarting, and R. D. Stout.** 1986. Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo-GM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **136**: 1586.
- Sypek, J. P., C. L. Chung, S. E. Mayor, J. M. Subramanyam, S. J. Goldman, D. S. Sieburth, S. F. Wolf, and R. G. Schaub.** 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukine 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* **177**: 1797.
- Takada, H., G. Matsuzaki, K. Hiromatsu, and K. Nomoto.** 1994. Analysis of the role of natural killer cells in *Listeria monocytogenes* infection: Relation between natural killer cells and T-cell receptor gd T cells in the host defence mechanism at the early stage of infection. *Immunology.* **82**: 106.
- Tay, C. H., R. M. Welsh, and R. R. Brutkiewicz.** 1995. NK cell response to viral infections in beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Immunol.* **154**: 780.
- Taylor, J. B., A. Vidal, G. Torpier, D. J. Meyer, C. Roitsch, J. M. Balloul, C. Southan, P. Sondermeyer, S. Pemble, J. P. Lecocq, A. Capron, and B. Ketterer.** 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**: 465.
- Tchuem-Tchuente, L. A., V. R. Southgate, D. Imbert-Establet, and J. Jourdane.** 1995. Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology.* **110**: 45.
- Teixeira, H. C., and S. H. Kaufmann.** 1994. Role of NK1-1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN- $\gamma$  producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **152**: 1873.
- Tendler, M., M. M. Vilar, C. A. Brito, N. M. Da Serra Freire, N. Katz, and A. Simpson.** 1995. Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential basis of a multi-valent anti-helminth vaccine ? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 255.
- Tielens, A. G.** 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today.* **10**: 346.
- Timonen, T., and E. Saksela.** 1980. Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J. Immunol. Methods.* **36**: 285.
- Tripp, C. S., S. F. Wolf, and E. R. Unanue.** 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  are costimulators of interferon  $\gamma$  production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3725.
- Tripp, C. S., M. K. Gately, J. Hakimi, P. Ling, and E. R. Unanue.** 1994. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. *J. Immunol.* **152**: 1883.

- Trottein, F., M. P. Kieny, C. Verwaerde, G. Torpier, R. Pierce, J. M. Balloul, D. Schmitt, J. P. Lecocq, and A. Capron.** 1990. Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 35.
- Tsicopoulos, A., A. B. Tonnel, B. Wallaert, M. Joseph, J. C. Ameisen, P. Ramon, J. P. Dessaint, and A. Capron.** 1988. Decrease of IgE-dependent platelet activation in *Hymenoptera* hypersensitivity after specific rush desensitization. *Clin. Exp. Immunol.* **71**: 433.
- Tsicopoulos, A., A. B. Tonnel, B. Wallaert, M. Joseph, P. Ramon, and A. Capron.** 1989. A circulating suppressive factor of platelet cytotoxic functions after rush immunotherapy in *Hymenoptera* venom hypersensitivity. *J. Immunol.* **142**: 2683.
- Varkila, K., R. Chatelain, L. M. C. C. Leal, and R. L. Coffman.** 1993. Reconstitution of C.B-17 *scid* mice with BALB/c T-cells initiates a T-helper type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania-major* infection. *Eur. J. Immunol.* **23**: 262.
- Verwaerde, C., M. Joseph, M. Capron, R. Pierce, M. Damonville, F. Velge, C. Auriault, and A. Capron.** 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **138**: 4441.
- Vujanovic, N. L., S. Yasumura, H. Hirabayashi, W. C. Lin, S. Watkins, R. B. Herberman, and T. L. Whiteside.** 1995. Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues. *J. Immunol.* **154**: 281.
- Wang, B., C. Biron, J. She, K. Higgins, M. J. Sunshine, E. Lacy, N. Lonberg, and C. Terhorst.** 1994. A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9402.
- Weinstock, J. V., and D. L. Boros.** 1981. Heterogeneity of the granulomatous response in the liver, colon, ileum, and ileal Peyer's patches to schistosome eggs in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **127**: 1906.
- Weinstock, J. V., and D. L. Boros.** 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **1983**: 418.
- Wherry, J. C., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue.** 1991. Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in *scid* mice: Roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* **59**: 1709.
- Whiteside, T. L., and R. B. Herberman.** 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 704.
- Wilder, J. A., C. Y. Koh, and D. Yuan.** 1996. The role of NK cells during in vivo antigen-specific antibody responses. *J. Immunol.* **156**: 146.

- Williams, D. L., R. Pierce, E. Cookson, and A. Capron.** 1992. Molecular cloning and sequencing of a glutathione peroxidase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 127.
- Wiltrout, R. H., R. B. Herberman, S. R. Zhang, M. A. Chirigos, J. R. Ortaldo, K. M. Green, and J. E. Talmadge.** 1985. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastasis in lung and liver. *J. Immunol.* **134**: 4267.
- Wolowczuk, I., C. Auriault, H. Gras-Masse, C. Vendeville, J. M. Balloul, A. Tartar, and A. Capron.** 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.* **142**: 1342.
- Wright, M. D., K. J. Henkle, and G. F. Mitchell.** 1990. An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J. Immunol.* **144**: 3195.
- Wynn, T. A., I. Eltoun, A. W. Cheever, F. A. Lewis, W. C. Gause, and A. Sher.** 1993. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **151**: 1430.
- Wynn, T. A., I. Eltoun, I. P. Oswald, A. W. Cheever, and A. Sher.** 1994. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J. Exp. Med.* **179**: 1551.
- Wynn, T. A., A. W. Cheever, D. Jankovic, R. W. Poindexter, P. Caspar, F. A. Lewis, and A. Sher.** 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* **376**: 594.
- Xu, C. B., C. Verwaerde, J. M. Grzych, J. Fontaine, and A. Capron.** 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.
- Yokoyama, W. M., L. B. Jacobs, O. Kanagawa, E. M. Shevach, and D. I. Cohen.** 1989. A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. *J. Immunol.* **143**: 1379.
- Yokoyama, W. M., J. C. Ryan, J. J. Hunter, H. R. Smith, M. Stark, and W. E. Seaman.** 1991. cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with Ly-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *J. Immunol.* **147**: 3229.
- Yokoyama, W. M.** 1995. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 110.
- Yoshimoto, T., and W. E. Paul.** 1994. CD4<sup>pos</sup>, NK1.1<sup>pos</sup> T cells promptly produce interleukin 4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* **179**: 1285.

- Yoshimoto, T., A. Bendelac, C. Watson, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1995.** Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a T<sub>H</sub>2 response and in immunoglobulin E production. *Science*. **270**: 1845.
- Yoshimoto, T., A. Bendelac, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1995.** Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup> T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **92**: 11931.
- Yuan, D., C. Y. Koh, and J. A. Wilder. 1994.** Interactions between B lymphocytes and NK cells. *FASEB J*. **8**: 1012.

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
--------------	---

RÉSUMÉ	11
--------	----

## GÉNÉRALITÉS

### LES CELLULES NATURAL-KILLER

1- Généralités	13
2- Techniques d'isolement. Modèles expérimentaux	16
3- Caractérisation des récepteurs exprimés par les cellules NK	18
4- Fonctions cytotoxiques des cellules NK	19
5- Mécanismes d'inhibition de la cytotoxicité	22
6- Hétérogénéité des cellules NK et sélection	25
7- Cellules NK et cytokines	29
8- Intéraction des cellules NK avec d'autres populations cellulaires	31
9- Cellules NK et pathologies	32
10- Les cellules T NK1.1 <sup>+</sup>	40

### LA SCHISTOSOMIASE

1- Généralités	41
2- Répartition géographique	42
3- Cycle	42
4- Biologie	47
5- Pathologies associées aux schistosomiasés	50
6- Traitements	52
7- Prophylaxie	53
8- Réponse du système immunitaire à l'infection par <i>S.mansoni</i>	53
9- Régulation de la réponse immunitaire par le parasite	55

10- La réponse granulomateuse et sa régulation	
Généralités et modèles expérimentaux	60
Initiation et phase aiguë de la réaction	64
Immunomodulation	70
Granulomes intestinaux	71
Pathologie humaine	72
11- Approches vaccinales	72

## TRAVAUX PERSONNELS

### I- Mise au point et applications d'un dosage radioimmunologique spécifique de l'ubiquitine

1- Introduction et résumé de l'article	77
2- Article	79
3- Caractérisation d'un récepteur spécifique de l'ubiquitine sur la lignée mégacaryocytaire DAMI	88

### II- Effet de la déplétion des cellules Natural-Killer sur l'immunité et la pathologie au cours de l'infection expérimentale par *S.mansoni*

1- Activation des cellules NK. Approches <i>in vitro</i>	90
2- Introduction et résumé de l'article	96
3- Article	98
4- Production d'IFN- $\gamma$ par les cellules NK	129

DISCUSSION, CONCLUSION 132

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 137

