

N° D'ORDRE

Université des Sciences et Techniques de Lille

Flandres-Artois

THESE DE DOCTORAT

présentée à l'université de LILLE I
pour l'obtention du titre de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
par

XU Xiaochuan



*

**Contribution à l'étude des propriétés protectrices de la
glutathion-S-transférase de *Schistosoma mansoni* dans un modèle
de souris transgénique surexprimant cet antigène**

*

présentée le 30 Juin 1997

Membres du Jury :

Président :	Professeur	A. Dhainaut
Rapporteurs:	Professeur	D. Camus
	Docteur	R. J. Pierce
Examineurs:	Professeur	A. Capron
	Docteur	J- Y. Cesbron
	Docteur	J- M. Grzych

Le travail présenté ici a été accompli :

Au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

INSERM U167

Institut Pasteur de Lille

Directeur: Professeur. **André CAPRON**

Et plus particulièrement dans le groupe de recherche dirigé par le

Docteur **Jean-Yves CESBRON**

En étroite collaboration avec le groupe de recherche animé par le

Docteur **Jean-Marie GRZYCH**

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

URA CNRS 1459

Institut Pasteur de Lyon

Dirigé par le **Docteur J. A. GRIMAUD**

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire

Hôpital Claude Huriez, CHR & U de Lille

Dirigé par le **Professeur P. M. DEGAND**

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mon Epoux NI Gemin

A mon fils NI Sen

A ma famille et belle-famille

A mes amis en France et en Chine

Pour ce qu'ils représentent pour moi et pour l'amour que je leur porte

A Monsieur le Professeur CAPRON,

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et avez eu une attention particulière au déroulement de mon travail. Vous m'avez permis de participer à un programme très avancé visant à vérifier un vaccin contre la schistosomiase. Que cette thèse soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur A. Dhainaut,

Vous m'avez fait l'honneur de présider cette thèse. Je vous en remercie vivement.

A Monsieur le Professeur D. Camus,

Pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, je tiens à vous remercier chaleureusement.

A Monsieur le Docteur R. J. Pierce,

Vos suggestions scientifiques ont été précieuses. Je vous en suis très reconnaissant.

A Monsieur le Docteur J. M. Grzych,

Votre gentillesse, votre disponibilité et vos suggestions scientifiques ont été précieuses. Vous m'avez encouragé pour mes études. Soyez en sincèrement remercié.

A Monsieur le Docteur J. Y. Cesbron,

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

A Madame le Docteur C. Dissous,

Je vous remercie pour votre disponibilité et votre efficacité dans la correction de ce manuscrit.

Sans leur aide, ce mémoire n'aurait pu voir le jour, je tiens à y associer pleinement :

Les personnes du Laboratoire du CIBP de l'Institut Pasteur de Lille, du groupe Prion et du groupe Hybridome en particulier.

Merci d'avoir été présent quand il le fallait.

Et particulièrement

A C. Lemaire, F. Mullier, J. Fontaine, I. Wolowczuk, J. L. Liu, N. Delhem, J.-P. De Cavel, T. Schulze, S. Lafitte, S. Gaubert, J.-L. Neyrinck, pour leur gentillesse et la qualité de leur suggestions scientifiques, leur compétence technique et leur disponibilité.

A Madame le Docteur M. Raccurt, Monsieur le Docteur F. Zerimech et leurs équipes, pour leur collaboration.

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

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

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

Article 1

Xiaochuan XU; Catherine Lemaire; Jean-Marie Grzych; Raymond J. Pierce; Jean-Alexis Grimaud; Frederic Mullier; Farid Zerimech; Jean-Pierre Decavel; Jinli Liu; Josette Fontaine; Sophia Lafitte; Andre Capron; Jean-Yves Cesbron (1997) **Expression of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase in the liver of transgenic mice and its effect on parasite infection.** *Infection and immunity*, soumis

Article 2

XU Xiaochuan; Jean-Yves Cesbron; R.J. Pierce; Catherine Lemaire; Sophie Gaubert; Josette Fontaine; Sophia Lafitte; Frederic Mullier; Jean Pierre Decavel; Andre Capron and Jean-Marie Grzych (1997) **Cytokine response to *Schistosoma mansoni* protective antigen in Sm28GST Transgenic Mice.** *Parasit.Immunol.* soumis

SOMMAIRE

Abréviations	8
Résumé	9
Introduction	10
Résultats	62
Discussion et conclusion	134
Bibliographie	140
Table des matières	163

ABREVIATIONS

Alum: Gel d'hydroxyde d'aluminium
 AST: Aspartate aminotransferase,
 CDNB: 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene,
 CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
 Cellules ES: Cellules souches embryonnaires
 CFA: Adjuvant complet de Freund.
 CTL: Lymphocytes T cytotoxiques
 GOT: L- aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase,
 hGH: hormone de croissance humaine.
 IFA: Adjuvant incomplet de Freund.
 KLH: Keyhole Limp et Hemocyanin.
 HA: Hemagglutinine
 HSV: Virus de l'herpès
 HTLV-I: Virus T-lymphotropique humain de type 1
 LCMV: Virus lymphocytaire de la choriomeningite
 LTR: longue séquence de répétition terminale
 mAb: Anticorps monoclonal
 mPTf: Promoteur du gène de la transferrine murine
 ORF: cadre ouvert de lecture
 OD: densité Optique.
 PBS: Tampon Phosphate
 PVR: Récepteur du poliovirus
 Sm28GST: glutathione S-transferase 28 kDa de *Schistosoma mansoni*.
 Sm28GSTr: Sm28GST recombinant.
 SNC: système nerveux central
 SWAP: préparation antigénique soluble de ver adulte
 TAT: transactivatrice
 Tg: Transgénique
 TNF: Facteur de nécrose tumoral
 VAPP: Poliomyélite paralytique associée à la vaccine
 VIS: Virus d'immuno-déficiencia du singe

RESUME

Les bilharzioses sont des affections parasitaires chroniques pour lesquelles une glutathion-S-transferase de 28 kDa présente des propriétés vaccinales. Toutefois la Sm28GST possède une homologie significative avec les isoformes de la glutathione transferase de mammifère.

Dans le but d'étudier le problème d'une possible auto-immunité chez les animaux immunisés avec la Sm28GST, et la part de la réponse immunitaire dirigée contre cet antigène, nous avons construit des souris transgénique exprimant Sm28GST sous le contrôle d'une partie du promoteur transferine murine. L'étude de ces souris montre que l'expression de la Sm28GST est strictement localisé dans les hépatocytes peri-centrolobulaire. Aucune toxicité ou processus auto-immunes n'ont été observés sur une période 18 mois, en dépit d'une réactivité croisée avec une molécule de 30 kDa retrouvée dans tous les tissus testés. Les études immunologiques réalisées montrent que les souris sont tolérantes à Sm28GST. Les souris transgénique infectées par des furcocercaires de *S. mansoni* hébergent plus de vers que les souris contrôles. Cependant la fertilité des femelles est identique entre les 2 groupes d'animaux. Les résultats obtenus renforcent l'idée que cet enzyme joue un rôle clef dans le développement et la viabilité du parasite.

Introduction

I. LA SCHISTOSOMOSE OU BILHARZIOSE

A. GENERALITES

La schistosomose ou bilharziose, est une maladie chronique et débilitante qui est endémique dans 76 pays tropicaux et subtropicaux. Les continents africains, sud-américain et asiatique sont les plus touchés (Fig.1). On estime à 200 millions le nombre de personnes infestées, dont 50 à 100 millions développent une maladie. Un pour cent d'entre eux en meurt chaque année. L'ampleur de la population concernée et l'important retentissement socio-économique de cette maladie font de la lutte contre la schistosomose une des priorités de l'O.M.S.

Les schistosomoses sont des affections parasitaires dues à des vers du genre *Schistosoma*, parasites électifs du système veineux splanchnique et responsables chez l'homme de maladies urinaires, intestinales ou hépatospléniques, selon l'espèce en cause. Trois espèces principales de schistosomes sont pathogènes pour l'homme :

- ✓ *S. haematobium*, agent de la bilharziose urinaire ou vésicale ;
- ✓ *S. mansoni*, de la bilharziose intestinale et hépatosplénique ;
- ✓ *S. japonicum*, de la bilharziose hépatosplénique d'Extrême-Orient.

La prévalence et l'intensité de l'infection sont liées aux contacts des populations humaines avec l'eau parasitée : les femmes et les enfants, qui sont le plus souvent en contact avec l'eau, présentent l'intensité à l'infection la plus élevée. Les principaux facteurs affectant l'intensité de l'infection sont :

1. LES FACTEURS NATURELS

La température, la pluviosité et l'existence de la population de mollusques susceptible aux parasites sont des facteurs naturels qui interviennent dans la transmission du parasite. Ainsi, au Sénégal, la transmission de la schistosomose est maximale après la saison des pluies (de mars à mai puis d'octobre à décembre) (Talla et al., 1990).

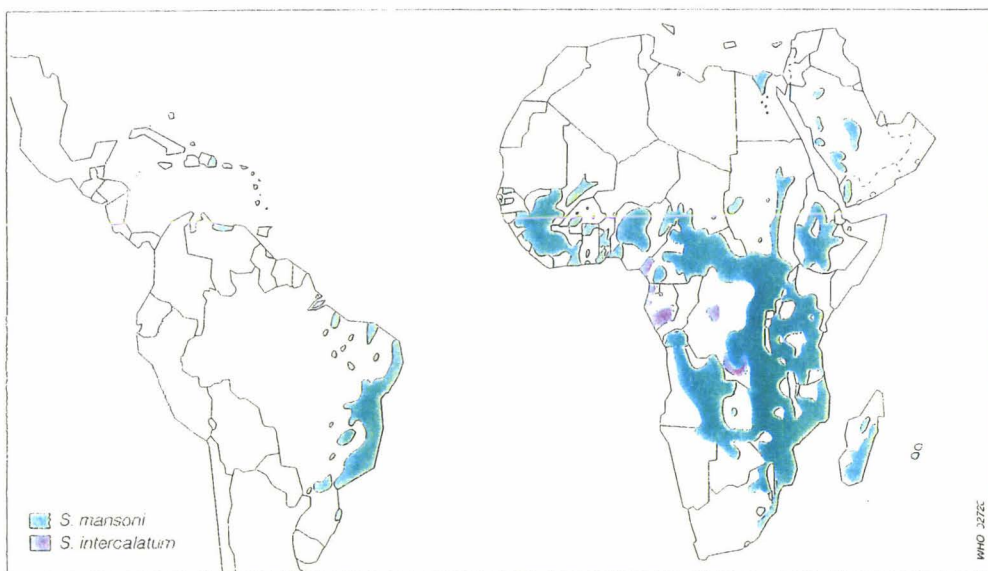
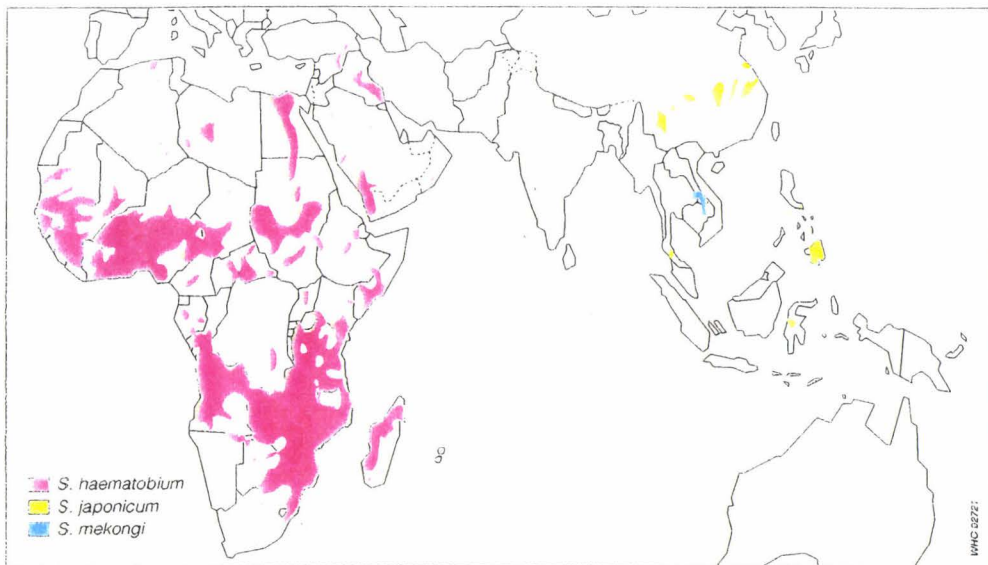


Figure 1. Répartition géographique des schistosomiasis humaines
(d'après "Atlas de la répartition mondiale des schistosomiasis" O. M. S., 1992)

2. LES FACTEURS SOCIAUX

Les études épidémiologiques sur le terrain, incluent le contrôle de l'habitat et de la population de mollusques infectés, la connaissance des périodes de transmission maximale, les études des conditions de vie des populations concernées, surtout leurs besoins sanitaires et alimentaires en eau et leurs moyens d'irrigation des cultures. C'est ainsi que *Schistosoma mansoni* a été introduit dans la région de Richard Toll (Sénégal) en 1988, probablement à cause de la construction d'un barrage sur le fleuve Sénégal (Gryseels et al., 1994). A Paracambi, dans la région de Rio de Janeiro au Brésil, l'urbanisation incomplète, en particulier l'insuffisance des systèmes de traitement et de purification de l'eau et les mauvaises conditions sanitaires, facilite la transmission de la schistosomose (Soares et al., 1995). Enfin, les mouvements de population, notamment l'immigration et le tourisme, augmentent l'incidence de la maladie et la dissémination du parasite.

3. LES FACTEURS IMMUNITAIRES

De nombreux rapports supportent l'existence chez l'homme d'une immunité acquise à la schistosomose (Bergquist, 1990). Les enfants âgés de plus de treize ans sont plus résistants à la réinfection après traitement chimio-thérapeutique, que les enfants plus jeunes (Butterworth et al., 1985). La charge parasitaire chez l'adulte diminue en fonction de la fréquence de l'exposition durant l'enfance. Le degré d'immunité acquise exige un temps d'exposition parasitaire long et des infections répétées (Dessein et al., 1992b).

Par ailleurs, à l'intérieur d'un même groupe d'âge, un faible nombre d'individus présente des infections graves, la majorité d'entre eux développant des infections modérées, suggérant l'intervention ces facteurs génétiques dans le développement de la réponse immune (Dessein et al., 1992a).

B. PLACE DES SCHISTOSOMES DANS LE REGNE ANIMAL ET TAXONOMIE

Les schistosomes sont des métazoaires que les taxinomistes rangent dans l'embranchement des plathelminthes, dans la classe des trématodes, dans la famille des schistosomatides et le genre schistosoma. La classification des schistosomes peut être basée soit sur la morphologie de leurs œufs, soit sur leurs spectres d'infectivité. Parmi les espèces de schistosomes, cinq d'entre elles sont des parasites de l'homme : *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. mekongi* (Rollinson and Southgate, 1987).

C. CYCLE EVOLUTIF DES SCHISTOSOMES

Le schistosome est un parasite à deux phases de multiplication: l'une sexuée chez son hôte définitif vertébré, l'autre asexuée chez son hôte intermédiaire invertébré, un mollusque aquatique (Fig.2).

1. LE MIRACIDIUM

Les œufs de schistosomes sont rejetés dans l'eau. Si certaines conditions sont réunies (pH neutre, lumière, salinité modérée, température voisine de 30 °C), les œufs éclosent et libèrent des larves ciliées : les miracidii. Ces larves se déplacent rapidement, guidées par divers stimuli sensoriels et chimiques, leur assurant la reconnaissance du mollusque hôte.

2. LE SPOROCYSTE

Le miracidium pénètre le tégument du mollusque, et se transforme en sporocyste primaire qui migre dans les gonades ou les glandes digestives du mollusque et donne naissance au sporocyste secondaire ; celui ci produit des quantités énormes de cercaires. En effet, un seul miracidium ayant pénétré chez le mollusque peut donner naissance à 100 voire 200.000 larves infestantes.

3. LA CERCAIRE

Les cercaires sont libérées aux heures chaudes de la journée

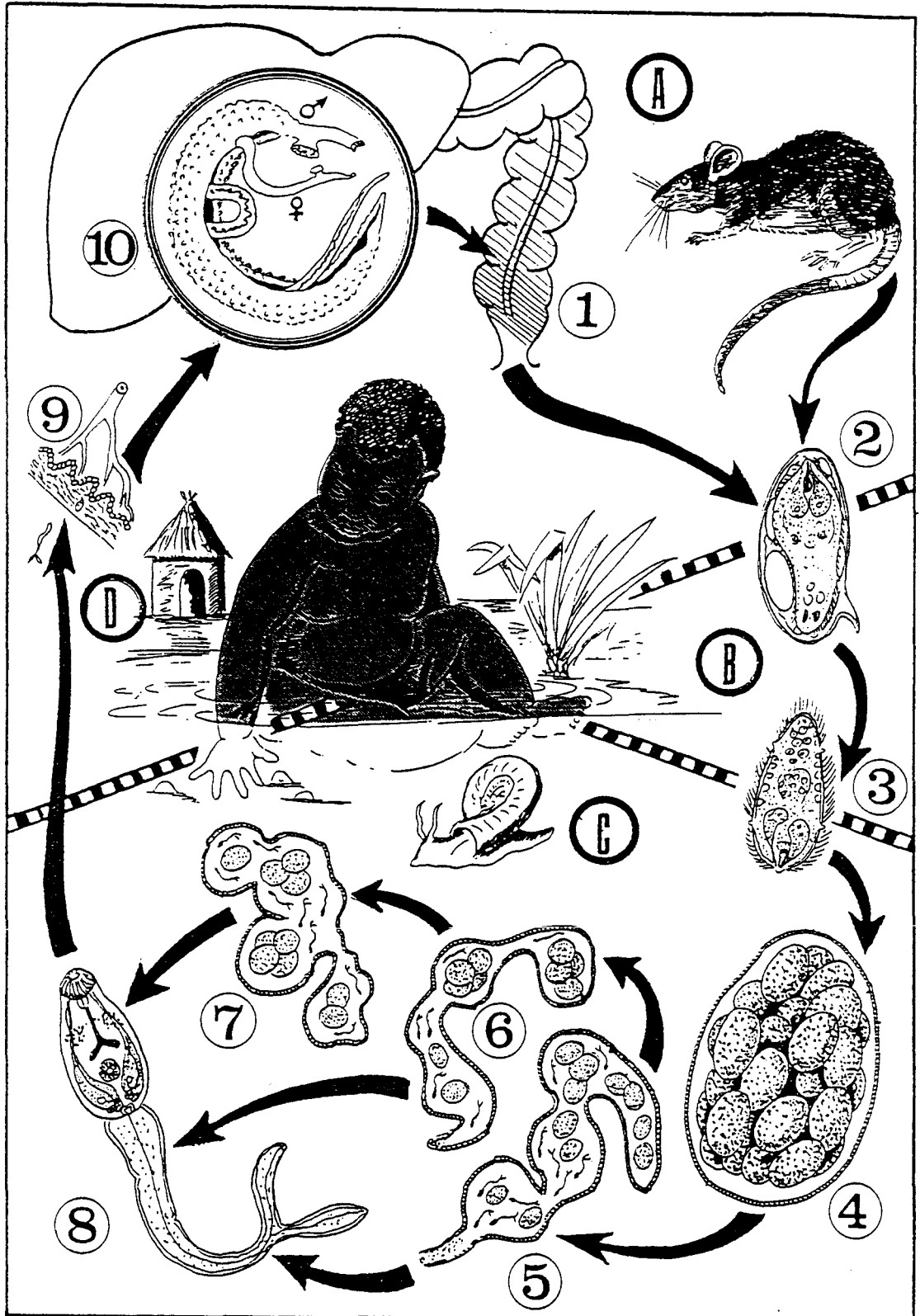


Figure 2. Cycle évolutif de *Schistosoma mansoni*

(d'après "Atlas de parasitologie". Y. Golvan, Ed. Le Léopard d'Or, 1990)

(Nojima and Sato, 1982), elles sont pourvues d'un appendice caudal fourchu qui leur confère une grande mobilité. La durée de vie des cercaires est de 8 à 12 h. Elles sont attirées par des signaux physiques et chimiques (la température de la peau de l'hôte, les acides gras, la lumière...) qui favorisent la rencontre d'une cible adaptée.

4. SCHISTOSOMULE ET VERS ADULTE

La cercaire rencontre et pénètre la peau d'une manière active. Elle perd sa queue et secrète des enzymes protéolytiques, qui lui permettent de traverser les couches supérieures de la peau (Landsperger et al., 1982). Elle se transforme alors en Schistosomule.

Le Schistosomule pénètre rapidement dans une veinule ou un vaisseau lymphatique. En quelques jours, le Schistosomule migre vers les poumons, où il se métamorphose en une larve plus filiforme, puis franchit les capillaires. Ces larves se retrouvent dans la circulation sanguine générale et se relocalisent au niveau du foie. A ce stade, le jeune parasite va subir un profond remaniement structural et physiologique (Torpier et al., 1977) et se transformer en vers adulte. Les adultes de *Schistosoma mansoni*, vivent accouplés dans la veine porte et les veines mésentériques (Fig. 3). Les femelles pondent des œufs, dont certains se localisent dans le foie en provoquant une fibrose réactionnelle à l'origine de la pathologie. D'autres parviennent à traverser la paroi intestinale et sont éliminés avec les fécès. Le cycle peut recommencer.

D. BIOLOGIE DU SCHISTOSOME

Le vers mâle (5 à 11 mm) a deux ventouses, une ventouse buccale située à l'extrémité du ver, une ventouse ventrale latérale. Les vers se situent généralement dans le système mésentérique, accrochés par leur ventouse ventrale à l'endothélium veineux. Une large rainure ventrale "bordée" d'épines (le canal gynécophore) retient la femelle accouplée. La surface (tégument) externe est caractérisée par d'abondantes papilles. Elle est formée de deux couches lipidiques et syncitiales, dont les propriétés permettent au schistosome de résister aux agressions de l'hôte,

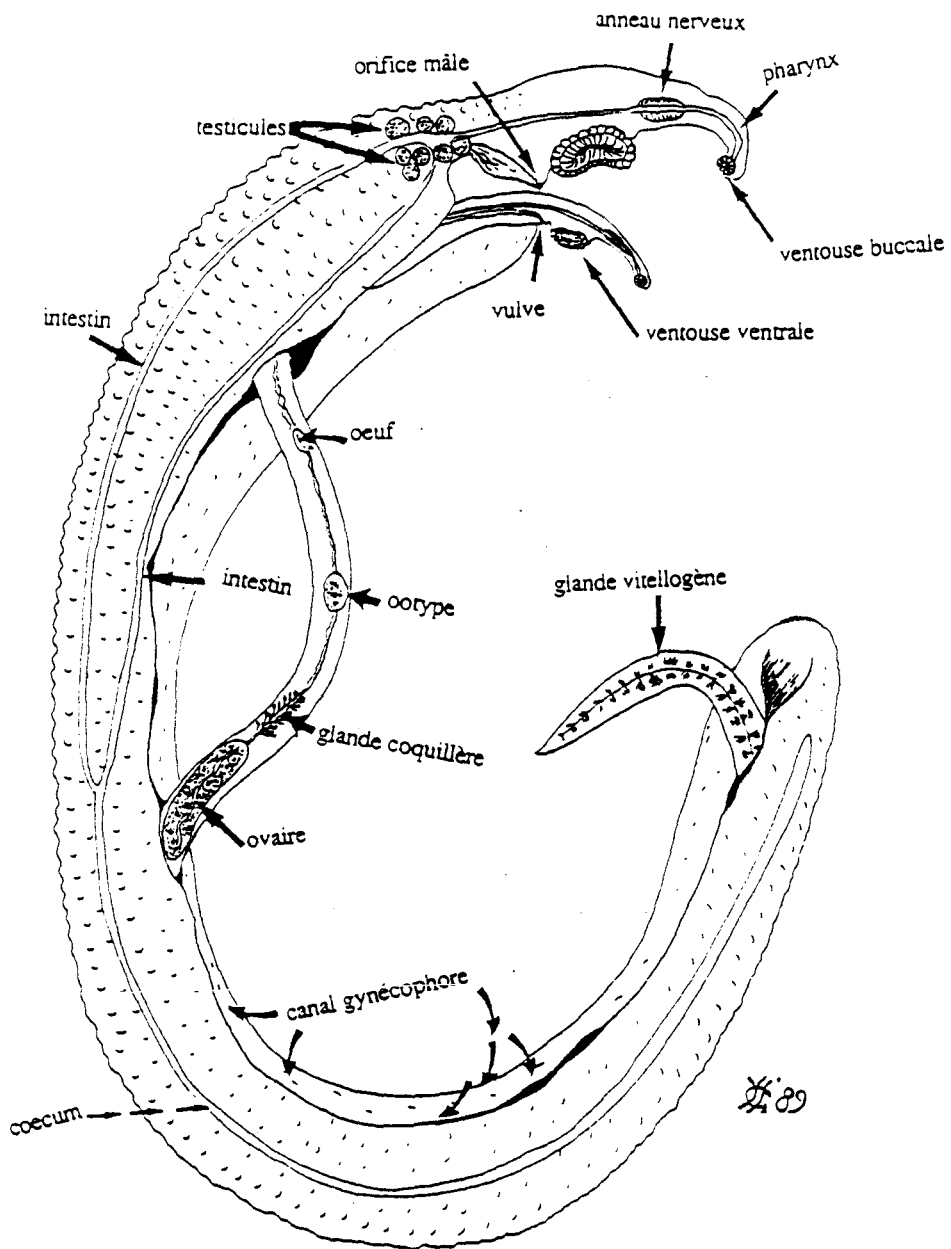


Figure 3. Anatomie schématique d'un couple de schistosomes
 (d'après "Atlas de parasitologie". Y. Golvan, Ed. Le Léopard d'Or, 1990)

et d'éviter la coagulation du sang (McLaren et al., 1981). Il participe à l'absorption de certains nutriments solubles et à l'excrétion de déchets toxiques. Le système de reproduction du mâle est constitué de 7 à 8 testicules situés au niveau dorsal, en aval de la ventouse ventrale.

La femelle est plus longue (jusqu'à 20 mm) et plus fine que le mâle. Elle possède également deux ventouses. Hématophage, la femelle consomme environ 1,5 millions d'hématies par jour. Le système de reproduction de la femelle est bien développé. Il est constitué d'un ovaire, d'un oviducte, de nombreuses glandes vitellines, d'ootype et de glandes de Mehlis.

E. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA BILHARZIOSE

La pathologie de la bilharziose est essentiellement due à la ponte des œufs par les vers adultes, qui s'établit de façon continue dès la cinquième semaine d'infestation. La plupart des œufs sont excrétés en occasionnant des lésions tissulaires, tandis que les œufs non excrétés piégés dans les tissus surtout au niveau hépatique sont responsables d'une réaction inflammatoire granulomateuse. Les manifestations pathologiques d'une infection à *S. mansoni* présentent des degrés d'intensité variables, selon qu'il s'agit d'une primo-infection ou non, selon l'importance de la charge parasitaire ou selon les prédispositions génétiques de l'individu infecté (Dessein et al., 1992b). Les malades les plus atteints sont les enfants, et les patients souffrant d'infections massives.

Cliniquement, il existe trois principales phases d'évolution : l'infestation, la phase d'invasion et la phase d'état.

1. L'INFESTATION

Le premier symptôme qui apparaît chez le sujet est la "dermatite du nageur", éruption illustrant localement la pénétration cutanée de la cercaire.

2. LA PHASE D'INVASION

Cette phase survient après une période de deux à trois semaines

et s'étend jusqu'à la ponte des premiers œufs. Elle est caractérisée par des réactions d'hypersensibilité, un état fébrile, des diarrhées, de la toux, une hyperthermie, et une hyperéosinophilie sanguine.

3. LA PHASE D'ETAT

Elle est caractérisée par l'installation des vers adultes dans leur site définitif et la ponte des œufs dans les tissus, entraînant une réponse granulomateuse (Bourré, 1993).

Les œufs provoquent des lésions tissulaires au cours de leur migration dans les tissus. La migration conduit les œufs vers la lumière intestinale, où ils peuvent être éliminés avec les selles. Ils progressent grâce à la sécrétion d'enzymes protéolytiques qui provoquent une nécrose et une inflammation sur leur trajet (Pino-Heiss et al., 1985). On observe souvent des diarrhées, des hémorragies, des douleurs abdominales imprécises.

Néanmoins, une partie des œufs reste dans les organes, principalement les intestins et le foie. Autour des œufs piégés dans les tissus, se développent des granulomes résultant d'une réaction inflammatoire T dépendante qui évolue en fibrose. Cette pathologie se développe plusieurs années après l'infection (forme chronique). L'accumulation des granulomes dans les espaces portes induit une gangue scléreuse autour des vaisseaux, "la sclérose en tuyau de pipe", lésion très caractéristique d'une évolution chronique. Leur présence gêne la circulation sanguine. Dans le foie, ils sont à l'origine d'une hypertension portale qui conduit à une cirrhose hépatique. Une circulation collatérale se développe, avec apparition de varices œsophagiennes dont la rupture peut conduire à une hémorragie digestive, parfois fatale. Dans l'intestin, les granulomes causent diarrhées et malnutrition.

F. IMMUNOLOGIE DES SCHISTOSOMOSES

La compréhension des mécanismes effecteurs de la réponse immune chez l'animal de laboratoire et chez l'homme est un préalable

indispensable à la mise en place d'une stratégie vaccinale. Le grand nombre de connaissances a été acquis par notre laboratoire, et récemment rassemblé dans l'article " Vaccine strategies against schistosomiasis" par le professeur A. Capron (Capron et al., 1992).

1. LA REPONSE HUMORALE

Plusieurs expériences ont confirmé le mécanisme de cytotoxicité dépendant d'anticorps. Dans le modèle du rat, la participation active des anticorps a été largement illustrée grâce aux expériences de transfert passif d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux de rat qui ont permis d'établir le rôle prépondérant des anticorps de type anaphylactique (IgE et IgG2a). Le transfert des IgE spécifiques du schistosome protège l'animal vis-à-vis d'une infection d'épreuve par le schistosome (Rousseaux-Prevost et al., 1978). L'effet protecteur des sérums immuns de rat est aboli par déplétion sélective en IgE ou IgG2a selon la période d'infection considérée (Capron et al., 1979). Le rôle protecteur de ces anticorps anaphylactiques a été aussi confirmé par le transfert passif des anticorps monoclonaux spécifiques de *S. mansoni* d'isotype IgG2a ou IgE (Grzych et al., 1982, Verwaerde et al., 1987). La cible principale de la réponse anticorps est le Schistosomule. La coopération entre les anticorps et différents types de cellules inflammatoires (macrophages, éosinophiles et plaquettes) conduit à la lyse de la larve parasitaire par les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps aussi appelés mécanismes d'ADCC (Antibody dependent Cell Cytotoxicity). La destruction du Schistosomule dépend essentiellement du pontage réalisé par l'anticorps (qui se fixe par son fragment Fab à la surface du parasite, et par son fragment Fc sur son récepteur spécifique à la surface des cellules effectrices). Cette interaction déclenche la dégranulation des cellules qui libèrent des enzymes, des peroxydes et des radicaux libres à la surface du parasite et entraîne sa lyse (Capron et al., 1981, Joseph et al., 1978, Joseph et al., 1983). La participation des IgA dans les mécanismes d'ADCC a été démontrée par la déplétion sélective des IgA dans les sérums de rat immunisé ou la compétition des IgA non spécifiques

(Grezel et al., 1993).

Chez l'homme, une relation positive entre le taux d'Anticorps IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST du *S. mansoni* et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été démontrée (Auriault et al., 1990, Grzych et al., 1993). La présence d'isotypes d'IgE, IgG4, et IgG2 anti-larve est également corrélée (positivement pour IgE et négativement pour IgG2 et IgG4) avec la résistance à la réinfection (Demeure et al., 1993).

2. LA REPONSE CELLULAIRE

L'infection par les cercaires suscite l'apparition d'une réponse cellulaire dominante de type Th1, caractérisée la production de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-12. Cependant, lors de la production des œufs par les schistosomes adultes, cette réponse est modifiée en faveur d'une réponse Th2 dominante qui produit principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Grzych et al., 1991). Cet effet de polarisation peut aussi s'exercer à l'encontre d'antigènes précédemment décrits comme inducteurs d'une réponse de type Th1 (myoglobuline de cachalot) (Kullberg et al., 1992). Cette inversion de réponse (type Th1 vers type Th2) est liée aux oligosaccharidiques présents dans l'antigène œufs capables de stimuler la production d'IL-10, une cytokine inhibitrice de la prolifération des cellules Th1 (Velupillai and Harn, 1994). Chez la souris la participation des différentes cytokines dans la réaction granulomateuse a été envisagée par l'injection d'œufs ou de SEA (antigène soluble des œufs) fixé sur des billes pour produire des granulomes synchronisés ou par l'injection d'anticorps anti-cytokines neutralisant l'effet des cytokines étudiées. Les cytokines produites par les cellules du granulome sont : MIF (macrophage migration inhibitory factor), IFN- γ et α/β , IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, MIP-1a (macrophage inflammatory protein), CSF-1, TNF- α TGF β , GM-CSF (Boros, 1994). Parmi ces cytokines, certaines amplifient ou modulent la réaction inflammatoire, d'autres participent à la formation de la fibrose.

Le rôle de l'IFN- γ dans les granulomes est double : il joue un rôle

inducteur au début de la réaction granulomateuse ; durant la maturation des granulomes, il régule la production inflammatoire d'IL-2 et IL-4 et contrôle ainsi l'expansion des granulomes et la fibrose tissulaire. L'IL-2 est nécessaire pour l'expression de la réponse Th2, ou tout au moins de certaines de ses composantes (Wynn et al., 1993). L'IL-4 est impliquée dans la phase précoce de la réponse inflammatoire (Boros, 1994). L'IL-5 maintient le nombre d'éosinophiles dans la circulation et localement autour du granulome (Metwali et al., 1993).

G. DIAGNOSTIC DES SCHISTOSOMOSES

La coprologie est une méthode simple de diagnostic, mais est sujette à des erreurs par défaut du fait de l'irrégularité du nombre d'œuf excrétés au cours de l'infestation. C'est pourquoi les examens immunologiques (hyperéosinophilie, recherche d'anticorps sériques et des antigènes circulants (Barsoum et al., 1991)) sont aussi importants pour le diagnostic. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) permet de préciser l'étendue des lésions dans les organes.

H. TRAITEMENT DES SCHISTOSOMOSES

Le praziquantel (PZQ) semble être le plus efficace et d'utilisation généralisée pour toutes les espèces de schistosomose infectant l'homme. Son mécanisme d'action est peu connu, mais il semble faire intervenir un brusque influx de calcium à travers le tégument du schistosome entraînant des perturbations musculaires et des altérations tégumentaires qui aboutissent à sa perméabilisation (Harnett, 1988). *In vivo*, son action dépend d'une réponse immunitaire préexistante vis-à-vis du parasite (Brindley and Sher, 1990). Cette réponse immune est dirigée contre des antigènes démasqués par l'action du PZQ (Fallon et al., 1995). Le PZQ diminue l'immunité humorale en ne modifiant pas l'immunité cellulaire (Hamadto et al., 1990). Ainsi, il réduit la résistance à la réinfection pour *S. mansoni* (Hassan et al., 1990). Par ailleurs, le parasite peut développer une résistance au médicament, dont le mécanisme d'action est peu connu.

L'oxamniquine est la deuxième molécule actuellement utilisée pour le traitement de la bilharziose. Cette molécule paralyse la musculature du vers, provoque son reflux dans la circulation portale intra-hépatique où les mâles sont détruits. Les femelles semblent survivre mais cessent de pondre. Des traitements de masse ont été réalisés, notamment dans les îles des Caraïbes anglophones et au Brésil (Picot, 1993). Dans ces régions, la distribution répétée d'oxamniquine a été l'élément principal responsable de la réduction de la transmission de la maladie. Mais comme le PZQ, l'oxamniquine ne prévient pas les réinfections et diminue l'immunité acquise (Bezerra et al., 1993). De plus, il n'est actif que sur *S. mansoni*.

Fallon a décrit que *S. mansoni* exposé à une pression médicamenteuse peut développer une résistance contre le PZQ ou l'oxamniquine, après plusieurs passages (6-7 passages). Mais la cross-résistance entre le PZQ et l'oxamniquine n'a pas été décrite (Fallon and Doenhoff, 1994).

I. PROPHYLAXIE DES SCHISTOSOMOSES

La prophylaxie est basée sur l'interruption du cycle parasitaire. Elle vise à contrôler les contacts entre l'hôte définitif et le biotope aquatique où vit l'hôte intermédiaire. Les moyens disponibles doivent être associés pour lutter contre la bilharziose dans les régions d'endémies.

1. EDUCATION SANITAIRE ET ASSAINISSEMENT

La prophylaxie doit commencer par l'éducation sanitaire des populations et l'assainissement dans les régions d'endémie, pour limiter les contaminations de l'eau par les œufs de schistosomes éliminés dans les excréments humains. Mais, en raison des mauvaises conditions de vie et les traditions de ces populations, l'éducation sanitaire est malheureusement souvent difficile, et n'induit pas toujours un changement de comportement. De plus, les coûts engendrés par les opérations d'assainissement sont souvent très élevés.

2. LA LUTTE CONTRE LES MOLLUSQUES

Le mollusque est l'hôte intermédiaire du schistosome. La lutte contre les mollusques peut diminuer le nombre de cercaires dans l'eau douce, arrêtant ainsi le cycle du schistosome. L'élimination des mollusques peut être chimique (molluscicides). L'étude des molluscicides synthétiques s'est développée à partir de 1950 (Sturrock, 1995). Le sulfure de cuivre a été le produit le plus utilisé (Picot, 1993). Un seul molluscicide de synthèse est actuellement disponible sur le marché, le niclosamide. Mais à cause de sa toxicité, de son coût et des difficultés pour obtenir une dilution efficace aux divers points d'un cours d'eau, son usage est réservé aux petites étendues d'eau.

L'élimination des mollusques peut être biologique. Elle peut être réalisée par aménagement des plans d'eau : bétonnage, élimination de la végétation aquatique, assèchement des marécages et, compétition biologique (Wolmarans and Yssel, 1990). Par exemple, en Martinique et en Guyane, l'introduction de *Biomphalaria straminea*, incompatible avec *S. mansoni*, a chassé *B. glabrata*, et, associée à une chimioprophylaxie, a permis une importante réduction des cas de schistosomoses.

3. PROPHYLAXIE MEDICALE

Devant les difficultés pour établir et maintenir un programme de traitement de masse efficace contre les bilharzioses, la démarche actuelle est essentiellement dirigée vers l'élaboration d'un vaccin. Cette immunisation doit permettre de réduire le niveau de réinfection et la fécondité parasitaire. Cela conduirait à une diminution de la morbidité, des formes aiguës de la maladie, et permettrait aussi une diminution de la transmission. Néanmoins, le schistosome ne prolifère pas dans l'hôte vertébré. La modélisation épidémiologique montre qu'une réduction d'environ 60% de la charge parasitaire après l'infection réduirait considérablement la pathologie et affecterait la transmission parasitaire (Capron et al., 1992). Un vaccin conférant un tel pourcentage de protection de 60%, ou plus, serait estimé être un vaccin efficace.

L'étude vaccinale de la schistosomose reste encore au stade

expérimental. Avec divers protocoles expérimentaux, des taux de protection significatifs ont été observés chez les animaux, mais ils n'atteignent pas encore le niveau qui devrait permettre de la vaccination chez l'homme. Il ne s'agit pas ici de décrire toutes les stratégies vaccinales mises en œuvre par différentes équipes de chercheurs, mais d'en résumer les grands axes de recherche.

a) Vaccin vivant, infestations croisées

Une primo-infestation par des cercaires de *S. bovis* protège le babouin contre une infestation par des cercaires de *S. mansoni*. Les cercaires de *S. bovis* sont utilisées car elles ne peuvent pas accomplir un cycle complet chez le babouin (hôte expérimental inapproprié), et sont incapables d'induire la maladie. La protection croisée entre schistosomes suggère donc l'existence d'antigènes communs inter-spécifiques responsables de la protection (Taylor, 1975).

b) Vaccin vivant : larves atténuées

L'atténuation des larves a pour but d'empêcher la maturation complète du vers tout en préservant la migration et le déclenchement d'une réponse immune. L'atténuation des cercaires de schistosomes peut être réalisée à l'aide d'agents chimiques ou par irradiation par des rayons χ , γ ou UV. Les cercaires irradiées pénètrent la peau comme le font les cercaires non irradiées, mais leur migration est retardée. La maturation en vers adultes ne se fait pas et la pathologie dans l'hôte due aux œufs du parasite est complètement évitée. Néanmoins, la stimulation du système immunitaire existe. Elle confère des taux de résistance élevés (Richter et al., 1995). La protection liée à la vaccination par les cercaires irradiées varie de 40% à 90% (Barsoum et al., 1992, Delgado and McLaren, 1990b). Le taux de protection dépend de nombreuses conditions d'immunisation:

- ✓ La dose d'irradiation (Mumo and Kinoti, 1992);
- ✓ La répétition de la vaccination (exposition percutanée simple ou multiple) (Caulada-Benedetti et al., 1991);

- ✓ Le nombre de cercaires irradiées (Barsoum et al., 1992) (Caulada-Benedetti et al., 1991);
- ✓ L'hôte (souris (Richter et al., 1993), babouin (Soisson et al., 1993), cobaye d'Inde (McLaren et al., 1990)) ou les espèces parasitaires (Sher et al., 1984);
- ✓ Les protocoles de vaccination (exposition percutanée, injection sous-cutanée ou intraveineuse) (Richter et al., 1995).

L'étude de la réponse immune, induite par les immunisations par cercaires irradiées, montre l'intervention à la fois de la réponse humorale et cellulaire. La vaccination induit un haut niveau d'anticorps protecteur anti-schistosomule (Richter et al., 1993). Le transfert passif de sérum de souris vaccinées à des souris naïves leur confère une résistance à l'infection (Delgado and McLaren, 1990a). Le même résultat a été obtenu chez le rat (Lawson et al., 1995).

Les souris athymiques ne développent pas de résistance après exposition à des cercaires irradiées, montrant que les cellules T sont essentielles à l'induction de l'immunité protectrice induite par cette immunisation (Phillips et al., 1991, Smythies et al., 1992a). L'excision des ganglions qui drainent les sites de vaccination percutanée réduit le niveau de résistance (Mountford and Wilson, 1990). Les lymphocytes de souris vaccinées sécrètent, après stimulation *in vitro*, des taux significativement plus élevés de cytokines du type Th1, surtout d'IFN- γ (Smythies et al., 1992b, Mountford et al., 1992). De plus, le traitement des souris par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ , diminue considérablement la protection (Wynn et al., 1994).

La vaccination par cercaires irradiées induit un haut niveau de protection (James, 1992, Bergquist, 1990), mais cette vaccination est difficile à mettre en œuvre: l'obtention des cercaires par le traitement radioactif et leur conservation est délicate. C'est pourquoi il est nécessaire d'élaborer un vaccin non-vivant.

On classe les vaccins non-vivant en trois catégories: les antigènes bruts, les antigènes purifiés et antigènes recombinants.

c) Vaccin non-vivant: antigènes bruts

Les préparations d'antigènes bruts correspondent à un stade particulier du développement du parasite. On distingue l'antigène d'adultes SWAP (Soluble Worm Antigen Preparation), l'antigène d'œufs (SEA) et l'antigène de schistosomules. Les essais de protection avec l'antigène d'œufs se sont soldés par des échecs dans les modèles murins et d'autres modèles expérimentaux (Harrison et al., 1982). Les résultats avec l'extrait antigénique total du vers adulte sont variables suivant le mode d'injection ou le type d'adjuvant utilisé. L'un des protocoles le plus efficace chez la souris est l'injection d'antigènes par voie intradermique en présence de BCG, où une réduction de 50% de la charge vermineuse est obtenue (James and Sher, 1990). Une protection de 34% est obtenue par la vaccination avec l'extrait total de schistosomules sans utilisation d'adjuvant par voie sous cutanée (Flanigan et al., 1989).

d) Vaccin non-vivant: antigènes purifiés et antigènes recombinants

La vaccination par des larves atténuées ou par des antigènes bruts dépend de la disponibilité des parasites et reste donc difficile à mettre en œuvre. C'est pourquoi il est nécessaire d'élaborer des vaccins purifiés ou recombinants.

Cinq stratégies pour l'identification d'antigènes protecteurs sont la base de l'élaboration des vaccins purifiés ou recombinants. Elles se basent sur l'importance du facteur humoral dans les mécanismes de défense de l'animal (Capron et al., 1987):

(1) *Identification de l'antigène présent chez l'hôte résistant.*

Mitchell a identifié une souche résistante de souris vis à vis de l'infection par *S. japonicum*. Dans le sérum de ces animaux des anticorps correspondants à une protéine de 26 kDa (Sj26GST de *S. japonicum*) étaient abondants. Cette protéine fut purifiée, clonée et ensuite reinjectée à des souches de souris BALB/c (non résistantes) par voie sous-cutanée.

L'immunisation par cette molécule de 26 kDa ne donna seulement que 28% de protection (Mitchell et al., 1988, Smith et al., 1986, Smith et al., 1988). Il semble que les résultats de protection avec la protéine complète soient variables selon la souche de souris utilisée (0-40%) et que la réponse soit soumise à une restriction génétique très stricte (Davern et al., 1987, Mitchell et al., 1990).

(2) *Génération des sondes anticorps protectrices
visant à l'identification des antigènes cibles.*

L'utilisation de sondes anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques a permis l'identification d'antigènes cibles. Cependant, le fait qu'un sérum (protecteur en transfert passif) reconnaisse majoritairement un antigène ne signifie pas forcément que celui-ci soit responsable de la résistance à la réinfection. L'utilisation de sondes monoclonales, d'isotypes sélectionnés, a permis l'identification d'un certain nombre d'antigènes potentiellement protecteurs tels la Gp38 (Dissous et al., 1982). Cette protéine de 38 kDa est présente dans les différents stades des parasites mais aussi chez l'hôte intermédiaire. L'épitope majeur de la GP38 est retrouvé dans l'hémocyanine d'un mollusque ancestral (KLH: Keyhole Limpet Hemocyanine) (Dissous et al., 1986). Un anticorps monoclonal IgG2a dirigé contre un déterminant glucidique de la Gp38, et doué d'un pouvoir cytotoxique *in vitro*, induit par transfert passif une protection équivalente à la molécule entière (Grzych et al., 1982). La production d'anticorps anti-idiotypiques a permis l'obtention d'un effet protecteur chez le rat (Grzych et al., 1985). L'immunisation par la KLH induit une protection de 50 à 75% chez le rat (Grzych et al., 1987).

(3) *Identification d'antigène par l'étude d'une
réponse immunitaire vis à vis d'antigènes bruts.*

Une protéine de 91 kDa a été isolée des antigènes bruts du vers adulte à partir d'un gel de polyacrylamide sur lequel les antigènes totaux du vers adulte ont été préalablement fractionnés, puis injectée sans adjuvant par voie sous-cutanée chez la souris. Le taux moyen de protection avec cette préparation antigénique est de 24 % et s'élève à 52% en présence de BCG (Flanigan et al., 1989, Pearce et al., 1988).

Cette protéine a été identifiée comme étant une paramyosine (protéine myofibrillaire d'invertébré dont les séquences sont hautement conservées).

(4) Identification d'antigènes par l'étude d'une réponse immunitaire vis à vis des larves atténuées.

L'étude de la réponse immune développée chez l'hôte expérimental à la suite d'une immunisation par des larves de schistosome irradiées, a permis d'identifier de nouveaux antigènes d'intérêt. Un antigène de 200 kDa est identifié comme l'antigène protecteur. Une portion de 62 kDa de cet antigène a été clonée. La vaccination par cette protéine recombinante donne une protection de 32% (Soisson et al., 1992). Une autre expérience de Hanna indique que les antigènes 106 et 97 kDa peuvent être les antigènes cibles d'une protection induit par les larves irradiées - atténuées (Hanna et al., 1994).

(5) Identification d'antigènes qui sont des composantes fonctionnellement essentielles pour la survie parasitaire.

Au moins, deux familles d'enzymes sont essentielles à la survie du parasite dans son hôte et sont donc de ce fait des candidats vaccinaux. Il s'agit des protéases et des glutathion S-transférases, ces dernières seront décrites avec plus de détails dans le chapitre suivant. Le schistosome exprime des protéases à tous les stades de cycle parasitaire. Ces sont des enzymes multi - fonctionnelles qui aident les parasites pendant l'invasion, le développement et leur expulsion de l'hôte. Outre le fait que ces molécules soient les candidats de la vaccination, ce type d'approche permet de trouver des inhibiteurs enzymatiques de ces protéines qui peuvent contrôler l'infection parasitaire, et donc servir de médicament (McKerrow, 1988).

Par l'intermédiaire de toutes ces stratégies, de nombreuses protéines sont étudiées, mais seul un faible nombre de ces protéines recombinantes a démontré des propriétés vaccinales (Bergquist, 1990, Bergquist, 1995). Le tableau qui suit récapitule l'état des recherches dans cette approche vaccinale:

Antigène	Propriété	Références
Molécules de 53 kDa et 155 kDa	Antigène membranaire	(Smith and Clegg, 1985)
Complexe antigénique (200 kDa)		(Hazdai et al., 1985)
Molécule de 38 kDa	KLH-like	(Dissous et al., 1986)
SRP: 22kDa et 26 kDa (SRP26)		(Damonville et al., 1986)
Sm28GST (28 kDa)	Enzyme	(Balloul et al., 1985)
Paramyosine (97 kDa)	Protéine musculaire	(Pearce et al., 1988)
IrV-5 (62 kDa)	Protéine musculaire	(Soisson et al., 1992)
Triose-phosphate-isomérase (28kDa)	enzyme	(Shoemaker et al., 1992)
Molécules de 23kDa (Sm23)	antigène membranaire	(Reynolds et al., 1994)
Protéine fixant des acides gras (Sm14, 14 kDa)	antigène membranaire	(Bergquist, 1995)

II. LA GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE 28KDA DE *S. MANSONI*

A. IDENTIFICATION DE SM28GST

La quatrième stratégie pour l'identification des antigènes qui est basée sur le concept de l'immunité concomitante, consistait à caractériser un antigène présent non seulement au stade adulte mais également à la surface du schistosomule. A partir d'un extrait antigénique total, une dizaine d'antigènes de masse moléculaire comprise entre 28 et 90 kDa ont été purifiés par électroélution puis injectés chez des rats. Les antisérums polyclonaux mono-spécifiques correspondants furent testés en immuno-précipitation contre :

1. Le produit de marquage métabolique du vers adulte;
2. Le produit de marquage de surface du schistosomule;
3. Le produit de traduction *in vitro* des ARN messagers du vers adulte et du schistosomule.

Seul un antisérum fut capable l'immuno-précipiter, à partir des quatre catégories antigéniques précédemment citées, une molécule de 28 kDa. De plus, ce sérum, dirigé contre la fraction moléculaire migrant à 28 kDa (P28), induisait une cytotoxicité élevée en présence d'éosinophiles (Balloul et al., 1985). L'immunisation avec la molécule native (purifiée à partir de l'extrait antigénique total du parasite) conduit à des degrés de protection significatifs, puisqu'ils atteignent 70% chez le rat et 45% chez la souris (Balloul et al., 1987c). Le clonage moléculaire de cette molécule fut donc entrepris et aboutit à la caractérisation complète de cet antigène de 28 kDa (Balloul et al., 1987b).

B. CARACTERISATION DE L'ANTIGENE SM28GST

L'antigène Sm28GST est une protéine de poids moléculaire apparent 28 kDa qui se caractérise par son activité enzymatique Glutathion-S-transferase (GST). Ces enzymes catalysent la réaction d'oxydation du glutathion réduit (GSH), avec formation de thio-esters en

présence de substrats portant un groupement électrophile. Elles interviennent également dans le transport non spécifique de nombreuses substances telles que la bilirubine, l'hématine ou les stéroïdes, ce qui leur a valu le qualificatif de ligandine (Pickett and Lu, 1989). Chez les mammifères, les GST participent aux réactions de détoxification hépatique en neutralisant les peroxydes et les radicaux libres. Elles pourraient exercer un rôle comparable chez les parasites, qui sont continuellement exposés à ces médiateurs toxiques au cours d'activation du système immunitaire (Jakoby and Ziegler, 1990, O'Leary and Tracy, 1991).

C. ANALYSE MOLECULAIRE DE SM28GST

Le clonage moléculaire de Sm28GST a été effectué grâce à des sérums de lapins immunisés avec la protéine électroéluée. A partir d'une banque d'ADNc de vers adultes, un clone produisant la totalité de la molécule Sm28GST, a été sélectionné afin de construire des plasmides recombinants permettant l'expression dans différents systèmes tels que des bactéries (*E.coli*), des levures (*S. cerevisiae*) ou le virus de la vaccine (Balloul et al., 1987a).

L'analyse de la séquence a permis de supposer sa nature enzymatique par comparaison aux séquences déjà décrites des GSTs humaines. Cette hypothèse a été ensuite confirmée sur le plan biochimique grâce à l'activité enzymatique de la protéine recombinante en présence de nombreux substrats spécifiques des GSTs. Cependant, on remarque que l'homologie avec les GSTs du rat et de l'homme reste faible, et ne porte que sur des zones restreintes de la molécule (Taylor et al., 1988). La localisation du site enzymatique reste controversée, bien que les zones d'homologie les plus importantes se situent entre les résidus 70 à 80 d'une part, et dans la partie carboxy-terminale de la séquence d'autre part. Certains résidus sont conservés dans des positions similaires sur toutes les GST, ce qui suggère leur participation au site enzymatique. L'étude cristallographique de Sm28GST indique que les cristaux parmi le groupe d'espace cubique P₄32 (ou P₄32), avec l'unité

de dimension cellulaire $a = 122,6 \text{ \AA}$ et contient une molécule dans l'unité asymétrique (Trottein et al., 1992).

D. LOCALISATION DE L'ANTIGENE SM28GST

Le marquage immunologique montre que Sm28GST est présent dans le cytoplasme à tous les stades de développement du parasite, sauf dans les œufs intra-utérins. On observe chez le vers adulte une répartition préférentielle de Sm28GST dans des cellules spécialisées du parenchyme et dans les tubercules dorsaux du vers mâle. On note aussi sa présence dans les cellules germinales immatures et dans le système d'excrétion protonéphridien, mais pas à la surface. L'antigène est présent dans le tégument de schistosomule, et montre une expression transitoire à la surface. Il s'agit d'un antigène commun à tous les stades du parasite, dont l'accessibilité au système immunitaire semble limitée aux produits d'excrétion - sécrétion. Au niveau ultrastructural, l'antigène est abondant dans les noyaux et présent dans le cytoplasme à un niveau plus faible (Taylor et al., 1988, Holy et al., 1989, Porchet et al., 1994, Liu et al., 1996).

E. POUVOIR PROTECTEUR DE SM28GST

1. REDUCTION DE LA CHARGE PARASITAIRE

Une seule injection de Sm28GST recombinant à des rats provoque une réduction de la charge parasitaire de plus de 50% (Balloul et al., 1987b, Grezel et al., 1993). Chez la souris, l'immunisation induit une réduction de la charge parasitaire d'environ 30% (Wolowczuk et al., 1989). Chez le babouin, elle peut atteindre 80%, cependant d'importantes variations individuelles sont notées et une moyenne de 40% de la charge parasitaire est enregistrée dans ce modèle primate (Balloul et al., 1987a, Boulanger et al., 1991).

2. REDUCTION DE LA PONTE DE VERS FEMELLES

Chez la souris et le babouin, l'immunisation par la Sm28GST affecte la ponte des vers femelles (Boulanger et al., 1991). Un anticorps

monoclonal d'isotype IgA, spécifique de la Sm28GST, induit le même effet (Grezel et al., 1993). Si le transfert passif de lymphocytes de souris immunisées par Sm28GST, à des souris saines ultérieurement infectées, n'induit pas de réduction de la charge parasitaire, il induit toutefois une forte diminution du nombre des œufs hépatiques (Wolowczuk et al., 1989). Ces mécanismes peuvent être attribués à un processus actif d'inhibition de la ponte des parasites. En effet, les sérums d'animaux immunisés par Sm28GST sont capables d'inhiber *in vitro*, la ponte des schistosomes de 30%, sans intervention de cellules effectives (Boulangier et al., 1991). Cet effet anti -fécondité ne se manifeste qu'avec les anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la molécule Sm28GST (Xu et al., 1991). De plus, Grzych et coll. (1993) associent le taux d'IgA spécifiques de la Sm28GST et de divers peptides de synthèse qui en sont dérivés, à la capacité à neutraliser l'activité enzymatique et l'acquisition de l'immunité protectrice chez une population résidant en zone d'endémie (Grzych et al., 1993).

3. REDUCTION DE LA VIABILITE DES OEUFS

Une réduction d'environ 30% de la viabilité des œufs pondus par les vers femelles est obtenue après immunisation par l'antigène Sm28GST ou le transfert passif d'un anticorps monoclonal bloquant l'activité enzymatique de GST (Boulangier et al., 1991, Xu et al., 1991).

4. REDUCTION DE LA PATHOLOGIE

Un effet sur la diminution de la taille des granulomes péri -ovulaires ainsi qu'une diminution de la fibrose hépatique sont observées après immunisation de souris ou de babouins par l'antigène Sm28GST. La réduction de la fécondité et de la viabilité des œufs peut jouer un rôle dans cette diminution. D'autre part, l' INF- γ induit par l'immunisation inhiberait activement la fibrogénèse (Boulangier et al., 1991, Pancre et al., 1994).

F. L'ANTIGENICITE DE SM28GST

La Sm28GST recombinante est reconnue par les sera

d'infestation de rongeurs et de patients bilharziens, ce qui conforte sa similitude avec l'antigène natif. Réciproquement, l'immunisation de rongeurs par l'antigène recombinant exprimé dans différents vecteurs produit des anticorps qui reconnaissent l'antigène parasitaire (Balloul et al., 1985). L'analyse de l'immunogénicité des différentes régions de la molécule, et la mise en évidence des épitopes majeurs, ont été entreprises. Sept peptides ont été déduits de la séquence de Sm28GST à partir de ses caractères physico-chimiques selon des critères d'hydrophilie et d'hélicité, grâce aux méthodes de Janin et de Hopp (Janin, 1979, Hopp and Woods, 1981). Les séquences peptidiques ainsi déterminées sont, en partant de l'extrémité N-terminale: 24-43, 65-86, 87-111, 115-131, 140-153, 158-175, 190-211. L'ensemble de ces peptides couvre presque tout l'antigène. Certains d'entre eux, tels que le peptide 24-43, se révèlent être des épitopes B. Ils sont reconnus aussi bien par les sérums d'infestation des rongeurs que par ceux des patients bilharziens. Ces peptides représentent également des épitopes T qui sont reconnus par les lymphocytes T des rongeurs, mais aussi par les lymphocytes T circulants d'hommes infestés. L'injection des peptides chez le rat suscite une réponse anticorps spécifique de l'antigène Sm28GST (Auriault et al., 1988, Wolowczuk et al., 1991). Les sérums des enfants infectés sont capables de reconnaître les peptides 115-131 et 24-43 (Auriault et al., 1990). Une autre étude, réalisée sur des individus âgés de 6 à 66 ans, montre une corrélation positive entre l'acquisition de l'immunité à la réinfection, l'âge et le taux d'IgA anti-115-131, mais pas anti-24-43 (Grzych et al., 1993). Pour augmenter l'immunogénicité de ces peptides, le peptide 115-131 a été mis sous forme octopus, c'est-à-dire construction composée de 8 peptides identiques greffés à un corps de poly-L-lysine. L'immunisation par cette construction permet de protéger, à plus de 50%, de rats contre une infestation expérimentale (Wolowczuk et al., 1991).

III. TRANSGÈNESE ANIMALE

Les progrès croissants de la biologie cellulaire et de la génétique moléculaire ont permis de manipuler, presque à volonté, le patrimoine génétique de la souris, donnant ainsi la possibilité de créer des modèles expérimentaux complexes. Deux principales modalités opératoires sont actuellement utilisées pour obtention d'animaux transgéniques : la transgénèse classique par micro-injection dans le pronucleus de l'œuf fécondé et la recombinaison homologue utilisant les cellules ES (Embryonic Stem cells). La transgénèse classique permet d'insérer des séquences géniques de façon aléatoire, supplémentaires au propre patrimoine génétique de la souris. La création de tels animaux permet d'étudier les conséquences de l'expression du gène étudié, tandis que la recombinaison homologue permet d'obtenir des animaux défectifs pour le gène d'intérêt.

A. LA TRANSGENESE CLASSIQUE : LA MICROINJECTION

Elle a pour principe la micro-injection de gènes clonés dans l'œuf fécondé de souris. La technique a été décrite pour la première fois par Brinster (Brinster et al., 1980). Elle est détaillée dans "Manipulating the mouse embryo" (Hogen et al., 1986). Les paragraphes suivants décrivent brièvement la méthode.

1. CLONAGE DE LA CONSTRUCTION COMPORTANT LE GÈNE ETUDIÉ :

Elle comprend trois éléments importants. Premièrement, les séquences promotrices et régulatrices d'un gène qui permettent de cibler l'expression du gène étudié dans des organes choisis. Par exemple, si on veut cibler une expression au niveau hépatique, on pourra utiliser les séquences régulatrices et promotrices du gène de l'albumine (Chisari, 1996), ou le promoteur de la transferrine (Lu et al., 1993). Deuxièmement, les séquences exoniques et introniques du gène étudié

sont importantes. Il a été en effet démontré qu'il est préférable pour obtenir une bonne transcription, d'utiliser de l'ADN génomique ou d'intégrer au ADNc des introns artificiels. Troisièmement, les signaux de polyadénylation et de terminaison de la transcription qui permettent de stabiliser la transcription en message transgénique doivent être considérés.

2. MICROINJECTION DE CETTE CONSTRUCTION DANS L'OEUF:

Pour la micro-injection, il faut d'abord obtenir les œufs par superovulation de femelles de 3-5 semaines d'âge. Celles-ci sont stimulées successivement par deux hormones (Pregnant Mare Serum Gonadotropin et Hormone Gonadotropine Chorionique) puis accouplées avec des mâles féconds. Les œufs sont obtenus par le sacrifice des femelles, dans l'ampoule de l'oviducte, 20 heures après la superovulation. La construction est alors microinjectée dans l'un des deux noyaux de l'œuf fécondé (sous microscope et à l'aide de micromanipulateurs).

3. REIMPLANTATION DES OEUFS MICROINJECTES DANS L'UTERUS DE FEMELLES PREPAREES A LA NIDATION:

Les femelles préparées à la nidation sont les femelles pseudogestantes. Elles sont obtenues par accouplement de femelles normales avec des mâles vasectomisés. Les œufs microinjectés sont réimplantés dans l'infundibulum de l'oviducte de ces femelles.

4. ANALYSE DES SOURICEAUX ET DE LEURS DESCENDANTS:

Le criblage des souriceaux a pour but de rechercher l'existence de fondateurs qui seront à l'origine d'une lignée transgénique par croisement avec des souris non transgéniques. Brièvement, une partie de la queue des souriceaux nés de la femelle reimplantée sera coupée, et l'ADN extrait. Par analyse en Southern blot et dot blot, on recherche l'existence d'animaux transgéniques parmi les nouveau-nés en utilisant tout ou

partie du transgène comme sonde. Dès qu'une lignée est établie, et le nombre d'animaux suffisant pour assurer la pérennité de la lignée, quelques animaux transgéniques seront sacrifiés pour analyser l'expression du transgène en ARN messenger (northern blot, hybridation in situ) et détecter la protéine (Western blot, Immunofluorescence ou immunohistochimie).

La micro-injection est la technique la plus puissante de manipulation génétique animale. Elle donne un rendement satisfaisant et permet d'introduire des gènes de grande taille (250 kb). Mais l'intégration du transgène dans le génome se fait de manière aléatoire tant en ce qui concerne le locus que le nombre de copies. De plus, dans le cas où le transgène est un gène endogène, normal ou muté, l'expression de ce transgène est associée à la persistance de l'expression du gène normal sous le contrôle de son propre promoteur. Cette persistance de l'expression du gène endogène peut créer un biais dans l'interprétation des résultats. Par des événements épigénétiques (par exemple, méthylation d'ADN) l'expression du transgène peut aussi être diminuée.

B. LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE (LEMARCHANDEL AND MONTAGUTELLI, 1990)

La recombinaison homologue est un phénomène d'échange de matériel entre deux molécules d'ADN de séquence très voisine au cours duquel aucun nucléotide n'est perdu ni ajouté. Elle permet des échanges de fragments d'ADN entre des doubles brins possédant des séquences identiques. Il est possible de créer des souris transgéniques par la recombinaison homologue (Lemarchandel and Montagutelli, 1990). Cette technique requiert d'abord l'obtention de cellules souches embryonnaires totipotentes ES ayant subi un événement de recombinaison homologue entre le gène d'intérêt et le gène endogène homologue. Une fois obtenues, les cellules ES clonées seront introduites dans le blastocyste, qui sera réimplanté dans une femelle pseudogestante.

Cette technique comprend 4 étapes critiques:

1. LA CONSTRUCTION

La construction génomique comportant le segment du gène étudié muté et des vecteurs. La construction de vecteur peut être délicate car l'ADN génomique est plus difficile à manipuler que l'ADNc. Les améliorations de la réaction en chaîne par la polymérase (PCR) qui permet d'amplifier des fragments de très grande taille peuvent faciliter cette construction. L'utilisation de vecteurs de sélection permet aussi un enrichissement des clones ayant recombiné.

2. LA TRANSFECTION

La construction est introduite par électroporation dans les cellules ES. La puissance du criblage des clones recombinants est un facteur important de la réussite de la technique. Il est habituellement utilisé une double sélection positive et négative.

3. LA MICROINJECTION

Pour obtenir une lignée de souris "knock out", il convient que les cellules ES injectées participent au développement des gonades.

Cette technique permet de créer des lignées murines mutantes bien définies. On peut contrôler l'intégration du gène d'intérêt en un exemplaire unique dans un locus ciblé. Le plus souvent, la mutation créée aura pour but d'empêcher toute transcription et traduction du gène, permettant ainsi d'étudier dans les lignées homozygotes les conséquences de l'absence d'expression de gène (knock-out mice).

C. CONCLUSIONS

Il convient de souligner que pour les deux techniques précitées de recombinaison homologe et de transgénèse classique, l'effet mutagène intervient dès les premiers stades de développement de l'embryon. Les conséquences de la transgénèse peuvent donc intervenir très tôt dans le développement et ne pas permettre l'obtention d'une lignée transgénique, ou induire des effets qui sont éloignés d'une situation physiopathologique.

La technique de transgénèse a été originairement développée chez

la souris, parce qu'un grand nombre d'embryons peut-être obtenu et manipulé facilement, et que l'intervalle génératif est court. Mais elle peut aussi être utilisée chez d'autres animaux (de grande taille: porc, bovin, lapin, poulet, mouton, chèvre, ou de petite taille: drosophile), pour améliorer les produits agricoles (lait, viande, protéines utilisées uniquement par l'homme) et pour obtenir des espèces domestiques résistantes aux infections. Cependant il est plus difficile de manipuler les gènes des ces animaux que ceux de la souris et il n'a pas été possible d'obtenir des cellules ES, dans une autre espèce que la souris.

IV. UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR ANALYSER LA TOLÉRANCE

La tolérance immunitaire reflète l'absence de réactions immunologiques à l'égard des antigènes du soi (tolérance naturelle) ainsi qu'à des antigènes exogènes. Le terme de tolérance naturelle réfère à une situation physiologique normale où il n'existe pas de manifestations pathologiques d'une immunité à l'égard du soi. Trois mécanismes sont proposés pour expliquer la tolérance:

- ✓ la délétion des clones réactifs;
- ✓ l'anergie clonale: les lymphocytes spécifiques existent mais sont inactifs;
- ✓ la suppression des cellules T ou B responsables, induite par les cellules T.

Les recherches sur les mécanismes de la tolérance ont bénéficié ces dernières années de l'apport des animaux transgéniques qui permet d'exprimer un gène codant pour un antigène étranger (un antigène, un TCR ou un anticorps), dans un tissu ou un type de cellule, sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cet antigène devient une molécule du soi authentique dans la souris transgénique et il est synthétisé par la souris dans un site précis et à un stade particulier du développement (Monastersky and Robl, 1995).

L'introduction de nouvelles molécules par transgénèse a montré qu'il n'existe aucune différence d'essence entre le soi et le non-soi. Une protéine humaine ou de poulet introduite dans le génome d'une souris devient une composante du soi susceptible d'induire une tolérance au soi, au même titre que n'importe quelle autre protéine de la souris (Seman, 1994).

A. LA TOLÉRANCE DES CELLULES T

1. LA TOLÉRANCE CENTRALE DES CELLULES T

Les lymphocytes T reconnaissent des peptides liés aux molécules

d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II à la surface de cellules présentatrices d'antigène (Gahring and O., 1989). Des expériences de transfert chez des receveurs irradiés avaient montré que des cellules de souches allogéniques, après leur différenciation dans le thymus du receveur deviennent tolérantes aux antigènes du CMH de l'hôte et sont capables de produire des effecteurs cytotoxiques reconnaissant des antigènes viraux présentés par le CMH de l'hôte lors d'une infection par un virus (Zinkernagel et al., 1990). La tolérance restreinte des cellules T ne dépend pas de leur génotype mais de l'environnement dans lequel ces cellules se différencient.

Les preuves d'une sélection positive et d'une sélection négative ont été apportées par plusieurs modèles de souris transgéniques pour un TCR (Kisielow et al., 1988, Sha et al., 1988). Par exemple, le TCR choisi provient d'un clone de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ issu d'une souris femelle de CMH H-2^b. Ce clone reconnaît l'antigène tissulaire H-Y en association avec la molécule du CMH H-2D^b. L'antigène H-Y est exclusivement exprimé chez le mâle. Son absence chez la femelle permet l'obtention de cellules cytotoxiques anti-H-Y après immunisation avec des cellules d'un donneur mâle. Chez les femelles H-2^b transgéniques, le TCR de ce clone se trouve présent sur un fort pourcentage de cellules CD8⁺ à la périphérie. Cette situation est en partie attendue puisque les transgènes introduits bloquent les réarrangements des gènes du TCR endogène. Cela montre qu'un TCR provenant d'une cellule CD8⁺, introduit par transgénèse dans une souris, se retrouve préférentiellement exprimé sur des cellules CD8⁺ et non sur les cellules CD4⁺. L'introduction de ce TCR chez des mâles H-2^b revient à créer des animaux transgéniques exprimant un TCR autoréactif. Chez de tels animaux, on observe une disparition, à la périphérie, des cellules T fonctionnelles CD8⁺ exprimant le TCR transgénique et on constate une forte diminution des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans le thymus. Les cellules cytotoxiques autoréactives seraient donc éliminées du répertoire des cellules T et cette élimination interviendrait dans le thymus au niveau des précurseurs CD4⁺ et CD8⁺, dont ils dérivent normalement. Ces

résultats indiquent que la tolérance peut être mise en place au niveau central dans le thymus par l'élimination précoce de cellules CD4+ et CD8+ susceptibles de donner naissance à des lymphocytes cytotoxiques CD8+ autoréactifs (Kisielow et al., 1988).

2. LA TOLERANCE PERIPHERIQUE DES CELLULES T

La sélection négative procède par l'élimination des cellules T fortement autoréactives dans le thymus conduisant à leur absence dans les organes lymphoïdes périphériques, mais le phénomène de délétion clonale n'est pas absolu. Tous les peptides du soi ne sont pas nécessairement représentés dans le thymus. La nécessité d'un mécanisme périphérique d'induction et de maintien de la tolérance se trouve donc posée. Dans les modèles de souris transgéniques évoqués plus haut, le TCR peut être retrouvé sur des lymphocytes périphériques (Seman, 1994). Q10/L est un gène de classe I dans la région Q du CMH de la souris codant pour une molécule sécrétée. L'expression de Q10/L dans les hépatocytes induit une tolérance fonctionnelle pour les lymphocytes, bien que les souris transgéniques aient un nombre normal de CTLs induits par cet antigène. Des cellules T réagissant au transgène peuvent être activées *in vitro* indiquant que la tolérance correspond à une anergie (Forman et al., 1991).

B. LA TOLERANCE DES CELLULES B

La question de la tolérance des lymphocytes B pourrait être envisagée de façon un peu caricaturale en se rappelant que leur différenciation en cellules productrices d'anticorps requiert l'intervention des lymphocytes T auxiliaire. La tolérance des lymphocytes T pourrait donc suffire pour rendre compte de la non-production d'anticorps et donc d'une tolérance B.

1. DELETION CLONALE

Une délétion clonale des cellules B exprimant un anticorps transgénique est, par exemple, observée chez des animaux transgéniques pour un gène codant l'IgM anti-H-2K^DK du CMH classe I. Chez la

souris transgénique exprimant ce gène (H-2^d), 25-50% des cellules B spléniques portent l'immunoglobuline membranaire spécifique, et dans le sérum, on observe aussi l'anticorps anti-H-2^k. Par contraste, des souris doubles transgéniques exprimant les gènes d'anticorps IgM anti-H-2k et H-2d (H-2-d/k), aucune cellule B anti H2-k n'est détectable. Ces résultats suggèrent que les cellules B autospécifiques peuvent être contrôlées par la délétion clonale (Nemazee and Baurki, 1989).

Chez des animaux transgéniques pour un anticorps anti-lysozyme de poulet, on observe une forte fréquence de cellules B exprimant cet anticorps. Ainsi l'on introduit en plus, chez des animaux doublement transgéniques, le lysozyme par une construction génétique permettant son expression à la surface de la membrane cellulaire, en particulier dans la moelle osseuse, les cellules B produisant les anticorps antilysozyme disparaissent. Un autre exemple est apporté par l'étude de la souris transgénique surexprimant la particule HBs du virus hépatite B humain au niveau hépatique. Dans le sérum de cette souris on retrouve une quantité importante de particule HBs. Aucune réponse anticorps n'est détecté vis à vis de ces particules, avec ou sans l'immunisation (Mancini et al., 1993).

Un problème important, c'est la tolérance pour l'immunoglobuline elle-même. Les gènes d'immunoglobulines sont capables d'hypermuter leurs régions variables, afin de produire des anticorps ayant une forte affinité pour les antigènes étrangers. L'hypermutation du gène de l'immunoglobuline induite par l'antigène étranger peut potentiellement produire des anticorps capable de croiser avec les composants du soi. Il existe un mécanisme pour l'inactivation des clones cellulaires B matures auto-réactifs dans la périphérie. Pour analyser le mécanisme d'induction de la tolérance pour l'immunoglobuline G (IgG) humaine, une souris transgénique qui exprime le facteur rhumatoïde IgM humain (IgM RF) au niveau des cellules B a été obtenue. L'injection d'IgG humaine désagrégée provoque la délétion spécifique des cellules B qui exprime l'IgM RF intact au niveau de la surface cellulaire. Le degré de délétion des cellules B

spécifiques est proportionnel à la réduction de la réponse proliférique des splénocytes à l'antigène (l'IgG humaine agrégée), ou aux fragments F(ab')(2) d'IgM anti-humain. Les délétions sur les cellules B IgM RF humain sont bien spécifiques, car l'administration d'IgG a peu d'effet sur le nombre de cellules exprimant les IgG en surface ou sur leur capacité de proliférer pour un mitogène non spécifique. Les résultats montrent que l'exposition périphérique aux IgG induit la délétion des cellules B réactives, et que l'inactivité périphérique contre l'IgG peut être due à une délétion lymphocytaire (Tighe et al., 1995).

Une tolérance centrale des cellules B par délétion des cellules auto-réactives analogue à celle des cellules T dans le thymus semble donc exister.

2. ANERGIE

Néanmoins, l'expression du transgène n'a pas toujours d'effet détectable sur le développement ou la fonction des cellules B. Par exemple, si dans les souris transgéniques pour un anticorps anti-lysozyme de poulet, on introduit l'expression du lysozyme de sorte qu'il circule sous forme libre dans le sérum, il n'y a plus production d'anticorps, mais la fréquence des cellules B exprimant l'anticorps transgénique reste aussi élevée que chez la souris uniquement transgénique pour l'anticorps anti-lysozyme (Goodnow et al., 1989).

La souris transgénique contenant l'ORF de l'enveloppe du HBV, sous contrôle du promoteur de l'albumine murine, exprime l'HBsAg dans tous les hépatocytes et le secrète dans la circulation (10-40 ng/ml) (Wirth et al., 1995). L'immunisation chez ces souris par l'HBsAg purifié avec adjuvant complet de Freund, plus l'infection répétée par l'enveloppe du virus vaccinal HBV recombinante produit des auto-anticorps anti-HBs, qui éliminent les HBsAg du sérum mais n'active pas les CTL HBsAg-spécifique. Mais le titre de cet anticorps est plus bas que chez les souris contrôles. L'analyse montre que ces souris sont tolérantes au niveau des cellules T mais pas au niveau des cellules B, et l'activation de la réponse anti-HBs n'est pas suffisante pour induire

une maladie hépatique auto-immune dans ces souris (Wirth et al., 1995).

Des expériences de transfert chez des receveurs irradiés qui permettent l'apport de cellules T auxiliaires, confirment que les cellules B, dans ce cas, sont dans un état d'anergie.

3. TOLERANCE PERIPHERIQUE B

La question d'une tolérance périphérique des lymphocytes B, qui concerne des cellules matures, est plus complexe. Il est clair, comme le montrent les animaux transgéniques, que la rencontre de l'antigène, en l'absence de signaux auxiliaires T, conduit les cellules à un état de tolérance. De même, un traitement «tolérogène», chez des animaux pré-immunisés, empêche l'apparition d'anticorps de haute affinité, ce qui confirme que les cellules B qui ont été engagées dans une réponse immune restent susceptibles à l'induction de la tolérance. Des cellules B anergiques (provenant de la souris transgénique) ou normales sont transférées dans des souris normales ou transgéniques. Ces expériences montrent que les cellules B anergiques auto-réactives ne migrent pas vers les follicules primaires et meurent après 1 à 3 jours de résidence dans les zones de cellules T. La mort des cellules B n'est pas due à une caractéristique intrinsèque des cellules B anergiques, mais est le résultat d'une compétition avec les cellules B portant l'autre spécificité pour l'auto-antigène. Ainsi, les cellules B HEL-spécifiques transférées dans les souris transgéniques exprimant l'auto-antigène HEL, sont exclues des follicules, mais sont activées pour l'expression de CD86 (B7-2/B70) et forment des foyers extrafolliculaires sécrétant des auto-anticorps (Cyster and Goodnow, 1995).

L'étude des mécanismes en cause reste cependant difficile puisque les cellules B ont, en tout état de cause, une espérance de vie très courte *in vitro* (Freitas et al., 1986).

C. MECANISMES CELLULAIRES DE LA TOLERANCE

Si les grands mécanismes qui peuvent rendre compte de la

tolérance paraissent maintenant bien établis sur le plan expérimental, les événements cellulaires, dans leur intimité, restent encore assez mal compris. Dans le cas de la délétion clonale, on admet aujourd'hui qu'un processus de mort programmé, ou apoptose, est susceptible d'expliquer l'élimination de certaines cellules en particulier autoréactives. Plusieurs signaux accessoires (CD28, cytokines) sont nécessaires pour entraîner l'activation d'une cellule lymphoïde. Si ces signaux sont dissociés, ils pourraient entraîner l'anergie ou l'apoptose cellulaire. Par exemple, la molécule CD28 pourrait jouer le rôle de second signal lors de son interaction avec la molécule B7 présente à la surface des lymphocytes B (Liu et al., 1992). En l'absence de cette interaction, la seule liaison du TCR bloquerait la prolifération cellulaire et la production d'IL-2 ou IL-4. Cet exemple illustre le fait que les signaux annexes doivent être apporté par les cellules présentatrices de l'antigène. On pourrait ainsi expliquer le rôle des cellules de l'épithélium cortical thymique par rapport dans la sélection positive et négative des lymphocytes T.

V. UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR LES AGENTS INFECTIEUX

La multiplication des micro-organismes est sous la dépendance des facteurs de croissance, qui sont souvent spécifiques d'espèces. La transgénose permet de transférer une information génétique à un animal de laboratoire pour permettre son infestation et obtenir un modèle expérimental. D'autres approches visent à modifier la réponse immunitaire pour évaluer le rôle physiopathologique de la composante modifiée. Nous donnons ici quelques exemples de stratégies utilisant les souris transgéniques pour étudier la physiopathologie des maladies infectieuses.

A. ETUDE DES RECEPTEURS

1. LE VIRUS DE L'HEPATITE B (CHISARI, 1996)

L'étude du virus de l'hépatite B (HBV) est difficile, parce que le choix de l'hôte du virus est très limité et que le système de culture *in vitro* pour la prolifération du HBV n'existe pas. Bien que l'étude du virus hepadna chez la marmotte et le canard Pékin, nous donne des informations sur la pathogénèse du virus, ces espèces sont phylogéniquement trop éloignées de l'homme pour apporter des informations pertinentes pour l'affection humaine. De plus, il existe un manque de réactifs immunologiques pour l'étude de ces infections chez ces espèces.

Les souris transgéniques exprimant une partie ou la totalité du génome viral de l'HBV ont été construites. Les résultats montrent que le virus se réplique non seulement dans les hépatocytes, mais aussi dans beaucoup d'autres cellules, par exemple, les cellules épithéliales tubulaires de rein (DeLoia et al., 1989). Il n'y a donc pas de forte spécificité cellulaire permettant ou non la réplication du virus à l'intérieur d'une espèce, une fois que le HBV a pénétré la cellule.

2. LE POLIOVIRUS HUMAIN

Grâce aux souris transgéniques exprimant le récepteur du poliovirus humain, des essais alternatifs de contrôle de la neurovirulence du poliovirus ont commencé à se développer. Ce modèle est plus accessible que celui du primate et permet d'utiliser un plus grand nombre d'animaux pour d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Enfin et surtout, le récepteur du poliovirus (PVR) de ces souris est le récepteur humain, et non celui du singe. Les souris transgéniques exprimant le PVR (ICR-PVRTg1) inoculées intracérébralement avec le poliovirus de souche Sabin type 1 atténué, développent une maladie clinique et les lésions histopathologiques. Les résultats obtenus chez la souris ICR-PVRTg1 corrélaient avec ceux obtenus chez le singe. Le modèle a donc été utilisé pour évaluer la neurovirulence des souches de Sabin type 1, 2 ou 3 (Horie et al., 1994, Bouchard et al., 1995, Ren et al., 1991, Abe et al., 1995, Mento et al., 1993) et celle du virus isolé de la poliomyélite paralytique qui est une maladie associée au vaccin (VAPP, vaccine associated paralytic poliomyelitis) (Georgescu et al., 1995). Pour identifier les déterminants responsables de la neurovirulence du virus de la poliomyélite, des virus recombinants sont obtenus puis testés dans la souris transgéniques ICR-PVRTg1. Le nucléotide A-481 dans la région 5' non-codante et l'isoleucine en position 143 de la protéine de capsid VP1 ont ainsi été identifiés comme déterminants d'atténuation pour le vaccin Sabin type 2. Une souche contenant ces mutations a été isolée chez un patient présentant en VAPP. Le rétablissement de la séquence normale n'a cependant pas restitué la neurovirulence, suggérant l'intervention d'autres déterminants (Ren et al., 1991). Cette étude a été faite chez la souris et le singe (Macadam et al., 1991) et les résultats des deux modèles concordent. Toutefois certaines souris transgéniques obtenues ne sont pas assez sensibles (Dragunsky et al., 1993) et le modèle singe reste encore le plus pertinent. Les sites de réplication du virus sont limités aux neurones du SNC, aux neurones des ganglions nerveux périphériques, aux neurones

de muscle squelettique, aux tissus adipeux bruns et à la muqueuse nasale (Ren and Racaniello, 1992). Pour d'autres lignées de souris transgéniques, la réplication se retrouve ainsi dans les cellules intestinales (Koike et al., 1993). Ces résultats sont similaires aux observations faites chez les primates (Nomoto et al., 1994).

3. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAIN (VIH)

Le VIH est responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le modèle animal le plus approprié pour l'étude de ce virus est le macaque infecté par le virus d'immunodéficience simien (VIS). Cependant, le nombre de singe en expérimentation est limité, et la maladie provoqué par le VIS n'est pas totalement homologue au VIH. C'est pourquoi, la souris transgénique pourrait être un modèle intéressant pour l'étudier du VIH (Brady et al., 1994).

Quelques lignées de souris transgéniques exprimant le CD4 humain dans les cellules T et B (sous le contrôle du promoteur H-2K^b de souris) ont été obtenues. Cependant les lymphocytes CD4⁺ ne soutiennent pas la réplication du virus. Ces résultats pris ensemble ont suggérés l'existence de récepteurs accessoires pour la fixation et/ou l'entrée du virus dans la cellule. La deuxième stratégie a consisté en l'obtention de souris transgéniques pour le virus entier. Les nouveaux nés hétérozygotes développent un syndrome caractérisé par un retard de croissance et une cachexie évoluant irrémédiablement vers la mort des souris dans le mois qui suit la naissance. Les conditions de manipulation de ces souris doivent être réalisés dans un laboratoire de niveau 4, limitant l'utilisation de tels modèles (Leonard et al., 1988).

B. ANALYSE DU POUVOIR PATHOGENE DES PROTEINES

Les micro-organismes pathogènes synthétisent des protéines qui peuvent être la cause principale du pouvoir pathogène. L'identification de ces protéines et le mode de leur action constituent des voies de

recherches importantes pour l'obtention d'un vaccin ou d'un médicament efficace. La transgènes animal permet d'exprimer une protéine du micro-organisme d'intérêt pour étudier ces propriétés physiopathologiques. Voici quelque exemples où cette stratégie a été mise a profit.

1. HTLV-I (HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1)

HTLV-I qui est un membre de la sous-famille des rétrovirus *Oncovirinae*, a été identifié comme un agent étiologique de la leucémie liée aux cellules T chez l'adulte (ATL). Récemment, HTLV-I a été associé à de nombreux autres désordres pathologiques, tels que la paraparésie spasmodique tropicale (démyélination des neurones), la polymyosite et l'uvéite. La protéine Tax est impliquée dans la transformation cancéreuse. La souris transgénique pour le gène Tax placé sous le contrôle du promoteur HTLV-1 LTR exprimant la protéine Tax dans le muscle squelettique, les fibroblastes et la glande salivaire développent des tumeurs fibroblastiques (Nerenberg et al., 1990). Mucke (Mucke et al., 1991) a microinjecté le gène rapporteur lacZ de *E. coli* (codant pour l'enzyme β -galactosidase), placé sous le contrôle du gène de HTLV-I LTR. La perfusion de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) chez la souris permet de visualiser les cellules où s'exprime la construction transgénique. L'expression de β -gal est non-délectable chez la souris transgénique unique. La souris double transgénique HTLV-I LTR-lacZ \times LTR-tax obtenue par le croisement des deux différentes lignées souris simple transgéniques, exprime la β -galactosidase au niveau des chondrocytes et des fibres musculaires squeletiques qui deviennent atrophiées. La distribution de la β -galactosidase correspond a la celle de l'expression du gène Tax. La région tumorale, liée à la transactivation de cette protéine tax peut être visualisée par la coloration induite par l'activité de la β -galactosidase. Ces résultats confirment qu'il existe dans la région génomique LTR des séquences transactivatrices pour le gène Tax.

2. VIH

Des souris transgéniques exprimant des protéines virales (gp 120, gp16 (Toggas et al., 1994, Toggas et al., 1995)), LTR-tat (Vogel et al., 1988) ont été obtenues pour étudier la responsabilité de ces protéines pour des désordres pathologiques liés au VIH tels que la démence (Toggas and Mucke, 1995), le sarcome de Kaposi, la néphropathie, etc. (Klotman et al., 1995). La gp120 du HIV-1 est une glycoprotéine enveloppe virale qui est libérée par les cellules infectées (Toggas et al., 1994). Pour étudier son activité toxique sur le système nerveux, des souris transgéniques exprimants la gp120 sous le contrôle du promoteur de GFAP (glial fibrillary acid protein) sont construites. Trois lignées de souris développent effectivement les lésions et les changements dans les neurones et les cellules gliales qui sont similaires avec les observations anopathologiques chez l'homme infecté par le VIH. La sévérité de la pathologie est en relation avec le niveau d'expression du transgène. Il est ainsi montré que l'expression de la gp120 peut induire les lésions pathologiques dans le cerveau (Toggas et al., 1994).

3. LE VIRUS D'HEPATITE B (HBV)

Le virus HBV entraîne une hépatite nécroinflammatoire aiguë ou chronique, pouvant aboutir un développement d'un carcinome hépatocellulaire. La toxicité des protéines du HBV pour les hépatocytes a été analysée chez la souris transgénique en surexprimant de les protéines (HBsAg, HBcAg, HBVx ou tout la ORFs du HBV (Chisari, 1996)) du HBV. On observe l'apparition de carcinome hépatocellulaire chez la souris transgénique, dans quelque cas. Il semble donc que cette protéine ne soit pas le facteur unique responsable du développement la tumeur (Koike et al., 1994). La surexpression d'autre protéines virales n'induit pas ces lésions cytopathologiques (Chisari, 1996). Il semble que le virus ne soit donc pas cytopathique par lui même pour les hépatocytes, et que la maladie soit induite par la réponse immune spécifique pour les antigènes viraux exprimés par les hépatocytes infectés. Ainsi l'administration d'IFN- γ chez la souris transgénique exprimant HBsAg

induisent une hépatite grave, ce phénomène n'est pas observé chez les souris non transgéniques (Chisari, 1996).

4. MALARIA

La malaria est l'infection parasitaire la plus répandue dans le monde. Les études épidémiologiques et des études *in vitro* montrent que les hématies de patients thalassémiques sont résistantes à l'infection par *Plasmodium falciparum*. La génération de souris transgéniques exprimant l'hémoglobine β humaine anormale a permis d'étudier ce facteur *in vivo*. Les souris transgéniques pour l'hémoglobine thalassémique humaine sont accouplées à des souris déficientes pour le gène de l'hémoglobines β de souris. Les résultats de l'infestation montrent que cette lignée de souris doubles transgéniques est protégée significativement contre deux espèces de malaria murine, confirmant le rôle favorable d'hémoglobine humaine anormal pour le développement des plasmodies (Shear et al., 1993). Cependant, des observations *in vivo* ne corrèlent pas toujours avec celles faites *in vitro*. Par exemple, les protéines C-réactives de l'homme, du lapin ou du rat sont les molécules qui inhibent le développement de sporozoaires *in vitro* dans l'hépatocyte. Néanmoins, la surexpression la protéine C-réactive du lapin dans la souris transgénique n'entraîne pas une protection de ces souris à l'infection par le sporozoaire *Plasmodium yoelii* (Renia et al., 1993).

C. ANALYSE DE LA REPONSE IMMUNE

La transgénèse a aussi permis de mieux comprendre la physiopathologie des maladies infectieuses, liée a la réponse immune.

1.LE VIRUS LYMPHOCYTAIRE CHORIOMENINGITIS (LCMV)

Le CMH de classe I permet aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) de reconnaître les cellules cibles. Les neurones ne synthétisent pas

le CMH de classe I, limitant ainsi les réponses immunes au niveau du cerveau. De nombreux virus tel que le LCMV, un pathogène naturel mais non cytopathologique pour les souris, utilise cette stratégie pour établir une infection neuronale persistante. Afin d'analyser les conséquences pathogénique de la reconnaissance des cellules du cerveau par des CTLs, des lignées de souris transgéniques exprimant le CMH de classe I, soit au niveau de l'astrocyte utilisant le promoteur GFAP, soit au niveau des neurones en utilisant le promoteur de l'enolase neuronale (NSE), ont été construites par Rall (Rall et al., 1994, Rall et al., 1995). Ces souris ne développent pas de neuropathie spontanée. Par contre, les souris infectées par le LCMV, puis injectées par des de CTLs anti-LCMV restreint au CMH classe I, présentent une mortalité plus importante que les souris ayant reçu des CTLs "*mismatched*", ou que les souris exprimant des transgènes irrelevantes. Ces résultats confirment la possibilité pour les cellules T cytotoxiques spécifiques d'antigènes d'entrer dans le cerveau et d'y exercer des effets pathologiques (Oldstone and Southern, 1993).

Inversement, des souris double déficientes pour la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2$ -m) et la chaîne légère de la glycoprotéine de CMH classe I, développent une maladie du dépérissement chronique. La cinétique du développement des cellules CTL CD4+ est en retard, et le niveau de la libération de ^{51}Cr dans l'essai standard de cytotoxicité avec les cellules cibles CMH classe II infectées par le virus est très bas. Ces résultats montrent que les cellules T CD8+ virus spécifiques jouent un rôle important dans la protection virale (Hou et al., 1992, Muller et al., 1992).

2. HBV

La réponse CTL restreint par le CMH de classe I joue un rôle central dans la physiopathologie de certaines maladies virales (Moriyama et al., 1990). Dans l'hépatite virale humaine à HBV, les CTLs s'attachent aux hépatocytes présentant l'antigène HBs, et induisent l'apoptose. Ceci se traduit par un signe anatomo-pathologique caractéristique de l'hépatite virale aiguë: les corps de Councilman, acidophiliques et largement

dispersés (Ando et al., 1994). Cette fonction est médiée par l'IFN- γ et le TNF α sécrétés par les CTLs ou par les macrophages et les cellules T activées par ces mêmes CTLs (Guidotti et al., 1996). Les résultats chez la souris exprimant HBV montrent que la destruction des hépatocytes n'est pas indirectement causée par les CTLs, mais par les cellules inflammatoires qui sont recrutées ou activées par les CTLs et l'IFN- γ (Ando et al., 1993). L'étude de ces souris a montré une fonction inhabituelle des CTLs, celle d'inhiber l'expression du gène HBV dans les hépatocytes transgéniques, probablement indirectement par l'expression des cytokines (Guidotti et al., 1994a, Guidotti et al., 1996, Guidotti et al., 1994b).

3. LES CYTOKINES

Les cytokines constituent une famille de molécules responsables de la communication intercellulaire du système immunitaire. L'expression de cytokines est influencée par des facteurs infectieux ou par d'autres cytokines, formant des réseaux en "cascades". L'étude *in vitro* ne pouvant pas reproduire ces cascades, la surexpression ou l'inactivation homozygote d'un gène de cytokines chez des souris transgéniques permet d'explorer les fonctions complexes des cytokines les unes par rapport aux autres.

Les cytokines IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IFN- γ , l'érythropoïétine, le TGF- β , le GM-CSF ont été surexprimées par transgénèse chez la souris. Les résultats ont été rassemblés dans le livre "Overexpression and knockout of cytokines in transgenic mice" par C. O. Jacob (Jacob, 1994). Le tableau ci-joint résumet les résultats souvent contradictoires.

Ces modèles ont permis de mettre en lumière certaines fonctions des cytokines dans la physiopathologie des maladies infectieuses, par exemple la schistosomiase: Les souris transgéniques surexprimant l'IL-5 présentent une éosinophilie élevée. La vaccination par des cercaires irradiées de *S. mansoni* de souris transgéniques IL-5, induit une augmentation du niveau des éosinophiles dans le sang périphérique, mais

Table 2. Les souris transgéniques pour les cytokines

Cytokines	Tg	Gène	Promoteur	Reference
IL-1	knock out exprime surexprime	mIL-1 β mIL-1 recepteur antisenc mIL-1 β	- mLCK mLCK	(Csaikl et al., 1994) (Abraham et al., 1991) (Csaikl et al., 1994)
IL-2	surexprime knock out surexprime	mIL-2 mIL-2 mIL-2 ou IL-2R	promoteur d'insulin de rat -	(Allison et al., 1992) (Schorle et al., 1991) (Ishida et al., 1989b)
IL-4	surexprime surexprime	mIL-4 mIL-4	le gène de Ig chaine loup μ , (m ou h) lck	(Tepper et al., 1990) (Lewis et al., 1991)
IL-5	surexprime	mIL-5	LCR humain metallothionein	(Dent et al., 1990) (Tominaga et al., 1991)
IL-6	surexprime	hIL-6 hIL-6	enhancer de Ig Keratin 14 humain	(Suematsu et al., 1989) (Turksen et al., 1992)
IL-7	surexprime	mIL-7	le gène de Ig chaine loup k	(Samaridis et al., 1991)
Leukemia inhibitor factor(LIF)	knock out		-	(Stewart et al., 1992)
IFNs	surexprime surexprime knock out	mIFN β mIFN α mIFN α et recepteur	mMet I promoteur s'insuline humain -	(Iwakura et al., 1988) (Sarvetnick et al., 1988) (Dalton et al., 1993)
Glycoprotein hormone erythropoietin (EPO)	surexprime	hEPO	promoteur endogène	
Transforming growth factor β (TGF- β)	knock out	mTGF- β	-	(Shull et al., 1992)
Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)	surexprime	mGM-CSF	virus Moloney LTR	(Lang et al., 1987)

(d'après "Overexpression and knockout of cytokines in transgenic mice" C. O. Jacob-Ed. Academic Press, 1994)

la protection contre le schistosome reste identique à celle des souris non transgéniques (Freeman et al., 1995), montrant certaines limites à la fonction anti-parasitaire de cette cytokine.

4. MALARIA ET SCHISTOSOMIASE

Chez les souris déficientes en cellules T α/β par recombinaison homologue, la vaccination par des sporozoïtes irradiés induit une inhibition du développement du parasite au stade hépatique. Cette protection est annulée par l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre les TCR $\gamma\delta$, qui induit une déplétion des cellules T $\gamma\delta$. Inversement, le transfert passif des clones cellulaires T $\gamma\delta$ spécifiques à des souris 'knock out' cellules T α/β vaccinées, restaure la protection. L'ensemble de ces résultats permet de supposer un rôle protecteur des cellules T $\gamma\delta$ contre la malaria (Tsuji et al., 1994). Les cytokines jouent également un rôle important dans la malaria. Des souris transgéniques pour le TNF (tumeur necrosis factor) sous contrôle du promoteur CD2 humain développent une anémie. Après l'infection par *Plasmodium yoelii*, le nombre de parasites dans le sang de cette souris est environs 10 fois moins élevé que chez la souris contrôle, et la multiplication de *P. chabaudi* est plus fortement inhibée. L'inhibition de la réplication parasitaire s'expliquerait par l'augmentation de l'activité des macrophages par le TNF (Taverne et al., 1994).

La souris infectée par *Schistosoma mansoni* développe des granulomes dans le foie avec une accumulation de cellules T $\gamma\delta$. Ces cellules jouent un rôle dans la formation de granulomes et le gène TCR V contrôle ces cellules. Une absence des cellules T $\gamma\delta$ est observée chez la souris transgénique exprimant un seul TCR $\gamma\delta$ spécifique du CMH, dont le répertoire est limité à V γ 1.1, V δ 4, et V δ 6. Pris ensemble les résultats montrent l'importance de la spécificité de l'usage du répertoire TCR $\gamma\delta$ dans la formation du granulome hépatique, dans la schistosomiase expérimentale murine. Par ailleurs, le recrutement des cellules T $\gamma\delta$ existe chez la souris déficiente pour le gène de la β 2-m,

montrant que le recrutement de ces cellules dans les granulomes hépatiques n'est pas dépendant de la β 2-m (Sandor et al., 1995).

D. L'INFLAMMATION

L'inflammation est un processus de défense majeur contre les infections. Plusieurs modèles de souris transgéniques ont permis d'évaluer son implication dans la mécanismes de défenses non spécifique.

Le système nerveux central (SNC) est considéré comme un site immunologiquement privilégié, du fait de la barrière sang-cerveau. En effet cette barrière hémato-méningée protège le SNC contre les pathogènes, mais aussi, contre le développement d'une réponse immune parfois délétère. Dans certaines maladies telles que la sclérose en plaques et les infections virales (l'herpès et le VIH), la réponse inflammatoire et la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α et IFN- γ) joue un rôle physiopathologique majeur dans le développement de la maladie (Benveniste, 1992). Récemment, l'établissement de souris transgéniques pour les cytokines et/ou leurs récepteurs ont permis d'analyser l'influence des cytokines sur l'inflammation au niveau du SNC.

L'expression de l'IL-2 humaine et du gène du récepteur IL-2 sous le contrôle du promoteur de CMH classe I peut induire l'expression du transgène dans le thymus, la rate, les poumons, ... mais cette expression induit spontanément la perte de cellules Purkinje dans le cervelet, mais pas l'inflammation dans le cerveau, bien que les souris présentent alopecie et pneumonie (Ishida et al., 1989a, Kroemer et al., 1991). La surexpression de l'IL-3 au niveau des astrocytes entraîne l'infiltration des cellules polymorphonucléaires (Chiang et al., 1994), tandis que la surexpression de IL-6 au niveau astrocytaire entraîne des tremblements avec dégénérescence nerveuse, astrocytose, vacuolation des neurones et perte des ramifications dendritiques (Campbell et al., 1993). Les souris transgéniques surexprimant l'IFN- γ et infectées par le HSV (virus herpétique) produisent une plus grande quantité de virus au niveau cérébral mais vivent plus longtemps que les non-transgéniques (Geiger

and Sarvetnick, 1994).

La physiopathologie des maladies inflammatoires du tube digestif demeurent mal connues. Des facteurs auto-immuns et infectieux sont souvent évoqués comme facteurs intro pathogéniques majeurs.

Il a été intrigant de constater que la plupart des lignées d'animaux transgéniques obtenues présentant un déficit T ou en cytokines (IL-2, IL-10), développent par recombinaison homologue, des lésions inflammatoires dont la gravité dépend des conditions de stabulation des animaux (Kuhn et al., 1993, Ma et al., 1995)]. La relation de cause à effet est encore inconnue.

E. INTERET DU MODELE DE SOURIS TRANSGENIQUE POUR LE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS OU NOUVEAUX VACCINS

1. LE MEDICAMENT

La souris transgénique peut permettre de cribler de nouveaux médicaments. Quelques approches ont été réalisées dans le domaine de la pathologie infectieuse.

Mehtali et collaborateurs ont développé un système de souris transgénique binaire qui permet facilement d'évaluer *in vivo* un nouveau médicament anti-VIH-1, ou des thérapies. Ces souris transgéniques expriment le gène HIV-1-TAT dans les lymphocytes T et sont croisées avec des souris transgéniques qui expriment un gène rapporteur silencieux sous le contrôle un LTR de HIV-1. Les souris doubles transgéniques expriment fortement le gène rapporteur induit par TAT. L'alpha 1-antitrypsine (alpha 1-AT) a été choisit comme gène rapporteur, car il est facile de déterminer le niveau plasmatique de la protéine alpha 1-AT avant, et, après le traitement contre l'activité du LTR ou du TAT (Mehtali et al., 1992).

2. VACCINOLOGIE

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont des cellules importantes dans la protection contre l'infection virale. La caractérisation

des épitopes de ces cellules T spécifiques d'une molécule vaccinale est cruciale pour son développement. Dans le cadre du paludisme, des souris doubles transgéniques HLA-A2.1 x β 2-microglobuline humaine sont immunisées avec le peptide 1-10 de la protéine circumsporozoite (CS). Les cellules T isolées du ganglion lymphatique drainant le site d'infection, présentent une activité cytotoxique, dirigée contre le peptide 1-10 et restreint par le complexe HLA-A2.1 (Blum Tirouvanziam et al., 1995). Dans un modèle pour le virus influenza, des souris transgéniques exprimant HLA-DQ6 sont immunisées avec des peptides déduits de l'hémagglutinine (HA) du virus. Le peptide HA123-138 induit un niveau de réponse T DQ6 restreinte chez la souris transgénique. Des lignées de cellules T spécifiques pour le peptide d'intérêt sont obtenues, une réponse est testée vis à vis de différents peptides pour déterminer les déterminants épitopiques majeurs (Takami, 1995).

3. LE VECTEUR DE MALARIA: MOUSTIQUE TRANSGENIQUE

La transgénose peut aussi être appliquée aux vecteurs pour étudier la relations hôte parasite et pour contrôler les vecteurs. La lutte anti-anophèle est un moyen important de lutte contre le paludisme. Les problèmes de pollution liées aux insecticides et la résistance du moustique à ces produits accroissent l'intérêt de l'application de la lutte biologique. Un gène de résistance à la néomycine, liée au promoteur de choc thermique de *Drosophila hsp 70*, est introduit dans les cellules germinales de *Anopheles gambiae*. Les moustiques transgéniques sont ensuite sélectionnés par l'antibiotique. La survie de ces moustiques est très fortement modifiée après un choc thermique à 41 °C, un peu moins lorsque le choc thermique est à 37 °C (Sakai et al. 1992). Ces résultats représentent une perspective à la création de moustiques stérile dans les régions de la malaria afin de mieux contrôler cette maladie (Crampton, 1994).

VI. OBJECTIF ET RESULTATS

La Schistosomose est la seconde endémie parasitaire. Elle affecte plus de 200 millions de personnes dans le monde. Cette maladie est causée par 3 espèces de trématodes parasites: *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*. La nécessité d'un vaccin est une évidence.

La glutathion *S*-transférase de *S. mansoni* (Sm28GST) est parmi les candidats vaccinaux la mieux caractérisée (Capron et al., 1992, Balloul et al., 1987c, Taylor et al., 1988). Cette molécule induit une immunité protectrice chez les rongeurs et chez les primates (Boulanger et al., 1991), par au moins deux mécanismes différents selon les modèles testés: soit par réduction du nombre de vers, par diminution de la fécondité du ver femelle, soit par réduction de la viabilité des oeufs (Xu et al., 1993).

La Sm28GST possède une homologie de séquence avec des isoformes de la glutathione transférase de mammifères (Hughes, 1993). Les épitopes induisant la réponse immunitaire ont été caractérisés (Auriault et al., 1990, Guidotti et al., 1994a) et se situent principalement en dehors des séquences présentant une identité avec les GSTs humaines (Trottein et al., 1992). La possibilité d'une réponse auto-immune après l'immunisation est cependant une question importante. L'induction d'une réaction auto-immune est dépendante de l'adjuvant, de la route d'administration et de la génétique des receveurs (Janeway, 1992, Cohen and Young, 1991).

Le transgène animal permet l'expression d'un gène qui n'appartient pas au patrimoine génétique de l'hôte dans un tissu ou un type de cellule donné. Cette molécule devient habituellement un antigène du soi dans la souris transgénique. L'étude concerne l'expression d'un transgène au niveau du tissu lymphoïde central (thymus). Les travaux sur la conséquence immunitaire, de l'expression d'un transgène au niveau périphérique sont plus rares (Forman et al., 1991, Goodnow, 1992).

Dans le but d'étudier le problème d'une possible auto-immunité chez les animaux immunisés avec la Sm28GST, nous avons développé une lignée de souris transgénique exprimant la Sm28GST au niveau

hépatique. En effet, le foie est le site principal de la ponte des oeufs de schistosome, et donc du lieu de relargage de la Sm28GST pendant l'infection. Pour ce faire nous avons utilisé le gène parasite codant pour la Sm28GST sous le contrôle du promoteur de la transferrine murine.

Dans un premier temps, notre travail s'est focalisé sur l'étude phénotypique de ces souris. L'analyse histologique et en immunopreinte a montré que l'expression du transgène est strictement localisé au niveau des hépatocytes pericentrolobulaires. Ces études n'ont montré aucun signe d'hépatite auto-immune ou toxique, même après l'immunisation seule ou après immunisation puis infection par *S. mansoni*.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à étudier la réponse immune de ces souris après immunisation par la Sm28GSTr. Nous avons pu ainsi constater que la réponse anticorps et la réponse cellulaire étaient diminuées chez les animaux transgéniques par rapport aux animaux contrôles.

Dans un troisième temps, nous avons examiné les paramètres de l'infection parasite chez les animaux transgéniques immunisés par la Sm28GSTr. Nous avons observé que le nombre des oeufs chez ces animaux était significativement supérieur. Nous avons montré que le nombre de couples de *S. mansoni* adultes est significativement plus élevé chez les animaux transgéniques que des animaux contrôles.

Dans un dernier temps, nous avons étudié la production des cytokines chez ces souris. Nous avons observé chez les souris transgéniques immunisées, une diminution de la production de cytokines (IL-2, IL-5, IFN- γ).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de deux articles soumis, "Expression of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase in the liver of transgenic mice and its effect on parasite infection " et "Relation between cytokine and Sm28GST protective effect in Sm28GST transgenic mice ".

Résultats

ARTICLE 1

Expression of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase in the liver of transgenic mice and its effect on parasite infection

Running title: *S. mansoni* infection in Sm28GST Tg mice

Xiaochuan XU#; Catherine Lemaire#; Jean-Marie Grzych*; Raymond J. Pierce*; Mireille Raccurt+; Frederic Mullier#; Farid Zerimech♦; Jean-Pierre Decavel#; Simone Peyrol+; Jinli Liu*; Josette Fontaine*; Sophia Lafitte*; André Capron*; Jean-Yves Cesbron#°

#Unité INSERM 415, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, B. P. 245, 59019 Lille Cedex; France

*Centre d'immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM 167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, B. P. 245, 59019 Lille Cedex; France

+Tonyganier, URA CNRS 1459 (Dir. Dr.J.-M. Grimaud), 69365 Lyon cedex 07

♦Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (Professeur P.-M. Degand) Hôpital Claude Huriez, CHR & U de Lille, Place de Verdun, 59037 Lille Cedex, France

Abbreviations

Sm28GST: 28 kDa glutathione S-transferase (GST) from *Schistosoma mansoni*,

rSm28GST: recombinant Sm28GST,

ORF: Open Reading Frame,

hGH: human growth hormone,

mPTf: mouse Transferrin gene Promoter,

CFA: Complete Freund's Adjuvant,

IFA: Incomplete Freund's Adjuvant,

Alum: Aluminium hydroxide gel,

KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin,

CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene,

Tg: Transgenic,

GOT: L- aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase,

AST: Aspartate aminotransferase,

PBS: Phosphate Buffer Saline,

SWAP: Soluble Adult Worm Preparation,

OD: Optique Density.

Abstract

Schistosomiasis is a debilitating tropical disease for which an effective vaccine is needed. A 28kDa glutathione S-transferase from *S. mansoni* (Sm28GST) has been shown to induce protective immunity. Sm28GST possesses significant sequence identity to mammalian glutathione transferase isoforms. In order to study self-reactivity in mice immunized with Sm28GST and the concomitant phenomena of immune tolerance, as well as their consequences for the protective immunity induced by this vaccination, we have developed transgenic mice (Tg) that express Sm28GST under the control of a part of the mouse transferrin gene promoter. The study of the ^{P28}Tg shows that the expression of Sm28GST is strictly localized in the pericentrolobular hepatocytes. No histological change, inflammatory infiltrates or modification of GOT seric concentration was observed over a 14 months period, despite a cross reactivity between Sm28GST and a mouse molecule of 30kDa.

The IgG anti-Sm28GST response of ^{P28}Tg mice immunized with recombinant Sm28GST, was lower ($p < 0.001$) than that observed in the non ^{P28}Tg littermates, and inversely proportional of the Sm28GST liver expression. The response of the non ^{P28}Tg mouse spleen cells to Sm28GST stimulation was greater ($p < 0.01$) than that observed with the ^{P28}Tg mouse spleen cells. ^{P28}Tg mice infected with 40 *S. mansoni* furcocerciae harbored more worms ($p < 0.05$) than the non ^{P28}Tg control mice. The increase in the level of infection in ^{P28}Tg mice was reflected in a concomitant increase in the numbers of adult worms and schistosome eggs found in the liver and in the intestines after whole body perfusion 56d post-infection, but no relative increase in the fertility of individual female worms was observed. The results obtained argue for the involvement of Sm28GST in reducing levels of infection and support the view that this enzyme has a central role in the maintenance of parasite viability, at least during its migration through

the host tissues.

Introduction

Schistosomiasis is a debilitating disease affecting about 200 million people in 75 countries, caused by three major species of parasitic trematode. Over the last few years, research into the development an effective recombinant subunit vaccine has led to the characterization of several candidate antigens (24). One problem associated with these antigens is that they are all either enzymes or structural proteins that show significant sequence identity to their human counterparts, raising the of possibility of auto-immune effects of vaccination.

The best defined of these vaccine candidates is a 28 kDa glutathione *S*-transferase from *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) (3) that has been shown to induce protective immunity to a challenge infection in both rodents and primates (7) both in terms of a reduction in worm burden and of a diminution in female worm fecundity and egg viability (34). Sm28GST possesses limited but significant sequence identity to mammalian glutathione transferase isoforms (18). The target epitopes of the immune response have been defined (1, 2) and unsurprisingly are mainly outside areas of maximum sequence identity with human GSTs (29). Moreover, no evidence has so far been obtained indicating auto-immune consequences of vaccination with the complete recombinant protein, or with derived peptides.

However, induction of autoimmune reactions is dependent on the adjuvant used, the route of administration and the genetics of the recipient (11, 19), and we cannot rule out such reactions to Sm28GST with new formulations and dose-routes in outbred recipient populations.

In order to study further the problem of self-reactivity in animals immunized with Sm28GST and the concomitant phenomena of immune tolerance and epitope

suppression, as well as their consequences for the protective immunity induced by this vaccination, we have developed transgenic (Tg) mice that express this parasite antigen. Although most previous studies of tolerance have concerned Tg mice expressed in central lymphoid tissues, peripheral tolerance is beginning to be examined including tolerance to liver-specific Tg mice (12, 14). We chose to express the protein specifically in the liver since this is the main site of schistosome egg deposition and thus of release of Sm28GST during infection. We wished to determine how the immune system copes with a genetically engineered, self-reactive situation.

In this paper we describe p^{28} Tg mice expressing Sm28GST in the liver under the control of the mouse transferrin gene promoter (mPTf). We show that these mice fail to respond to the antigen after immunization with recombinant Sm28GST (rSm28GST) and that they show increased parasitaemia compared to non p^{28} Tg controls.

Materials and Methods

Construction used for micro-injection

The Sm28GST open reading frame (ORF) was previously amplified by PCR on cloned cDNA, and inserted into a *Bgl*III site, 5' to the human growth hormone gene (hGH) 3' untranslated region present in the EV142 vector (kindly given by Dr. Palmiter, R. D. University of Washington, USA). A 1,2 kb *Hind* III-*Bam* HI fragment containing 600 bp of the mouse transferrin gene promoter (mPTf) directly 5' to the ATG was subcloned from the original construct. The mPTf was provided by M. Zakim (Institut Pasteur, Paris, France). An *Nco* I site was then created at the ATG translation start site by oligonucleotide site directed mutagenesis on the *Hind* III-*Bam* HI-mPTf construct. Finally, the 600 bp *Hind* III /*Nco* I fragment was ligated into the *Nco* I -*Kpn* I digested Sm28GST ORF - hGH construct (Fig. 1).

Creation and analysis of ^{p28}Tg mice

The DNA encoding the mPTf linked to the Sm28GST coding sequence was freed from the vector by digestion with *Eco*R1 (Boehringer Mannheim, Meylan, France). The linearized DNA was then purified on a sucrose gradient. The purified fragment corresponding to the mPTf-Sm28GST ORF-hGH transgene was then introduced into C57BL/6J x SJL mice by micro-injection of one cell embryos (17). The eggs were transferred into oviducts of ICR foster mothers. Animals containing the transgenes were identified by dot blot and Southern blot analysis on genomic DNA from mouse tail tissue and hybridization with ³²P labelled Sm28GST cDNA fragment. The transgene copy number was determined by quantitative dot blot analysis using different copy numbers of the Sm28GST ORF fragment mixed with mouse genomic DNA. The DNA positive founders were back-crossed with C57BL/6J mice. The DNA negative littermates were

used as non p28 Tg control animals.

Dot Blot and Southern blotting

p28 Tg mouse tail DNA (5 μ g) was deposited onto a nylon transfer membrane (Amersham, Bucks, UK) in an equal volume of $20 \times$ SSC solution, and then fixed with 4M NaOH. C57BL/6J mouse tail DNA was used as a negative control. The filter was hybridized with a Sm28GST probe, 32 P-labelled using random priming (Megaprime Kit, Amersham, Bucks, UK). Mouse tail DNA was digested to completion by *Eco* RI and was subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel. After denaturation and neutralization, the DNA was transferred to a nylon transfer membrane (Amersham) by Southern blotting (27). The filter was hybridized with a 32 P-labeled Sm28GST probe.

RNA analysis

The tissues were removed quickly after killing the mice and frozen immediately in liquid nitrogen. RNA was extracted from frozen tissue that was mechanically pulverized using RNazol (1 ml for 100mg tissue, Bioprobe, Montreuil, France), according to the manufacturer's specifications. The quality of the RNA was checked on a 1% agarose gel. RNA dot blots were prepared from 5 μ g of total RNA as described (31) and hybridized with a 32 P labeled Sm28GST probe. The presence of the 1,4 kb chimeric Sm28GST-hGH mRNA was then checked by northern blot analysis, performed as previously described (13). Briefly, the total RNAs of tissues were fractionated on a 1,2% formaldehyde - agarose gel and blotted onto nylon membranes, which were then hybridized with the same DNA probe.

Western blot

Separated cells were harvested from mouse tissues by mechanical dissociation. Cell suspensions were boiled in sample buffer for 5 min. and separated by SDS-PAGE

(5% concentration gel pH 6.8 and 15% separation gel pH 8.8), the protein was electrophoretically transferred to a nitrocellulose filter (0.45 μ , Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The filters were incubated with an anti-Sm28GST polyclonal rabbit serum (1/5000) for 90 min. at room temperature, followed by an incubation with anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1/10000, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 45 min. and then stained with Renaissance^R kit (Du Pont, Boston, MA, USA)

Histological and immunohistochemical analysis

^{p28}Tg mouse tissues were fixed in 0.1 M sodium phosphate, 0.15M NaCl (PBS, pH 7.4) formaldehyde 4% and embedded in paraffin. The tissue sections (2-4 μ m) were incubated with an anti-Sm28GST polyclonal rabbit antiserum (1/2000), for 2-3 h at room temperature. After 3 washes with 0.1M Tris-HCl saline buffer (pH 7.4), the tissue sections were incubated with an anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1/200, Sigma) for 1 h. After a further 3 washes, the sections were stained with the new fuchsin substrate system (DAKO, Glostrup, Denmark) and counterstained with hematoxylin solution before examination. Sections for histological analysis were stained directly by hematoxylin eosine saffron.

Parasite life cycle and reagents

The *S. mansoni* life cycle was maintained using *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts and OF1 mice as definitive hosts. A full length cDNA copy encoding Sm28GST was expressed in *E. coli* using a PL-expression vector (4). The recombinant Sm28GST (rSm28GST) was purified (95% purity) by passage through a glutathione-agarose column (Sigma). The anti-Sm28GST sera were prepared as previously described (4). Rabbits (New Zealand) were immunized subcutaneously with 250 μ g rSm28GST v/v CFA (Difco, Detroit, M, USA). They were boosted subcutaneously 3 wk later with 250 μ g rSm28GST v/v IFA (Difco) and were bled 1 wk after the last boost.

SWAP: *S. mansoni* adult worms were collected by perfusion of the liver and the mesenteric veins of golden hamsters 40 days after the infection (1,000 cercariae/animal). The adult worms were washed in phosphate-buffered saline (PBS), homogenized with an Ultraturax (Janke et Kunkel, IKA Labortechnik, Strasbourg, France) for 1 min, disrupted by a 5 min sonication (Labsonic U., B. Braun, Strasbourg), and centrifuged for 20 min at $10,000 \times g$. The supernatant was collected and stored in liquid nitrogen.

Assessment of liver function

Naive ^{P28}Tg and non ^{P28}Tg mice were bled during every 3 months. After collection, the plasma was separated at 4°C, $2500 \times g$, 10 min and stored at -20°C before being tested. The seric aspartate aminotransferase (AST or GOT, L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2.) activity was assayed at 37°C with a commercially available kit AS 7148 (Randox, Crumlin, UK) according to the standardized procedure recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (5). We measured enzymatic activity with a Hitachi 911 Automatic Analyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Immunization experiments

^{P28}Tg mice and non ^{P28}Tg control mice were injected subcutaneously with either 25 µg of rSm28GST or 25 µg of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA, USA) in the presence of either 1.25 mg Alum (Intergen, Purchase, NY, USA) or CFA at the base of the tail. Mice were boosted under the same conditions 3 wk later. Serum samples were collected every week and stored at -20°C.

ELISA

Plates (Nunc-Immuno Module, Inter Med, Denmark) were incubated overnight at 4°C with 5 µg/ml of rSm28GST or 10 µg/ml peptides in 100 ml of sodium carbonate

buffer (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.6). The plates were then saturated for 1 h with PBS-5% gelatin. After 3 washes with PBS-0.1% Tween 20 (pH 7.2), 100 µl of serum from immunized or infected mice at different dilutions (1/5000 for anti-Sm28GST IgG; 1/250000 for anti-KLH IgG; 1/200 for IgG1, IgG2a) in PBS-0.1% Tween 20 were dispensed in each well and were incubated overnight at 4°C. After 5 washes, peroxidase labeled anti-mouse IgG-FC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) was added at a dilution of 1/15000 in the same buffer for 90 min at 37°C. After 3 washes, 1 mg/ml orthophenylenediamine (Sigma) in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 5.5), containing H₂O₂ (1 ml/l) was then incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 100 µl 2N HCl. The optical density was measured with a multichannel spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC 1340) at 492 nm. Results were expressed as the mean of duplicate wells after subtraction of the background.

Inhibition of GST activity

The GST catalyzed reaction was performed using 1, chloro dinitro-2,4 benzene (CDNB, Sigma) as a substrate according to Habig (16). rSm28GST (0,11 µg) was incubated with 50 µl of immunized ^{P28}Tg mouse serum for 1 h at 37 °C and then for 4 h at 4°C. The enzymatic reaction was then carried out in 200 µl potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6,5) with 5 mM glutathione and 5 mM CDNB. The absorbance was measured at 340 nm in a spectrophotometer (DU^R-64-Beckman, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA) every 30 sec for up to 3 min at room temperature. Similar enzyme inhibition tests were performed in parallel with appropriate controls, either using sera of immunized non^{P28}Tg mice or non-immunized control mice.

Lymphocyte proliferation assay

Spleen cells were isolated from immunized and infected mice. For the in vitro assays, 5 × 10⁵ lymphocytes were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI

1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (JRH BioSciences, Lenexa, Ka. USA), 50 µg/ml gentamicin (Schering-Plough, Le-Vallois-Perret, France), 2 mM L-glutamine (Seromed, Berlin, Germany), 1% non-essential amino-acids (Seromed), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), and 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated alone or in the presence of rSm28GST (20 µg/ml), SWAP (100 µg/ml) or Concanavalin A (ConA, 2.5 mg/ml, Sigma), in a total vol of 0,2 ml, in 96-well flat-bottom microtiter tissue culture plates (Nunclon, Roskilde, Denmark). The cells were then exposed to 1 µCi/well of ³H-TdR (37 Gbq/mmol, CEA, Gif-sur-Yvette, France) for the last 18 h of a 5 days culture period. Finally, the cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the amount of incorporated ³H-TdR was measured using a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as the arithmetic means of cpm of triplicate cultures.

Infection

^{P28}Tg and non^{P28}Tg mice were exposed percutaneously to 40 *S. mansoni* furcocercariae (Guadeloupe strain), according to the method first described by Smithers *et al.* (26). Parasite burdens were evaluated by whole body perfusion 56 days post-infection. The livers and intestines were digested by 4% potassium hydroxide solution according to the method of Sturrock (28). Tissue egg counts were expressed per g of tissue analyzed and per g of tissue/ female worm. The organs of each mouse were treated and analyzed individually. The data are presented as means ± SE.

Statistics

The significance of the results was calculated by Student's t-test and F test.

Results

1. Generation of Sm28GST^{p28}Tg Mice

The transgene microinjected consisted of the Sm28GST cDNA under the regulatory control of a 600 bp fragment containing the mouse transferrin gene promoter and with an hGH poly (A) signal downstream of the cDNA (Fig.1). DNA recovered following tail biopsy of weaning animals was screened for the presence of the Sm28GST cDNA by DNA dot blot analysis using a parasite cDNA probe. Examination of 53 mice identified 9 mice that contained at least one copy of the transgene (Table 1). Breeding colonies for each founder animal containing the Sm28GST gene were established by mating them to C57BL/6J mice and the second generation mice scoring positive in the hybridization assay were tested for the expression of Sm28GST.

All founders harboring transgenes yielded ^{p28}Tg progeny, except three designated 1, 3 and 23 (Table 1). The diploid copy number of each ^{p28}Tg line was estimated by semi quantitative dot blot analysis and ranged from 5 to 50 copies of the transgene. Southern blot analysis of genomic DNA obtained from the ^{p28}Tg mice lines revealed the 1.9- kb *Eco*R1 fragment characteristic of the Sm28GST gene (data not show). Northern blot analysis demonstrated the presence of Sm28GST mRNA in the livers and the brains of ^{p28}Tg animals from line 9 and 26, but not in the lines 5, 8, 21, and 35 (data not shown).

In the next generation, the transgenes segregated, as assessed by dot blot analysis, in an approximate 1:1 ratio of male and females, with no evidence of transmission ratio distortion except for the line 9. Analysis of the progeny of the line 9 showed a transmission of the transgene in the X chromosome.

2. Expression of Sm28GST in the liver of ^{p28}Tg mice

Both the lines (line 9 and 26) expressed the Sm28GST protein in the liver, detected

on immunoblots probed with a monospecific polyclonal antibody (Fig.2). The cross reactive band in the liver of the non^{P28}Tg mice (approx. 30 kDa) is thought to represent a host GST. No specific Sm28GST expression was observed in the livers of lines 5, 8, 21 and 35 (Fig.2). Control non^{P28}Tg littermate did not show specific reactivity.

To assess the expression in other tissues, brain, skin, spleen, lungs, kidneys, and muscles were collected from lines 9 and 26. Western blot analysis failed to detect Sm28GST reactivity in any other tissue than liver. A blot of brain homogenate is shown in Fig.2 as a representative control experiment. Due to the low fecundity of line 9, we henceforward used line 26.

The distribution of Sm28GST was examined by immuno-histological analysis. The hepatocytes stained were localized mainly at the pericentrolobular areas. The staining was heterogeneous, and approximately 10% of the total hepatocytes were stained. The expression is cytoplasmic and nuclear. No histological changes or inflammatory infiltrates were observed (Fig.3).

In order to determine whether the expression of Sm28GST was toxic for the liver, we measured serum GOT concentrations of the ^{P28}Tg mice. Fig.4A shows that the levels of this enzyme remained similar to those of control animals over a 18 mo period. The slight peak at 12 mo is not statistically significant and could be due to the presence of hemoglobin in some sera.

3. Analysis of the humoral immune responses in ^{P28}Tg mice immunized with rSm28GST

Antibody responses to Sm28GST were measured in ^{P28}Tg mice and non ^{P28}Tg littermates in response to immunization with rSm28GST, or with KLH used as a control. Fig.5A shows the IgG anti-Sm28GST response throughout the experiments. Non^{P28}Tg mice displayed a consistent response which peaked 2 wk after the second

injection, and remained stable until the end of the experiment. In the group of P^{28} Tg mice, the antibody levels peaked at the same time (peaked 2 wk after the second injection), but were significantly lower ($p < 0,01$), and tended to decline. Furthermore, immunization of P^{28} Tg and non P^{28} Tg mice with rSm28GST failed to affect the serum concentration of GOT (Fig.4B). Antibody responses against individual peptide epitopes of Sm28GST (24-43; 87-111; 103-153; 115-131; 190-221) were measured at day 56 after infection. This correspond to the day of sacrifice, because insufficient amount of serum were available for the other sampling days. No significant responses to peptides could be measured using ELISA (34) (data not shown).

Immunization of P^{28} Tg mice and non P^{28} Tg mice with KLH was performed as a control. As shown in Fig.5B, no difference between the anti-KLH response of P^{28} Tg and non P^{28} Tg mice was observed.

In the light of the positive association previously reported between the anti-Sm28GST antibody response and the inhibition of GST catalytic activity (34), the immune sera of P^{28} Tg mice and non P^{28} Tg mice were tested for their ability to inhibit the Sm28GST enzyme activity. As shown in Fig.6, 93% of the GST catalytic activity was ablated by the sera from immunized non P^{28} Tg mice, whereas the sera from immunized P^{28} Tg mice failed to inhibit the GST enzyme activity.

4. Individual variation in Sm28GST expression

In order to determine whether variations in the individual level of antibody response in P^{28} Tg mice could be related to the levels of Sm28GST expressed in their livers, we estimated the Sm28GST expression by immunohistological analysis.

Four different P^{28} Tg and a non P^{28} Tg mice from the same littermate, housed together, were immunized with rSm28GST. The degree of Sm28GST expression in these mice was estimated as +, ++, +++ or -. Fig.7 shows the time course of individual

antibody responses toward Sm28GST. The levels of the anti-Sm28GST response were approximately inversely proportional to the level of Sm28GST expression in the liver.

5. Lymphocyte proliferative responses of P^{28} Tg mice immunized with rSm28GST

The proliferative responses of lymphocytes from rSm28GST immunized mice were determined by incubating spleen cells of P^{28} Tg mice and non P^{28} Tg mice with rSm28GST, and with SWAP as a control. The rSm28GST stimulation of non P^{28} Tg mouse spleen cells was significantly greater ($p < 0.01$) than that observed with the P^{28} Tg mouse spleen cells (Fig. 8A). No difference was observed between the cells isolated from P^{28} Tg and non P^{28} Tg mice immunized with ACF. As a control, SWAP stimulations of spleen cells from rSm28GST immunized and infected P^{28} Tg and non P^{28} Tg mice were performed (Fig. 8B). Strong reactivities were observed, both in the P^{28} Tg and non P^{28} Tg mice, with no difference between the responses of the 2 groups ($p > 0.05$).

6. Effects of Sm28GST expression in P^{28} Tg mice on *S. mansoni* infection

To determine the effect of Sm28GST expression by the hepatocytes on the *S. mansoni* infection in mice, we compared P^{28} Tg mice and non P^{28} Tg control mice infected with 40 *S. mansoni* furcocercariae. Eggs and adult worms were collected from the livers and intestines of the P^{28} Tg mice and controls, 56 days post infection. The results are shown in Table 2.

A significant increase in worm burden was observed in P^{28} Tg, compared to the non P^{28} Tg mice (27%; $p < 0.05$). The numbers of eggs g of tissue was significantly increased in the intestines of P^{28} Tg mice, compared to the non P^{28} Tg mice (74%; $p < 0.05$), and there was a similar tendency in the liver. However, when individual female worm fecundity was considered, the total number of eggs produced per g of tissue and per female worm showed no significant differences between P^{28} Tg mice and non P^{28} Tg

mice.

In a separate experiment, anatomopathological analysis was performed on mouse liver sections sampled at different times after infection (at 8, 12, 14, 16, 21 wk). No difference in the granuloma surface area, or in the level of inflammation was noticeable between $P^{28}Tg$ mice and non $P^{28}Tg$ mice.

Discussion

In this study we describe the construction of transgenic mice expressing a heterologous protein, the 28 kDa glutathione *S*-transferase of the trematode parasite *S. mansoni*. This molecule is one of the best defined vaccine candidates for this debilitating disease. One of the objectives of this work was to produce a mouse tolerant for this molecule. In this case, it would be possible to show, by the absence of an immune response toward a crucial parasite molecule, how important this is to parasite survival and host resistance. We show here that the expression of this non-self antigen by liver cells did indeed induce a functional tolerance, but that this tolerance was not absolute, since an antibody response was detectable after immunization with the corresponding recombinant antigen. This may have been possibly due to the localized expression of the transgene in the liver. However, despite this partial tolerance, we observed that ^{P28}Tg mice were more susceptible to *S. mansoni* infection, indicating that immune reactions toward this molecule may be an important component of resistance toward infection.

We deliberately chose to express this antigen in the liver by making use of a liver-specific promoter since the pathological effects of schistosome infection implicate this organ in particular. This pathology is due to the entrapment of schistosome eggs in the portal vein radicles which stimulate an inflammatory response, in turn leading to extensive fibrosis. Sm28GST is a major component of egg secretions (25) and may be a target of the inflammatory response.

A fused gene containing 600 bp of upstream mPTf genomic sequence linked to the Sm28GST open reading frame and to the hGH poly (A) signal was used to produce transgenic mice. Two lines (out of 10) that incorporated 8 and 60 complete copies of the transgene expressed substantial levels of Sm28GST mRNA in the liver and a lower level in the brain. However, western blot analysis showed that Sm28GST protein was present

only in the liver, and not in the brain. This result is not in accordance with the work of Lu (21), who showed that transgenic mice carrying 0.67 Kb of the Tf 5' flanking region of the human Tf gene fused to the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene express the transgene in the liver and in the brain, both at the transcriptional and translational level. The absence of the Sm28GST protein in the brains of our 2 lines of transgenic mice may indicate that Sm28GST protein is not stable in the central nervous system of the mice. The expression of the transgene could thus be regulated at a post-transcriptional level. Immunohistological analysis showed Sm28GST was localized at the pericentrolobular area of the liver. The location of other transgenes under the control of the Tf (0.6Kb) promoter in transgenic mice has never been studied precisely at the cellular level and it is not possible therefore to infer a particular cellular specificity for the portion of the promoter that we utilised.

A significant observation in this study was the absence of any change in the seric concentration of GOT or of any histological alterations over a 14 month period. Despite the relatively low level of Sm28GST expression (no more than 10% of total hepatocytes are immuno-stained), these data showed that the expression of Sm28GST is not toxic in the transgenic mouse model. This evidence can be added to other unpublished data accumulated during different protocols of immunization in ruminants (8), baboons (7), *Erythrocebus patas* monkeys (9), mice (7), and rats (15) in which no evidence of toxicity after immunization with the recombinant protein was observed, in some cases over very long periods.

Another point to come out of this study was the clear evidence for cross reactivity between Sm28GST and a mouse molecule of 30 kDa (Fig. 2) in the liver. GSTs are abundant in mammals and are multifunctional, but are particularly implicated in detoxification and the transport of lipophilic molecules (22). The superfamily can be

divided into five groups and Sm28GST possesses significant sequence homology to the human α isoform (28%) and at a slightly lower level to the π isoform (18). The fact that a polyclonal rabbit antiserum to the recombinant schistosome protein can recognize a mouse GST isoform is therefore not surprising. This cross reactivity is not limited to the liver tissue, since the 30 kDa protein was also detected on western blot using brain and muscle extracts.

In terms of vaccination, this could in part explain the relatively feeble immunogenicity of Sm28GST that we observed (Fig.4A.). Indeed, an immunization protocol which led to a strong immune response, might also induce an autoimmune process. Although this is more dependent on the type of response produced. Indeed, viral models of autoimmune disease underline the role of CD8+ CTL in the process (30). Protocol aimed at inducing this type of response will be tested in order to determine the conditions for the rupture of tolerance in this model. However, the immunization of non P^{28} Tg mice with rSm28GST led to a protection of 27% (data not shown) with an humoral (Fig.4A) and a cellular (Fig. 8) immune response without any evidence of histological lesions at the liver level. In addition, no autoimmune hepatitis has been observed during the different experimental protocols performed up till now.

Sm28GST is one of the components of adult worm excretions/secretions and, indeed, its absence from the worm gut mucosa implies that it is secreted by or released from the tegument (25). In fact the N-terminal peptide sequence possesses the characteristics of an eukaryotic signal sequence (R. Pierce, unpublished data), but the mature schistosome protein lacks only the first Met residue (6). It was, however, tempting to speculate that this sequence might be functional in a mammalian cell. Thus it was interesting to compare the behaviour of the protein expressed in a mammalian system with the expression in the helminth. Sm28GST was found both in the cytoplasm

and the nuclei of hepatocytes, and this distribution is similar to that recently reported in parasite cells (20). This raises the as yet unanswered question of the role of this enzyme in the nucleus.

Both B- and T-cell mediated immune responses toward Sm28GST were analyzed. ^{P28}Tg mice showed a low antibody and cellular responsiveness, but clearly these were not totally abolished. This unresponsiveness was specific since ^{P28}Tg mice produced a normal response to both KLH and SWAP. The basic mechanisms of non responsiveness are being investigated. It has been previously reported for neo-self reactive transgenic products such as virally encoded proteins, that expression of the transgene led to a functional unresponsiveness (32). In almost all the models, this *in vivo* state was reversible by various manipulations *in vivo* and *in vitro*, suggesting that peripheral tolerance was due to an inability to the non lymphoid cells in the peripheral tissues to present the transgene products (32).

When transgenic mice were infected by *S. mansoni* cercariae, they harbored significantly more worms than the non-transgenic littermates. The increase in the level of infection of ^{P28}Tg mice shown in Table 2 was reflected in a concomitant increase in the numbers of adult worms and schistosome eggs found in various tissues, but no relative increase in the fertility of individual female worms was observed. This may, however, be due to a crowding effect in which increased numbers of worms does not lead to an increase in egg numbers (10, 23). This may be due to a relative reduction in nutrient availability and it should be remembered that the infection of a mouse by 30 worms is the equivalent of a human infection with 15, 000 worms, a very heavy infection indeed. In addition, the absence of a measurable antibody response toward defined peptide epitopes, whilst a significant antibody response toward the recombinant Sm 28GST was observed, may indicate the antibody response of ^{P28}Tg mice was principally derived

against conformational epitopes, and may explain the absence of an effect on fertility, since this has been shown to be linked to recognition of the C-terminal epitope (34).

We noted that the infection levels in individual P^{28} Tg mice were variable and we attempted to correlate this variation to the different levels of expression of Sm28GST in their livers. The mice studied were heterozygote for the Sm28GST gene and were obtained by back-crossing to C57BL/6J mice. Results presented here concern 5th or 6th generation mice. The level of Sm28GST expression in the liver was estimated by immunohistochemistry and showed that there was significant variability in the individual levels of expression of the transgene. We did not attempt to measure this quantitatively due to the cross-reactivity previously mentioned. Fig. 7 shows the relationship between the kinetics of appearance of anti-Sm28GST antibodies in the sera of P^{28} Tg mice immunized with rSm28GST and the levels of Sm28GST expressed in the livers. The results show that the lower the expression level, the stronger is the response. We have not attempted to establish a relationship of Sm28GST expression to protection levels obtained after immunization, since it would be difficult to estimate the level of transgene expression in a parasitized liver (schistosome eggs secrete large amounts of this protein).

While the variability in the levels of expression could explain a large part of the individual differences observed, the non-consanguinity of the mice might be also involved. Five back-crosses are insufficient to establish total homogeneity in the MHC and the anti-Sm28GST response has been shown to be haplotype dependent (33). It should be noted that it required two years and the screening of 600 mice to establish the transgenic line over five generations.

The results we have obtained argue for a role of Sm28GST in reducing levels of infection and in turn support the view that this enzyme has a central role in the maintenance of parasite viability, at least during its migration through the host tissues.

The line we have established is currently being used to dissect T-cell responses to specific epitopes of Sm28GST. Future work will aim at testing the effect of different immunization protocols on the induced tolerance of P^{28} Tg mice.

Acknowledgments

This work was supported by the INSERM and X. C. XU benefited from a doctoral fellowship from the Government of the Peoples Republic of China. We gratefully acknowledge the support of Volvic S. A. in the maintenance of the schistosome life cycle. We particularly thank Dr. I. Wolowczuk for her advice. We wish to thank J. L. Neyrinck for statistical assistance and thank C. Dessenne and C. Kizomzolo for secretarial assistance.

Corresponding Footnote. Jean-Yves Cesbron
Unité INSERM 167, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France
Phone: (333)20877959.
Fax: (333)20877888.
E.Mail: Jean-Yves Cesbron@Pasteur-lille.Fr

References:

1. **Auriault, C., H. Gras-Masse, R. J. Pierce, A. E. Butterworth, I. Wolowczuk, M. Capron, H. J. 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. Microbiol.* **28**(9):1918-1924.
2. **Auriault, C., H. Gras-Masse, I. Wolowczuk, R. J. Pierce, J. M. Balloul, J. L. Neyrinck, H. Drobecq, A. Tartar, and A. Capron.** 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* p28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* **141**(5):1687-1694.
3. **Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq, and A. Capron.** 1987. Molecular Cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* **326**:149-153.
4. **Balloul, J.-M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron.** 1987. A Purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**:3448-3453.
5. **Bergmeyer, H. U., G. N. Bowers, M. Horder, and D. W. Moss.** 1977. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.* **23**(5):887-899.
6. **Bouchon, B., M. Klein, R. Bischoff, C. Roitsch, F. Trottein, M. Jaquinod, K. Klanlor, and A. Van Doprsselcier.** 1994. Analysis of the primary structure and post-translational modifications of the *Schistosoma mansoni* antigen Smp28 by electrospray mass spectrometry. *J. Chromatog. B.* **662**:279-290.

7. **Boulanger, D., G. D. F. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J. M. Balloul, D. Grezel, R. J. Pierce, M. F. Otieno, S. Guerret, J. A. Grimaud, A. E. Butterworth, and A. Capron.** 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*. **13**:473-490.

8. **Boulanger, D., F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, D. Couret, R. J. Pierce, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, J. P. Lecocq, B. Sellin, and A. Capron.** 1994. Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* **16**:399-406.

9. **Boulanger, D., A. Warter, F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, F. Audibert, D. Couret, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, R. J. Pierce, J. P. Lecocq, B. Sellin, and A. Capron.** 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* **17**:361-369.

10. **Cheever, A. W.** 1968. A quantitative post-mortem study of *Schistosoma mansoni* in man. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **17**:38-64.

11. **Cohen, I. R., and D. B. Young.** 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today*. **12**:105-110.

12. **Forman, J., K. Wieties, and R. E. Hammer.** 1991. Tolerance to liver-specific antigens. *Immunol. Rev.* **122**:33-46.

13. **Gilles, P. N., D. L. Guerette, R. J. Ulevitch, R. D. Schreiber, and F. V. Chisarei.** 1992. HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-g. *Hepatology*. **16**:655-663.

14. **Goodnow, C. C.** 1992. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:489-581.
15. **Grezel, 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 Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* **23**:454-460.
16. **Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jacoby.** 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**(22):7130-7139.
17. **Hogen, B., F. Costantini, and E. Lacy.** 1986. Manipulating the mouse embryo. Cold spring harbor laboratory press, New York.
18. **Hughes, A. L.** 1993. Rates of amino acid evolution in the 26- and 28- kDa glutathione S-transferases of *Schistosoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**:43-52.
19. **Janeway, C. A. J.** 1992. The immune system evolved to discriminate infectious non-self from non-infectious self. *Immunol. Today.* **13**:11-16.
20. **Liu, J. L., J. Fontaine, A. Capron, and J. M. Grzych.** 1996. Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology.* **113**:377-391.
21. **Lu, Y., L. A. Cox, D. C. Herbert, F. J. Weaker, C. A. Walter, and G. S. Adrian.** 1993. Expression of chimeric human transferrin-chloramphenicol acetyltransferase genes in liver and brain of transgenic mice during development. *Dev. Biol.* **155**(2):452-458.
22. **Mannervih, B.** 1985. Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enz. Rel. Mol. Biol.* **57**:357-417.

23. **Medley, G., and R. M. Anderson.** 1985. Density-dependent fecundity in *Schistosoma mansoni* infections in man. *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**:532-534.
24. **Pierce, R. J., and A. Capron.** 1994. Development of a recombinant vaccin against schistosomiasis, p. 357-380. *In* E. Kurstak (ed.), *Modern Vaccinology*. Plenum Publishing Corporation, New York.
25. **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. *Parasitol.* **109**(Pt. 5):565-572.
26. **Smithers, S. R., and R. J. Terry.** 1969. Immunity in Schistosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **160**(2):826-840.
27. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**(3):503-517.
28. **Sturrock, R. F., A. E. Butterworth, and V. Houba.** 1976. *Schistosoma mansoni* in the baboon (*Papio anubis*): parasitological responses of Kenyan baboons to different exposures of a local parasite strain. *Parasitology.* **73**(3):239-252.
29. **Trottein, F., C. Godin, R. J. Pierce, B. Sellin, M. G. Taylor, I. Gorillot, M. S. Silva, J. P. Lecocq, and A. Capron.** 1992. Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**:63-72.
30. **Von Herrath, M. G., C. F. Evans, M. S. Horwitz, and M. B. A. Oldstone.** 1996. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of langerhans and the central nervous system. *Immunol. Rev.* **152**:111-143.
31. **White, B. A., and F. C. Bancroft.** 1982. Cytoplasmic dot hybridization simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J. Biol. Chem.*

257:8569-8572.

32. **Wirth, S., L. G. Guidotti, K. Ando, H. J. Schlicht, and F. V. Chisari.** 1995. Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis b virus envelope transgenic mice. *J Immunol.* **154**(5):2504-2515.

33. **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**:1342-1350.

34. **Xu, C. B., C. Verwaerde, H. Gras-Masse, J. Fontaine, M. Bossus, F. Trottein, I. Wolowczuk, A. Tartar, and A. Capron.** 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Immunol.* **150**(3):940-949.

Figures

Figure 1. Sm28GST transgene construction. The mPTf-Sm28GST-hGH fusion gene is represented. (E): EcoR I; (H): Hind III.

Figure 2. Western blot analysis of Sm28GST protein in 3 lines of ²⁸Tg mice (N^o: 9, 26, 35). MW: molecular weight in kDa. L: liver; B: brain; P28: rSm28GST (30 ng); C-: non^{P28}Tg littermate.

Figure 3. Immunohistochemical analysis of Sm28GST protein in the liver of ^{P28}Tg mice. Immunoperoxidase staining revealed the protein in center-lobular hepatocytes (cytoplasm and/or nucleus, A, B), while no labelling was observed in the liver of non ^{P28}Tg control mice (C). Hepatitis or abnormal liver histology were not observed (Original magnification: A: × 50; B: × 400; C: × 200)

Figure 4. Measurement of liver function in ^{P28}Tg mice. The function was monitored by measurements of GOT concentration (U/L) in the serum. (A): GOT concentration in the sera of naive mice; (B): GOT concentration in the sera of the ^{P28}Tg mice (●) or non ^{P28}Tg mice (○) immunized by rSm28GST + Alum or Alum alone.

Figure 5. Kinetics of the IgG response of ^{P28}Tg mice immunized with rSm28GST, Alum and KLH. (A): Anti-Sm28GST antibodies (serum dilution: 1/5000); (B): Anti-KLH antibodies (serum dilution: 1/25000); ^{P28}Tg mice immunized with Sm28GST+Alum (●); Non ^{P28}Tg mice immunized with Sm28GST+Alum (○); ^{P28}Tg mice

immunized with Alum (—◆—); Non ^{p28}Tg mice immunized with Alum (—◆—).

Arrows show the time of the primary immunization and the boost.

Figure 6. Inhibition of Sm28GST enzyme activity by pooled anti-rSm28GST antisera of ^{P28}Tg mice ($n=6$) and non ^{P28}Tg mice ($n=7$). The sera of mice immunized with Alum alone were used as negative controls to calculate the percentage inhibition.

Figure 7. Individual kinetic antibody responses of rSm28GST immunized ^{p28}Tg mice which have high (+++), medium (++) or low (+) Sm28GST expression in the liver. C-: non ^{p28}Tg littermate as negative control. . Arrows show the time of the primary immunization and the boost.

Figure 8. Proliferation assay of spleen lymphocytes from rSm28GST immunized mice. The lymphocytes were stimulated with rSm28GST (A) or SWAP (B).

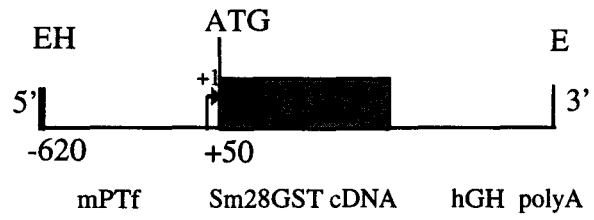
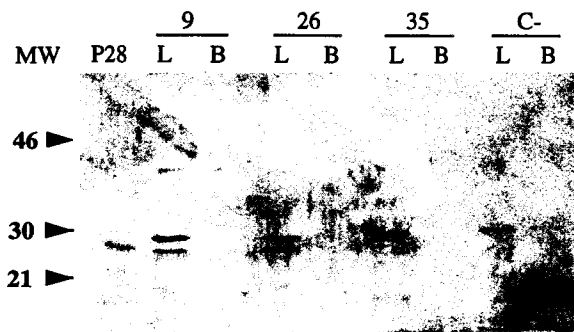


Fig. 1 (XU)



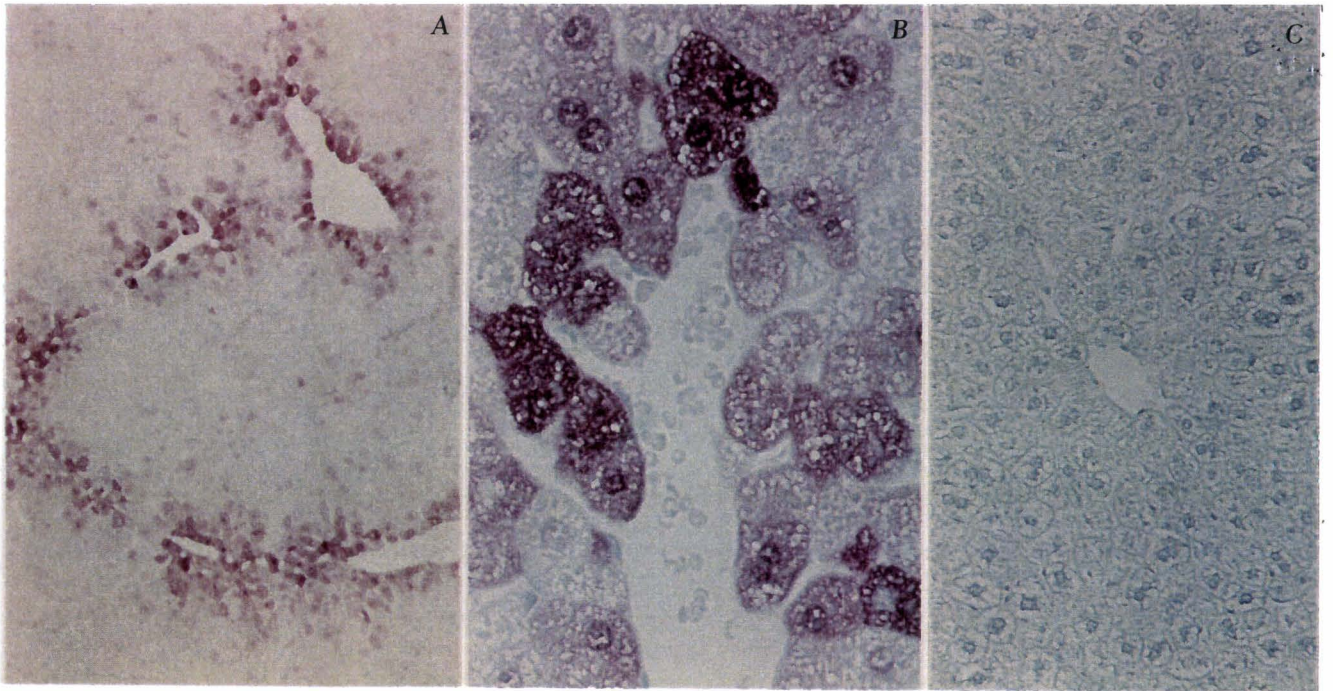


Fig 3

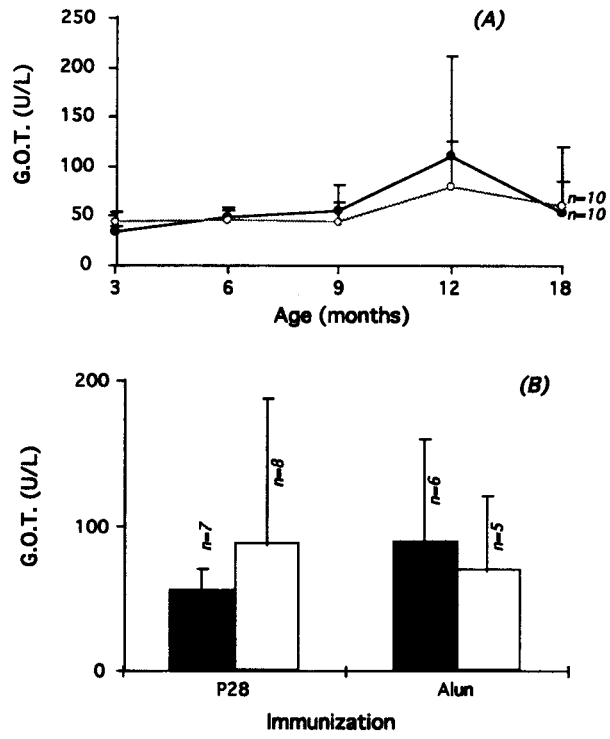


Fig.4 (XU)

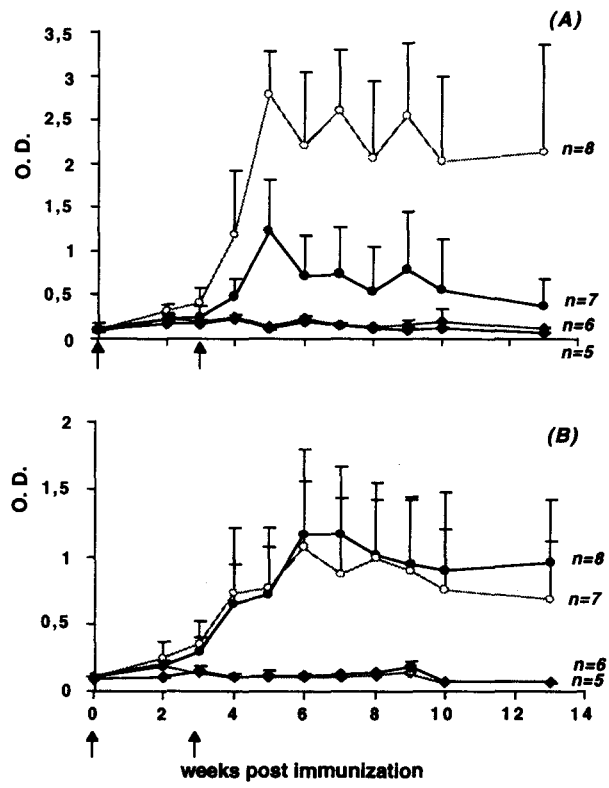


Fig.5 (XU)

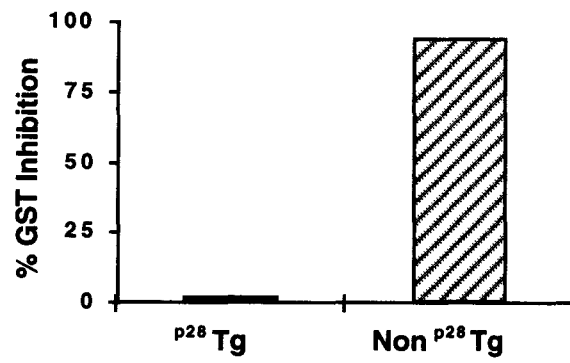


Fig.6 (XU)

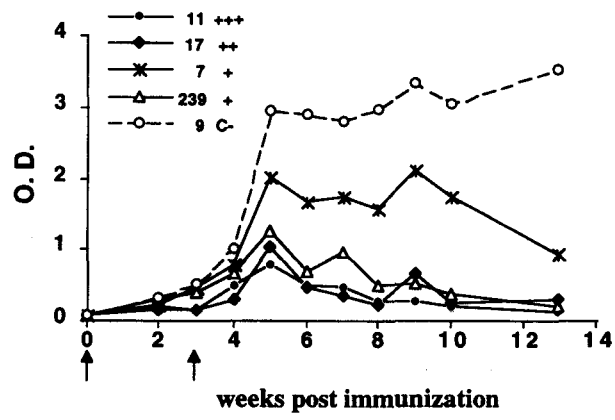


Fig. 7 (Xu)

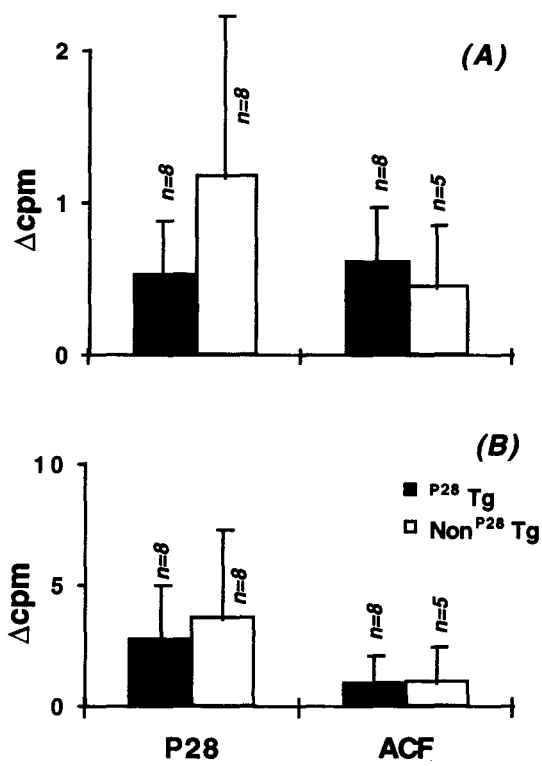


Fig. 8 (XU)

Table 1. Characteristics of PTF-Sm28GST -hGH Tg mice

mouse line	transgene copy number	Southern blot	progeny	transgene expression
1	5	+	-	ND
3	5	+	-	ND
5	5	+	+	-
8	8	+	+	-
9	>50	+	+	+
21	20	+	+	-
23	50	+	-	ND
26	8	+	+	+
35	>10	+	+	-
37	>50	+	+	ND

ND, not determined

Table2. Schistosoma mansoni Infection to Tg mice

Mice		Infection	Increasing	Student
^{P28} Tg(n=9)	Non ^{P28} Tg(n=8)	Parameters	effet(%)	p-Value
<i>worm burden</i>				
^{P28} Tg		25±7	39	<0,05
Non ^{P28} Tg		18±8		
<i>liver</i>				
<i>egg/g</i>				
^{P28} Tg		4164±1085	23	>0,05
Non ^{P28} Tg		3388±1909		
<i>intestin</i>				
<i>egg/g</i>				
^{P28} Tg		6417±1659	74	<0,05
Non ^{P28} Tg		3685±1493		
<i>liver</i>				
<i>egg/g/ couple</i>				
^{P28} Tg		900±345	-	>0,05
Non ^{P28} Tg		1246±592		
<i>intestin</i>				
<i>egg/g/ couple</i>				
^{P28} Tg		1354±367	-	>0,05
Non ^{P28} Tg		1378±515		

ARTICLE 2

**Cytokine response to *Schistosoma mansoni* protective antigen in
Sm28GST Transgenic Mice**

XU Xiaochuan[#]; Sophie Gaubert[#]; Jean-Yves Cesbron[#]; Catherine Lemaire[#];
Isabelle Wolowczuk^{*}; Josette Fontaine[#]; Sophia Lafitte[#]; Frederic Mullier[#]; André
Capron[#] and Jean-Marie Grzych^{#°}

[#] : Unité INSERM 167, IFR N°17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, B. P.
245, 59019 Lille Cedex; France

^{*}: CNRS URA 1854, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, B. P. 245, 59019
Lille Cédex; France

[°]: Corresponding author. Mailing address: Centre d'Immunologie et de Biologie
Parasitaire, Unité INSERM 167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, B. P. 245,
59019 Lille Cédex; France

Summary

The cellular immune response to Sm28GST protective antigen was evaluated in Tg mice carrying the gene encoding for this antigen before and after infection with *Schistosoma mansoni* by comparison to non Tg littermates. This study indicates discrepancy between Tg and non Tg mice in the ability to produce cytokines after *in vitro* stimulation with Sm28GST. Indeed, spleen cells from Tg mice demonstrated unresponsiveness to antigen stimulation (IL-2, IL-5 and IFN- γ) are compared with the reduction of proliferation, suggested that involvement of mechanisms of tolerance. Furthermore, the impairment of the cellular parameters seems to be associated with the reduction of the protective immunity to *S. mansoni*. These results supported this idea that this molecule can play an essential role in the development of immunity to schistosomiasis.

Introduction

Schistosomiasis represents the second major parasitic disease worldwide, affecting more than 200 million people in 75 countries. This debilitating infection is responsible each year for 500,000 deaths according to WHO, and research to develop effective immune prophylaxis has largely benefited from the introduction of monoclonal antibody and recombinant DNA methodologies for the characterization of potent protective molecules (Capron *et al.* 1992). Among the antigens proposed for the development of vaccines, the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase (Sm28GST) appears as a promising candidate. This molecule induces, under its native or recombinant form, high levels of protection towards challenge infection in both rodents and primates (Boulanger *et al.* 1991). The protective effect of this molecule acts at 2 different levels depending on the animal models used, either by a reduction of worm burden, or by impairment of parasite fecundity and egg viability (Xu *et al.* 1991, 1993). Passive transfer of monoclonal antibody inhibiting the enzymatic activity of this molecule, as well as immunization using synthetic peptides derived from the primary structure of the molecule have suggested a dissociation between the protective effects. Indeed effect on worm fertility and egg viability seems to be linked to inactivation of the catalytic site of the molecule, whereas the reduction of worm burden appears to be independent of the enzymatic activity.

The Sm28GST molecule possesses epitopes capable of activating T helper cells and able to induce a strong protective immunity by enhancing the production of cytotoxic antibodies (Auriault *et al.* 1987). Both Sm28GST specific IgE and IFN- γ induce platelets from normal rats into cytotoxic effectors for the parasitic larvae (Pancre *et al.* 1990). Sm28GST specific cells produce small amounts of interleukin-4 (IL-4) and

high levels of IFN- γ and adoptive transfers of these Sm28GST-specific CD4⁺, or CD8⁺ T cells reproduced protective effect obtained with the recombinant molecule (Pancre *et al.* 1990, 1994a). The protection depends on the type, dose and route of the T cell administration. However, Sm28GST possesses limited homology with mammalian glutathione transferase isoforms (Hughes 1993). Although no evidence has so far been obtained indicating auto-immune consequences of vaccination with Sm28GST, this possibility needs to be addressed.

To further understand immune mechanisms induced by Sm28GST, we introduced the cDNA encoding this protein into mice under control of the murine transferrin promoter which induces expression in the liver. Transgenic mice produced in this way expressed Sm28GST in the centro-lobula hepatocytes and showed no ill effects of the expression on liver pathology or physiological parameters of liver function were observed. Tg mice showed antigen specific tolerance toward the recombinant Sm28GST, but did produce a low-level antibody response (Xu *et al.* 1997). After *S. mansoni* infection, the Tg mice displayed an increased worm burden compared to controls. Since the lower antibody titer can not on its own explain the result of infection, we decided to further explore T cell response in Tg mice. It is suspected that immunity elicited in murine schistosomiasis is mainly based on cell-mediated mechanisms rather than on humoral response (Auriault *et al.* 1987). In this paper, we report the investigation of cytokine responses in Tg mice immunized with rSm28GST and infected with *S. mansoni*, as well as the parameters of parasitic infection.

Materials and Methods

Parasites

A Guadeloupean strain of *S. mansoni*, kindly provided by Professor Jourdane, (Université de Perpignan, France) was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails (bred in mineral water (Société des Eaux de Volvic, Volvic, France) and OF1 mice as definitive hosts.

Antigen and antisera

Soluble Adult Worm Preparation (SWAP) was prepared from adult worms washed in phosphate-buffered saline (PBS), homogenized with an Ultraturax (Janke et Kunkel, IKA Labortechnik) for 1 min., disrupted by a 5 min. sonication (Labsonic U., B. Braun), and centrifuged for 20 min. at $10,000 \times g$. The supernatant was then collected and stored in liquid nitrogen until use.

Recombinant Sm28GST (rSm28GST): a full length cDNA copy encoding Sm28GST was expressed in *E. coli* using a PL-expression vector (Balloul *et al.* 1987). The rSm28GST was purified (95% purity) by passage through a glutathione agarose column (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to Ketterer's method (Ketterer *et al.* 1987). The anti-Sm28GST sera were prepared as previously described (Balloul *et al.* 1987). Briefly, New Zealand rabbits were immunized subcutaneously (s.c.) with 250 μ g rSm28GST and CFA (Difco, Detroit, MI, USA, v/v). Rabbits were boosted s.c. 2 wk later with 250 μ g rSm28GST emulsified (v/v) in IFA (Difco) and bled 2 wk after boost.

Generation of Tg mice line:

The Tg mice were obtained as described elsewhere (Xu *et al.* 1997). The DNA negative littermates were used as non-Tg control animals.

Immunization

Tg and non-Tg mice were injected s.c. at the base of the tail with 50 μ g of Sm28GST or Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, Calbiochem-Behring Corp., La Jolla,

CA), an irrelevant antigen used as control, mixed with 100 µl CFA. The mice were boosted s.c. 3 weeks later with 25 µg of Sm28GST or KLH mixed with 100 µl IFA. Two weeks later, mice were bled and the spleens were removed under aseptic conditions for lymphocyte assays. Mice immunized with adjuvant alone were used as controls.

***Schistosoma mansoni* infection**

Tg and non Tg mice were infected by percutaneous exposure of the abdominal skin to 60 *S. mansoni* cercariae as already described (Sturrock *et al.* 1976). Whole body perfusion was carried out 50 days post-infection to measure worm burden. Livers and intestines were collected for egg load evaluation. Organs were digested in a 4% potassium hydroxide solution according to the method of Sturrock *et al.* (Sturrock *et al.* 1976). Data are presented as means ± SE.

Lymphocyte collection

Single splenocyte suspensions were prepared by forcing splenic tissue through fine wire mesh. Erythrocytes were lysed by osmotic treatment (176 mM Tris-buffered saline, 155 mM ammonium chloride solution) followed by 3 washes in sterile RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France). Cellular viability was evaluated by trypan blue dye exclusion. Cells were resuspended at 10^7 cells per ml in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (JRH BioSciences, Lenexa, Kans.), 50 µg/ml gentamycin (Schering-Plough, Le Vallois-Perret, France), 2 mM L-glutamine (Seromed, Berlin, Germany), 1% non-essential amino-acids (Seromed), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), and 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany). The isolated cells were incubated in medium alone or in the presence of Sm28GST (40 µg/ml), SWAP (200 µg/ml), KLH (100 µg/ml), or concanavalin A (ConA) 5 µg/ml (Seromed) in 24-well plates at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Supernatants were collected after 24h for IL-2 and IL-4 detections and after 72h for IFN-γ and IL-5

assays.

Lymphocyte proliferation assay

For the *in vitro* assays, 5×10^5 isolated spleen cells were cultured in lymphocyte culture medium and incubated alone or in the presence of Sm28GST (40 $\mu\text{g/ml}$), SWAP (200 $\mu\text{g/ml}$) or ConA (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma), in a total volume of 0.2 ml in 96-well flat-bottom microtiter tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). Cells were then exposed to 1 $\mu\text{Ci/well}$ of $^3\text{H-TdR}$ (37 Gbq/mmol, CEA, Gif-sur-Yvette, France) for the last 18 h of a 5 day culture period. Finally, cells were harvested by filtration on fiberglass discs using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the amount of incorporated $^3\text{H-TdR}$ was measured using a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as the arithmetic means of cpm of triplicate cultures.

Cytokine assays

Cytokine detection was performed on plates (Nunc-Immuno Module, Inter Med, Denmark) coated overnight at 4°C with 100 μl of purified anti-cytokine in coating buffer (0.1 M NaHCO_3 , 0.1 M Na_2CO_3 , pH 9.6) per well at 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$ of the anti-IL-4 mAb, anti-IL-5 mAb, anti-IL-2 mAb and anti-IFN- γ mAb, respectively. After one wash in PBS-0.1% Tween 20 (TPBS, pH 7.2), plates were saturated with 200 μl of PBS-0.5% gelatine per well for 1 h. After three washes with TPBS, supernatants were added and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed and incubated for 90 min. at 37°C with biotinylated anti-cytokine mAb (100 μl per well) diluted in TPBS at 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and 0.4 $\mu\text{g/ml}$ of biotinylated anti-IL-2, anti-IL-5, anti-IL-4 and anti-IFN- γ mAb, respectively. After washing, streptavidin conjugate was added at a dilution of 1/2000 for 1 h 30 min. at 37°C. After 3 washes, 1 mg/ml orthophenylenediamine (OPD, Sigma) in 0.1M sodium

phosphate buffer (pH 5.5), containing H₂O₂ (1 ml/l) was then added for 30 min. at 37°C. Cytokine productions were determined by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 2N HCl. The optical density was measured at 492 nm with a multichannel spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC 1340). Values were ranged between 0.1 - 10 ng/ml for IL-5, 0.2 - 20 ng/ml for IFN-γ, 1 - 200 U/ml for IL-2 and 20 - 1,250 pg/ml for IL-4.

Antibody assays

Plates (Nunc-Immuno Module) were incubated overnight at 4°C with 5 µg/ml rSm28GST in 100 µl of sodium carbonate buffer (0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaHCO₃, pH 9.6). The plates were then saturated for 1 h with PBS-5% gelatine. After 3 washes with TPBS, 100 µl of serum from immunized or infected mice at different dilutions (1/5000: anti-Sm28GST IgG; 1/250000: anti-KLH IgG; 1/200: IgG1, IgG2a) in TPBS were dispensed in each well and were incubated overnight at 4°C. After 5 washes, peroxidase labeled anti-mouse IgG-FC (1/15000) (Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania), goat anti-mouse IgG1-HRP (1/10000, SBA Inc., Birmingham, AL.) or goat anti-mouse IgG2a-HRP (1/10000, SBA Inc.) was added in the same buffer for 90 min. at 37°C. This was followed by additional washes and substrate addition. Results are expressed as the mean of duplicate wells minored of the background.

Statistics

Significance of results was calculated by Student's t-test.

Results

Immunization-induced cytokine responses (Fig.1)

Cytokine responses were studied in spleen cells collected 35 days after the first immunization. As shown in Fig. 1, after *in vitro* stimulation with Sm28GST, spleen cells from transgenic mice immunized with rSm28GST produced significantly lower IL-2 and IL-5 when compared to non-transgenic controls ($p < 0.05$), while under the same conditions, IL-4 and IFN- γ productions were comparable for Tg and non Tg mice. Splenocytes from KLH-immunized Tg and control animals produced weak and similar amounts of cytokines (IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- γ). Interestingly, after ConA stimulation, no difference in cytokine production was recorded between the two groups, and amounts of produced cytokines were higher when compared to the antigen stimulation (Fig. 1). In KLH-stimulated spleen lymphocytes, the measurement of the different cytokines did not show any differences of cells from Tg and non Tg mice to produce cytokines (data not shown).

Antibody responses

Antibody responses to rSm28GST and KLH of the corresponding mice were tested (Fig. 2). Total IgG and IgG1 specific antibodies to Sm28GST in Tg mice immunized by Sm28GST were significantly lower than those of non Tg mice ($p < 0.001$). No difference was observed after KLH immunization between these 2 groups. No IgG2a antibodies specific to Sm28GST were detected in each group of mice.

Cytokine responses in infected Tg mice

Cytokine productions by splenocytes of immunized-infected mice were presented in Fig. 3. When stimulated with rSm28GST, cells from rSm28GST immunized-infected Tg mice secreted significantly lower level of IL-2, IL-4 and IFN- γ when compared to non Tg control ($p < 0.05$), although the concentrations of IL-2, IL-5 and IFN- γ were

lower when compared to the splenocytes from immunized mice. Productions of IL-4 in both groups were comparable and low. Sm28GST stimulation has no effect upon the production of cytokines in the adjuvant control groups (Fig. 3, column A).

Significant (but non different between Tg and non Tg mice) cytokines were recorded when spleen cells were stimulated *in vitro* with SWAP (Fig. 3, column B). High levels of the 4 cytokines were obtained after incubation with ConA in the different groups. No difference was observed between Tg and non Tg mice (Fig. 3, column C).

Lymphocyte proliferative responses of Sm28GST transgenic mice

In vitro stimulation of spleen cells from immunized-infected non-Tg mice with rSm28GST induced significantly higher proliferation when compared to those from Tg mice (Fig. 4 A), while similar levels of proliferation in the two groups were elicited after SWAP stimulation (Fig. 4 B).

Effect of rSm28GST vaccination upon parasitological parameters

To study the potential relationship between the cellular response and the expression of immunity, Tg and non Tg mice were immunized with rSm28GST and then challenged with 60 *S. mansoni* cercariae 3 week after the second immunization. Worm burden and tissue egg load were evaluated 50 days post infection. Results summarized in Table 1 revealed that Sm28GST immunization significantly reduced the worm burden (28%, $p < 0.05$) and the number of the eggs (36%, $p < 0.05$) in non Tg mice when compared to non immunized mice. This protective effect was not observed in Tg immunized-infected mice when compared to appropriate controls.

The worm burden in Tg immunized mice was significantly higher to that recorded

in non Tg immunized mice (27%, $p < 0.05$), while the worm burden and the tissue egg load were similar in both non-immunized groups ($p > 0.05$).

The numbers of eggs per g of tissue were high both in the intestine and in the liver of immunized or non-immunized Tg mice, while in non Tg mice, the numbers of egg load were significantly reduced after Sm28GST immunization (25%, $p < 0.05$ in the intestine and 29%, $p < 0.05$ in the liver). However, when individual female worm fecundity was considered, the number of eggs produced per g of tissue and per female worm, no significant differences were noticed between Tg mice and non Tg mice either immunized or non-immunized.

Antibody responses in the sera of the same animals indicated that transgenic mice produced significantly lower IgG anti-rSm28GST antibodies when compared to the non-Tg mice, whereas the antibody response to SWAP was comparable in the two groups (Fig.5).

Discussion

In this paper, the cytokine response to the Sm28GST protective antigen was analyzed in spleen cells of the mice harboring the gene encoding for this antigen, previously immunized with Sm28GST or immunized and infected with *S.mansoni*. Globally, these studies revealed that spleen cells from Sm28GST transgenic mice produce significantly lower level of cytokines after *in vitro* stimulation with the Sm28GST when compared to spleen cells collected from non transgenic control. Differences recorded mainly concerned the amounts of IL-2 and IL-5 in immunized animals and IL-2, IL-5 and IFN- γ in immunized-infected mice. This phenomenon appears to be restricted to Sm28GST stimulation since lymphocytes from Tg and non Tg mice

display comparable patterns of cytokines when respectively stimulated with KLH and ConA (immunized mice) or ConA and SWAP (immunized-infected animals). This suggests an hyporesponsiveness of transgenic animals lymphocytes toward Sm28GST antigen, also recorded in the sera of Tg animal in which lower specific antibody titers (IgG and IgG1) to the Sm28GST were observed when compared to the non-transgenic controls. Interestingly, immunization with Sm28GST did not protect Tg mice from a challenge infection, since the worm burden as well as total egg counts were not modified while a reduction of these two parameters was recorded in the non Tg littermates.

This lack of protection might be explain in regard to cytokine profiles observed. Indeed, in mice, T-cells have been reported to play an important role via cytokines in the installation of the protection toward schistosome infections. Depletions of CD4⁺ or CD8⁺ cells using specific antibodies result in a significant reduction of protective effects conferred by Sm28GST immunization (Pancre *et al.* 1994b).

A down-regulation of IFN- γ production has been already reported previously in *S. mansoni* infected mice after egg (Grzych *et al.* 1991). In our experiment, a decrease of Th1 cytokines was observed. After Sm28GST or mitogen stimulation, IFN- γ and IL-2 levels were lower when compared to non-infected mice. Nevertheless, increase of Th2 cytokine responses was not clear, and seems to be restricted to the mitogen stimulation.

IFN- γ exhibits a protective effect in murine schistosome infection by inducing macrophages cytotoxicity against the *S. mansoni* larvae (James *et al.* 1986) and by limiting the hepatic damage related to granuloma formation (Pancre *et al.* 1994a). Researches using IFN- γ knock out mice demonstrated that IFN- γ is important in the early defense against intracellular parasites such as *Listeria monocytogenes* (Huang *et al.* 1993) and *Mycobacterium bovin* (Dalton *et al.* 1993), and indicated that IFN- γ is crucial

for the production of nitric oxide by macrophages. Furthermore, in *S. mansoni* infected mice, treatment with mAb anti-IFN- γ induced increasing circulating eosinophil levels when compared to the controls (Sher *et al.* 1990). Macrophages and eosinophils represent two major cell subsets for the induction of cytotoxicity against parasite. This lower IFN- γ production might impair the cell cytotoxicity, and explain the absence of immunization induced protection.

In human *S. mansoni* infections, a marked helminthocidal capacity of eosinophils have been demonstrated (Butterworth *et al.* 1992). Anti-IL-5 antibody treatment results in granulomas that are nearly devoid of eosinophils with marginally smaller granulomas (Sher *et al.* 1990). In IL-5 Tg mice, the number of blood eosinophils were higher when compared to normal littermates (Dent *et al.* 1990). IL-5 can also induce B cell proliferation and differentiation. (Sanderson *et al.* 1993). Immunoglobulin levels (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM) in IL-5 Tg mice were higher than in non Tg mice, and there was significantly higher levels of IgG2a, IgG3 and IgM in the Tg mice. In our Tg mice (infected or non infected), after immunization with rSm28GST, depression of specific antibodies response (total IgG and IgG1) to rSm28GST was observed. The fact that Tg mice secreted lower level of IL-5 might partially explain the lower anti-Sm28GST antibody titers in Tg mice after Sm28GST immunization

Reduction of IL-2 production was observed in spleen cells of Sm28GST Tg mice. The failure of IL-2 production has been previously reported as a marker of T cell tolerance (Jankovic 1993). For example, the ability of lymphocytes of IL-2 knock out mice to proliferate after stimulation with T cell mitogen was severely impaired (Schorle *et al.* 1991). Neither activation with polyclonal activator nor with allogeneic T cell deprived spleen cells led to generation of cells able to lyse the relevant allogeneic target cells (Schimpl *et al.* 1992). Moreover, an increase in natural killer (NK) cells was found

in the huIL-2/huIL-2Ra double Tg mice (Ishidan *et al.* 1989). NK cells play a regulatory role in schistosomiasis, anti-NK-1.1 mAb treatment reduced NK cell activity (70-90%) (Hashimoto *et al.* 1990). The lower production of IL-5 in our model might impair the function of T cells and NK cells.

IL-4 can induce the development of Th2 response to parasite *Leishmania major* infection *in vivo* (Chatelain *et al.* 1992). *In vitro*, IL-4 inhibits the differentiation of Th1 lymphocytes (Maggi *et al.* 1992) and induces IgG1 and IgE, inhibits IgG2a production (Banchereau 1992). Although in our studies IL-4 production were low, it might still be an essential factor to control isotype responses, since the main isotype observed was IgG1.

In this context, reduction of the worm burden and the egg number observed in vaccinated non-Tg mice might be related to the fact that IFN- γ activated cytotoxicity of T-cells and macrophages, and that IL-5 and IFN- γ stimulated eosinophils and protective antibodies. Furthermore, cooperation between antibodies to Sm28GST and inflammatory cells (macrophages, eosinophiles and platelets) induced lysis of parasite larvae by ADCC (Antibody dependent Cell Cytotoxicity) mechanism. Since transgenic mice seem to be tolerant to Sm28GST antigen, vaccination with Sm28GST is unable to induce protective immunity, neither T-cell nor antibody-dependent. Thus it is not surprising to observe reductions in worm and egg load in rSm28GST immunized non Tg mice, while no protective effect toward *S. mansoni* challenge was observed in Tg mice.

Spleen lymphocytes proliferation and specific antibodies production suggested that B-cells and T-cells of transgenic mice are unresponsive to Sm28GST antigen. It appears to be an interesting tolerance model restricted to Sm28GST. The studies setted in Tg mice reveal a variety of tolerance (anergy and unresponsiveness) in both thymus and peripheral lymphoid organs. It has been reported for neo-self reactive transgenic

products such as viral encoded proteins HBsAg, that expression of the transgene led to a functional unresponsiveness in lymphocytes (Wirth *et al.* 1995). In almost all the models, this tolerant state was reversible. When tolerant B cells are removed from the double-transgenic mice and "parked" in non transgenic recipients, they recover expression of membrane IgM but fail to recover their ability to mount an efficient antibody response to stimulation with an immunogenic antigen conjugate and an optimal source of helper T cells (Goodnow *et al.* 1991). It suggests that peripheral tolerance was due to an inability of the non lymphoid cells in the peripheral tissues to present the transgene products and explained that in our Tg model, rSm28GST immunization induced a low antibody response. Moreover, the transgenic mice expressing a higher level of IL-2 in islet β cell developed a massive pancreatitis (Allison *et al.* 1992). Although immunization with rSm28GST induced anti-Sm28GST antibodies in sera of Tg mice expressing Sm28GST protein in their livers, no inflammation in liver was observed (Xu *et al.* 1997). IL-2 depression recorded in our study might take into account for this.

In conclusion, the present report describes a state of cellular tolerance to Sm28GST in Sm28GST transgenic mice. This animal model confirmed the protective effect of Sm28GST toward *S. mansoni* infection. It enlightens the importance of T cell responses (including Th1 and Th2 type) in the protective immunity triggered by Sm28GST against *S. mansoni* infection.

Acknowledgments

This work was supported by the INSERM U167, IFR17, grants from the E. E. C. (Biotech contract: Bio2CT-93011) and benefited from a doctoral fellowship from the Government of the Peoples Republic of China. We particularly thank R.J. Pierce for his

helpful advice. We wish to thank J. L. Neyrinck for statistical assistance and C.Dessenne and C. Kizomzolo for reference assistance.

Legends

Fig1. Cytokine responses of spleen cells from rSm28GST immunized Tg mice. Values correspond to cytokine produced by splenocytes stimulated with antigens or mitogen minus the background (medium). Column A: *in vitro* stimulation with rSm28GST, Column B: *in vitro* stimulation with KLH.

Fig2. Antibody responses of Tg mice and non Tg mice immunized with rSm28GST (serum dilution: IgG1 and IgG2a: 1/100, IgG total: 1/5000) (A) or with an irrelevant antigen KLH as control (serum dilution: 1/2000, IgG total: 1/5000) (B). C-: serum from the non-immunized mice (IgG total).

Fig. 3. Cytokine productions in rSm28GST immunized-infected Tg and non Tg mice. Values correspond to cytokine produced by splenocytes stimulated with the antigen or mitogen minus the background (medium). Column A: *in vitro* stimulation with rSm28GST, Column B: *in vitro* stimulation with SWAP. Column C: *in vitro* stimulation with ConA.

Fig. 4. proliferation assay of spleen lymphocyte from rSm28GST immunized mice. The spleen cells were stimulated with rSm28GST (A) and SWAP (B). Δ cpm value is

$$\text{calculated by: } \Delta\text{cpm} = \frac{\text{cpmX} - \text{cpm Medium}}{\text{cpm Medium}}$$

Fig. 5. Anti-Sm28GST (A) and anti-SWAP (B) IgG in rSm28GST immunized-infected Tg mice (serum: 1/200), 8 week after infection. C+: Sm28GST (A) or SWAP (B) immunized mice.

References

Allison J., Malcolm L., Chosich N. & Miller J.F.A.P. (1992) Inflammation but not autoimmunity occurs in transgenic mice expression constitutive levels of interleukin-2 in islet β cells. *European Journal of Immunology* **22**, 1115-1121.

Auriault C., Balloul J.M., Pierce R.J. *et al.* (1987) Helper T Cells Induced by a Purified 28-Kilodalton Antigen of *Schistosoma mansoni* Protect Rats against Infection. *Infection and Immunity* **55**, 1163-1169.

Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D. *et al.* (1987) Molecular Cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**, 149-153.

Banchereau J. & Rousset F (1992) Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. *Advance in Immunology* **52**, 125-262.

Boulanger D., Reid G.D.F., Sturrock R.F. *et al.* (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **13**, 473-490.

Butterworth A.E., Dunne D.W., Fulford A.J. *et al.* (1992) Human immunity to *Schistosoma mansoni*: observations on mechanisms, and implications for control. *Immunological Investigation* **21**, 391-407.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M. & Pierce R.J. (1992) Vaccine strategies

against schistosomiasis. *Immunobiology* **184**, 282-294.

Chatelain R., Varkila K. & Coffman R.L. (1992) IL-4 induces a TH2 response in *Leishmania major* infected mice. *Journal of Immunology*. **148**, 1182-1187.

Cheever A.W., Finkelman F.D. & Cox T.M. (1995) Anti-interleukin-4 treatment diminishes secretion of Th2 cytokines and inhibits hepatic fibrosis in murine Schistosomiasis japonica. *Parasite Immunology* **17**, 103-109.

Chensue S.W., Terebuh P.D., Warmington K.S. *et al.* (1992) Role of IL-4 in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation: orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function. *Journal of Immunology*. **148**, 900-906.

Dalton D.K., Pitts Meek S., Keshav S. *et al.* (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**, 1739-1742.

Dent L.A., Strath M., Mellor A.L. & Sanderson C.J. (1990) Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1425-1431.

Goodnow C.C., Brink R. & Adams E. (1991) Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* **352**, 532-536.

Grzych J.M., Pearce E., Cheever A. *et al.* (1991) Egg deposition is the major

stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* **146**, 1322-1327.

Hashimoto A., Pincelli C., Fujioka A. *et al.* (1990) Relationship between NK cells and granulomatous inflammation in mice. *Journal of Clinical Laboratory Immunology* **33**, 41-47.

Heath A.W. & Playfair J.H.L. (1990) Conjugation of interferon-gamma to antigen enhances its adjuvanticity. *Immunology* **71**, 454-456.

Huang S., Hendriks W., Althage A. *et al.* (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259**, 1742-1745.

Hughes A.L. (1993) Rates of amino acid evolution in the 26- and 28-kDa glutathione S-transferases of *Schistosoma*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **58**, 43-52.

Ishidan Y., Nishi M., Taguchi O. *et al.* (1989) Immune dysfunctions and activation of natural killer cells in human IL-2 and IL-2/IL-2 receptor L-chain transgenic mice. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **54 Pt 2**, 695-704.

Jankovic D.L. (1993) Interleukine-2. ed. Cavailon J.M. *Les cytokines*, p. 223-236. Masson, Paris.

James, S. L. (1986) Activated macrophages as effector cells of protective

immunity to schistosomiasis. *Immunology Research* **5**, 139-148.

Ketterer B., Tan K.H., Meyer D.J. & Coles B. (1987) A possible role in detoxification of DNA and lipid hydroperoxydes. ed. Mantle T.J., Piskett C.B. & Hayes J.D. *Glutathione S-transferases and carcinogenesis*, p. 149-163. Taylor and Francis, London.

Kresina T.F., He Q. & Zern M.A. (1992) Cytokines, hepatic fibrosis and schistosomiasis. *Rhode Island Medicine* **75**, 191-195.

Maggi E., Parronchi P., Manetti R. & al e. (1992) Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology* **148**, 2142-2147.

Oswald I.P., Caspar P., Jankovic D. *et al.* (1994) IL-12 inhibits Th2 cytokine responses induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **153**, 1707-1713.

Pancre V., Schellekens H., Van de M.P. *et al.* (1990) Biological effect of interferon-gamma during the course of experimental infection of rat by *Schistosoma mansoni*. *Cellular Immunology* **125**, 58-64.

Pancre V., Wolowczuk I., Bossus M. *et al.* (1994a) Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: Interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Molecular Immunology* **31**, 1247-1256.

Pancre V., Wolowczuk I., Guerret S. *et al.* (1994b) Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infection and Immunity* **62**, 3723-3730

Sanderson C.J., Strath M., Mudway I. & Dant L.A. (1993) Transgenic experiments with IL-5. ed. Kay A.B. & Gleich G.J. *Eosinophils in Asthma*, pp. 335-351. Academic Press, London.

Schimpl A., Schorle H., Hünig T. *et al.* (1992) Cytokines in health and disease p. 87-95. Serono Symposium Publications, Raven Press, New York.

Schorle H., Holtschke T., Hünig T. *et al.* (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**, 621-624.

Sher A., Coffman R.L., Hieny S. *et al.* (1990) Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 61-65.

Sturrock R.F., Butterworth A.E. & Houba V. (1976) *Schistosoma mansoni* in the baboon (*Papio anubis*): parasitological responses of Kenyan baboons to different exposures of a local parasite strain. *Parasitology* **73**, 239-252.

Wirth, S., Guidotti, L.G., Ando, K. *et al.* (1995) Breaking tolerance leads to

autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis b virus envelope transgenic mice. *Journal of Immunology* **154**, 2504-2515.

Xu C.B., Verwaerde C., Gras-Masse H. *et al.* (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *Journal of Immunology* **150**, 940-949.

Xu C.B., Verwaerde C., Grzych J.M. *et al.* (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *European Journal of Immunology* **21**, 1801-1807.

Xu X.C., Lemaire C., Grzych J.M. *et al.* (1997) Expression of *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase in the liver of transgenic mice and its effect on parasite infection. *Infection and immunity* (submit)

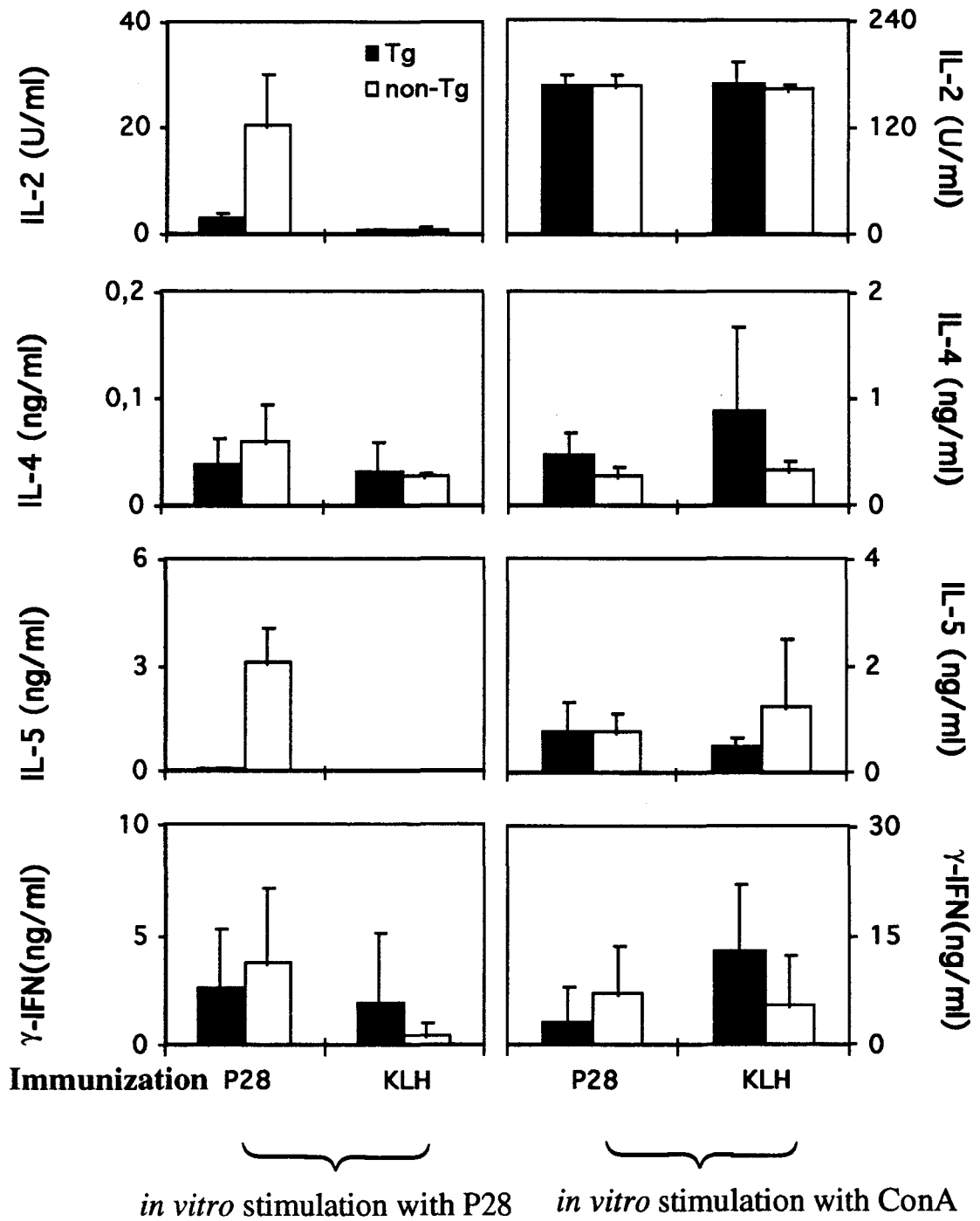
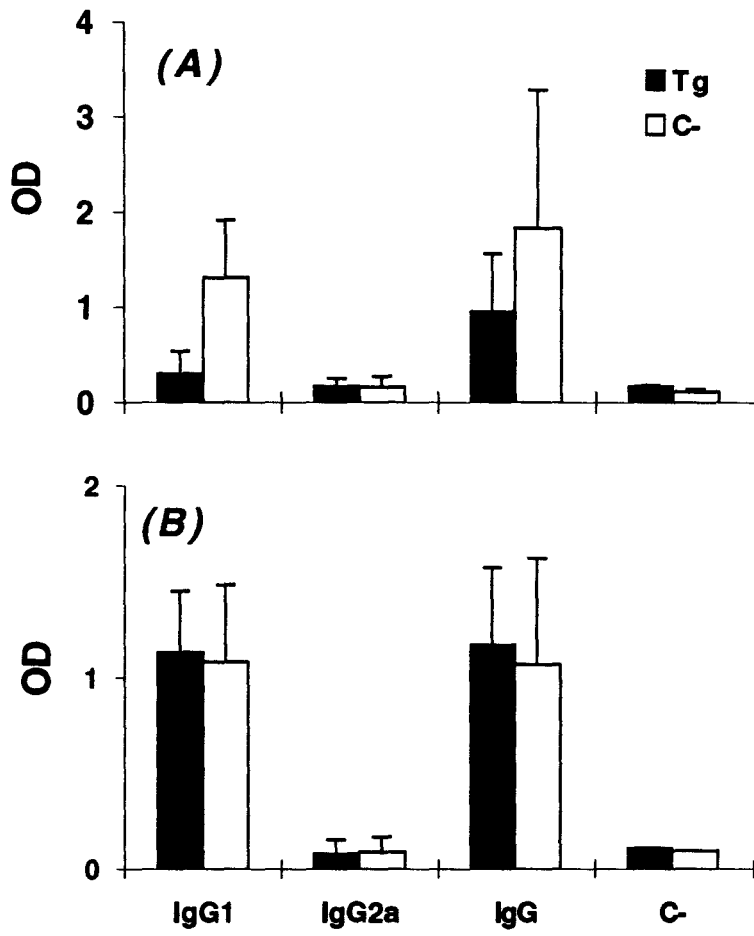


Fig1.

**Fig.2**

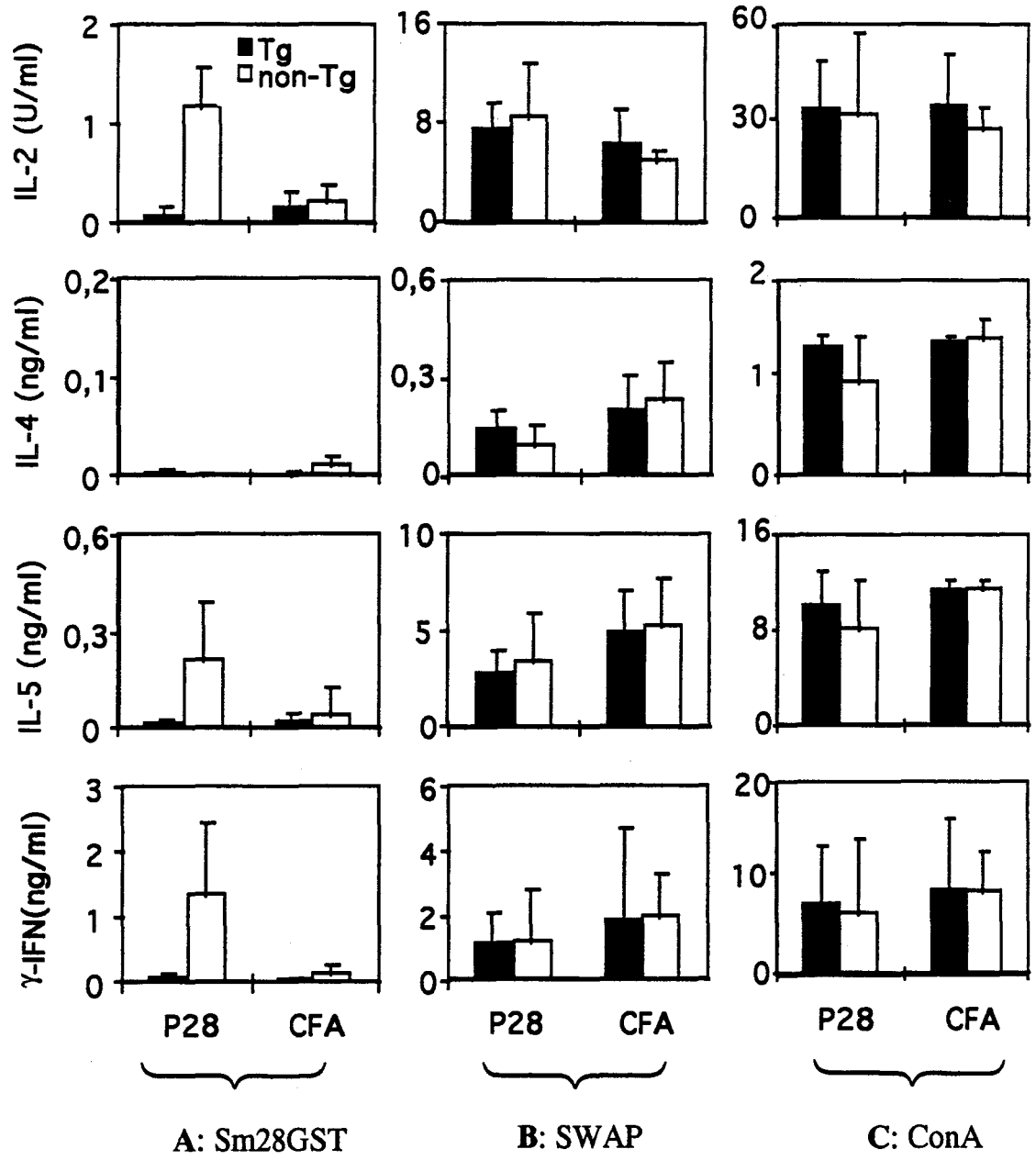


Fig. 3.

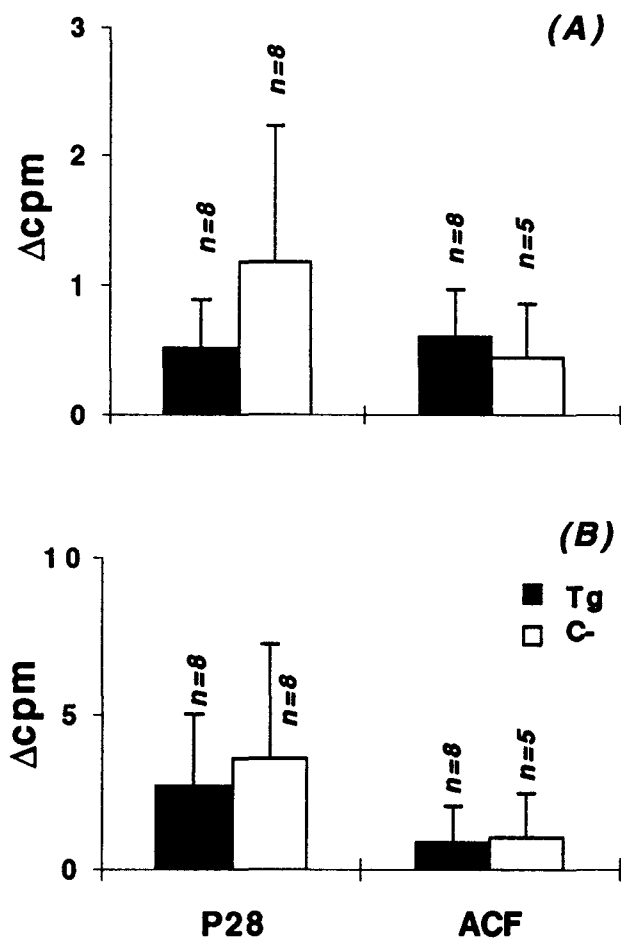


Fig. 4

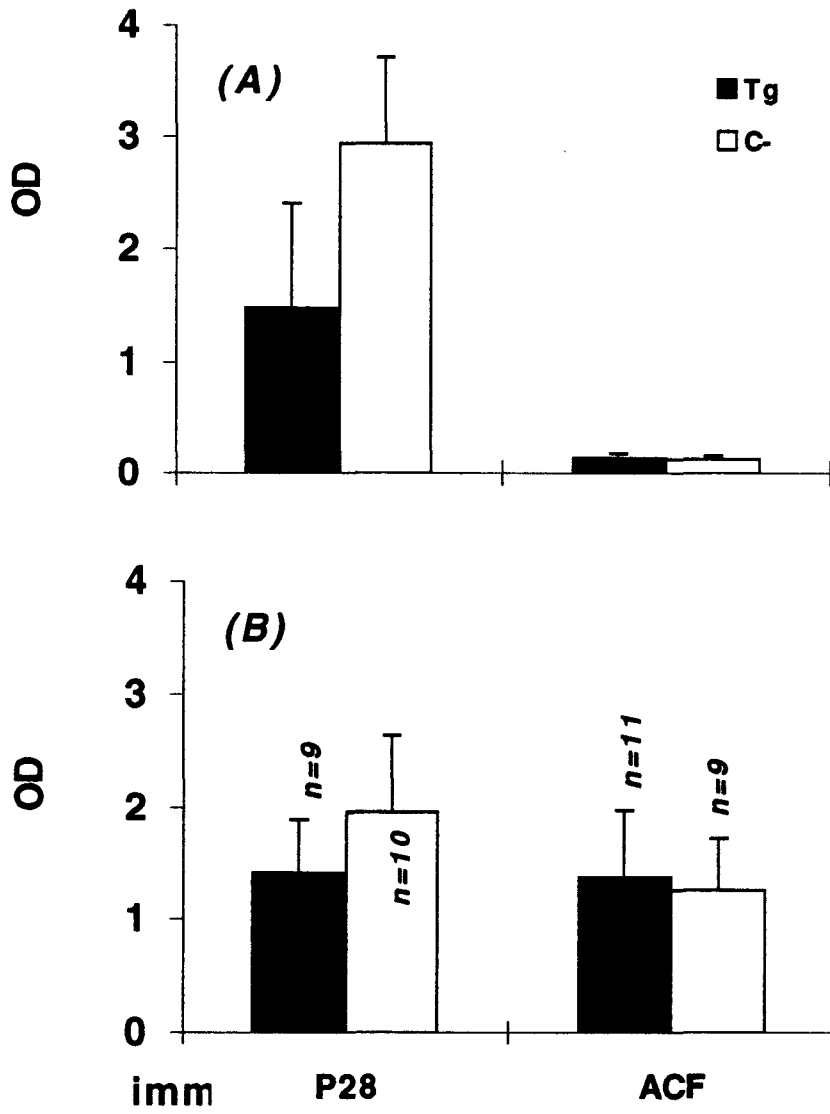


Fig. 5

Table 1. Parasite parameters after Sm28GST vaccination

Mouse	p28+CFA	CFA
worm/mouse		
Tg	29±7(9) ^{1*2}	26±6(11)
non Tg	21±8(10)	29±11(9) ^{#3}
egg/g Intestin.		
Tg	12780±2825*	11573±3562
non Tg	9532±3481	14843±7860#
egg/g liver		
Tg	7757±2146*	6393±2019
non Tg	5483±2051	7516±2763#
egg/g Int./Female		
Tg	1104±195	1104±226
non Tg	1109±351	1143±261
egg/g liver/Female		
Tg	665±146	611±108
non Tg	609±121	603±103

1: the number in brackets is the number of mice in each group.

2: * statistically significant ($p < 0.05$), compared with the Non Tg mice

3: # statistically significant ($p < 0.05$), compared with the immunized mice

Discussion et conclusion

VII. DISCUSSION ET CONCLUSION

S'inscrivant dans un vaste programme de développement d'un vaccin anti-bilharzien, notre travail de thèse s'est orienté vers la construction d'un modèle animal exprimant la Sm28GST, une molécule candidate du vaccin contre l'infection par *S. mansoni*, dans le foie de cette souris. Cette construction permet d'analyser des cascades complexes de phénomènes qui sont induits *in vivo* en réponse à l'expression de Sm28GST, et ainsi de progresser dans la compréhension des mécanismes protecteurs de cette molécule.

A. CONSTRUCTION D'UNE SOURIS TRANS-GENIQUE EXPRIMANT SM28GST DANS LE FOIE.

Les effets pathologiques de l'infection à schistosome se situent au niveau du foie. Leur oeufs, piégés dans les capillaires hépatiques, stimulent une réaction inflammatoire granulomateuse et produisent des fibroses extensives. Sm28GST, un composant principal sécrété par les oeufs, peut jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire (Porchet et al., 1994). De plus, le foie est l'endroit où l'enzyme GST est en fonction. Considérant ces raisons, on fait exprimer intentionnellement la molécule dans le foie par le promoteur de la transferrine. Un gène contenant 600 bp de la séquence génomique du promoteur de la transferrine murine (mPTf) upstream, lié avec "l'open reading frame" de Sm28GST et avec le poly (A) de l'hGH, est utilisé pour produire les souris transgéniques.

Nous avons obtenu dix lignées de souris portant le transgène. Parmi elles, seules deux lignées (lignée 9 et lignée 26) exprimaient l'ARN messager de Sm28GST. Bien que cet ARN ait été retrouvé dans le foie et le cerveau l'analyse par western blot ne permet de détecter la protéine que dans le foie de la souris transgénique. Ceci peut s'expliquer soit par une concentration protéique trop faible pour être détectable par histologie ou western blot, soit parce que la protéine produite est instable dans le cerveau, suite à une modification post-traductionnelle. Au niveau

de l'ARN messager, nos résultats concordent avec ceux de souris portant comme transgène le promoteur Tf plus l'hormone croissance humaine (hGH): l'ARN messager dans le foie est beaucoup plus abondant que dans le cerveau (Idzerda et al., 1989). Au niveau protéique, une autre souris transgénique, portant 0.67 Kb de la région 5' encadrant la transferrine humaine (hTf) fusionnée avec le gène de la chloramphenicol acétyltransferase bactérienne, exprime la protéine dans le foie et dans le cerveau, à un niveau suffisant pour détecter l'activité de l'enzyme (Lu et al., 1993). Les fonctions de transcription et de traduction du promoteur de la transferrine humaine sont peut-être plus efficaces que celles du promoteur murin.

L'analyse immunohistologique montre que la distribution de Sm28GST dans le foie est péricentrolobulaire. C'est peut être la première fois que l'expression d'un transgène sous le contrôle du promoteur Tf est étudié au niveau histologique. Bien qu'on ne puisse pas comparer cette distribution avec l'autre expérience, de la distribution de la transferrine de souris est différente de celle de la Sm28GST dans la même souris (Fig. 4). Elles sont sous le contrôle du même promoteur. Il est possible que le promoteur ne soit pas le seul facteur contrôlant l'expression du transgène. Les GSTs sont multifonctionnelles mais leurs fonctions particulières sont la détoxification et le transfert des molécules lipophiliques (Mannervih, 1985). La composition du sang traversant le foie peut également être un facteur inducteur, expliquant l'expression préférentielle de Sm28GST autour des vaisseaux.

Les GSTs sont abondantes chez les mammifères. Leur super-famille peut être divisée en cinq groupes. La Sm28GST possède une homologie de séquence significative avec l'isoforme α humaine (28%) et une homologie légèrement plus faible avec l'isoforme π (Hughes, 1993, Trottein et al., 1992). Dans les résultats de western blot, l'anticorps anti-Sm28GST (sérum du lapin) présente une réaction croisée avec les GSTs de souris (30 kDa). Si l'on désire utiliser cette molécule comme vaccin, il est nécessaire de bien connaître sa toxicité et la possibilité d'obtenir une réponse auto-immune. Notre souris transgénique se développe

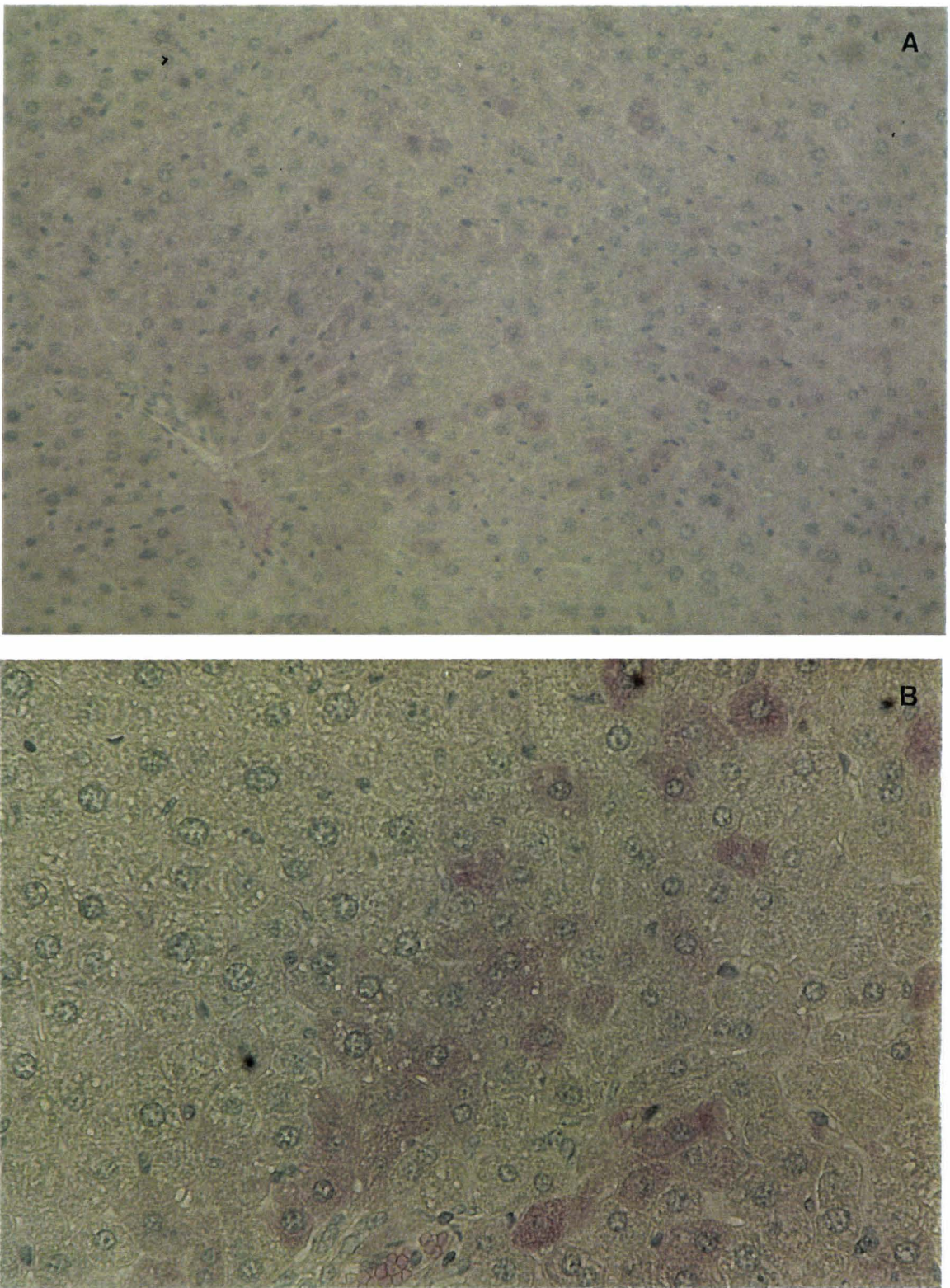


Figure 4. Transferrine exprimée dans le foie de la souris transgénique. La protéine transferrine (en rouge) est localisée dans les hépatocytes (cytoplasme et/ou noyau) d'une manière différente par rapport à la distribution de la Sm28GST (grossissement : A: $\times 50$; B: $\times 400$)

normalement. L'histologie du foie de la souris naïve, jusqu'à l'âge de 18 mois, ne présente aucune inflammation ou hépatite. La concentration de TGO (L- aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase) dans le sérum de la souris transgénique est du même niveau que celle d'une souris non transgénique de la même portée, pendant une période de 14 mois. Ce résultat confirme ceux des expériences immunologiques avec la Sm28GST recombinante chez différentes espèces d'animaux montrant que cette protéine n'est pas toxique (Boulanger et al., 1991, Balloul et al., 1985 ; 1987c ; 1987b ; 1987a).

De plus, l'immunisation par la Sm28GST produit des anticorps dirigés contre la même molécule exprimée dans le foie, à un niveau plus faible. Ces anticorps ne peuvent pas induire une réaction d'inflammation au niveau du foie (analysé par histologie), ni augmenter la concentration de TGO dans le sérum. Dans ce cas, Sm28GST et l'anticorps n'induisent pas de réaction auto-immune chez ces souris.

Sm28GST est un des composants d'excrétion ou de sécrétion du schistosome. L'absence de cette molécule dans la muqueuse intestinale du ver implique qu'il soit sécrété ou libéré par le tégument (Porchet et al., 1994). La séquence N-terminale du peptide possède le caractère de la séquence de signal eucaryotique (R. Pierce, non publié), mais la protéine du schistosome mature est seulement dépourvue du premier résidu Met (Bouchon et al., 1994). Il est possible que la séquence fonctionne dans une cellule de mammifère et, de ce fait, il serait intéressant de comparer l'expression du gène de Sm28GST dans un système eucaryotique et chez l'helminthe. Nos résultats montrent que Sm28GST est présente dans le cytoplasme et dans le noyau des hépatocytes. La distribution est similaire à celle publiée récemment dans un rapport sur les cellules parasitaires (Liu et al., 1996). Mais le rôle de l'enzyme dans le noyau reste encore inconnu.

B. LA REPONSE HUMORALE APRES IMMUNISATION DES SOURIS TRANSGENIQUES PAR SM28GSTR

Les réponses immunes des cellules B et T spécifiques de la

Sm28GST sont analysées. Après immunisation par Sm28GST, avec ACF ou Alum, la souris transgénique présente une faible activité anticorps et cellulaire. Cet effet est spécifique du transgène, car la souris transgénique produit une réponse normale pour la KLH et le SWAP. Les mécanismes de cet effet sont étudiés, et la technique de la souris transgénique est utilisée pour l'étude des mécanismes de la tolérance. L'expression d'un neo-antigène réactif, par exemple des protéines virales, induit une inactivité fonctionnelle dans le système immunitaire (Wirth et al., 1995). Dans de nombreux modèles, cet état *in vivo* est réversible par différentes manipulations *in vivo* et *in vitro*, suggérant que la tolérance périphérique est la conséquence d'une inactivation des lymphocytes dans les tissus périphériques, en présentant les produits transgéniques (Goodnow, 1992). La tolérance pour l'antigène du soi peut se produire au niveau du thymus ou à la périphérie (Blackman et al., 1990). Dans notre modèle, la protéine Sm28GST n'est retrouvée ni dans le thymus, ni dans les fluides. De plus, les hépatocytes sont des cellules épithéliales (les cellules radiorésistances). Les cellules de Kupffer n'expriment pas le transgène. Ces résultats impliqués peuvent être une tolérance périphérique. Les lymphocytes restent dans un état d'anergie: ces cellules spécifiques de l'antigène du soi existent mais sont inactives (Forman et al., 1991). Ceci peut être considéré comme une tolérance non absolue.

L'anergie peut expliquer en partie la faible immunogénicité spécifique de Sm28GST. L'autre explication est la cross-réaction de l'anticorps anti-Sm28GST (sérum du lapin) avec les GSTs de souris (30 kDa). Alternativement, l'immunisation, qui entraîne une forte réponse immunitaire, peut induire un processus auto-immun. Aucune hépatite auto-immune n'a été observée au cours des différentes expériences jusqu'à maintenant.

C. LES REPONSES DES CYTOKINES APRES IMMUNISATION DES SOURIS TRANSGENIQUES PAR SM28GST RECOMBINANT

Les résultats d'infection par *S. mansoni* montre que les souris transgéniques retiennent significativement plus de vers que les contrôles.

Néanmoins, les niveaux d'anticorps spécifiques de la Sm28GST sont très faibles entre les deux groupes et il n'est pas suffisant pour expliquer le résultat. Il est considéré que l'immunité provoquée par la schistosomiase murine repose en grande partie sur des mécanismes cellulaires (Xu et al., 1991).

Dans le second rapport présenté dans la thèse, nous décrivons l'étude de la production de cytokines des souris transgéniques immunisées par la Sm28GST recombinante, puis infectées par *S. mansoni*.

Nous montrons que les cellules spléniques de souris transgéniques stimulées *in vitro* par Sm28GST produisent moins d'IL-2, IL-5 et d'IFN- γ que les souris contrôles. Cette différence est restreinte à Sm28GST, dans la mesure où il n'y a pas de différence avec les animaux témoins en utilisant des antigènes irrelevantes tels que la KLH ou la ConA.

Ces résultats soulignent l'importance de la réponse cellulaire T anti-Sm28GST dans la protection à l'infection par *S. mansoni*.

Il serait probablement intéressant d'envisager la reconstitution de souris transgéniques avec des population cellulaires définies (sur le plan des clusters de différenciation), et sur le plan des v β pour caractériser les épitopes T essentiels à la protection à la réinfection.

Par ailleurs, ce modèle de souris transgéniques exprimant un antigène à un niveau périphérique pourrait être utilisée pour l'étude de la tolérance périphérique, qui reste encore mal comprise.

Bibliographie

VIII. REFERENCES

- Abe, S., Ota, Y., Doi, Y., Nomoto, A., Nomura, T., Chumakov, K. M. and Hashizume, S.** (1995) Studies on neurovirulence in poliovirus-sensitive transgenic mice and cynomolgus monkeys for the different temperature-sensitive viruses derived from the Sabin type 3 virus. *Virology*, **210**, 160-166.
- Abraham, K. M., Levin, S. D., Marth, J. D., Forbush, K. A. and Perlmutter, R. M.** (1991) Thymic tumorigenesis induced by overexpression of p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3977-3981.
- Allison, J., Malcolm, L., Chosich, N. and Miller, J. F.** (1992) Inflammation but not autoimmunity occurs in transgenic mice expressing constitutive levels of interleukin-2 in islet beta cells. *Eur J Immunol*, **22**, 1115-1121.
- Ando, K., Guidotti, L. G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missake, G., Moriyama, T., Schreiber, R. D., Schlicht, H. J., Huang, S. and Chisari, F. V.** (1994) Class I restricted Cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J. immunol.*, **152**, 3245-3253.
- Ando, K., Moriyama, T., Guidotti, L. G., Wirth, S., Schreiber, R. D., Schlicht, H. J., Huang, S. and Chisari, F. V.** (1993) Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J. Exp. Med.*, **178**, 1541-1554.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R. J., Butterworth, A. E., Wolowczuk, I., Capron, M., Ouma, J. H., Balloul, J. M., Khalife, J., Neyrinck, J. L., Tartar, A., Koech, D. and Capron, A.** (1990) Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1918-1924.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Neyrinck, J. L., Drobecq, H., Tartar, A. and Capron, A.** (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.*, **141**, 1687-1694.
- Balloul, J. M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M.,**

Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1987a) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*(Ed, McInnis, A.) Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 77-84.

Balloul, J. M., Pierce, R. J., Grzych, J. M. and Capron, A. (1985) *In vitro* synthesis of a 28-Kilodalton antigen present on the surface of the *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **17**, 105-114.

Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1987b) Molecular Cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, **326**, 149-153.

Balloul, J.-M., Grzych, J.-M., Pierce, R. J. and Capron, A. (1987c) A Purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunology*, **138**, 3448-3453.

Barsoum, I. S., Bogitsh, B. J. and Colley, D. G. (1992) Detection of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen for evaluation of resistance induced by irradiated cercariae. *J Parasitol*, **78**, 681-686.

Barsoum, I. S., Kamal, K. A., Bassily, S., Deelder, A. M. and Colley, D. G. (1991) Diagnosis of human schistosomiasis by detection of circulating cathodic antigen with a monoclonal antibody. *J Infect Dis*, **164**, 1010-1013.

Benveniste, E. N. (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: source, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.*, **263**, C1-16.

Bergquist, N. R. (1995) Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option? *Parasitol Today*, **11**, 191-194.

Bergquist, R. (1990) Prospects of vaccination against schistosomiasis. *Scand J Infect Dis Suppl*, **76**, 60-71.

Bezerra, F. S., Coelho, P. M. and Tavares, C. A. (1993) *Schistosoma mansoni*: protective immunity in mice cured by chemotherapy at the chronic phase of the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **35**, 337-344.

Blackman, M., Kappler, J. and Marrack, P. (1990) The role of the T cell

receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science*, **248**, 1335-1341.

Blum Tirouvanziam, U., Servis, C., Habluetzel, A., Valmori, D., Men, Y., Esposito, F., Del Nero, L., Holmes, N., Fasel, N. and Corradin, G. (1995) Localization of HLA-A2.1-restricted T cell epitopes in the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *J Immunol*, **154**, 3922-3931.

Boros, D. L. (1994) The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiol.*, **191**, 441-450.

Bouchard, M. J., Lam, D. H. and Racaniello, V. R. (1995) Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J Virol*, **69**, 4972-4978.

Bouchon, B., Klein, M., Bischoff, R., Roitsch, C., Trottein, F., Jaquinod, M., Klanor, K. and Van Doprselcier, A. (1994) Analysis of the primary structure and post-translational modifications of the *Schistosoma mansoni* antigen Smp28 by electrospray mass spectrometry. *J. Chromatog. B.*, **662**, 279-290.

Boulanger, D., Reid, G. D., Sturrock, I., Wolowczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Butterworth, A. E. and Capron, A. (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, **13**, 473-470.

Bourré, P. (1993) Symptômes et évolution de l'infestation à *Schistosoma mansoni*, Rev. Prat., (Paris) **43**, 424-427

Brady, H. J., Pennington, D. J. and Dzierzak, E. A. (1994) Transgenic mice as models of human immunodeficiency virus expression and related cellular effects. *J Gen Virol*, **75**, 2549-2558.

Brindley, P. J. and Sher, A. (1990) Immunological involvement in the efficacy of praziquantel. *Exp Parasitol*, **71**, 245-248.

Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E. and Avarbock, M. R. (1980) Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. *Nature*, **283**,

499-501.

Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Prentice, J. H., Richardson, B. A., A., S. T. K., Sturrock, R. F. and Taylor, D. W. (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 393-408.

Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J. D., Oldstone, M. B. A. and Mucke, L. (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10061-10065.

Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. and Pierce, R. J. (1992) Vaccine strategies against schistosomiasis. *Immunobiology*, **184**, 282-294.

Capron, A., Pierce, R. J., Balloul, R. J., Grzych, J. M., Dessaint, J. P., Sondermeyer, P. and Lecocq, J. P. (1987) Protective antigens in experimental schistosomiasis. *Acta. Tropica*, **44**, 63-69.

Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A. (1981) Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.*, **126**, 1764-1768.

Capron, M., Torpier, G. and Capron, A. (1979) *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.*, **123**, 2220-2230.

Caulada-Benedetti, Z., al-Zamel, F., Sher, A. and James, S. (1991) Comparison of Th1- and Th2-associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Immunol.*, **146**, 1655-1660.

Chiang, C. S., Stalder, A., Samimi, A. and Campbell, I. L. (1994) Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci*, **16**, 212-221.

Chisari, F. V. (1996) Hepatitis B virus transgenic mice models of viral immunobiology and pathogenesis. In *Transgenic models of human viral and*

immunologicam disease(Eds, Chisari, F. V. and Oldstone, M. B. A.) Springer, Berlin, pp. 150-168.

Cohen, I. R. and Young, D. B. (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today*, **12**, 105-110.

Crampton, J. M. (1994) Molecular studies of insect vectors of malaria. *Adv Parasitol*, **34**, 1-31.

Csaikl, F. F., Csaikl, U. M. and Durum, S. K. (1994) Stragies for modulation of interleukin-1 *in vivo*: knockout and transgenics. In *Overexpression and knockout of cytokines in transgenic mice*(Ed, Jacob, C. O.) Academic Press, London, pp. 1-13.

Cyster, J. G. and Goodnow, C. C. (1995) Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity*, **3**, 691-701.

Dalton, D. K., Pitts Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A. and Stewart, T. A. (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, **259**, 1739-1742.

Damonneville, M., Auriaur, C., Verwoerde, C., Delanoye, A., Pierce, R. J., Strecker, G. and Capron, A. (1986) Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A) role of IgE antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, **65**, 244-252.

Davern, K. M., Tiu, W. V., Morahan, G., Wright, M. D., Garcia, E. G. and Michell, G. F. (1987) Response in mice to Sj26, a parasite glutathion S-transferase of *Schistosoma japonicum* worm. *Immunol. Cell. Biol.*, **65**, 473-482.

Delgado, V. and McLaren, D. J. (1990a) Evidence for enhancement of IgG1 subclass expression in mice polyvaccinated with radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* and the role of this isotype in serum-transferred immunity. *Parasite Immunol*, **12**, 15-32.

Delgado, V. S. and McLaren, D. J. (1990b) Evidence that radio-sensitive cells are central to skin-phase protective immunity in CBA/Ca mice vaccinated

with radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* as well as in naive mice protected with vaccine serum. *Parasitology*, **1**, 45-56.

DeLoia, J. A., Burk, R. D. and Gearhart, J. D. (1989) Developmental regulation of hepatitis B surface antigen expression in two lines of hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virol.*, **63**, 4069-4073.

Demeure, C. E., Rihet, P., Abel, L., Ouattara, M., Bourgois, A. and Dessein, A. J. (1993) Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J Infect Dis*, **168**, 1000-1008.

Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L. and Sanderson, C. J. (1990) Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*, **172**, 1425-1431.

Dessein, A., Rihet, P., Demeure, C., Cuissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Patra, A., Goudot, V., Bourgois, A. and Abel, L. (1992a) Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Méd. Sci.*, **8**, 108-118.

Dessein, A. J., Couissinier, P., Demeure, C., Rihet, P., Kohlstaedt, S., Carneiro, C. D., Ouattara, M., Goudot, C. V., Dessein, H., Bourgois, A. and et, a. l. (1992b) Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol Invest*, **21**, 423-453.

Dissous, C., Grzych, J. M. and Capron, A. (1982) *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *J. Immunol.*, **129**, 2232-2234.

Dissous, C., Grzych, J. M. and Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, **323**, 443-445.

Dragunsky, E., Gardner, D., Taffs, R. and Levenbook, I. (1993) Transgenic PVR Tg-1 mice for testing of poliovirus type 3 neurovirulence: comparison with monkey test. *Biologicals*, **21**, 233-237.

Fallon, P. G. and Doenhoff, M. J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis:

Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**, 83-88.

Fallon, P. G., Hamilton, J. V. and Doenhoff, M. J. (1995) Efficacy of treatment of murine *Schistosoma mansoni* infections with praziquantel and oxamniquine correlates with infection intensity: role of host antibody. *Parasitology*, **111** (Pt1), 95-66.

Flanigan, T. P., King, C. H., Lett, R. R., Nauduri, J. and Mahmoud, A. A. F. (1989) Induction to resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J. Clin. Inv.*, **83**, 1010-1014.

Forman, J., Wieties, K. and Hammer, R. E. (1991) Tolerance to liver-specific antigens. *Immunological reviews*, **122**, 33-46.

Freeman, G. L. J., Tominaga, A., Takatsu, K., Secor, W. E. and Colley, D. G. (1995) Elevated innate peripheral blood eosinophilia fails to augment irradiated cercarial vaccine-induced resistance to *Schistosoma mansoni* in IL-5 transgenic mice. *J Parasitol*, **81**, 1010-1011.

Freitas, A. A., Rocha, B. and Coutinho, A. A. (1986) Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol. Rev.*, **91**, 101-105.

Gahring, L. C. and Weigle, W. O. (1989) The induction of peripheral T cell unresponsiveness in adult mice by monomeric human gamma-globulin. *J Immunol*, **143**, 2094-100.

Geiger, K. and Sarvetnick, N. (1994) MHC class I expression contributes to the development of cataract in transgenic mice with ectopic expression of IFN- γ . In *Advances in ocular immunology*(Ed, Nussenblatt, R.B., Whitcup, S.M., Caspi, R.R.; Gery, I) Amsterdam, pp. 135-138.

Georgescu, M. M., Delpeyroux, F. and Crainic, R. (1995) Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol*, **76**, 2343-2348.

Goodnow, C. C. (1992) Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, **10**, 489-518.

Goodnow, C. C., Crosbie, J., Jorgensen, H., Brink, R. A. and Basten, A.

(1989) Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature*, **342**, 385-391.

Grezel, D., Capron, M., Grzych, J. M., Fontaine, J., Lecocq, J. P. and Capron, A. (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol*, **23**, 454-460.

Gryseels, B., Stelma, F. F., Talla, I., van Dam, G. J., Polman, K., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R. F., Doehring-Schwerdtfeger, E. and Kardorff, R. (1994) Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Trop Geogr Med*, **46**, 209-19.

Grzych, J. M., Capron, A., Dissous, C., Capron, M. and Lambert, P. H. (1987) A protective carbohydrate epitope of major immunogen is expressed in Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). *J. Exp. Med.*, **165**, 865-878.

Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J. Immunol.*, **129**, 2739-2743.

Grzych, J. M., Capron, M., Lambert, P. H., Dissous, C., Torres, S. and Capron, A. (1985) An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature*, **316**, 74-76.

Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. and Capron, A. (1993) IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis mansoni. *J Immunol*, **150**, 527-535.

Grzych, J. M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P., Heiny, A., Lewis, F. and Sher, A. (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, **146**, 1322-1327.

Guidotti, L. G., Ando, K., Hobbs, M. V., Ishikawa, T., Runkel, R. D., Schreiber, R. D. and Chisari, F. V. (1994a) Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3764-3768.

Guidotti, L. G., Guilhot, S. and Chisari, F. V. (1994b) Interleukin 2 and interferon alpha/beta downregulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor dependent and independent pathway. *J. Virol*, **68**, 1265-1270.

Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R. and Chisari, F. V. (1996) Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, **4**, 25-36.

Hamadto, H. H., Rashed, S. M., el, S. A. and Elhayawan, I. A. (1990) Humoral and cellular immune response in schistosomiasis pre and post praziquantel therapy. *J Egypt Soc Parasitol*, **20**, 667-672.

Hanna, L. S., Mohamed, M. I. and Botros, S. S. (1994) *Schistosoma mansoni*: IgG reactivity to soluble adult worm antigen preparation (SWAP) in sera of immunized mice with irradiated attenuated and virulent cercariae. *J Egypt Soc Parasitol*, **24**, 553-568.

Harnett, W. (1988) The antihelminthic action of praziquantel. *Parasitology Today*, **4**, 144-146.

Harrison, R. A., Bickle, Q. D. and Doenhoff, M. D. (1982) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology*, **84**, 93-110.

Hassan, S. I., Botros, S. S., el, N. H., Azab, M. E., Shaker, Z. A. and el, G. A. (1990) Effect of specific chemotherapy on the immune response and resistance to reinfection in experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Int J Immunopharmacol*, **12**, 207-215.

Hazdai, R. T., Levi-Schaffer, F., Breuner, A., Horowitz, S., Eschar, Z. and Arnon, R. (1985) Protective monoclonal antibody against *Schistosoma mansoni*: antigen isolation, characterization and suitability for active immunization. *J. Immunol.*, **135**, 2772-2779.

Hogen, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986) Manipulating the mouse embryo, Cold spring harbor laboratory press, New York.

- Holy, J. M., O'Leary, K. A., Oaks, J. A. and Track, J. W.** (1989) Immunocytochemical localization of the major GST in adult *S. mansoni*. *J. Parasitology*, **75**, 181-190.
- Hopp, T. P. and Woods, K. R.** (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **78**, 3824-3828.
- Horie, H., Koike, S., Kurata, T., Sato Yoshida, Y., Ise, I., Ota, Y., Abe, S., Hioki, K., Kato, H., Taya, C. et al** (1994) Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: new animal models for study of poliovirus neurovirulence. *J Virol*, **68**, 681-8.
- Hou, S., Doherty, P. C., Zijlstra, M., Jaenisch, R. and Katz, J. M.** (1992) Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8+ T cells. *J Immunol*, **149**, 1319-1325.
- Hughes, A. L.** (1993) Rates of amino acid evolution in the 26- and 28- kDa glutathione S-transferases of schistosoma. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 43-52.
- Idzerda, R. L., Behringer, R. R., Theisen, M., Huggenvik, J. I., McKnight, G. S. and Brinster, R. L.** (1989) Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, **9**, 5154-5162.
- Ishida, H., Nishi, M., Taguchi, O., Inaba, K., Hattori, O., Minato, N., Kawaihi, M. and Honjo, T.** (1989a) Expansion of natural killer cells but not T cells in human interleukin-2/interleukin-2 receptor (Tac) transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **170**, 1103-1115.
- Ishida, Y., Nishi, M., Taguchi, O., Inaba, K., Minato, N., Kawaichi, M. and Honjo, T.** (1989b) Effects of the deregulated expression of human interleukin-2 in transgenic mice. *Int Immunol*, **1**, 113-120.
- Iwakura, Y., Asano, M., Nishimune, Y. and Kawade, Y.** (1988) Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon-beta gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter. *Embo J*, **7**, 3757-62.
- Jacob, C. O.** (1994) Overexpression and knockout of cytokines in transgenic

mice, Academic Press INC., London.

Jakoby, W. B. and Ziegler, D. M. (1990) The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chemistry*, **265**, 20715-20718.

James, S. L. (1992) Experimental models of immunization against schistosomes: lessons for vaccine development. *Immunol Invest*, **21**, 477-493.

James, S. L. and Sher, A. (1990) In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 15 (Ed, Springer-Verlag) Berlin, pp. 21-31.

Janeway, C. A. J. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious non-self from non-infectious self. *Immunol. Today*, **13**, 11-16.

Janin, J. (1979) Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*, **277**, 491-2.

Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vomgt, H. and Viens, P. (1983) A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, **303**, 810-811.

Joseph, M., Capron, A., Butterworth, A. E., Sturrock, R. F. and Houba, V. (1978) Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin Exp Immunol*, **33**, 48-56.

Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. and von Boehmer, H. (1988) Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*, **333**, 742-6.

Klotman, P. E., Rappaport, J., Ray, P., Kopp, J. B., Franks, R., Bruggeman, L. A. and Notkins, A. L. (1995) Transgenic models of HIV-1 [editorial]. *Aids*, **9**, 313-324.

Koike, K., Moriya, K., Lino, S., Yotsuyannagi, H., Enddo, Y., Miyammura, T. and Hurokawa, K. (1994) High level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*, **19**, 810-819.

Koike, S., Horie, H., Sato, Y., Ise, I., Taya, C., Nomura, T., Yoshioka, I.,

Yonekawa, H. and Nomoto, A. (1993) Poliovirus-sensitive transgenic mice as a new animal model. *Dev Biol Stand*, **78**, 101-7.

Kroemer, G., de Cid, R., Moreno de Alborán, I., Gonzalo, J. A., Iglesias, A., Martínez, C. and Gutierrez-Ramos, J. C. (1991) Immunological self-tolerance: an analysis employing cytokines or cytokine receptors encoded by transgenes or a recombinant vaccinia virus. *Immunol. Rev.*, **122**, 173-204.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W. (1993) Interleukin 10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, **75**, 263-274.

Kullberg, M. C., Pearce, E. J., Hieny, S. E., Sher, A. and Berzofsky, J. A. (1992) Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.*, **148**, 3264-3270.

Landsperger, W. J., Stirewalt, M. A. and Dresden, M. H. (1982) Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.*, **201**, 137-146.

Lang, R. A., Metcalf, D., Cuthbertson, R. A., Lyons, I., Stanley, E., Kelso, A., Kannourakis, G., Williamson, D. J., Klintworth, G. K., Gonda, T. J. and et al. (1987) Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell*, **51**, 675-686.

Lawson, B. W., Bickle, Q. D. and Taylor, M. G. (1995) Higher levels of passive compared with active immunity in rats immunized with larval antigens of *Schistosoma mansoni*. *J. Helminthol*, **69**, 39-45.

Lemarchandel, V. and Montagutelli, X. (1990) La recombinaison homologue, de nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères. *Médecine sciences*, **6**, 18-29.

Leonard, J. M., Abramczuk, J. W., Pezen, D. S., Rutledge, R., Belcher, J. H., Hakim, F., Shearer, G., Lamperth, L., Travis, W., Fredrickson, T. and al, e. (1988) Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA. *Science*, **242**, 1665-1670.

Lewis, D. B., Yu, C. C., Forbush, K. A., Carpenter, J., Sato, T. A.,

- Grossman, A., Liggitt, D. H. and Perlmutter, R. M.** (1991) Interleukin 4 expressed in situ selectively alters thymocyte development. *J Exp Med*, **173**, 89-100.
- Liu, J. L., Fontaine, J., Capron, A. and Grzych, J. M.** (1996) Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*, **113**, 377-391.
- Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C. A. J., Linsley, P. S. and Linsley, P.** (1992) Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol*, 2855-2859.
- Lu, Y., Cox, L. A., Herbert, D. C., Weaker, F. J., Walter, C. A. and Adrian, G. S.** (1993) Expression of chimeric human transferrin-chloramphenicol acetyltransferase genes in liver and brain of transgenic mice during development. *Dev. Biol.*, **155**, 452-458.
- Ma, A., Datta, M., Margosian, E., Chen, J. and Horak, I.** (1995) T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med*, **182**, 1567-1572.
- Macadam, A. J., Pollard, S. J., Ferguson, G., Dunn, G., Skuce, R., Almond, J. W. and Minor, P. D.** (1991) The 54 noncoding region of the type 2 poliovirus vaccinia strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. *Virology*, **181**, 451-458.
- Mancini, M., Hadchouel, M., Tiollais, P., Pourcel, C. and Michel, M. L.** (1993) Induction of anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) antibodies in HBsAg producing transgenic mice: a possible way of circumventing "nonresponse" to HBsAg. *J Med Virol*, **39**, 67-74.
- Mannervih, B.** (1985) Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enz. Rel. Mol. Biol.*, **57**, 357-417.
- McKerrow, J. H.** (1988) Parasite proteases. *Exp. Parasitol.*, **68**, 111-1115.
- McLaren, D. J., Delgado, V. S., Gordon, J. R. and Rogers, M. V.** (1990) *Schistosoma mansoni*: analysis of the humoral and cellular basis of resistance in guinea-pigs vaccinated with radiation-attenuated cercariae. *Parasitology*, **1**, 35-44.

McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A. B. (1981) Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil cationic proteins in vitro. *Parasitol. Immunol.*, **3**, 359-371.

Mehtali, M., Munschy, M., Ali Hadji, D. and Kieny, M. P. (1992) A novel transgenic mouse model for the in vivo evaluation of anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **8**, 1959-1965.

Mento, S. J., Weeks Levy, C., Tatem, J. M., Gorgacz, E. J. and Waterfield, W. F. (1993) Significance of a newly identified attenuating mutation in Sabin 3 oral poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand*, **78**, 93-9; discussion 99-100.

Metwali, A., Elliott, D., Mathew, R., Blum, A. and Weinstock, J. V. (1993) IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, **150**, 536-542.

Mitchell, G. F., Davern, K. M., M., W. S., Wright, M. D., Argyropoulos, V. P., McLeod, K. S., Tiu, W. V. and Garcia, E. G. (1990) Attempts to induce resistance in lice to *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* by exposure to crude schistosome antigens plus cloned glutathione S-transferases. *Immunol. Cell. Biol.*, **68**, 377-385.

Mitchell, G. F., Garcia, E. G., Davern, K. M., Tiu, W. U. and Smith, D. B. (1988) Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to *Schistosoma japonicum* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 885-889.

Monastersky, G. M. and Robl, J. M. (1995) Strategies in transgenic animal science, American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Moriyama, T., Guilhot, S., Klopchin, K., Moss, B., Pinkert, C. A., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Kanagawa, O. and Chisari, F. V. (1990) Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science*, **248**, 361-364.

Mountford, A. P., Coulson, P. S., Pemberton, R. M., Smythies, L. E. and Wilson, R. A. (1992) The generation of interferon-gamma-producing T

lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology*, **75**, 250-256.

Mountford, A. P. and Wilson, R. A. (1990) *Schistosoma mansoni*: the effect of regional lymphadenectomy on the level of protection induced in mice by radiation-attenuated cercariae. *Exp Parasitol*, **71**, 463-469.

Mucke, L., Oldstone, M. B. A., Morris, J. C. and Nerenberg, M. (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New BOOL*, **3**, 465-474.

Muller, D., Koller, B. H., Whitton, J. L., LaPan, K. E., Brigman, K. K. and Frelinger, J. A. (1992) LCMV-specific, class II-restricted cytotoxic T cells in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Science*, **255**, 1576-1578.

Mumo, J. M. and Kinoti, G. K. (1992) Vaccination of the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*) against infection with *Schistosoma mansoni*. *Scand J Immunol Suppl*, **11**, 23-28.

Nemazee, D. A. and Baurki, K. (1989) Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic louse bearing anti-MHC class 1 antibody genes. *Nature*, **337**, 562-566.

Nerenberg, M., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G. and Jay, G. (1990) The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumor in transgenic mice. *Science*, **237**, 1324-1329.

Nojima, H. and Sato, A. (1982) *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* emergence of schistosome cercariae from snails with darkness and illumination. *Exp. Parasitol*, **53**, 189-198.

Nomoto, A., Koike, S. and Aoki, J. (1994) Tissue tropism and species specificity of poliovirus infection. *Trends Microbiol*, **2**, 47-51.

Oldstone, M. B. A. and Southern, P. J. (1993) Trafficking of activated cytotoxic T lymphocytes into the central nervous system: use of a transgenic model. *J. Neuroimmunol.*, **46**, 25-32.

O'Leary, K. A. and Tracy, J. W. (1991) *Schistosoma mansoni*: GST-catalysed

detoxification of Dichlorvis. *Exp. Parasitology*, **72**, 355-361.

Pancre, V., Wolowczuk, I., Guerret, S., Copin, M. C., Delanoye, A., Capron, A. and Auriault, C. (1994) Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infect Immun*, **62**, 3723-3730.

Pearce, E. J., James, S. L., Hieny, S., Lanar, D. and Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5678-5682.

Phillips, S. M., Lin, J. J., Galal, N., Tung, A. S., Linette, G. P. and Perrin, P. J. (1991) Resistance in murine schistosomiasis is contingent on activated IL-2 receptor-bearing L3T4+ lymphocytes, negatively regulated by Lyt-2+ cells, and uninfluenced by the presence of IL-4. *J Immunol*, **146**, 1335-1340.

Pickett, C. B. and Lu, A. Y. H. (1989) GST: gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochemistry*, **58**, 743-764.

Picot, H. (1993) La lutte contre les schistosomiasis. *Rev. Prat. (Paris)*, **43**, 462-465.

Pino-Heiss, S., Brown, M. and McKerrow, J. H. (1985) *Schistosoma mansoni*: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Exp. Parasitol.*, **59**, 217-221.

Porchet, E., McNair, A., Caron, A., Kusnierz, J. P., Zemzoumi, K. and Capron, A. (1994) Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*, **109**, 565-572.

Rall, G. F., Mucke, L., Nerenberg, M. and Oldstone, M. B. (1994) A transgenic mouse model to assess the interaction of cytotoxic T lymphocytes with virally infected, class I MHC-expressing astrocytes. *J. Neuroimmunol.*, **52**, 61-68.

Rall, G. F., Mucke, L. and Oldstone, M. B. (1995) Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons *in vivo*. *J Exp Med*, **182**, 1201-1212.

Ren, R. and Racaniello, V. R. (1992) Human poliovirus receptor gene

expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice. *J Virol*, **66**, 296-304.

Ren, R. B., Moss, E. G. and Racaniello, V. R. (1991) Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *J Virol*, **65**, 1377-1382.

Renia, L., Xia, D., Samols, D. and Nussenzweig, V. (1993) Transgenic mice expressing C-reactive protein are susceptible to infection with *Plasmodium yoelii* sporozoites. *Infect Immun*, **61**, 348-349.

Reynolds, S. R., Shoemaker, C. B. and Harn, D. A. (1994) T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, **149**, 3995-4001.

Richter, D., Harn, D. A. and Matuschka, F. R. (1995) The irradiated cercariae vaccine model: Looking on the bright side of radiation. *Parasitol Today*, **11**, 288-293.

Richter, D., Reynolds, S. R. and Harn, D. A. (1993) Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, **151**, 256-265.

Rollinson, D. and Southgate, V. R. (1987) Hepatitis B virus transgenic mice models of viral immunobiology and pathogenesis. In *The biology of schistosomes*(Eds, Rollinson, D. and Simpson, A. J. G.) Academic Press., New York, pp. 1-49.

Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H. and Capron, A. (1978) II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S.mansoni* : a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology*, **35**, 33-40.

Sakai, R. K. and Miller, L. H. (1992) Effects of heat shock on the survival of transgenic *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under antibiotic selection. *J Med Entomol*, **29**, 374-375.

Samaridis, J., Casorati, G., Traunecker, A., Iglesias, A., Gutierrez, J. C., Muller, U. and Palacios, R. (1991) Development of lymphocytes in

interleukin 7-transgenic mice. *Eur J Immunol*, **21**, 453-460.

Sandor, M., Sperling, A. I., Cook, G. A., Weinstock, J. V., Lynch, R. G. and Bluestone, J. A. (1995) Two waves of gamma delta T cells expressing different V delta genes are recruited into schistosome-induced liver granulomas. *J Immunol*, **155**, 275-284.

Sarvetnick, N., Liggitt, D., Pitts, S. L., Hansen, S. E. and Stewart, T. A. (1988) Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell*, **52**, 773-782.

Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A. and Horak, I. (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*, **352**, 621-624.

Seman, M. (1994) La Tolérance immunitaire. *Rev. Prat. (Paris)*, **44**, 32-35.

Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H. and Loh, D. Y. (1988) Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature*, **336**, 73-76.

Shear, H. L., Roth, E. F. J., Fabry, M. E., Costantini, F. D., Pachnis, A., Hood, A. and Nagel, R. L. (1993) Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood*, **81**, 222-226.

Sher, A., Hieny, S. and James, S. L. (1984) Mechanisms of protective immunity against *S. mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. VI. Influence of the major histocompatibility complex. *Parasite Immunol.*, **6**, 319-328.

Shoemaker, C., Gross, A., Gebremichael, A. and Harn, D. (1992) cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1842-1846.

Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. and et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, **359**, 693-699.

Smith, D. B., Davern, K. M., Board, P. G., Tiu, W. V., Garcia, E. G. and

Michell, G. F. (1986) The Mr 28,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathion-S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8703-8707.

Smith, D. B., Rubira, M. R., Simpson, R. J., Davern, K. M., Tiu, W. U., Board, P. G. and Michell, G. F. (1988) Expression of an enzymatically active parasite molecule in *Escherichia coli*: *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**, 249-256.

Smith, M. A. and Clegg, J. A. (1985) Vaccination against *Schistosoma mansoni* with purified surface antigens. *Science*, **227**, 535-537.

Smythies, L. E., Coulson, P. S. and Wilson, R. A. (1992a) Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol*, **149**, 3654-3658.

Smythies, L. E., Pemberton, R. M., Coulson, P. S., Mountford, A. P. and Wilson, R. A. (1992b) T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, **148**, 1512-1518.

Soares, M. S., Barreto, M. G. M., Dasilva, C. L. P. A. C., Pereira, J. B., Moza, P. G., Rey, L., Calcado, M. S., Lustoza, A. and Maspero, R. (1995) Schistosomiasis in a low prevalence area: Incomplete urbanization increasing risk of infection in Paracambi, RJ, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **90**, 451-458.

Soisson, L. A., Reid, G. D., Farah, I. O., Nyindo, M. and Strand, M. (1993) Protective immunity in baboons vaccinated with a recombinant antigen or radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* is antibody-dependent. *J Immunol*, **151**, 4782-4789.

Soisson, L. M., Masterson, C. P., Tom, T. D., McNally, M. T., Lowell, G. H. and Strand, M. (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol*, **149**, 3612-3620.

Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. and Abbondanzo, S. J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal

expression of leukaemia inhibitory factor (6390):17. *Nature*, **359**, 76-79.

Sturrock, R. F. (1995) Current concepts of snail control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **90**, 241-248.

Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989) IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7547-51.

Takami, K. (1995) [Determination of a peptide deduced from the influenza virus haemagglutinin that induces human class II-restricted T cell responses in DQ6 transgenic mice]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, **70**, 329-342.

Talla, I., Belot, J., Verlé, P., Kongs, A., Sarr, S. and Coll, A. M. (1990) Observations sur un nouveau foyer de schistosome à *Schistosoma mansoni* dans la vallée du fleuve Sénégal. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **8**, 802-814.

Taverne, J., Sheikh, N., de Souza, J. B., Playfair, J. H., Probert, L. and Kollias, G. (1994) Anaemia and resistance to malaria in transgenic mice expressing human tumour necrosis factor. *Immunology*, **82**, 397-403.

Taylor, J. B., Vidal, A., Torpie, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J. M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Capron, A. and Ketterer, B. (1988) The GST activity and distribution of a cloned Mr28k protective antigen of *S.mansoni*. *EMBO journal*, **7**, 465-472.

Taylor, M. G. (1975) Towards the development of a live vaccine for schistosomiasis. In *Nuclear techniques in helminthology research*. (Ed, Agency, I. A. E.) Vienna, pp. 165-173.

Tepper, R. I., Levinson, D. A., Stanger, B. Z., Campos Torres, J., Abbas, A. K. and Leder, P. (1990) IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell*, **62**, 457-467.

Tighe, H., Heaphy, P., Baird, S., Weigle, W. O. and Carson, D. A. (1995) Human immunoglobulin (IgG) induced deletion of IgM rheumatoid factor b cells in transgenic mice. *J Exp Med*, **181**, 599-606.

Toggas, S. M., Masliah, E. and Mucke, L. (1995) Prevention of HIV-1

gp120-induced neuronal damage in the central nervous system of transgenic mice by the NMDA receptor antagonist memantine. *Brain Res.*, (**in press**), 188-193.

Toggas, S. M., Masliah, E., Rockenstein, E. M., Rall, G. F., Abraham, C. R. and Mucke, L. (1994) Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature*, **367**, 188-193.

Toggas, S. M. and Mucke, L. (1995) Transgenic models in the study of AIDS dementia complex. In *Transgenic models of human viral and immunological disease*(Eds, Chisari, F. V. and Oldstone, M. B. A.) Berlin, pp. 223-241.

Tominaga, A., Takaki, S., Koyama, N., Katoh, S., Matsumoto, R., Migita, M., Hitoshi, Y., Hosoya, Y., Yamauchi, S., Kanai, Y. and et al. (1991) Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (interleukin 5) develop eosinophilia and autoantibody production. *J Exp Med*, **173**, 429-37.

Torpier, G., Capron, M. and Capron, A. (1977) Structural changes of the tegument membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Ultrastruct. Res.*, **61**, 309-324.

Trottein, F., Vaney, M. C., Bachet, B., Pierce, R. J., Colloc'h, N., Lecocq, J. P., Capron, A. and Mornon, J. P. (1992) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a protective cloned 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.*, **224**, 515-518.

Tsuji, M., Mombaerts, P., Lefrancois, L., Nussenzweig, R. S., Zavala, F. and Tonegawa, S. (1994) Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha beta T-cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 345-349.

Turksen, K., Kupper, T., Degenstein, L., Williams, I. and Fuchs, E. (1992) Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5068-5072.

Velupillai, P. and Ham, D. A. (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice : A

mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 18-22.

Verwaerde, C., Joseph, M., Capron, M., Pierce, R. J., Damonville, M., Velge, F., Auriault, C. and Capron, A. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, **138**, 4441-4446.

Vogel, J., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Luciw, P. A. and Jay, G. (1988) The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma on transgenic mice. *Nature*, **333**, 78-81.

Wirth, S., Guidotti, L. G., Ando, K., Schlicht, H. J. and Chisari, F. V. (1995) Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis b virus envelope transgenic mice. *J Immunol*, **154**, 2504-2515.

Wolmarans, C. T. and Yssel, E. (1990) The granulocyte response of *Bulinus africanus* to infection with compatible and non-compatible trematode parasites. *Int J Parasitol*, **20**, 315-318.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras, M. H., Mazingue, C., Pierce, R. J., Grezel, D., Reid, G. D., Tartar, A. and et, a. I. (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. 1. Partial protection of fischer rat after active immunization. *J. Immunol.*, **146**, 1987-1995.

Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J. M., Tartar, A. and Capron, A. (1989) Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.*, **142**, 1342-1350.

Wynn, T. A., Eltoun, I., Cheever, A. W., Lewis, F. A., Gause, W. C. and Sher, A. (1993) Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, **151**, 1430-1440.

Wynn, T. A., Oswald, I. P., Eltoun, I. A., Caspar, P., Lowenstein, C. J., Lewis, F. A., James, S. L. and Sher, A. (1994) Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after

challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*, **153**, 5200-5209.

Xu, C. B., Verwaerde, C., Gras, M. H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. and Capron, A. (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J Immunol*, **150**, 940-949.

Xu, C. B., Verwaerde, C., Grzych, J. M., Fontaine, J. and Capron, A. (1991) A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur J Immunol*, **21**, 1801-1807.

Zinkernagel, R. M., Cooper, S., Chambers, J., Lazzarini, R. A., Hengartner, H. and Arnheiter, H. (1990) Virus-induced autoantibody response to a transgenic viral antigen. *Nature*, **345**, 68-71.

Table des matières

IX. TABLE DES MATIÈRES

I. LA SCHISTOSOMOSE OU BILHARZIOSE	10
A. GÉNÉRALITÉS	10
1. LES FACTEURS NATURELS	10
2. LES FACTEURS SOCIAUX	12
3. LES FACTEURS IMMUNITAIRES	12
B. PLACE DES SCHISTOSOMES DANS LE RÈGNE ANIMAL ET TAXONOMIE	13
C. CYCLE ÉVOLUTIF DES SCHISTOSOMES	13
1. LE MIRACIDIUM	13
2. LE SPOROCTE	13
3. LA CERCAIRE	13
4. SCHISTOSOMULE ET VERS ADULTE	15
D. BIOLOGIE DU SCHISTOSOME	15
E. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA BILHARZIOSE	17
1. L'INFESTATION	17
2. LA PHASE D'INVASION	17
3. LA PHASE D'ÉTAT	18
F. IMMUNOLOGIE DES SCHISTOSOMOSES	18
1. LA RÉPONSE HUMORALE	19
2. LA RÉPONSE CELLULAIRE	20
G. DIAGNOSTIC DES SCHISTOSOMOSES	21
H. TRAITEMENT DES SCHISTOSOMOSES	21
I. PROPHYLAXIE DES SCHISTOSOMOSES	22
1. EDUCATION SANITAIRE ET ASSAINISSEMENT	22
2. LA LUTTE CONTRE LES MOLLUSQUES	23
3. PROPHYLAXIE MÉDICALE	23
II. LA GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE 28KDA DE <i>S. MANSONI</i>	30
A. IDENTIFICATION DE SM28GST	30
B. CARACTÉRISATION DE L'ANTIGÈNE SM28GST	30
C. ANALYSE MOLÉCULAIRE DE SM28GST	31
D. LOCALISATION DE L'ANTIGÈNE SM28GST	32

E.	POUVOIR PROTECTEUR DE SM28GST	32
1.	RÉDUCTION DE LA CHARGE PARASITAIRE	32
2.	RÉDUCTION DE LA PONTE DE VERS FEMELLES	32
3.	RÉDUCTION DE LA VIABILITÉ DES OEUFS	33
4.	RÉDUCTION DE LA PATHOLOGIE	33
F.	L'ANTIGÉNICITÉ DE SM28GST	33
 III. TRANSGÈNESE ANIMALE		35
<hr/>		
A.	LA TRANSGÉNÈSE CLASSIQUE : LA MICROINJECTION	35
1.	CLONAGE DE LA CONSTRUCTION COMPORTANT LE GÈNE ÉTUDIÉ :	35
2.	MICROINJECTION DE CETTE CONSTRUCTION DANS L'OEUF:	36
3.	RÉIMPLANTATION DES OEUFS MICROINJECTÉS DANS L'UTÉRUS DE FEMELLES PRÉPARÉES À LA NIDATION:	36
4.	ANALYSE DES SOURICEAUX ET DE LEURS DESCENDANTS:	36
B.	LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE (LEMARCHANDEL AND MONTAGUTELLI, 1990)	37
1.	LA CONSTRUCTION	38
2.	LA TRANSFECTION	38
3.	LA MICROINJECTION	38
C.	CONCLUSIONS	38
 IV. UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR ANALYSER LA TOLÉRANCE		40
<hr/>		
A.	LA TOLÉRANCE DES CELLULES T	40
1.	LA TOLÉRANCE CENTRALE DES CELLULES T	40
2.	LA TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE DES CELLULES T	42
B.	LA TOLÉRANCE DES CELLULES B	42
1.	DÉLÉTION CLONALE	42
2.	ANERGIE	44
3.	TOLERANCE PÉRIPHÉTIQUE B	45
C.	MÉCANISMES CELLULAIRES DE LA TOLÉRANCE	45
 V. UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES POUR LES AGENTS INFECTIEUX		47
<hr/>		
A.	ETUDE DES RÉCEPTEURS	47

1.	LE VIRUS DE L'HÉPATITE B (CHISARI, 1996)	47
2.	LE POLIOVIRUS HUMAIN	48
3.	LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAIN (VIH)	49
B.	ANALYSE DU POUVOIR PATHOGENÈSE DES PROTÉINES	49
1.	HTLV-I (HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1)	50
2.	VIH	51
3.	LE VIRUS D'HÉPATITE B (HBV)	51
4.	MALARIA	52
C.	ANALYSE DE LA RÉPONSE IMMUNE	52
1.	LE VIRUS LYMPHOCYTAIRE CHORIOMENINGITIS (LCMV)	52
2.	HBV	53
3.	LES CYTOKINES	54
4.	MALARIA ET SCHISTOSOMIASE	56
D.	L'INFLAMMATION	57
E.	INTÉRÊT DU MODÈLE DE SOURIS TRANSGÉNIQUE POUR LE CRIBLAGE DE NOUVEAUX MÉDICAMENTS OU NOUVEAUX VACCINS	58
1.	LE MÉDICAMENT	58
2.	VACCINOLOGIE	58
3.	LE VECTEUR DE MALARIA: MOUSTIQUE TRANSGÉNIQUE	59
VI.	OBJECTIF ET RESULTATS	60
ARTICLE 1		62
ARTICLE 2		103
VII.	DISCUSSION ET CONCLUSION	134
A.	CONSTRUCTION D'UNE SOURIS TRANS-GÉNIQUE EXPRIMANT SM28GST DANS LE FOIE.	134
B.	LA RÉPONSE HUMORALE APRÈS IMMUNISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES PAR SM28GSTR	137
C.	LES RÉPONSES DES CYTOKINES APRÈS IMMUNISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES PAR SM28GST RECOMBINANT	138
VIII.	REFERENCES	140
IX.	TABLE DES MATIÈRES	163

