

N° d'ordre : 2284

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

THESE DE DOCTORAT
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
discipline : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement par

Sophie GAUBERT

La réponse IgA dans l'infection murine par *Schistosoma mansoni*
Rôle des lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse
anti-schistosome

Soutenue le 25 Juin 1998 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse : Professeur A. Capron

Professeur G. Spik, Président

Docteur P. Minoprio, Rapporteur

Docteur I. Wolowczuk, Rapporteur

Docteur J.M. Grzych, Examineur



Ce travail de thèse a été réalisé

au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167,
à l'Institut Pasteur de Lille

sous la direction du Professeur A. Capron
et dans le groupe de recherche animé par le Docteur J. M. Grzych

en collaboration avec l'équipe du Docteur Paola Minoprio et avec le Docteur
Claude-Alain Maurage

Ces travaux ont été financés par l'Institut Pasteur de Lille et le
Conseil régional Nord Pas de Calais

*Je dédie cette thèse à mes parents,
pour ce qu'ils sont,
pour tout l'amour qu'ils me donnent et
pour ce qu'ils transmettent à Julie.*

A Florent, mon petit frère

...Garde cette chance
Que nous t'envions en silence,
Cette force de penser que le plus beau reste à venir...

Goldman

A Madame le Professeur Spik qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse et m'a livré son enseignement pendant mes trois années de Biochimie.

Monsieur le Professeur Capron, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre unité, d'avoir financé en partie mes travaux et surtout d'avoir partagé mon enthousiasme quant aux lymphocytes B1.

A Paola Minoprio. Je te remercie d'avoir accepté d'être mon rapporteur. Ce n'est rien comparé à ton accueil à Paris, quel punch, quelle chaleur toute brésilienne. Merci de m'avoir ouvert toutes grandes les portes de ton laboratoire. Merci d'avoir soutenu mes espoirs sur mon nouveau sujet.

A Isabelle Wolowczuk. Je te remercie grandement d'avoir tout fait pour être mon rapporteur. Tu m'as beaucoup apporté scientifiquement. Merci aussi pour les premières pages d'article dans mon casier et les petits mots de ta spécialité.

Monique Capron, recevez mes remerciements pour votre énergie débordante et motivante, votre disponibilité et votre efficacité.

Jean-Marie Grzych, après toutes ces années passées ensemble, je crois que l'on se connaît bien. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire, merci pour ma liberté d'action et enfin merci pour ta bonne humeur.

A toi, Monica, compagne des jours heureux, des pétages de plombs quotidiens de 17H30, pour les discussions nocturnes partagées, les pluies torrentielles du Portugal. Pour ta force de caractère, pour tes gueulantes, pour ton sourire, tes yeux verts et tes nouvelles bouclettes. Parce que tu as toujours été là, au labo, en Corse et pendant la descente, Tatie portugaise de Julie, je te remercie du fond du coeur.

Sylvain, pour le stress du DEA partagé, notre intimité, tes révoltes et ton intelligence, je t'aime.

Tobias, dernière amitié, temps qui s'écoule trop vite pour mieux discuter, je te remercie pour ta gentillesse, PauletPaula, Jules et Jim et l'attention que tu portes à Julie.

Sophia, merci. Merci pour tes conseils, ta philosophie de la vie, ton message d'espoir, ton oreille attentive, ton expérience de femme et de mère. Je te remercie de m'avoir initiée à la culture cellulaire et surtout d'avoir suivi avec moi les manip tout le long de cette thèse (+9 mois), ces bons moments à broyer des rates !

Josette, puisque tu m'as accueillie par un "On ne t'avait pas dit que tu étais là pour en chier ?" et que le résultat a été inattendu, tu es restée à mes côtés pendant ma thèse. Merci pour les bons moments partagés, ces heures d'animalerie égayées par ton espièglerie.

Sylvie Vermersch, pour l'initiation animalière, merci ! Mais surtout pour ce que tu irradies, force, calme, douceur et bonne humeur, je garde un grand souvenir de Joaninha.

Eduardo, reçois mes remerciements. Tu m'as aidée à réaliser ce que je voulais, ton expertise en manière de FAC'S et ta disponibilité, je m'en souviendrai et je m'efforcerais de partager ce que je sais, à ton exemple.

Jean-Loup, merci pour ta patience, ta disponibilité, tes conseils informatiques et ta participation active dans la préparation de ce mémoire, mais aussi merci pour la place privilégiée que tu m'as octroyée parmi toutes les poulettes des Hybridomes.

Karine-karinette, le bébé des Hyb... Pendant toute cette thèse, tu as toujours été là, même sans avoir le temps de parler, même quand les mots s'envolent, j'ai toujours senti ton soutien. Merci pour ta grande hospitalité et tes nombreuses crémaillères et ma carte "pour une femme ET FEE MERE".

Pascal, je n'ai jamais interagi scientifiquement avec toi alors laisse-moi te remercier pour les soirées agrémentées de ta guitare, tes visites comiques aux Hybridomes, la nuit philo à la BSP, ta sensibilité et ta gentillesse.

A Vinca, pour les repas au RU égayés de ton rire et de tes propos croustillants.

A ceux qui sont partis : Jackline et son verbe pétillant, Jinli et Marina. Gilles, ton odeur de caramel et tes sarcasmes m'ont manqué, heureusement tu as laissé la phrase négative : "Gaubert, faut se la faire !"

Je tiens à remercier tout particulièrement Monique et Suzanne qui m'ont alimentée en cercaires pendant toute cette thèse. Merci à Chantal, à Jean-Marc et à Maria pour leur disponibilité et leur gentillesse, à Mimi et Nicole à qui j'ai pensé toute cette thèse à chaque petit bouchon débalé.

Gaëtane, merci pour ta disponibilité et ton professionnalisme, Christine, merci pour le coup de pouce !.

A tous ceux que je ne nomme pas, avec qui j'ai eu plaisir à bavarder pendant cette thèse,

A Gaëlle, ma belle soeur copine

A stéphanie et Nathalie, pour tous les moments qui nous ont rassemblées : nos soirées de folie au foyer, nos sorties lilloises, les Vosges, le Touquet, l'Ardèche et tous ces moments tristes ou joyeux qui consolident l'amitié.

A Sophie et son Grégouille

A Benoît, cette thèse s'achève, treize ans la séparent de la première S...

Et enfin, à ma petite Julie qui m'a accompagnée dans tous mes déplacements à Paris et a poussé en moi, en même temps que le projet B1.

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Poulain-Godefroy, O., **Gaubert S.**, Lafitte S., Capron A., and J. M. Grzych. 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : Stimulatory role of egg antigens. *Inf. Immun.* 64 : 763-768.

Sophie Gaubert, Alexandra Viana da Costa, Claude-Alain Maurage, Eduardo César Santos Lima, Josette Fontaine, Sophia Lafitte, Paola Minoprio, André Capron and Jean-Marie Grzych. X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model. Soumis.

Sophie Gaubert, Eduardo César Santos Lima, Alexandra Viana da Costa, Sophia Lafitte, Josette Fontaine, Paola Minoprio, André Capron and Jean-Marie Grzych. CD5⁺ B cell in mucosal IgA response during *S. mansoni* murine infection. En préparation.

Alexandra Viana da Costa, **Sophie Gaubert**, Josette Fontaine, Sophia Lafitte, Antonio Seixas, Maria de Lourdes Sampaio Silva, André Capron and Jean-Marie Grzych. 1998. Murine *Schistosoma bovis* infection : analysis of parasitic and immune parameters. *Parasit. Immunol.* 20, 143-153.

Alexandra Viana da Costa, **Sophie Gaubert**, Sophia Lafitte, Josette Fontaine, André Capron and Jean-Marie Grzych. Egg-hatching inhibition in mice vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28 kDa glutathione S-transferase. Soumis.

Xu Xiaochuan, **Sophie Gaubert**, Jean-Yves Cesbron, Catherine Lemaire, Isabelle Wolowczuk, Josette Fontaine, Sophia Lafitte, Frédéric Mullier, André Capron and Jean-Marie Grzych. Immune response to *Schistosoma mansoni* antigens in a transgenic mouse model expressing the *S. mansoni* 28 KDa glutathione S-transferase. Soumis.

COMMUNICATIONS

Gaubert S., Santos Lima E. C., Minoprio P., Capron A., and J. M. Grzych. Role of B1 cells in mucosal immunity during murine schistosomiasis. The British Society for Parasitology, Manchester, United Kingdom April 1997. **Communication orale.**

Gaubert S., Santos Lima E.C., Minoprio P., Capron A., and J.M. Grzych. Lymphocytes B1 (B-CD5⁺) : Implication dans l'immunité muqueuse anti-schistosome. Société Française d'Immunologie, Marseille, France Nov 1997. **Communication orale.**

Grzych J.M., Fontaine J., **Gaubert S.**, Lafitte S., Liu J., Neyrinck J.L., Petitprez K., Viana da Costa A. Approche des propriétés effectrices des IgA dans les schistosomoses humaines et animales. Colloque Lille-ULB. Lille, France Mai 1995.

Poulain-Godefroy, O., **Gaubert S.**, Lafitte S., Capron A., and J.M. Grzych. Implication of egg antigens in IgA stimulation in murine schistosomiasis. European research conferences / Immunology of infections : mucosal infections. Castelvecchio Pascoli, Italy Sept 1995.

Gaubert S., Petitprez K., Grzych J. M., Riveau G., Capron A., and M. Capron. Réponse Th2 et protection contre les helminthes. Séminaire fondamental de microbiologie clinique. Paris, France Déc 1995.

Gaubert S., Santos Lima E. C., Minoprio P., Capron A., and J. M. Grzych. Role of B1 cells in mucosal immunity during murine schistosomiasis. European research conferences / Immunology of infections : oral and other mucosal vaccines. Giens, France Oct 1996.

Gaubert S., Santos Lima E. C., Minoprio P., Capron A., and J. M. Grzych. Role of B1 cells in mucosal immunity during murine schistosomiasis. Journée des Jeunes Chercheurs. Lille, France Nov 1996.

Gaubert S., Santos Lima E. C., Minoprio P., Capron A., and J. M. Grzych. Rôle des lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse au cours de la schistosomiase expérimentale murine. Colloque ULB-Lille, Bruxelles, Belgique Janv 1997.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	17
INTRODUCTION	18
Chapitre I - La schistosomiase ou Bilharziose	19
1. Généralités	20
1.1. Taxonomie du genre <i>schistosoma</i>	20
1.2. Cycle biologique de <i>S. mansoni</i>	21
1.3. Distribution géographique des schistosomiases	24
1.4. Pathologies associées aux bilharzioses	25
1.5. Diagnostic de la schistosomiase	26
1.6. Lutte contre les schistosomiases	27
1.6.1. La prophylaxie sanitaire	27
1.6.2. La lutte anti-vectorielle	28
2. Réponse immune développée au cours d'une infection à <i>Schistosoma mansoni</i>	
2.1. Immunité naturelle	29
2.2. Immunité acquise	30
2.2.1. La réponse humorale	30
2.2.1.1. Observations épidémiologiques	31
2.2.1.2. Les mécanismes effecteurs	31
2.2.2. La réponse cellulaire	32
2.2.3. L'immunorégulation de la pathologie granulomateuse	35
2.3. Stratégies d'échappement à la réponse immune développées par le parasite	37
2.3.1. Mimétisme moléculaire	37
2.3.2. Induction d'anticorps bloquants	38
2.3.3. Immunosuppression induite	38

3. Approche vaccinale de la schistosomiase : l'antigène Sm28GST

3.1. Propriétés protectrices de l'antigène Sm28GST	40
3.1.1. Sm28GST et anticorps	42
3.1.1.1. Activité enzymatique et expression de l'immunité	42
3.1.1.2. Peptides de la Sm28GST	43
3.1.2. Sm28GST et réponse cellulaire T	43
3.1.3. Sm28GST dans l'infection humaine	44
3.2. La réponse IgA et l'antigène Sm28GST	45

Chapitre II - L'immunoglobuline A et le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin (GALT)

1. L'IgA, l'isotype majeur des muqueuses

1.1. Aspects structuraux	49
1.1.1. Structure de l'IgA	49
1.1.2. Polymérisation des IgA	50
1.1.3. L'IgA sécrétoire	50
1.2. Aspects fonctionnels	51
1.2.1. Distribution des plasmocytes à IgA	51
1.2.2. Les IgA et la défense des muqueuses	52
1.2.2.1. Les IgA sécrétoires, barrière physique	52
1.2.2.2. Les IgA dans le tissu lymphoïde muqueux	53

2. Le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin ou GALT

2.1. Caractéristiques générales du GALT	55
2.1.1. Les plaques de Peyer : site inducteur de la réponse muqueuse	55
2.1.2. Le tissu muqueux diffus : site effecteur de la réponse muqueuse	58
2.1.2.1. La <i>lamina propria</i> , site effecteur de la réponse anticorps	58
2.1.2.2. L'épithélium, site effecteur de la réponse cellulaire	60
2.1.3. Domiciliation des lymphocytes dans les sites muqueux	62

2.3. Interleukines et orientation isotypique vers l'IgA	63
2.3.1. Interactions cellulaires dans les follicules lymphoïdes	63
2.3.2. Régulation de la réponse IgA par les interleukines	64
3. La tolérance orale : commentaire	
3.1. Caractéristiques majeures de la tolérance orale	69
3.2. Mécanismes immunitaires impliqués dans la tolérance orale	70
Chapitre III - Les lymphocytes B1 : une autre origine pour les plasmocytes à IgA	72
1. La lignée B1	
1.1. Phénotype	73
1.2. Localisation et migration	75
1.2.1. Localisation anatomique	75
1.2.1.1. Dans les organes périphériques	75
1.2.1.2. Dans la <i>lamina propria</i>	76
1.2.2. Migration	78
1.3. Répertoire et réponse B1	78
1.3.1. Spécificité	78
1.3.2. Répertoire	79
1.3.3. Rôle du CD5	79
1.4. Origine et développement	83
1.4.1. Origine	83
1.4.1.1. Le foie foetal, une source de lymphocytes B1	84
1.4.1.2. L'omentum foetal, un site enrichi en précurseurs de cellules B1	85
1.4.1.3. La moëlle osseuse, source de lymphocytes B conventionnels et de lymphocytes B1b	85
1.4.2. Développement	86
1.4.2.1. Deux voies de développement pour les lymphocytes B	86

1.4.2.2. Renouveaulement	87
1.4.2.3. Contrôle du développement	88
1.4.3. Du foetus à l'adulte, un système immunitaire évolutif	88
1.4.3.1. Caractéristiques des lymphocytes foetaux	89
1.4.4. Les lymphocytes B1 macrophages : une lignée hérétique ?	91
2. Les lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse	
2.1. Auto-immunité et immunité muqueuse	93
2.1.1. Lymphocytes B CD5 ⁺ et auto-immunité	93
2.1.2. Auto-immunité et immunité muqueuse	95
2.2. La cavité péritonéale, un réservoir de plasmocytes à IgA pour l'intestin	97
2.2.1. Le tissu lymphoïde associé au péritoine (PALT) : un organe lymphoïde secondaire ?	98
2.2.1.1. Les mécanismes de défense naturelle	98
2.2.1.2. Les mécanismes de défense spécifique	99
2.2.2. Les lymphocytes B1, source de plasmocytes à IgA dans l'intestin	101
2.2.2.1. Les cellules B1, source de plasmocytes à IgA intestinaux	101
2.2.2.2. Réactivité avec la flore intestinale	102
2.3. Cytokines et régulation des lymphocytes B1	104
2.3.1. Interleukines et orientation isotypique des lymphocytes B1	104
2.3.2. Interleukines, activation et régulation des cellules B1	108
2.4. Le système immunitaire muqueux : un système primitif et un système moderne	109
3. La mutation <i>Xid</i>	
3.1. Définition et origine	110
3.2. La souris <i>Xid</i>	111
3.2.1. Phénotype des lymphocytes B	111
3.2.2. Caractéristiques des immunoglobulines	112
3.2.3. Déficience <i>Xid</i> et activation des lymphocytes B	113
3.3. Implication dans les modèles parasitaires	114

RESULTATS	116
Partie I - Influence des facteurs parasitaires sur l'expression de la réponse IgA	118
1. Incidence de différents protocoles d'immunisation sur la réponse humorale et cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST	119
1.1. Administration de l'antigène Sm28GST par voie parentérale	119
1.2. Administration de l'antigène Sm28GST par voie muqueuse	124
2. Influence des facteurs parasitaires sur l'orientation cellulaire et isotypique vers l'IgA	128
2.1. Rôle des antigènes d'oeufs dans l'induction de la réponse IgA anti- <i>Schistosoma mansoni</i> : ARTICLE 1	129
2.2. Interleukines et orientation isotypique dans l'infection monosexuée	136
2.2.1. Réponse anticorps dans l'infection monosexuée	137
2.2.2. Production de cytokines en réponse au antigène parasitaires	138
2.2.2.1. Cytokines Th1	138
2.2.2.2. Cytokines Th2	139
2.3. Les antigènes associés aux oeufs, polarisation de la réponse cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST	140
2.3.1. Incidence des oeufs sur la réponse isotypique	141
2.3.2. Incidence des oeufs et de leurs antigènes associés sur la réponse cellulaire	142
Partie II - Rôle des lymphocytes B1 (B CD5⁺) dans l'immunité anti-schistosome	145

1. Rôle des lymphocytes B péritonéaux dans l'immunité muqueuse spécifique du schistosome	146
1.1. Evolution comparée des lymphocytes de la cavité péritonéale au cours de l'infection par <i>S. mansoni</i>	146
1.1.1. Les lymphocytes totaux	147
1.1.2. Les lymphocytes T	148
1.1.3. Les lymphocytes B CD5 ⁺	149
1.2. Lymphocytes B péritonéaux et réponse IgA muqueuse intestinale	150
1.2.1. Production d'IgA <i>in vitro</i>	150
1.2.1.1. Sécrétion d'IgA totales	150
1.2.1.2. Production d'IgA spécifiques de <i>S. mansoni</i>	152
1.2.2. Production d'IgA <i>in vivo</i>	153
1.2.2.1. Immunisation intra-péritonéale	153
1.2.2.2. Réponse muqueuse chez la BALB <i>Xid</i> infectée par <i>S. mansoni</i>	154
1.2.2.3. Migration des lymphocytes péritonéaux dans l'intestin et sécrétion d'IgA	156
1.2.2.3.1 Transfert de PerC infectées chez les BALB <i>Xid</i> naïves	156
1.2.2.3.2. Transfert de PerC infectées chez les BALB <i>Xid</i> infectées	159
1.2.2.3.3. Transfert des PerC fluorescentes chez la BALB <i>Xid</i>	161
2. Rôle des lymphocytes B1 dans l'immunité anti-schistosome : ARTICLE 2	166
DISCUSSION	207
MATERIEL ET METHODES	230
BIBLIOGRAPHIE	237

ABREVIATIONS

ACF	Adjuvant Complet de Freund
AcMc	Anticorps monoclonal
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AIF	Adjuvant Incomplet de Freund
AlOH	Hydroxyde d'alum
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
ConA	Concanavaline A
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FC	Furcocercaire
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP	Intra-péritonéale
LPS	Lipopolysaccharide
kDa	Kilo Dalton
MAI	Maladie Auto Immune
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	Ortho-phénylène-diamine
PBS	Phosphate buffered solution
PZQ	Praziquantel
SC	Sous-cutané
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEA	Soluble Egg Antigen
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
Sb 28GST	<i>Schistosoma bovis</i> 28kDa Glutathion S-transferase
Sm 28GST	<i>S. mansoni</i> 28kDa Glutathion S-transferase
Sh 28GST	<i>S. haematobium</i> 28kDa Glutathion S-transferase
TCR	Récepteur à l'antigène des cellules T
TTC	Fragment c de la toxine tétanique
Xid	X-linked immunodeficiency

INTRODUCTION

LA SCHISTOSOMIASE OU BILHARZIOSE

1. Généralités

Plus de mille ans avant Jésus-Christ, les Egyptiens étaient déjà atteints par la schistosomiase ou bilharziose car des calcifications bilharziennes ont été retrouvées dans la vessie d'une momie de la XX^{ème} dynastie. C'est en 1852 que Theodor Bilharz, pathologiste allemand, travaillant au Caire décrit *Schistosoma haematobium*, agent de la bilharziose urogénitale. Au début du siècle, Manson décrit une autre espèce de schistosomes : *Schistosoma mansoni*, agent d'une bilharziose intestinale et parfois hépato-splénique. D'autres espèces de schistosomes seront ensuite découvertes.

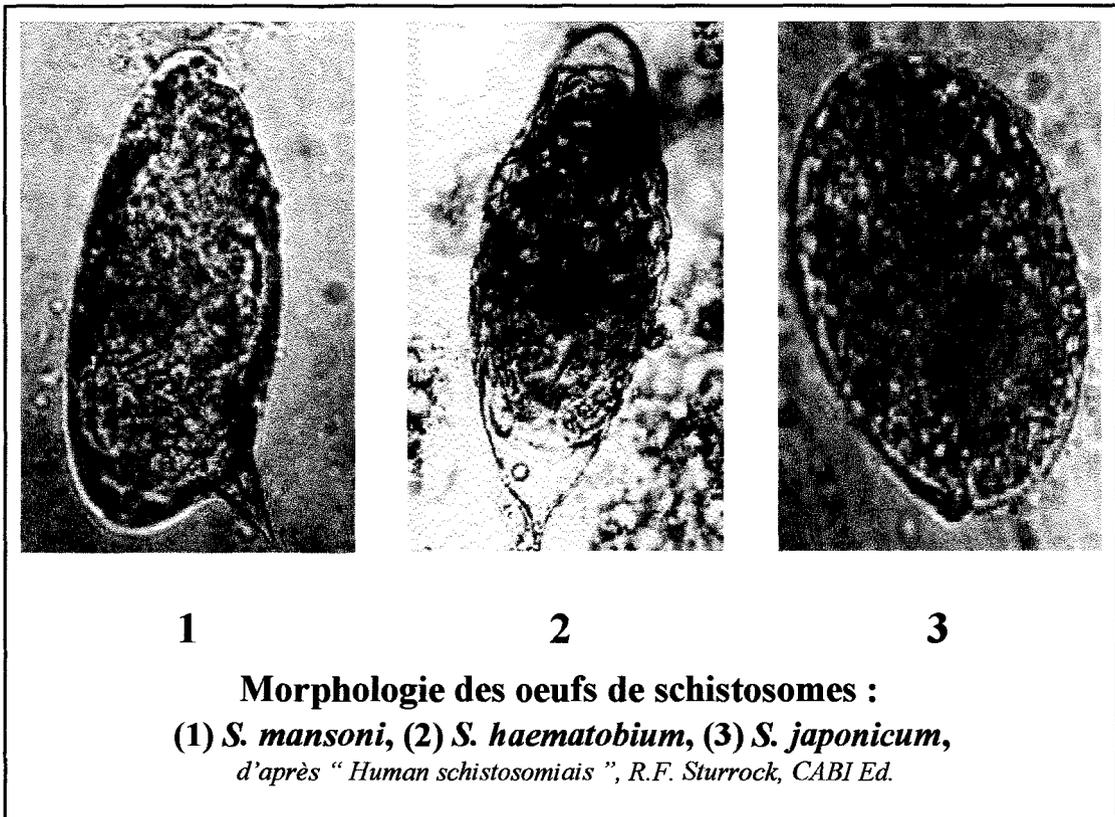
Les schistosomes sont des trématodes à sexe séparé, hémaphogues. Ils sont transmis à l'Homme par certains mollusques aquatiques qui constituent l'hôte intermédiaire de ces parasites.

La bilharziose est la deuxième grande endémie parasitaire après le paludisme. Cette maladie frappe, selon l'OMS, 200 millions de personnes et entraîne 500 000 décès chaque année dans 76 pays en voie de développement.

1.1. Taxonomie du genre *schistosoma*

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

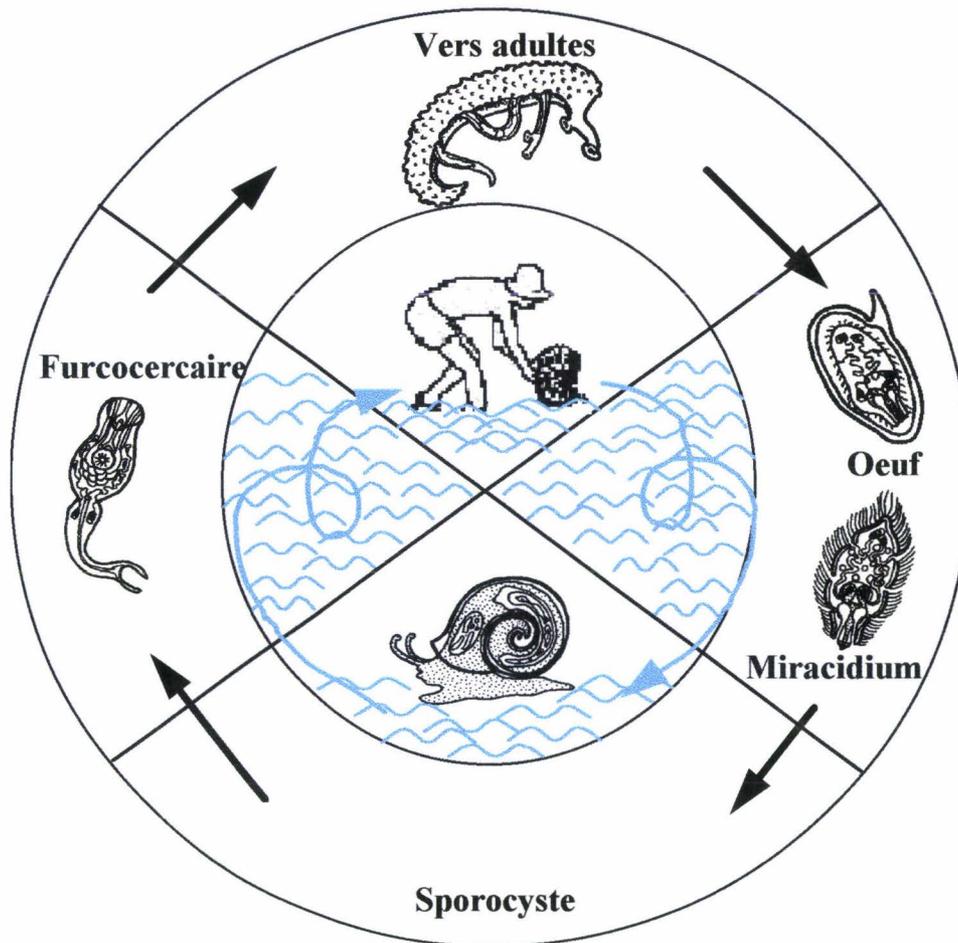
La classification peut être basée : soit sur la morphologie de leurs oeufs qui peuvent être ovales et munis d'un éperon latéral (*S. mansoni*), ovales et munis d'un éperon terminal (*S. haematobium*, *S. bovis*, *S. intercalatum*) ou alors ronds et munis d'un éperon minuscule (*S. japonicum*, *S. mekongii*),



soit selon leur spectre d'infectivité définissant les espèces anthropophiles telles que *S. mansoni*, *S. intercalatum* (bilharzioses intestinales), *S. haematobium* (bilharziose urogénitale), les espèces anthropo-zoophiles représentées par *S. japonicum*, *S. mekongii* ou les espèces zoophiles affectant les rongeurs et carnivores: *S. rodhaini*, les suidés : *S. incognitum* et les ruminants: *S. curassoni*, *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. leiperi*, *S. margrebowiei*, *S. indicum*, *S. spindale*, *S. nasale* et le genre *Orientobilharzia*

1.2. Cycle biologique de *S. mansoni*

Le cycle parasitaire nécessite un hôte définitif mammifère et un hôte intermédiaire gastéropode d'eau douce.



La forme infestante du parasite, la **furcocercaire** (issue du mollusque) traverse les couches supérieures de l'épiderme de son hôte définitif en quelques minutes. Au cours de la pénétration, elle va perdre sa queue bifide qui lui permettait de nager en quête de son hôte et devient chez l'hôte définitif un **schistosomule**.

Le schistosomule quitte le derme et gagne les poumons, entraîné par le flux sanguin. Le stade pulmonaire du schistosomule va durer 3 à 4 jours. Par la suite, le schistosomule sera entraîné vers l'aorte, les artères mésentériques et la veine porte, jusqu'au foie, son lieu de maturation.

Le jeune parasite va alors se différencier en **schistosome** et subir une maturation sexuelle. S'il est de sexe mâle, il acquiert la morphologie caractéristique du schistosome mâle, sa face ventrale formant un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle qui atteint alors sa maturité sexuelle. Chez l'homme, les vers peuvent demeurer accouplés pendant plusieurs années. Les vers accouplés se déplacent ensuite à contre-courant du flux sanguin grâce à leurs deux ventouses latérales et vont gagner leur lieu de ponte. La majorité des espèces de schistosomes infectant l'homme va se nicher dans les veines proches de l'intestin. L'espèce *S. haematobium*, quant à elle, a un tropisme particulier pour le système uro-génital.

Les femelles matures vont produire des oeufs en continu, on estime que la femelle de *S. mansoni* pond jusqu'à 300 oeufs par jour. Les **oeufs** de *S. mansoni* sont ensuite disséminés dans divers organes internes dont l'intestin et le foie, où ils se trouvent bloqués. Les oeufs sont alors la cible d'une intense réaction inflammatoire désignée sous le terme de réaction granulomateuse. Ils sont ainsi responsables de la pathologie liée à l'infection et permettent la poursuite du cycle parasitaire. En effet, les oeufs qui franchissent les muqueuses de l'appareil urinaire (*S. haematobium*) ou intestinal (*S. mansoni* et *S. japonicum*), grâce à la sécrétion de substances protéolytiques, sont excrétés dans les urines ou les selles et libérés dans l'eau.

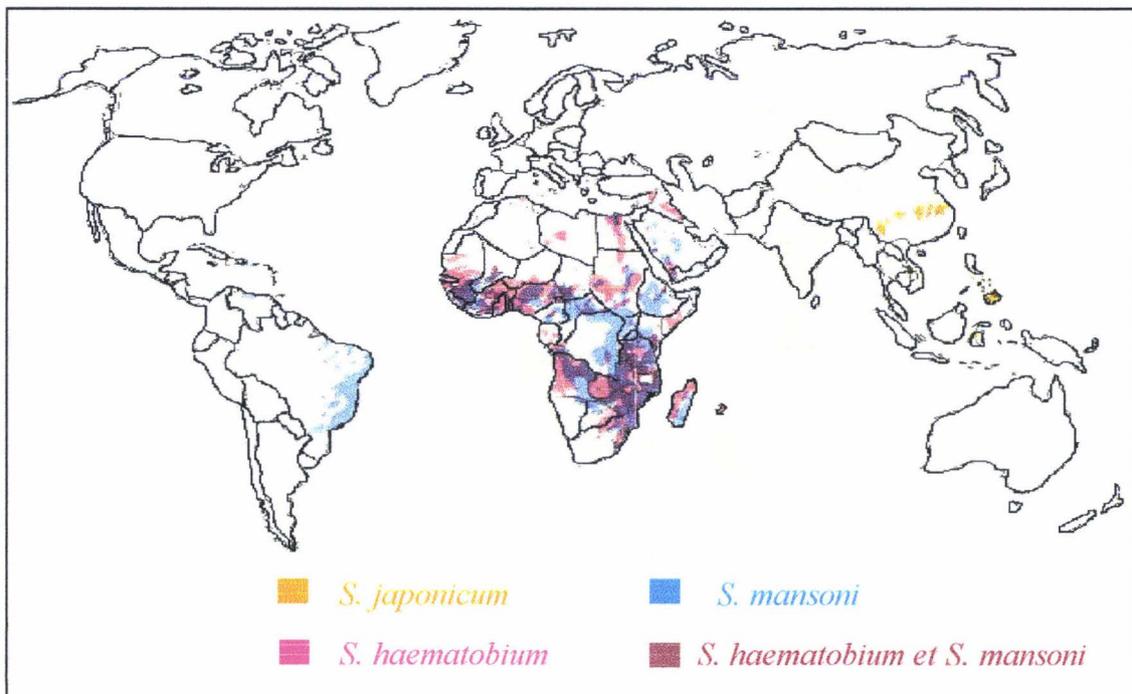
Les oeufs vont alors donner naissance, quand certaines conditions de milieu sont réunies à une forme larvaire libre, le **miracidium**. Celui-ci est extrêmement mobile car doté de cils vibratils lui permettant de se déplacer en quête de son hôte intermédiaire, vraisemblablement attiré par des facteurs chimiotactiques. Les mollusques-hôtes sont spécifiques de chaque espèce, cette spécificité étant déterminée par des facteurs génétiques.

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en **sporocyste** primaire et rejoint l'hépto-pancréas de l'hôte intermédiaire. Il passe alors, en 3 à 8 semaines, du stade sporocyste primaire et secondaire à celui de furcocercaire par multiplication asexuée et polyembryonie. Un seul miracidium peut ainsi aboutir à la production de 100 000 cercaires. Les mollusques infestés stimulés par la lumière et la chaleur, émettent alors chaque jour dans l'eau environnante des milliers de cercaires qui ne peuvent survivre plus de 48h en attente de l'hôte définitif.

1.3. Distribution géographique des schistosomias

Les schistosomias sont endémiques dans 76 pays sur les continents africain, américain et asiatique. 600 millions de personnes sont exposées au risque d'infection et 200 millions sont infectées. Une zone d'endémie offre simultanément l'espèce de mollusque vecteur compatible, des conditions d'hygiène favorables à la dissémination du parasite et des conditions hydriques convenables.

Répartition géographique des schistosomias



D'après l'OMS, février 1998 (www.who.ch)

S. haematobium, agent de la bilharziose vésicale, est endémique dans 54 pays d'Afrique et de Méditerranée orientale et on estime à 90 millions le nombre de personnes infectées.

S. mansoni atteint 60 millions d'individus dispersés dans plus de cinquante pays d'Afrique inter-tropicale, mais aussi dans le delta du Nil, le Yémen ou l'Arabie Saoudite. On le retrouve aux Caraïbes et en Amérique du Sud, en particulier dans le Nord-est du Brésil, le Venezuela et dans quelques foyers subsistant aux Antilles.

S. japonicum et *S. mekongi*, responsables de bilharzioses intestinales, sévissent en Asie. L'espèce *japonicum* est notamment présente en Chine, aux Philippines et en Indonésie, alors que *S. mekongi* a été identifié au Cambodge et au Laos (presqu'île du Mékong).

S. intercalatum, à localisation rectale chez l'homme, est quant à lui, un parasite strictement africain. Sa présence a été détectée au Tchad, en Ouganda, au Zaïre, au Gabon et au Cameroun.

Plusieurs espèces peuvent cohabiter, c'est le cas de *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*. Cette cohabitation peut donner lieu à des phénomènes d'exclusion entre les espèces en compétition pour le même hôte (Tchuem Tchuente, 1995 ; Tchuem Tchuente *et al.*, 1996). Des appariements interspécifiques au sein d'un même hôte peuvent entraîner l'apparition d'hybrides (Richard-Lenoble *et al.*, 1993). Les facteurs humains tels que le développement et l'utilisation des ressources hydrauliques ou le développement sanitaire ont également une influence sur l'apparition ou la régression d'une zone d'endémie. Le flux migratoire des populations, additionné à ces facteurs, va également modifier la répartition géographique des aires d'endémies ; on assiste donc à une épidémiologie en constant remaniement.

1.4. Pathologies associées aux bilharzioses

Au sein d'une population infectée, les manifestations cliniques sont extrêmement variables. Elles sont associées à l'intensité de l'infection, à la souche du parasite infestant, à la fréquence des réinfections, au statut immunitaire de l'individu infecté ainsi qu'à des facteurs génétiques de l'hôte. Les prévalences d'infection les plus élevées et l'intensité des infections les plus importantes sont observées chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, le nombre d'oeufs excrétés et l'intensité des lésions diminuant au cours du temps (Larivière, 1993).

Ce ne sont pas les vers adultes qui induisent la pathologie mais les oeufs qui sont à l'origine de la plupart des lésions bilharziennes car ils entraînent la formation d'un granulome. La pathologie varie suivant l'espèce de schistosome, la localisation des vers et la circulation des oeufs. La maladie s'exprime en plusieurs phases, la première phase est la phase d'infestation due à la pénétration des cercaires et qui se traduit par une dermatite. La

deuxième phase, la phase d'invasion, est liée au développement des schistosomules et elle correspond aux réactions de l'organisme au contact des antigènes et des toxines des vers et se traduit par des manifestations allergiques souvent fébriles. La phase d'état apparaît au minimum 2 mois après l'infestation, mais peut ne se manifester que beaucoup plus tard, elle correspond à l'installation des vers adultes dans leur site définitif et à la ponte des oeufs. Les manifestations dépendent de l'espèce de schistosome en cause.

S. haematobium entraîne des atteintes uro-génitales avec des hématuries quasi-constantes. Des lésions rénales, urétrales, génitales ou rectales peuvent compliquer cette forme. L'atteinte hépatique, si elle est fréquente histologiquement est, le plus souvent cliniquement muette.

S. mansoni occasionne des lésions de la paroi intestinale et du foie avec fibrose et hypertension portale secondaire et parfois, à un stade avancé, des signes pulmonaires et respiratoires. La gravité des lésions hépatiques est liée au développement d'une réaction inflammatoire de type hypersensibilité retardée, aboutissant à la formation des granulomes. Histologiquement, on note l'accumulation successive de nombreux types cellulaires, notamment d'éosinophiles, suivis par des macrophages, des lymphocytes, des cellules épithélioïdes et des fibroblastes. Cette réponse évolue par la suite vers la fibrose cicatricielle.

L'infection par *S. japonicum* est proche de celle par *S. mansoni* mais la fibrose hépatique se développe plus rapidement.

S. intercalatum est à l'origine d'une symptomatologie dominée par des manifestations rectales.

1.5. Diagnostic de la schistosomiase

Sur le terrain, le diagnostic se fait à l'échelle collective, par exemple sur les enfants scolarisés, en recherchant la présence d'œufs dans les selles ou les urines. L'absence d'œufs ne permettant pas de conclure à l'absence d'infection, le diagnostic repose également sur des examens cliniques, biologiques (symptomatologie, modifications des constantes sanguines)

et immunologiques (recherche d'antigènes circulants, de complexes immuns). L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) reste encore très peu répandue.

1.6. Lutte contre les schistosomiasés

Trois moyens de lutte contre les schistosomiasés tentent d'interrompre le cycle du parasite : la prophylaxie sanitaire, la lutte anti-vectorielle et la prophylaxie médicale.

1.6.1. La prophylaxie sanitaire

Ayant pour but d'interrompre le cycle du parasite, la prophylaxie sanitaire a été pendant longtemps la seule méthode de lutte contre les schistosomiasés. Elle consiste à réduire la contamination du biotope aquatique par les excréments humains et à limiter les contacts des populations avec les points d'eau contaminés. Une stratégie globale incluant à la politique d'assainissement, le dépistage et le traitement des populations infectées et une éducation sanitaire des populations à risque, a déjà prouvé son efficacité à Porto Rico et en Arabie Saoudite. En raison des coûts et de sa mise en œuvre difficile, cette stratégie n'a pu s'étendre à tous les pays concernés par la schistosomiase (Capron, 1993).

1.6.2. La lutte anti-vectorielle

Cette stratégie vise à éliminer les mollusques vecteurs indispensables au développement du parasite soit à l'aide de mollusquicides, soit par la réalisation de travaux d'assainissement visant à réduire le biotope des mollusques, soit en introduisant des mollusques compétiteurs. Cette stratégie anti-vectorielle ne suffit pas à interrompre le cycle du parasite et actuellement, l'une des méthodes de lutte la plus efficace contre la schistosomiase consiste en une prophylaxie médicale.

1.6.3. La prophylaxie médicale

Le praziquantel (PZQ) représente actuellement le composé le plus utilisé devant l'oxamniquine. Il est actif sur toutes les espèces de schistosomes infectant l'homme et le taux de guérison, déterminé par l'arrêt définitif de l'émission d'oeufs dans les selles, est estimé à environ 90% dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*. Son utilisation, dont les effets sont principalement ciblés sur les vers adultes, ne prévient cependant pas les réinfections très fréquentes en zone d'endémie. De plus, des phénomènes de résistance au PZQ ont été mis en évidence en laboratoire (Fallon & Doenhoff, 1994 ; Ismail *et al*, 1994) mais également dans certains foyers d'infection naturelle (Sénégal, Egypte) (Fallon *et al*, 1995).

Face aux échecs de la lutte anti-vectorielle, le développement d'une stratégie vaccinale devrait permettre, en association avec un traitement préalable au PZQ, de limiter l'infection et ses causes pathologiques. L'élaboration d'un vaccin passe par la connaissance des mécanismes immunitaires développés par l'hôte définitif au cours de l'infection.

2. Réponse immune développée au cours d'une infection à *S. mansoni*

Le développement de moyens de lutte contre la schistosomiase et notamment l'élaboration d'une stratégie vaccinale impliquent la compréhension des mécanismes immunitaires développés par l'hôte au cours de l'infection. Deux modèles animaux : le rat, hôte semi-permissif pour *S. mansoni*, et la souris, hôte permissif, ont été couramment utilisés en laboratoire et ont largement contribué aux connaissances sur l'immunologie des schistosomiasés. Quant aux études réalisées chez l'homme, elles consistent en des analyses épidémiologiques menées sur des populations vivant en régions endémiques.

2.1. L'immunité naturelle

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

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

- les hôtes semi-permissifs qui rejettent les vers adultes avant la ponte comme le rat. Bien que les schistosomules se transforment en vers immatures chez cet animal et se localisent au niveau hépatique, il se produit une chute brutale de la charge parasitaire à la quatrième semaine d'infection (Maddison et coll., 1970). De plus, ce modèle développe une forte immunité à la réinfection et fait intervenir des mécanismes de défense communs à ceux observés chez l'homme.

- les hôtes permissifs qui permettent la maturation complète des parasites et la ponte, comme la souris, le hamster, le singe Rhésus et le babouin. La souris constitue le modèle de référence pour l'étude des modifications immuno-pathologiques liées à la présence des oeufs dans les tissus. D'autre part, l'existence de nombreuses souches parfaitement définies

sur le plan génétique permet l'étude, dans ce modèle, du contrôle génétique de la réponse immune dirigée contre le parasite.

L'homme se comporte comme un hôte susceptible et développe des infections pouvant durer plusieurs années, cette infection arrive à se stabiliser à l'âge adulte.

2.2. L'immunité acquise

L'immunité concomitante

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

De nombreux mécanismes effecteurs ont été caractérisés *in vitro*, chez l'homme et dans des modèles expérimentaux au cours de l'infection. On décrit à la fois une réponse spécifique humorale et cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation des cellules inflammatoires (Capron *et al.*, 1986 ; Sher *et al.*, 1989).

2.2.1. La réponse humorale

La participation des anticorps dans l'acquisition de l'immunité à la réinfection dans la schistosomiase a été suggérée par de nombreuses observations épidémiologiques chez l'homme et différents travaux réalisés sur les modèles expérimentaux.

2.2.1.1. Observations épidémiologiques

La résistance à l'infection par le schistosome se développe progressivement pendant la période de l'enfance et atteint un maximum à l'âge de la puberté (Butterworth *et al*, 1985). Les capacités de résistance semblent dépendre d'un gène co-dominant majeur (Abel *et al*, 1991). Les infections par *S. mansoni* chez les populations kenyanes (Butterworth *et al*, 1985 ; Dunne *et al*, 1992) et brésiliennes (Rihet *et al*, 1991 ; Demeure *et al*, 1993) montrent une corrélation positive entre la réponse IgE spécifique des antigènes du parasite et l'acquisition d'une résistance à la réinfection, après chimiothérapie. Cette corrélation a été aussi observée lors d'une infection par *S. haematobium*, principalement chez les jeunes enfants (Hagan *et al*, 1991 ; Ndhlovu *et al*, 1996).

Cependant, l'expression de l'immunité acquise est influencée par la présence de différents isotypes liés à la susceptibilité à la réinfection. Ainsi des études réalisées au Kenya ont montré la présence d'anticorps IgM capables de bloquer la cytotoxicité dépendante des éosinophiles médiée par les IgG. En effet, l'intensité de réinfection peut être corrélée positivement avec la présence d'IgM et d'IgG2 spécifiques d'épitopes carbohydrates présents dans les antigènes d'œufs (Khalife *et al*, 1986 ; Butterworth *et al*, 1987 ; Dunne *et al*, 1988). De même, des anticorps IgG4 seraient associés à la susceptibilité à l'infection, aussi bien par *S. haematobium* que par *S. mansoni* (Hagan *et al*, 1991 ; Rihet *et al*, 1992 ; Demeure *et al*, 1993). Plus récemment, une association positive entre le taux d'anticorps IgA, spécifiques de l'antigène Sm28GST de *S. mansoni*, et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été observée (Auriault *et al*, 1990 ; Grzych *et al*, 1993).

2.2.1.2. Les mécanismes effecteurs

De nombreux travaux montrent qu'il existe des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC pour Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) qui conduisent à la destruction des larves de schistosome. Ces mécanismes font intervenir, chez le rat comme chez l'homme, des anticorps d'isotype IgG et IgE et impliquent la participation de cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes telles que les macrophages (Capron *et al*,

1975 ; Perez, 1975 ; Joseph *et al*, 1978), les éosinophiles (Butterworth *et al*, 1974 ; Capron *et al*, 1978 ; Capron *et al*, 1981) et les plaquettes (Joseph *et al*, 1983). Cette activité cytotoxique dépendante des plaquettes ou des éosinophiles est maximale entre 7 et 8 semaines après l'infection chez le rat..

La relevance de ces mécanismes a été confirmée *in vivo*, chez le rat, par la protection obtenue après transfert passif d'anticorps monoclonaux d'isotype IgG2a spécifiques d'une glycoprotéine de 38kDa du parasite ou d'anticorps monoclonaux IgE spécifiques d'un antigène de 26kDa (Grzych *et al*, 1982 ; Verwaerde *et al*, 1986). D'autre part, des anticorps de même spécificité antigénique sont capables d'inhiber cette cytotoxicité (Capron *et al*, 1987). Ces anticorps, IgG2c chez le rat (Grzych *et al*, 1984), IgM, IgG2 et IgG4 chez l'homme (Khalife *et al*, 1986 ; 1989 ; Demeure *et al*, 1993), sont dits "bloquants" de par leur capacité à neutraliser l'interaction cellules effectrices/anticorps/schistosomule (Cf § 2.3.2). De plus, l'injection intra-dermique ou sous-cutanée d'éosinophiles et de macrophages provenant de rat infectés confirme *in vivo* le rôle effecteur cytotoxique de ces deux populations (Capron *et al*, 1984)

Le rôle des anticorps a été aussi démontré au niveau d'expériences d'immunisation par des cercaires irradiées, dans le modèle murin où le transfert passif des sérums d'immunisation induit une réduction de 20-50% de la charge en vers après challenge (Mangold et Dean, 1986).

L'ensemble de ces informations montre que le schistosomule semble donc être la cible principale de la réponse immune et que les degrés variables de susceptibilité et de résistance à la réinfection sont liés à un équilibre dans l'expression d'anticorps effecteurs et d'anticorps bloquants.

2.2.2. La réponse cellulaire

Parallèlement au développement d'une réponse effectrice humorale chez le rat ou chez l'homme, la souris développe des mécanismes cellulaires impliquant les populations lymphocytaires T et leur production de cytokines. De nombreuses études réalisées sur le modèle murin ont permis d'appréhender l'immunopathologie associée à la bilharziose.

L'immunité développée contre *S. mansoni* est thymo-dépendante puisque des souris à fonction thymique déficiente présentent une très faible résistance à la réinfection (Capron *et al*, 1983 ; Philips *et al*, 1983). Cependant, les lymphocytes T ne semblent pas impliqués directement dans les mécanismes de cytotoxicité contre le parasite (Butterworth *et al*, 1979b) et les cellules T cytotoxiques sont incapables de lyser le parasite. Bien que les lymphocytes T ne participent pas directement à la destruction du parasite, ils sont indirectement impliqués dans l'immunité protectrice par le biais des cytokines qu'ils sécrètent.

Chez la souris, il existe deux sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ auxiliaires (T helper) Th1 et Th2, caractérisées par leur production différentielle de cytokines : les cellules Th1 produisent de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-12, alors que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Mosmann *et al*, 1986 ; Cherwinski *et al*, 1987 ; Fiorentino *et al*, 1989). Firestein *et al* (1989) ont montré par la suite, l'existence de cellules Th0, précurseurs des cellules Th1 et Th2, produisant simultanément de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-4. Au cours de la schistosomiase murine, la réponse cellulaire commute d'un profil Th1 vers un profil Th2 avec l'évolution du parasite. Ainsi, alors que les schistosomules induisent une réponse cellulaire de type Th1 (production d'IFN- γ et d'IL-2), l'apparition des œufs dans les tissus conduit à une réponse cellulaire de type 2, dominante aux environs de la 8^{ème} semaine après l'infection (Grzych *et al*, 1991; Pearce *et al*, 1991). Cet effet des œufs de schistosome sur la polarisation peut aussi s'exercer à l'encontre d'un antigène irrelevant du schistosome, décrit comme inducteur d'une réponse de type Th1 (Kullberg *et al*, 1992).

Des expériences de neutralisation des cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) à l'aide d'anticorps se sont avérées sans effet sur la résistance à l'infection (Sher *et al*, 1990a). Cependant, l'existence de souris déficientes en IL-4 (qui ne développent alors pas de réponse Th2 efficace) (Pearce *et al*, 1996) a permis de montrer les effets protecteurs de cette cytokine principalement sur les manifestations pathologiques observées en phase aiguë de la schistosomiase mais également sur la charge vermineuse lors d'expériences de réinfection (Rosa Brunet *et al*, 1997 ; Rosa Brunet *et al*, 1997)

D'autre part, l'étude de la réponse immune suite à l'infection par des cercaïres irradiées (immunisation qui ne conduit pas au développement du parasite mature et qui confère une protection à la réinfection) montre la prédominance d'une réponse Th1 qui est caractérisée par la production d'IFN- γ (Mountford *et al*, 1992 ; Smythies *et al*, 1992a). Cette protection est réduite si les animaux sont traités par des anticorps neutralisant l'activité de l'IFN- γ (Smythies *et al*, 1992b). Le rôle majeur de l'IFN- γ dans l'immunité protectrice est également confirmé *in vitro* puisqu'il active les macrophages qui sont alors capables de lyser les schistosomules (James *et al*, 1984 ; James *et al*, 1993 ; Pearce, 1993 ; Oswald *et al*, 1994a).

L'importance de ces deux cytokines est confirmée chez l'homme où la résistance à l'infection est liée à la présence de cellules CD4⁺ Th0/2 qui sécrètent plus d'IL-4 que d'IFN- γ , alors qu'inversement les clones T CD4⁺ de patients susceptibles produisent de l'IFN- γ majoritairement (Th0/1) (Couissinier-Paris & Dessein, 1995). Ces observations sont en accord avec le rôle des IgE (dont la présence est sous la dépendance de l'IL-4) dans la protection contre *S. mansoni* et indiquent que l'IFN- γ contribue à l'expression de l'immunité. De plus, deux études ont montré une association entre de faibles taux d'infection (DeJesus *et al.*, 1993) ou de réinfection (Roberts *et al*, 1993) et une prolifération lymphocytaire T vis-à-vis d'antigènes d'oeufs et de vers adultes. Une faible production d'IFN- γ a été observée alors que la production d'IL-5 est significative. Dans l'une de ces études (Roberts *et al*, 1993), il a été rapporté, de plus, une corrélation âge-dépendante significative entre cette production d'IL-5 en réponse à une stimulation par les antigènes d'oeufs, et de faibles taux de réinfection. Un autre aspect de l'immunité décrite dans les populations humaines est apporté par les travaux de Abel *et al* (1991) montrant la présence d'un gène co-dominant contrôlant la susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*.

2.2.3. Immunorégulation de la pathologie granulomateuse

Granulome et interleukines

La sécrétion d'antigènes par les œufs vivants entraîne une réaction inflammatoire appelée granulome caractérisé par le recrutement de macrophages, de neutrophiles, d'éosinophiles et de lymphocytes qui entourent l'œuf (Stenger *et al*, 1967 ; Moore *et al*, 1976). Le granulome est classiquement considéré comme une réaction inflammatoire à médiation cellulaire ou d'hypersensibilité retardée (Warren *et al*, 1967), médiée par les cellules T (Byram et Lichtenberg, 1977). La population lymphocytaire T la plus impliquée dans la formation du granulome est celle des lymphocytes T CD4⁺ puisque seule l'injection d'anticorps anti-CD4⁺ entraîne une réduction importante de la taille des granulomes (Mathew *et al*, 1986). Les œufs et leur sécrétion sont à la base de la commutation d'un profil cellulaire Th1 vers un profil Th2.

Il a été montré que l'IL-2 et l'IL-4 sont fortement impliquées dans le développement de la réaction granulomateuse et que leur neutralisation induit une diminution significative de la taille des granulomes (Mathew *et al*, 1990 ; Cheever *et al*, 1992 ; Chensue *et al*, 1992 ; Yamashita et Boros, 1992 ; Lukacs et Boros, 1993). L'IL-2 serait impliquée dans la génération de la réponse Th2. En effet, sa neutralisation conduit à une diminution de la synthèse d'IL-4 par les cellules T des granulomes mais aussi d'IL-5 (Cheever *et al*, 1992 ; Wynn *et al*, 1993 ; Metwali *et al*, 1993a). Tout comme l'IL-2 et l'IL-4, le TNF- α semble être nécessaire au développement d'une réaction granulomateuse maximale car la seule injection de TNF- α restaurerait la formation de granulomes, composés de macrophages et de neutrophiles, chez les souris SCID (souris déficientes en cellules T et B) (Amiri *et al*, 1992).

L'IFN- γ et l'IL-12, en revanche inhibent la formation du granulome. L'IFN- γ inhibe la production de cytokines favorisant le granulome et sa neutralisation par des anticorps provoque une augmentation de la réaction granulomateuse autour de billes sensibilisées par de l'antigène d'œufs (Lukacs et Boros, 1993). L'injection d'IL-12 inhibe la formation de granulomes pulmonaires et s'accompagne d'une augmentation d'IFN- γ et d'une suppression

des cytokines Th2, IL-4, IL-5 et IL-10, normalement induites par les œufs, dans le cas (Oswald *et al*, 1994 ; Wynn *et al*, 1994). L'effet de cette cytokine est médié par l'IFN- γ . En plus d'un effet sur la formation du granulome, ces deux cytokines réduisent significativement la fibrose hépatique liée à l'infection naturelle (Czaja *et al*, 1987 et 1989a ; Wynn *et al*, 1995).

Modulation de la réaction granulomateuse

Chez la souris, il existe un mécanisme de modulation spontanée de la réaction granulomateuse. En effet, l'intensité de la réaction granulomateuse induite par les oeufs pondus tardivement au cours de l'infection (phase chronique) est inférieure à celle induite par les premiers oeufs (phase aiguë). Deux voies complémentaires semblent impliquées dans la modulation du granulome : d'une part, les cellules T CD8⁺ auraient un effet supprimeur sur la production des cytokines Th2 (Chensue *et al*, 1993), d'autre part, la réponse Th1 est inhibée et les lésions granulomateuses diminuent en taille. Les cellules Th1 deviennent anergiques aux antigènes d'œufs et sécrètent moins d'IL-2 et d'IFN- γ , n'activant alors plus les populations cellulaires participant au granulome telles que les macrophages, les éosinophiles, les lymphocytes et les fibroblastes. L'IL-10, cytokine impliquée dans la régulation des populations Th CD4⁺, intervient très largement dans l'anergie des cellules Th1 en inhibant l'expression des molécules co-stimulatrices B7-1 et B7-2 à la surface des cellules présentant l'antigène (macrophages) (Flores-Villanueva *et al*, 1994). Récemment, Velupillai et Harn (1994) ont montré que la production d'IL-10 observée, juste après l'oviposition, chez les souris infectées est induite par un oligosaccharide (Lacto-*N*-fucopentaose) présent dans les antigènes d'œufs du schistosome.

La connaissance des mécanismes impliqués dans la formation du granulome et dans sa régulation fait clairement apparaître la complexité d'une telle réponse et la difficulté à établir des protocoles de vaccination qui ne favorisent pas la synthèse de cytokines qui exacerberaient la pathologie granulomateuse. Cependant, il faut garder à l'esprit que le granulome, à la base de la pathologie fibrosante, représente toutefois une sauvegarde pour l'hôte, en limitant la diffusion des toxines miracidiales. Il évite de sévères nécroses du

parenchyme hépatique, observées par exemple chez les souris Nude, déficientes en cellules T (Byram et Lichtenberg, 1977 ; phillips et Lammie, 1986 ; Amiri *et al*, 1992).

Parallèlement aux mécanismes effecteurs mis en place par l'hôte pour éliminer les organismes pathogènes, ces derniers élaborent des stratégies de défense qui leur permettent de se maintenir en place le plus longtemps possible au sein de son hôte.

2.3. Stratégies d'échappement à la réponse immune développées par le parasite

Dans le cas des parasites en général, et des schistosomes en particulier, les stratégies d'échappement ou de détournement de la réponse immune de l'hôte sont particulièrement élaborées, et font appel à des composantes très variées. Trois mécanismes sont mis en place pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte : le mimétisme moléculaire, l'induction d'anticorps bloquants et l'induction d'une immunosuppression de l'hôte.

2.3.1. Mimétisme moléculaire

Le schistosome détourne progressivement des composantes de l'hôte chez qui il se développe. Ainsi, le schistosomule acquiert passivement différentes molécules parmi elles, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Sher *et al*, 1978), des antigènes de groupe sanguin (Dean, 1974 ; Goldring *et al*, 1976). Les schistosomes sont alors masqués au système immunitaire et deviennent plus résistants aux mécanismes effecteurs (Damian, 1964). Le mimétisme moléculaire peut se traduire également par l'expression de structures antigéniques analogues à celles de l'hôte (Capron, 1965b). Le schistosome est également capable de fixer ou d'exprimer certains facteurs tels que le SCIP-1 (pour "schistosome complement inhibitor"), ou des protéases (m28) (Marikovsky *et al.*, 1988b) qui altèrent l'efficacité des réactions de défense non spécifiques médiées par les voies du complément (Fishelson, 1995).

2.3.2. Induction d'anticorps bloquants

Une façon très élaborée pour le parasite de contrecarrer les mécanismes effecteurs de type ADCC est de déclencher chez son hôte la production d'anticorps bloquants, de même spécificité que les anticorps effecteurs mais d'isotypie différente. Ces anticorps entrent alors en compétition sur une même cible : le schistosomule mais également sur les cellules effectrices, bloquant ainsi la lyse du jeune parasite. La notion d'anticorps bloquants a été dévoilée dans le modèle du rat grâce à la production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une glycoprotéine (Gp38) qui se trouve à la surface du schistosomule (Grzych *et al*, 1982). Des anticorps spécifiques d'un même épitope et d'isotypes différents peuvent avoir des fonctions biologiques opposées. L'un de ces anticorps, d'isotype IgG2a, est protecteur, puisqu'il est capable d'induire des mécanismes d'ADCC en présence d'éosinophiles et protège les animaux receveurs contre l'infection, lors d'expériences de transfert passif. Un autre anticorps d'isotype IgG2c, de même spécificité épitopique, abolit les effets protecteurs des IgG2a, dans des expériences *in vitro* et *in vivo* (Grzych *et al*, 1984). Cette compétition entre les anticorps effecteurs et les anticorps bloquants ne concerne pas uniquement l'épitope reconnu mais également les récepteurs Fc des immunoglobulines, sur les cellules effectrices. Cette observation expérimentale s'est confirmée dans la schistosomiase humaine où la présence d'anticorps dirigés contre des épitopes glycaniques de *S.mansoni* est corrélée avec la susceptibilité à la réinfection chez les enfants (Cf § 2.2.1).

2.3.3. Immunosuppression induite

Des travaux ont montré que les schistosomes adultes libèrent un facteur appelé SDIF (Schistosome Derived Inhibitory Factor) qui inhibe la dégranulation mastocytaire et la réponse IgE chez le rat, résultant en une diminution de l'activation des éosinophiles (Dessaint *et al*, 1977). De plus, le SDIF inhibe *in vitro*, la réponse proliférative des lymphocytes aux antigènes parasitaires ou à la stimulation par l'IL-2 (Mazingue *et al*, 1983 et 1986).

Par ailleurs, les schistosomules peuvent lier les IgG à leur surface : ils sécrètent des protéases dont l'action sur les IgG donne un peptide inhibiteur de nombreuses fonctions macrophagiques et altère profondément les capacités cytotoxiques du macrophage sur le parasite (Auriault *et al*, 1981 ; 1983a et b ; 1985).

La libération active de neuropeptides par le schistosome comme l'adrénocorticotropine (ACTH), l'hormone de stimulation des mélanocytes (α -MSH) et la β -endorphine, a été démontrée récemment : Duvaux-Miret *et al* (1992) rapportent leur rôle immunosupresseur aussi bien sur les immunocytes de l'hôte intermédiaire (mollusque) que sur les monocytes de l'hôte vertébré.

3. Approche vaccinale de la schistosomiase : l'antigène Sm28GST

Alors que la chimiothérapie représente aujourd'hui le seul moyen d'éliminer le parasite au sein de l'hôte définitif, son utilisation n'est pas dénuée d'effets secondaires et surtout elle ne prévient pas les réinfections fréquentes en zone d'endémie. Le développement de stratégies vaccinales, en complément de la chimiothérapie, a pour vocation de limiter l'expansion des schistosomiasés. Deux caractéristiques propres aux schistosomes sont à prendre en compte dans l'élaboration d'un vaccin : d'une part, les vers ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif et d'autre part, les oeufs sont les principaux responsables de la pathologie et sont un facteur de transmission. Un vaccin qui conduira à une protection contre le vers, même partielle, associée à une diminution de la fécondité des parasites ou de la réaction granulomateuse autour des oeufs limitera les formes aiguës de la maladie et contrôlera sa transmission.

Dans cette optique, et parmi de nombreuses préparations à potentiel vaccinant, six candidats vaccins produits de façon recombinante ont été retenus par l'OMS pour une évaluation chez l'homme (Bergquist, 1995).

Antigènes de *Schistosoma mansoni* à potentiel vaccinal retenus par l'OMS (d'après Bergquist, 1995)

Antigènes	Taille (kDa)	Localisation	Fonction	Protection			Références
				Souris	Rat	Autre	
Paramyosine (Sm97)	97	Schistosomule Vers adulte	Protéine du Muscle	30	ND	ND	Pearce <i>et al.</i> , 1988
IrV5	62	Tous stades	Protéine du Muscle	50-70	95	25 (babouin)	Amory Soisson <i>et al.</i> , 1992
Triose-phosphate-isomérase (TPI)	28	Tous stades	Enzyme	30-60	ND	ND	Shoemaker <i>et al.</i> , 1992
Sm23	23	Tous stades	Ag de membrane	40-50	ND	ND	Reynolds <i>et al.</i> , 1992 Köster <i>et al.</i> , 1993
Protéine fixant des acides gras (Sm14)	14	Schistosomule	Ag de membrane	65	ND	90-100 (lapin)	Tendler <i>et al.</i> , 1996
Glutathion-S-transférase (Sm28GST)	28	Tous stades	Enzyme	30-40	40-60	40-90 (babouin)	Balloul <i>et al.</i> , 1987 Boulanger <i>et al.</i> , 1991

3.1. Propriétés protectrices de l'antigène Sm28GST

Parmi ces six candidats, l'antigène Sm28GST, protéine à activité glutathion S-transférase de 28 kDa exprimée à divers stades du parasite, induit une immunité protectrice dans de nombreux modèles expérimentaux. Malgré quelques identités de séquence avec certaines isoformes de GST de mammifères (Hughes *et al.*, 1993), les épitopes cibles de la réponse immune ne correspondent pas aux zones d'identité, ce qui limite les risques de déclencher des réactions autoimmunes (Taylor *et al.*, 1988 ; Xiaochuan *et al.*, 1997). Le tableau ci-contre résume les études de protection réalisées avec l'antigène Sm28GST natif

ou recombinant ainsi qu'avec des peptides dérivés de la structure primaire de la molécule, dans différents modèles expérimentaux.

Effets protecteurs de la Sm28GST

Schistosome	GST	Antigène	Hôte	Protection (%)	Effet sur la fécondité	Références
<i>S.mansoni</i>	28	Native	Rat	50-72		Balloul <i>et al.</i> , 1987a
	28	Native	Souris	40-43		Balloul <i>et al.</i> , 1987a
	28	Clonée	Babouin	38	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1991
	28	Clonée	Souris	27-36	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1991
	28	Clonée	Rat	67		Balloul <i>et al.</i> , 1987b
	28	Clonée	Hamster	52		Balloul <i>et al.</i> , 1987b
	28	Clonée	Patas	Non	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1995
	28	Peptide T-épitopique	Souris	40-50	Oui	Wolowczuk <i>et al.</i> , 1991
	28	Peptide C-terminal	Souris	40	Oui	Xu <i>et al.</i> , 1993
	28	Peptide N-terminal	Souris	20	Oui	Xu <i>et al.</i> , 1993

La Sm28GST native recombinante induit une immunité protectrice chez le rat et le hamster (Balloul *et al.*, 1987a, Balloul *et al.*, 1987b; Grezel *et al.*, 1993), le babouin (Balloul *et al.*, 1987c; Boulanger *et al.*, 1991a) et la souris (Boulanger *et al.*, 1991a; Xu *et al.*, 1993; Pancré *et al.*, 1994b; Wolowczuk *et al.*, 1989). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50 à 70% chez le rat, de 30 à 45% chez la souris et 40% chez le babouin. Cependant, d'importantes variations individuelles sont notées dans ce dernier modèle, en effet, les taux individuels de protection varient de 0% à 80%. Toutefois, même chez les animaux peu protégés, un effet sur la diminution de la taille des granulomes périovulaires hépatiques et sur l'excrétion fécale d'oeufs est observé (Boulanger *et al.*, 1991a). De même, les singes *Patas patas* immunisés par la Sm28GST puis infestés par des cercaires de *S. haematobium* présentent des lésions vésicales moins importantes (Boulanger *et al.*, 1995).

Les effets protecteurs de la Sm28GST au niveau d'une réduction de la charge parasitaire, dans certains modèles expérimentaux et suivant le protocole d'immunisation

utilisé, sont accompagnés d'une réduction de la fécondité des vers femelles qui se traduit par une diminution des oeufs excrétés et/ou une diminution de la charge tissulaire en oeufs (Boulanger *et al*, 1991b ; Wolowczuck *et al*, 1989). En effet, l'immunisation par la Sm28GST contre une infection hétérologue par *S. haematobium*, chez le singe Patas, induit une réduction significative des oeufs excrétés dans les urines et les selles de 55% et 77% respectivement. De plus, la viabilité des oeufs urinaires est significativement diminuée par la vaccination (Boulanger *et al*, 1995). En résumé, la protection conférée par la Sm28GST, lors d'une immunisation, se manifeste par une réduction de la charge parasitaire et/ou l'inhibition de la fécondité du parasite.

Ces observations accentuent l'intérêt vaccinal de la Sm28GST dans le contrôle de la pathologie induite par les oeufs et la transmission de la schistosomiase, même lorsqu'il s'agit d'une infestation hétérologue (*S. haematobium*) (Boulanger *et al*, 1995). De même, l'homologue de la Sm28 GST, l'antigène Sb 28GST de *Schistosoma bovis*, induit, chez le bétail, une protection contre *S. bovis* mais également contre *S. matthei* (Bushara *et al*, 1993 ; Boulanger *et al*, 1994 ; De Bont *et al*, 1997)

3.1.1. Sm28GST et anticorps

3.1.1.1. Activité enzymatique et expression de l'immunité

Alors que les travaux précédents démontraient le rôle de la Sm28GST dans l'expression d'une immunité à deux niveaux contre le parasite (réduction de la charge parasitaire et/ ou une réduction de la fertilité des vers femelles et de la viabilité des oeufs), Xu *et al* ont montré l'implication du site enzymatique de la molécule dans l'immunité anti-fécondité. Ainsi, deux anticorps monoclonaux dirigés contre la Sm28GST ont été caractérisés : l'anticorps S13 d'isotype IgM qui est capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST et l'Ac H12 également d'isotype IgM, mais qui ne bloque pas l'activité enzymatique de la Sm28GST. S13 et H12 entraînent, par transfert passif, une réduction du nombre de vers de 45% et 34%, respectivement, chez le rat Fischer préalablement infecté par *S. mansoni* (Xu *et al*, 1991).

Chez la souris BALB/c, l'Ac monoclonal S13, inhibiteur, entraîne une diminution du nombre de vers mais également une forte réduction du nombre d'oeufs dans les tissus ainsi qu'une réduction de la viabilité des oeufs *in vivo* et *in vitro*. A l'opposé, l'Ac H12, non inhibiteur, n'induit qu'une réduction de la charge parasitaire (Xu *et al*, 1991).

Ces résultats laissent donc supposer un lien entre l'inhibition de l'activité GST et l'immunité anti-fécondité et révèlent une dissociation des effets protecteurs.

3.1.1.2. Peptides de la Sm28GST

Différents peptides ont été synthétisés en se basant sur la structure primaire de la Sm28GST suivant des critères d'hydrophobicité, d'accessibilité et de mobilité. Trois régions épitopiques particulières sont ressorties : les peptides 23-43 et 190-211 qui sont impliqués dans la composition du site actif de la molécule et le domaine central peptidique 115-131. Les propriétés protectrices des peptides correspondant à ces régions épitopiques, ont été étudiées chez la souris et le rat. La vaccination par le peptide 115-131 (contenant l'épitope B et T de la Sm28GST) conduit à une réduction de 40 à 45% de la charge parasitaire et induit la production d'anticorps aux propriétés larvicides (Wolowczuck *et al*, 1991a). Chez la souris, l'immunisation par les peptides N-terminal (10-43) et C-terminal (190-211) de la molécule, séquences impliquées dans le site actif de la molécule, conduit à une réduction de la ponte et de la viabilité des oeufs, mais est sans effet sur la charge parasitaire (Xu *et al*, 1993).

3.1.2. Sm28GST et réponse cellulaire T

Le transfert passif de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de souris immunisées par Sm28GST, à des souris saines n'induit pas de réduction de la charge parasitaire vis à vis d'une infection d'épreuve mais une forte diminution du nombre des oeufs hépatiques (Wolowczuk *et al*, 1991b).

La réponse cellulaire T contre la Sm28GST joue un rôle important par son implication dans la réduction du nombre d'oeufs dans le foie et dans la diminution de la

pathologie hépatique, évaluée sur le dépôt de collagène contenu dans le foie des souris infectées (Pancre *et al*, 1994a). L'étude des mécanismes de protection montre que les cellules T spécifiques de la Sm28GST (C-terminal) essentielles pour la protection, produisent peu d'IL-4 mais un niveau élevé d'IFN- γ (Pancre *et al*, 1994a) confirmant son rôle inhibiteur sur la synthèse du collagène qui accompagne le granulome (Czaja *et al*, 1987).

Récemment, il a été mis en évidence que l'immunisation par la Sm28GST induit une réponse T cytotoxique, par des lymphocytes TCD8⁺ de CMH classe 1. Les mêmes auteurs observent aussi que l'immunisation par le lipopeptide (C-terminal 190-211) de la molécule induit une activation CTL identique à celle de la molécule complète, suggérant l'utilisation possible de ces formulations dans un but vaccinal.

3.1.3. Sm28GST dans l'infection humaine

Des études épidémiologiques indiquent que l'antigène Sm28GST est reconnu par les sérums d'individus infectés par *S. mansoni*. Ainsi, sur 129 enfants bilharziens kenyans âgés de 9 à 16 ans, 97% ont des IgE spécifiques de l'antigène Sm28GST, 64% présentent des IgA anti-Sm28GST et 47% des IgG anti-Sm28GST (Auriault *et al*, 1990). Après traitement chimio-thérapeutique, les enfants classés comme susceptibles à la réinfection, présentent beaucoup plus d'IgG4 et beaucoup moins d'IgG1 spécifiques de l'antigène Sm28GST que ceux définis comme résistants à la réinfection. Par contre, aucune différence n'a été observée dans les taux d'IgG3, d'IgE ou d'IgA.

Une étude réalisée en zone d'endémie à *S. mansoni* au Kenya, a montré que 77% des enfants infectés par ce parasite ont, parmi leurs lymphocytes périphériques, des cellules spécifiques de l'antigène Sm28GST (Wolowczuk, 1991b). Ces différentes études montrent donc que la Sm28GST est également un antigène majeur chez l'homme.

3.2. La réponse IgA et l'antigène Sm28GST

Différentes observations ont révélé le rôle des IgA dans l'expression de l'immunité anti-schistosome. En effet, la réponse IgA spécifique de l'antigène Sm28GST et de ces différents peptides a été évaluée avant et 6 mois après traitement chez des patients kenyans infectés par *S. mansoni* (Grzych *et al*, 1993). Cette étude a révélé une association entre les taux d'IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST et du peptide 115-131, qui augmentent avec l'âge, et l'acquisition de la résistance à la réinfection. De plus, des études fonctionnelles, *in vitro*, ont mis en évidence les effets neutralisants des IgA sur l'activité enzymatique de la Sm28GST. Parallèlement, cet isotype altère la fécondité des schistosomes en limitant la ponte des oeufs mais également en réduisant leur capacité à éclore et libérer des miracidiums viables. Simultanément à cette étude qui révèle la participation des anticorps IgA dans les mécanismes d'anti-fertilité, des études conduites chez le rat immunisé par l'antigène Sm28GST ont mis en évidence les propriétés larvicides de cet isotype, en présence d'éosinophiles (Grezel *et al*, 1993). Très récemment, les propriétés neutralisantes des IgA ont été confirmées dans une étude conduite chez des patients infectés par *S. mansoni* avant traitement (Remoué *et al*, 1998 soumis). Cette étude révèle que les individus ayant une faible intensité d'infection sont ceux qui expriment les taux d'IgA (chez la femme) ou d'IgG3 (chez l'homme) et les potentiels d'inhibition de l'activité enzymatique de la Sm28GST maximums. De plus, les sérums de ces patients reconnaissent les épitopes impliqués dans le site enzymatique et sont associés à l'inhibition de l'activité enzymatique. Ces observations suggèrent que les anticorps IgG3 et les IgA neutralisants sont importants dans l'expression de l'immunité contre *S. mansoni* et que l'acquisition de la réponse immune est dépendante du sexe.

L'ensemble de ces travaux souligne l'importance des IgA dans l'expression de l'immunité anti-schistosome, à deux niveaux : tant dans les mécanismes effecteurs anti-larvaires que dans les mécanismes d'anti-fécondité, conduisant ainsi à une réduction des conséquences pathologiques et du potentiel de transmission de la maladie.

Ces différentes observations nous ont conduits, dans ce travail de thèse, à étudier les mécanismes impliqués dans l'induction et la production d'un tel isotype, au cours de la schistosomiase expérimentale murine.

**L'IMMUNOGLOBULINE A
ET LE TISSU LYMPHOIDE MUQUEUX
ASSOCIE A L'INTESTIN (GALT)**

Les muqueuses de l'organisme sont les principales voies d'introduction d'agents pathogènes puisqu'elles sont présentes au niveau de tous les tractus. Dans le cas de la schistosomiase à *S. mansoni*, trois sites muqueux sont principalement exposés aux antigènes parasites : le premier site atteint est la peau, à travers laquelle pénètre la forme infestante, le deuxième site correspond aux poumons qui abritent le schistosomule et enfin, le site muqueux le plus exposé en terme de temps de contact et de pathologie est certainement la muqueuse intestinale. Dès la maturation sexuelle des vers, l'intestin subit, en continu, l'effraction des oeufs qui franchissent le système vasculaire mésentérique et perforent la paroi intestinale pour atteindre la lumière et être excrétés. En plus des phénomènes d'excrétion, une partie des oeufs reste bloquée dans le tissu intestinal, entraînant la réaction granulomateuse propre à la pathologie bilharzienne et la stimulation constante du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT).

Le mucus et le glycocalyx qui recouvrent l'épithélium des muqueuses représentent la première barrière de protection contre les toxines et enzymes libérées par les pathogènes. A cette composante non spécifique, s'ajoute la réponse spécifique du MALT, caractérisée par la prédominance des immunoglobulines A sécrétées en quantités très supérieures à celles des IgG (Mestecky et Mc Ghee, 1987 ; van der Heidjen *et al*, 1987). Cet isotype représente une défense essentielle contre de nombreux pathogènes invasifs ou non. L'induction de cette réponse a lieu dans les tissus lymphoïdes muqueux, au niveau des plaques de Peyer pour le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin (ou GALT) puis les lymphocytes exprimant des IgA membranaires sont alors redistribués dans différents sites effecteurs muqueux où ils terminent leur maturation en cellules productrices d'IgA.

1. L'IgA, l'isotype majeur des muqueuses

Les concentrations relativement faibles des IgA dans le sérum, comparées à celles des IgG ont longtemps fait penser que cet isotype était une classe mineure. Actuellement, il est démontré que l'organisme synthétise plus d'IgA que tous les autres isotypes confondus, de part l'étendue de ses surfaces muqueuses (Mestecky et Mc Ghee, 1987). Les concentrations faibles d'IgA sériques sont en fait imputables à un catabolisme hépatique plus rapide que celui des IgG (Mestecky, 1992).

1.1. Aspects structuraux

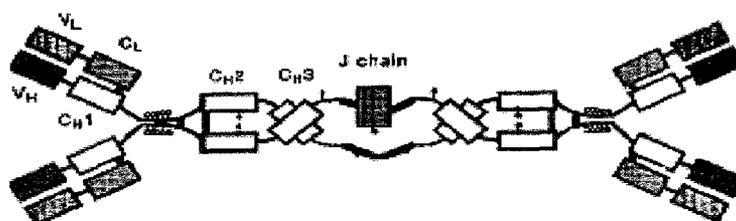
1.1.1. Structure de l'IgA

Comme toutes les immunoglobulines, les IgA sont composées de deux chaînes légères identiques et de deux chaînes lourdes. La majorité des espèces ne possède qu'un seul isotype d'IgA, à l'exception des lagomorphes qui présentent 13 sous-classes d'IgA et de l'homme chez qui il existe deux sous-classes, les IgA1 et les IgA2. Ces deux isotypes diffèrent, d'une part, en fonction de leur distribution dans les fluides biologiques : 85% des IgA sériques sont des IgA1 alors que dans les muqueuses et les sécrétions externes, la proportion d'IgA2 augmente jusqu'à 50% (Mestecky *et al*, 1986). D'autre part, les IgA2 présentent des différences structurales au niveau de la région charnière telles qu'une délétion de 13 acides aminés et une glycolysation beaucoup plus importante (Tomana *et al*, 1976). Ces différences et la présence de nombreux résidus glycaniques sur les IgA, à l'opposé des IgG et IgM confèrent aux IgA et plus particulièrement aux IgA2, une résistance accrue contre les protéases des micro-organismes présents dans les muqueuses (Shuster *et al*, 1971 ; Underdown *et al*, 1974).

1.1.2. Polymérisation des IgA

Les IgA sont présentes sous forme monomérique (dans le sérum) ou multimériques, le plus souvent dimériques. Ce phénomène de polymérisation est unique aux IgA et IgM et a lieu grâce à une glycoprotéine de 15 kDa : la chaîne J, produite par les lymphocytes B à différents stades de développement et les plasmocytes (Koshland, 1985). Une seule chaîne J relie, par l'intermédiaire de ponts disulfures, les pièces tail de deux monomères d'IgA (Hexham *et al*, 1997) tandis que les résidus cystéines des deux autres pièces tail s'associent et stabilisent le dimère formé. Bien que la chaîne J ne soit pas toujours nécessaire à la formation des polymères (surtout dans le cas des IgM), il semblerait qu'elle stabilise les structures polymériques (Hexham *et al*, 1997).

Structure de l'IgA1 dimérique



D'après Bastian et al (1992)

1.1.3. L'IgA sécrétoire

Les IgA sécrétoires produites localement sont parmi les éléments les plus importants de la réponse humorale protectrice au niveau des muqueuses. Les IgA sécrétoires sont des IgA multimériques auxquelles est lié covalamment (à un monomère) le composant sécrétoire (SC) constitué de 5 domaines homologues aux immunoglobulines (Mostov *et al*, 1985 ; 1994). La production d'IgA sécrétoires découle d'un phénomène actif de transport ou transcytose des IgA dimériques (dIgA). Les dIgA sécrétées par les plasmocytes se lient au récepteur (SC) exprimé sur la membrane basale des cellules épithéliales ou des hépatocytes des rongeurs et le complexe dIgA-SC est internalisé et transporté jusqu'à la membrane

apicale de la cellule épithéliale où il est clivé de sa partie transmembranaire. Les IgA sécrétoires conservent donc toute la région extracellulaire du récepteur. La présence du composant sécrétoire renforcerait le caractère de résistance à la protéolyse que possède cet isotype particulier (Butor *et al*, 1995).

Différentes études montrent que la production d'IgA sécrétoire est à la fois sous le contrôle du système immunitaire et influencée par le système endocrinien. Ainsi, des doses physiologiques d'oestradiol augmentent la réponse immune au niveau muqueux alors que des fortes doses expérimentales ou la progestérone l'inhibent. D'autre part, l'augmentation des taux d'IgA sécrétoires semble être liée à une augmentation du transport par le composant sécrétoire plutôt qu'à une augmentation de la synthèse d'IgA.

1.2. Aspects fonctionnels

Le rôle le plus couramment décrit pour les IgA exudées ou transportées dans les sécrétions est un rôle de barrière physique impliquée dans l'exclusion immune des pathogènes présents dans la lumière intestinale. Différents auteurs ont élargi cette notion en démontrant une participation active des IgA à des niveaux supérieurs à une simple association avec le mucus qui borde l'épithélium (Mazanec *et al*, 1993 ; Lamm *et al* 1995).

1.2.1. Distribution des plasmocytes à IgA

La présence de plasmocytes à IgA a été détectée dans la moëlle osseuse, la rate et les ganglions mais également dans les glandes exocrines telles que les glandes lacrymales, salivaires et mammaires et dans les différents sites muqueux associés aux tractus gastro-intestinal, respiratoire et uro-génital. Il existe une prépondérance très marquée des plasmocytes à IgA dans les tissus sécréteurs qui renferment 80% de cellules productrices d'IgA, 13% de plasmocytes à IgM et 7% de cellules productrices d'IgG ou d'IgD. Ces proportions sont inversées dans les organes lymphoïdes non muqueux dans lesquels on

retrouve 50% de plasmocytes producteurs d'IgG, 30% à IgA et 18% à IgM ou IgD (Mestecky *et al*, 1992). Brandtzaeg *et al* (1994) ont largement documenté la distribution des immunocytes producteurs d'IgA, chez l'homme. Ces auteurs confirment la prédominance des IgA par rapport aux autres isotypes dans tous les tissus excréteurs. Ils montrent également que la distribution des sous-classes d'IgA varie également en fonction des muqueuses et au sein même de la muqueuse concernée. Ainsi, alors que les IgA1 prédominent dans la majorité des glandes exocrines et des muqueuses, le nombre d'IgA2 augmente progressivement de la muqueuse gastrique au colon pour finalement devenir majoritaire au niveau du rectum.

1.2.2. Les IgA et la défense des muqueuses

Dans le tractus intestinal, le système immunitaire doit faire face non seulement aux organismes pathogènes et aux antigènes alimentaires mais il maintient également en équilibre la flore commensale. Plusieurs auteurs ont mis en évidence le rôle neutralisant des IgA à l'aide de sondes monoclonales spécifiques de pathogènes. Ces différents anticorps confèrent une protection contre les virus respiratoires tels que le virus Sandaï (Mazanec *et al*, 1987) ou le virus de l'Influenza (Renegar et Small, 1991 a, b) ou contre *Vibrio cholerae* (Winner *et al*, 1991).

1.2.2.1. Les IgA sécrétoires, barrière physique

Les IgA peuvent empêcher l'adhérence des pathogènes aux cellules épithéliales en les agglutinant. Elles entourent le micro-organisme et la plus grande hydrophobicité des fragments cristallisables, comparée aux autres isotypes, empêche l'attachement des complexes formés aux récepteurs et évite la pénétration des micro-organismes. Ainsi, des concentrations importantes d'IgM ou d'IgA sécrétoires spécifiques de l'hémagglutinine du virus de l'influenza inhibent l'attachement cellulaire du virus (Armstrong *et al*, 1992).

Une autre propriété des IgA sécrétées dans la lumière est la neutralisation des enzymes et toxines des bactéries entériques (Majumdar et Ghose, 1981 ; Lycke *et al*, 1987). Un autre aspect du rôle des IgA est l'exclusion immune des substances antigéniques dérivant de l'alimentation. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Cunningham-Rundles *et al*, (1978) qui démontrent que des patients déficients en IgA présentent une absorption augmentée des antigènes alimentaires ainsi que des complexes immuns circulants, associés à une susceptibilité accrue aux allergies atopiques et aux maladies auto-immunes.

Ces différentes observations soulignent le rôle de cet isotype en tant que barrière protectrice limitant dans les situations physiologiques, en association avec le mucus, les phénomènes de protéolyse et le péristaltisme, l'entrée d'antigènes et par conséquent la sur-activation du système immunitaire, mais également en empêchant l'invasion des micro-organismes pathogènes.

1.2.2.2. Les IgA dans le tissu lymphoïde muqueux

Les différents mécanismes mis en place au niveau de la lumière intestinale ne suffisent pas toujours à inhiber l'entrée de certains pathogènes très bien adaptés pour neutraliser l'activité des IgA. Cependant, Mazanec *et al* (1993) démontrent que les IgA peuvent également agir au niveau des cellules épithéliales, lors de leur transcytose vers la lumière, ou directement dans la lamina propria ou chorion. En effet, les IgA produites dans la lamina propria sous l'épithélium, ne peuvent pas franchir les jonctions serrées. Pour être excrétées dans la lumière, les IgA se fixent sur le récepteur polymérique (ou composant sécrétoire, Cf § 1.1.3) présent à la surface basale des cellules épithéliales, sont internalisées et transportées dans des vésicules jusqu'à la membrane apicale. Certains micro-organismes tels que les virus nécessitent obligatoirement un passage par voie intra-cellulaire. Mazanec *et al* (1993), dans un modèle *in vitro* d'épithélium polarisé, montrent que les IgA spécifiques du pathogène le reconnaissent et le complexent au cours de leur transcytose, et évitent ainsi, au niveau intra-cytoplasmique, l'assemblage des protéines virales et donc la multiplication et la colonisation du pathogène dans le tissu muqueux.

Un autre site d'action des IgA serait la lamina propria dans laquelle se situent les plasmocytes producteurs d'IgA. Au sein de ce site, il est possible de trouver des antigènes alimentaires ou microbiens qui ont été absorbés intacts (Paganelli *et al*, 1981). Les IgA polymériques produites localement complexent ces antigènes. L'équipe de Lamm montre que les complexes formés par les IgA, contrairement à ceux formés avec les IgG peuvent emprunter la voie de transcytose des cellules épithéliales et être évacués vers la lumière, réduisant leur chance de gagner la circulation sanguine (Lam *et al*, 1995). Une autre particularité très intéressante des IgA est leur très faible capacité à activer le complément et donc à engendrer des phénomènes inflammatoires, à l'opposé des IgG et des IgM (Pfaffenbach *et al*, 1982), ce qui représente un avantage considérable dans la défense de sites muqueux en état de constante stimulation.

Les différentes études rapportées dans ces deux paragraphes suggèrent que les anticorps IgA promeuvent une défense de l'hôte à trois niveaux, plus au moins adaptés selon le site concerné. Le rôle traditionnel d'une barrière luminale s'applique dans le cas d'anticorps pré-existants, après l'élimination de l'infection ou dans le cas d'immunisation. Si de nouveau, les organismes pathogènes gagnent l'épithélium, la réponse spécifique devrait suffire à contrecarrer l'infection. D'autre part, si l'épithélium est le site d'une infection virale, les IgA nouvellement induites pourront neutraliser le pathogène à l'intérieur même des cellules épithéliales. Si le pathogène gagne la lamina propria, les IgA produites localement pourront interagir et aider à son évacuation. Ces propriétés conférées aux IgA nouvellement induites au sein du tissu lymphoïde muqueux vont s'ajouter à celles des IgA déjà en place au niveau de la lumière intestinale. Ces aspects fonctionnels ainsi que le caractère non inflammatoire des IgA en font une composante essentielle dans la défense des muqueuses de l'organisme.

2. Le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin ou GALT

Le système immunitaire muqueux (MALT) est particulièrement complexe, il met en place une immunité locale comprenant une composante non spécifique et une réponse adaptative, donc inductible et spécifique, pour constituer une barrière à l'entrée des micro-organismes. La réponse immunitaire locale est induite au niveau des follicules lymphoïdes et de leur épithélium associé. Les lymphocytes activés et différenciés dans le site inducteur poursuivent leur maturation dans les ganglions drainant la muqueuse intestinale et repeuplent ensuite l'épithélium et le chorion (ou lamina propria) où ils se différencient en cellules effectrices. Une caractéristique du MALT provient du fait que les lymphocytes activés dans un site muqueux distant peuvent se localiser sélectivement dans un autre site. Cette connexion entre les différents systèmes muqueux permet à l'immunité induite à un site anatomique de protéger une autre muqueuse. L'immunité systémique, elle, n'intervient que lorsque les mécanismes locaux de protection se sont avérés inefficaces.

2.1. Caractéristiques générales du GALT

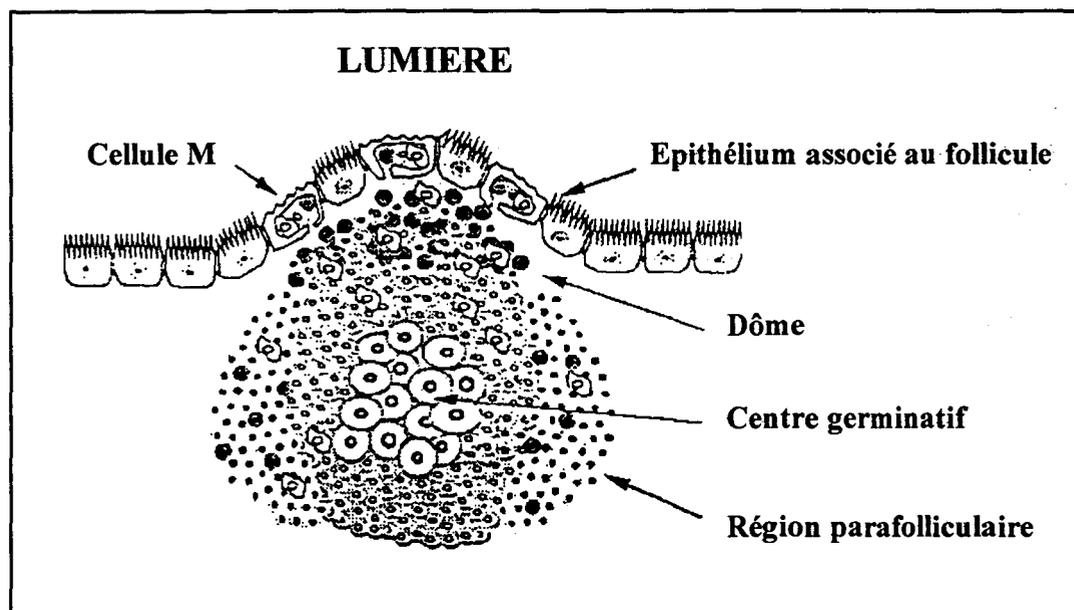
Le tissu lymphoïde muqueux le plus étudié est certainement celui associé à l'intestin. Ce tissu est constitué de structures organisées telles que des follicules lymphoïdes regroupés au sein des plaques de Peyer, les ganglions mésentériques qui drainent la muqueuse intestinale et des nodules lymphoïdes isolés, et d'éléments lymphoïdes non organisés comme les lymphocytes intra-épithéliaux et les lymphocytes de la lamina propria.

2.1.1. Les plaques de Peyer : site inducteur de la réponse muqueuse

Les plaques de Peyer regroupent plusieurs follicules lymphoïdes et sont localisées sur la face anti-mésentérique de l'intestin. Les follicules sont séparés les uns des autres par une région parafolliculaire et comportent un domaine en forme de dôme qui les sépare de

l'épithélium qui leur est associé (FAE). Histologiquement, les follicules lymphoïdes diffèrent des ganglions car ils ne sont pas drainés par un canal lymphatique afférent et ils ne comportent pas de capsule ni de medulla. Par contre, ils renferment un centre germinatif et une zone périphérique parafolliculaire (Cf figure ci-dessous).

Structure d'un follicule lymphoïde avec son épithélium associé



D'après Kraehenbuhl et Neutra, Physiological Reviews, 1992, Vol.72, 4, 853-879

Induction de la réponse locale dans les plaques de peyer

Le phénotype des lymphocytes et des cellules épithéliales associées au follicule a été décrit dans plusieurs espèces. Au niveau des plaques de Peyer, l'épithélium associé aux follicules comporte beaucoup moins de cellules à mucus que dans les régions sans plaques. Par contre, on y rencontre un type particulier d'entérocytes, les cellules M comportant des jonctions serrées avec les cellules épithéliales jointives. Ces cellules forment des poches intra-épithéliales qui contiennent des lymphocytes B immatures exprimant les IgD, des lymphocytes T mémoires CD45RO⁺ et un petit nombre de macrophages. Les cellules M expriment les molécules de CMH classe II mais leur rôle en tant que cellules présentant

l'antigène reste controversé. La principale fonction de ces cellules est un rôle d'échantillonnage des antigènes présents dans la lumière intestinale (Neutra et Kraehenbuhl, 1994). Elles prennent en charge les antigènes qui présentent des capacités d'adhérence spécifique (micro-organismes) ou des critères physico-chimiques adéquats, et ne les dégradent pas (Owen *et al*, 1986 a et b). Le transport des antigènes par les cellules M les amènent au contact de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles présentes soit dans la poche des cellules M (Ermak *et al*, 1994) soit dans le dôme sous l'épithélium, comme les macrophages (Sobhon, 1971) ou les cellules dendritiques (Kelsall et Strober, 1996), présentes également dans les zones parafolliculaires et interfolliculaires. La majorité des lymphocytes T dans les follicules sont $CD4^+$ et se trouve concentrée dans ces deux zones et la région du dôme. C'est dans le dôme que le premier contact se fait entre les lymphocytes B naïf et l'antigène apprêté. Les lymphocytes B du dôme et de la région parafolliculaire sont des lymphocytes naïfs qui expriment les IgM et les IgD (Gearhart et Cebra, 1981 ; Spencer *et al*, 1986) et sont activés par le contact avec l'antigène, les lipopolysaccharides des bactéries ou les super-antigènes. Parallèlement à l'activation, l'expression des molécules de CMH classe II et du récepteur à l'IL-5 est augmentée. L'IL-5 sécrétée par les lymphocytes Th2 présents dans les plaques de Peyer induit la prolifération des lymphocytes B activés par l'antigène et entraîne leur migration dans le centre germinatif. L'analyse phénotypique des lymphocytes du centre germinatif des follicules révèle une majorité de lymphocytes B en division exprimant les IgA (Lebman *et al*, 1987). Le micro-environnement au sein du centre germinatif, et plus particulièrement la présence de cytokines, telles que le TGF- β , l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 induisent la commutation isotypique des lymphoblastes IgM^+ en lymphoblastes IgA^+ . Parallèlement aux mécanismes de commutation, les lymphoblastes du centre germinatif et les cellules dendritiques peuvent présenter l'antigène aux lymphocytes T et les activer.

Les lymphoblastes T et B, spécifiques de l'antigène, quittent ensuite le centre germinatif via les ganglions mésentériques et gagnent la circulation sanguine à partir du canal thoracique. Ils se redistribuent dans différentes muqueuses et tissus excréteurs par l'interaction de molécules d'adhésion présentes à leur surface et à la surface des veinules

endothéliales qui irriguent les différents sites. Cette migration et la redistribution des lymphocytes B IgA⁺ induits dans un site muqueux vers un autre site muqueux est essentielle pour assurer l'échantillonnage des antigènes présents au sein de la muqueuse intestinale et la représentation du répertoire antigénique dans d'autres sites. Ces phénomènes de migration permettent la dissémination des cellules effectrices et mémoires qui assurent une surveillance immunologique des surfaces exposées aux pathogènes.

2.1.2. Le tissu muqueux diffus : site effecteur de la réponse muqueuse

Les lymphocytes T et B activés dans les sites inducteurs vont rejoindre leur site de domiciliation où ils vont exercer leurs fonctions effectrices. Ces sites font partie du tissu lymphoïde muqueux non organisé qui regroupe la lamina propria et l'épithélium intestinal. Les lymphocytes T dans ces sites effecteurs sont de deux types : les lymphocytes T CD3⁺ thymo-dépendants portant un récepteur T $\alpha\beta$ qui, comme 50% des plasmocytes à IgA de la lamina propria, dérivent de précurseurs sensibilisés à l'antigène dans les plaques de Peyer et sont principalement retrouvés dans la lamina propria, et les lymphocytes T qui dérivent de la moëlle osseuse, migrent dans l'épithélium, acquièrent, indépendamment du thymus, un récepteur T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, des chaînes CD8 α et β et possèdent un répertoire distinct des lymphocytes thymiques, et des propriétés cytotoxiques.

2.1.2.1. La lamina propria, site effecteur de la réponse anticorps

Les lymphocytes T

La lamina propria se situe entre l'épithélium et la sous-muqueuse et elle contient des lymphocytes T, des plasmocytes à IgA, des macrophages et des cellules dendritiques. Les lymphocytes T de la lamina propria sont d'origine thymique, ils représentent 40 à 90% des lymphocytes présents, la majorité exprime le CD4 et porte un récepteur T $\alpha\beta$. La faible proportion de lymphocytes T CD8⁺ présentent des fonctions cytolytiques et exprime le

CD28 (Abreu-Martin et Targan, 1996). Ce sont principalement des lymphocytes mémoires qui ont déjà rencontrés l'antigène dans les plaques de Peyer et expriment le marqueur CD45 RO. Les lymphocytes T de la lamina propria sont des lymphocytes activés qui expriment fortement le récepteur à l'IL-2, les molécules de CMH de classe II et l'intégrine $\alpha\beta 7$, intégrine impliquée dans la rétention des cellules activées, dans les sites muqueux. L'activation des lymphocytes domiciliés dans la lamina propria diffère de celle des lymphocytes T périphériques dans le sens où ils prolifèrent mal suite à la stimulation de leur TCR par les antigènes auxquels ils ont été déjà sensibilisés ; au contraire, ils prolifèrent et produisent des cytokines suite à la stimulation du CD2 et du CD28 (Pirzer *et al*, 1990 ; Qia *et al*, 1991, 1993 ; Targan *et al*, 1995). Le profil T auxiliaire est un profil majoritairement Th2, même si la production de cytokines Th1 et Th2 est nécessaire à l'homéostasie intestinale, entraînant ainsi la différenciation terminale des lymphoblastes IgA^+ en plasmocytes sécréteurs d'IgA.

La prolifération réduite des lymphocytes T de la lamina propria face à des antigènes connus et leurs voies peu classiques d'activation entraînent un état de non-réponse à la constante stimulation par les antigènes alimentaires et un haut degré d'implication dans l'expression d'une immunité spécifique des pathogènes via leur effet "helper" sur les lymphocytes B IgA^+ .

Les plasmocytes

(Voir aussi Les lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse, Chapitre III , § 2.2)

Les plasmocytes à IgA représentent 30 à 40% des cellules mononuclées de la lamina propria (Mac Donald *et al*, 1987). La moitié de ces plasmocytes dérive de lymphoblastes dont les précurseurs sont présents dans la moëlle osseuse et dont la sensibilisation aux antigènes de la lumière intestinale et la commutation isotypique vers l'IgA se sont effectuées au niveau des plaques de Peyer. Leur différenciation terminale en cellules productrices d'anticorps est stimulée par la présence de cytokines Th2 au sein du chorion. L'autre moitié des plasmocytes à IgA comprend des lymphocytes B non conventionnels, indépendants de la

moëlle osseuse, qui dérivent de la cavité péritonéale et représentent la première ligne de défense contre les pathogènes intestinaux. Les IgA sont assemblées en polymère avec la pièce J et sécrétées dans la lamina propria où elles sont ensuite prises en charge par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (CS) qui entraîne leur transcytose à travers les cellules épithéliales et conduit à la libération d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale.

2.1.2.2. L'épithélium, site effecteur de la réponse cellulaire

Quatre vingt quinze pour cent des lymphocytes intra-épithéliaux sont des lymphocytes T. Parmi ces lymphocytes T, 90% sont CD8⁺, les 10% restant étant CD4⁺. Ces lymphocytes sont répartis en trois catégories provenant de deux origines différentes. Trente pour cent des lymphocytes T exprime le CD8αβ en combinaison avec un récepteur Tαβ, ils sont thymo-dépendants et ont été sensibilisés et activés dans les plaques de Peyer et ce sont relocalisés au niveau de l'épithélium. Les deux autres tiers dérivent de la moëlle osseuse et existent en dehors de toute stimulation exogène. Ils se différencient dans l'épithélium intestinal, au contact des antigènes présents dans la lumière intestinale. Ce sont des lymphocytes T CD8αα porteur du récepteur T αβ ou γδ. Par ailleurs, les lymphocytes intra-épithéliaux immatures expriment RAG-1, enzyme responsable du réarrangement des gènes de leur récepteur T (Guy-Grand *et al*, 1992).

Fonctions et interactions avec les cellules du système immunitaire muqueux

Les lymphocytes intra-épithéliaux ont des fonctions cytotoxiques spécifiques de l'antigène ou polyclonales : ils sont capables de reconnaître les molécules d'histocompatibilité non classiques, ayant des similitudes avec les molécules de CMH de classe I, exprimées sur la face basolatérale des cellules épithéliales (Panja *et al*, 1993). Ils reconnaissent également les entérotoxines qui se comportent comme des super-antigènes et les protéines de stress dont la synthèse augmente au cours des agressions cellulaires. Ils renferment des granules dont le contenu peut être libéré au cours de réponses spécifiques de

l'antigène ou redirigées, conduisant à la destruction de leur cible (Ernst *et al*, 1985 ; Lefrançois, 1991). Aussi, il est possible d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'alloantigènes ou d'antigènes viraux chez les souris immunisées oralement par des cellules tumorales allogéniques ou des réovirus et rotavirus (Guy-Grand *et al*, 1991). Ces mécanismes de cytotoxicité et de dégranulation permettent la destruction des cellules épithéliales infestées par les virus ou recouvertes de toxines bactériennes ou dont la teneur en protéine de stress s'est accrue du fait de multiples agressions. Ils sont à la base du renouvellement cellulaire de l'épithélium, en effet, les cellules épithéliales se différencient dans les cryptes et ont une rotation de trois à quatre jours.

Les lymphocytes intra-épithéliaux possèdent des fonctions régulatrices des autres populations par le biais des cytokines qu'ils produisent et ils sont eux-mêmes régulés de manière paracrine et autocrine. En effet, les lymphocytes TCR $\gamma\delta^+$ sont activés et prolifèrent en présence d'IL-7 sécrétée de manière importante par les cellules épithéliales, et d'IL-2 dont l'origine pourrait être les lymphocytes intra-épithéliaux TCR $\alpha\beta^+$. De plus, les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta^+$ peuvent produire de l'IFN- γ et de l'IL-5 même en dehors de toute prolifération, avec cependant une propension à produire *in situ* des cytokines Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6, facteurs essentiels dans l'orientation isotypique vers l'IgA (Yamamoto *et al*, 1993 ; Hiroi *et al*, 1995). Ces lymphocytes, de part leur sécrétion orientée, peuvent donc être considérés comme effecteurs dans l'expression de la réponse B muqueuse. L'existence de souris mutantes, déficientes en cellules T $\gamma\delta$ a révélé une réduction de la réponse IgA (nombre de plasmocytes et production d'IgA diminués) (Fujihashi *et al*, 1996). Les mécanismes associés aux effets auxiliaires des lymphocytes TCR $\gamma\delta^+$ sur la réponse IgA ne sont pas encore connus mais la combinaison des trois types cellulaires, lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes Th2 $\alpha\beta$ et lymphocytes B-IgA $^+$ est un pré-requis à une réponse IgA muqueuse (Kiyono *et al*, 1996).

2.1.3. Domiciliation des lymphocytes dans les sites muqueux

La circulation des lymphocytes dans l'organisme est régie, très schématiquement, par des mécanismes d'adhésion et de désadhésion sélectives d'organes impliquant des molécules d'adhésion sur les lymphocytes, et des contre-récepteurs sur les endothéliums vasculaires, la matrice extracellulaire et l'épithélium. La domiciliation des lymphocytes au sein des sites muqueux se fait de manière spécifique par interaction de molécules d'adhérence exprimées à leur surface et à la surface des hautes veinules endothéliales dans le cas du tissu lymphoïde muqueux organisé et des petites veinules pour le MALT diffus. Les molécules d'adhésion sont classées en trois grandes familles structurales : les intégrines, les sélectines et la super-famille des immunoglobulines. La domiciliation des lymphocytes à l'intérieur d'un organe lymphoïde implique différentes étapes, qui simultanément à l'activation des lymphocytes, entraînent l'expression en cascade d'autres molécules. Pour pénétrer dans son site d'adressage, le lymphocyte qui roule sur les parois des veinules doit y adhérer puis s'extravaser à travers les cellules de l'endothélium et enfin gagner son site effecteur.

L' $\alpha 4\beta 7$ et l' $\alpha E\beta 7$: deux molécules d'adhésion aux sites muqueux

Deux intégrines sont impliquées dans la domiciliation des lymphocytes au niveau des muqueuses (Shaw et Brenner, 1995 ; Farstad *et al*, 1996). L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est exprimée sur les lymphocytes qui ont un tropisme pour la lamina propria et les plaques de Peyer . Son ligand est l'adressine MAdCAM-1 présente sélectivement à la surface des cellules endothéliales des veinules hautes. La deuxième intégrine mucosale, qui reconnaît la cadhérine E (Cepek *et al*, 1994 ; Higgins *et al*, 1998) présente à la surface des cellules épithéliales, est l' $\alpha E\beta 7$ exprimée par plus de 90% des lymphocytes T de l'épithélium ou les lymphocytes T CD8⁺ de la lamina propria (Kilshaw et Murant, 1991 ; Parker *et al*, 1992). Ces deux représentants de la sous-famille des intégrines $\beta 7$ interviennent dans l'adhérence et la rétention des lymphocytes activés au sein des muqueuses mais également des mastocytes qui partagent les mêmes récepteurs avec les lymphocytes T (Smith et Weis, 1996).

L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est exprimée aussi bien sur les lymphocytes mémoires et les cellules effectrices qui se lient à la lamina propria que sur les lymphocytes naïfs qui s'extravasent dans les plaques de Peyer. Par contre, l'intégrine $\alpha E\beta 7$ rencontrée presque exclusivement sur les cellules des sites effecteurs serait induite après extravasation. Malgré la découverte remarquable d'une interaction hétérotypique entre la cadhérine E et l' $\alpha E\beta 7$ qui permet d'expliquer la domiciliation des lymphocytes activés dans les sites muqueux, son action directe est cependant discutée (Cerf-Bensussan *et al*, 1988 ; Haury *et al*, 1993).

L'expression de ces deux molécules est régulée en fonction de l'activation des cellules mais également par les cytokines. Aussi, le TGF- β produit dans les plaques de Peyer et les cellules épithéliales diminue-t-il l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et augmente parallèlement celle de l' $\alpha E\beta 7$ (Smith *et al*, 1994).

2.3. Interleukines et orientation isotypique vers l'IgA

De très nombreux travaux réalisés *in vitro* ou *in vivo* ont été consacrés à l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'induction et l'expression préférentielle des IgA dans les sites muqueux. Ce paragraphe, bien loin de dresser une liste exhaustive des auteurs, a pour vocation d'intégrer les différentes interactions cellulaires, la sécrétion de cytokines et les étapes de différenciation terminale dans les sites effecteurs, en un schéma général qui permette d'expliquer la sécrétion préférentielle de cet isotype dans les muqueuses.

2.3.1. Interactions cellulaires dans les follicules lymphoïdes

La moitié des plasmocytes à IgA de la lamina propria proviennent de lymphocytes B exprimant presque exclusivement les IgA (75 à 80% des lymphocytes B) dans les centres germinatifs des plaques de Peyer. Ces cellules s'y divisent rapidement et sont maintenues dans un environnement de stimulation constante par les antigènes présentés dans les follicules. Les centres germinatifs existent de façon chronique dans les plaques de Peyer et

leur formation est dépendante de la présence de cellules T CD4⁺ que l'on retrouve en proportion très supérieure aux T CD8⁺ dans les zones interfolliculaires et de manière exclusive à l'intérieur du follicule. Kawanishi *et al* (1983) ont montré qu'au niveau clonal, les lymphocytes T des plaques de Peyer sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes IgM⁺ activés par le LPS en lymphocytes B IgA⁺. Ces premiers travaux ont été suivis de nombreuses études réalisées *in vitro* sous différentes conditions d'activation des lymphocytes B et ont conduit à l'implication cognitive des lymphocytes T CD4⁺ dans la différenciation des lymphocytes B IgA⁺. L'hypothèse, avancée par Kawanishi *et al* (1983), d'un type de cellules TCD4⁺ spécialisées dans la commutation des lymphocytes vers l'IgA (Th switch) dans les plaques de Peyer a été confirmée dix ans plus tard par Weiner et son équipe qui mettent en évidence une population de lymphocytes Th3 qui exprime le TGF- β et est régulée par l'IL-4 (Chen *et al*, 1994 ; Weiner, 1997). D'autres auteurs pensent que l'induction des lymphocytes B IgA⁺ dépend étroitement de la présence des cellules dendritiques présentant l'antigène (Spalding *et al*, 1986; Fayette *et al*, 1997). D'autre part, les nombreux travaux impliquant différentes voies de signalisation pour les lymphocytes B révèlent l'importance d'une activation via le CD40 (Defrance *et al*, 1992).

2.3.2. Régulation de la réponse IgA par les interleukines

La sécrétion de cytokines au niveau de la muqueuse intestinale est différente selon le site étudié (Cf tableau ci-dessous). Ainsi, les plaques de Peyer et l'épithélium renferment autant de cellules productrices d'IFN- γ que d'IL-5 avec cependant un nombre beaucoup plus important de cellules productrices dans l'épithélium. Par contre, la lamina propria représente le site le plus enrichi en lymphocytes Th2. Cette répartition corrèle avec les effets auxiliaires des différentes cytokines sur la génération de plasmocytes à IgA (Taguchi *et al*, 1990 ; Xu-Amano *et al*, 1992)

Caractéristiques des populations T des sites inducteurs et effecteurs muqueux chez la souris

Tissus muqueux	Fréquence des T-CD3 ⁺ (%)	Expression du récepteur T (%)		Fréquence des T-CD4 ⁺ (%)	Rapport Th1 : Th2	Rapport CD4 : CD8
		$\alpha\beta$	$\gamma\delta$			
Site inducteur						
Plaque de Peyer	25-35	> 90	1-5	60-65	1 : 1	2 : 1
Sites effecteurs						
Lamina propria	40-60	> 95	1-5	55-60	1 : 2-3	2 : 1
Lymphocytes intraépithéliaux	80-90	35-45	45-65	5-10	1 : 1	1 : 7-8

D'après Kiyono et Mc Ghee, Handbook of mucosal Immunology 1994 Academic Press, INC

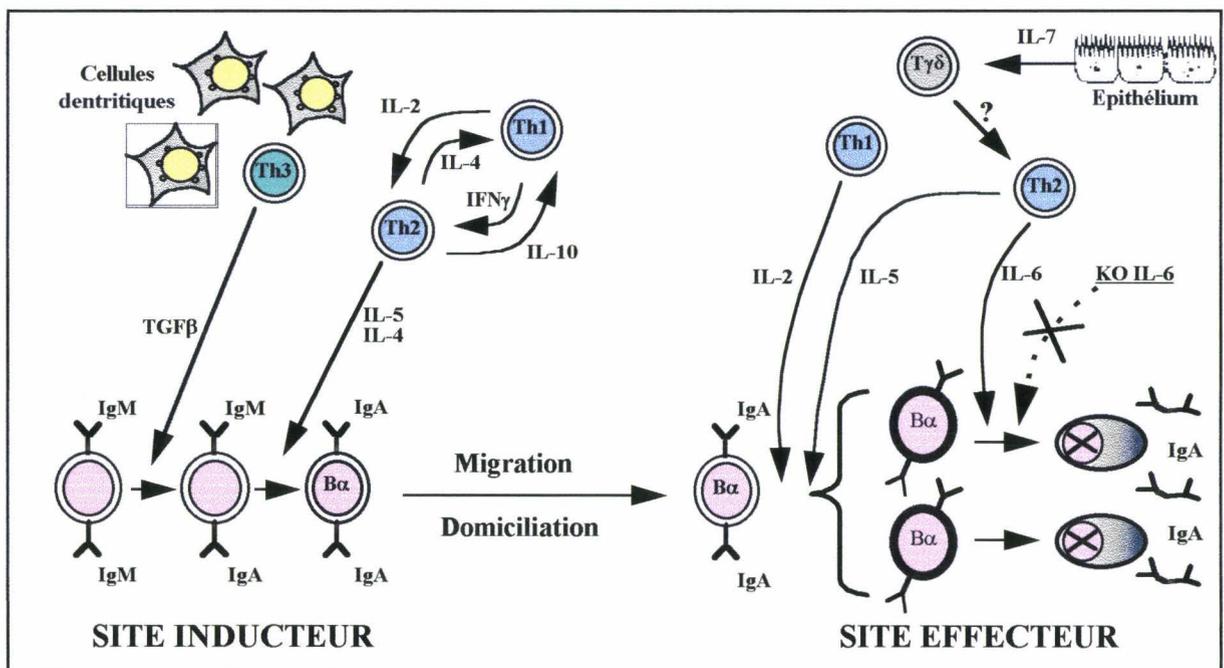
Les étapes de différenciation conduisant à la production d'IgA sont séquentielles et débutent dans les plaques de Peyer. La première étape après l'activation des lymphocytes B IgM⁺ est l'étape de commutation des chaînes lourdes des immunoglobulines vers la chaîne α qui implique l'expression des transcripts C α . Cette étape est dépendante chez l'homme comme chez la souris, de la présence du TGF- β , cytokine peptidique dont l'expression sous forme inactive est constitutive et ubiquitaire. Le clivage d'une partie du peptide rend la cytokine active et a lieu dans des environnements riches en protéases, tel que l'intestin soumis chroniquement aux protéases bactériennes. Cette cytokine induit la commutation isotypique des lymphocytes B IgA⁻ en lymphocytes B IgA⁺ (Coffman *et al*, 1989 ; Lebman *et al*, 1990). L'IL-2 et l'IL-4 et l'IL-5 augmentent également la sécrétion d'IgA dans les systèmes de culture *in vitro* (Coffman *et al*, 1987 ; Sonoda *et al*, 1989 ; Ehrhardt *et al*, 1992) soulignant ainsi l'implication des cytokines Th1 et Th2 dans la génération des

lymphocytes B IgA⁺ dans les centres germinatifs. Une étude récente renforce le rôle de ces deux sous-populations qui ensemble sont nécessaires à l'expression de la réponse IgA (Rizzo *et al*, 1995). L'action synergique de l'IL-4, à la différence de l'IL-2 ou de l'IL-5 semble promouvoir la commutation vers les lymphocytes B IgA⁺ (Lin *et al*, 1991 ; Wakatsuki et Strober, 1993). Chez l'homme, l'IL-10 coopère avec le TGF- β et induit la sécrétion d'IgA (Defrance *et al*, 1992). Dans les cas pathologiques de déficience en IgA, elle reverse même le blocage de la différenciation et entraîne l'apparition de plasmocytes à IgA (Brière *et al*, 1996).

L'IL-5 et l'IL-6 sont deux cytokines Th2 très bien représentées dans la lamina propria et l'épithélium de l'intestin. Bien qu'il soit difficile de caractériser au niveau cellulaire l'action des différentes interleukines, il apparaît clair que ces deux facteurs interviennent de façon postérieure à l'expression des IgA membranaires. Ils ne supportent aucune action dans la commutation isotypique vers l'IgA mais agissent en tant que facteurs de différenciation et maturation terminales. L'IL-5, *in vitro*, augmente la réactivité des lymphocytes B IgA⁺ seule ou en synergie avec l'IL-4, l'IL-6 ou le TGF- β (Beagley *et al*, 1988 ; Murray *et al*, 1987 ; Kunitomo *et al*, 1989 ; Coffman *et al*, 1989). Cette action est par ailleurs confirmée *in vivo* chez des animaux infectés par un virus recombinant exprimant l'IL-5 (Ramsay et Kohonen-Corish, 1993). L'IL-6, quant à elle, est une cytokine multi-fonctionnelle, très largement distribuée dans la muqueuse intestinale (Bao *et al*, 1993). Elle est impliquée dans la différenciation terminale des lymphocytes B IgA⁺ en plasmocytes sécréteurs d'IgA et elle augmente sélectivement la sécrétion *in vitro* des IgA à partir de lymphocytes B déjà commutés (Beagley *et al*, 1989 ; 1991). Le développement de souris déficientes en cytokine Th2, IL-4⁻, IL-5⁻ ou IL-6⁻ a permis de réviser le rôle de ces cytokines *in vivo* (Ramsay *et al*, 1996). Ces modèles révèlent que, malgré des centres germinatifs et des plaques de Peyer très réduits chez les souris déficientes en IL-4, l'IL-4 n'a en fait que peu d'incidence sur la commutation des lymphocytes B vers l'IgA mais que cette cytokine intervient dans le développement des lymphocytes Th2 et la réponse aux antigènes solubles. L'absence d'IL-5 n'entraîne pas de réduction de la réponse IgA locale mais elle diminue la proportion de lymphocytes B1 non conventionnels péritonéaux. A l'opposé de ces deux types de

déficiences, l'absence d'IL-6 réduit considérablement le nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA dans les muqueuses et entraîne des réponses B déficientes face aux antigènes conventionnels ou aux virus. Cependant, l'absence d'IL-6 n'est pas délétère à 100% en ce qui concerne le nombre de plasmocytes à IgA de la muqueuse intestinale puisque l'on retrouve 40% de plasmocytes à IgA chez ces animaux. Ils s'avèrent que ces plasmocytes à IgA dérivent de lymphocytes non conventionnels, les lymphocytes B1 dont l'origine est indépendante de la moëlle osseuse et qui n'ont pas été induits au niveau des plaques de Peyer. Ces lymphocytes B sont caractérisés par l'expression du marqueur CD5 et leur fréquence est importante dans la cavité péritonéale et ils représentent 50% des cellules productrices d'IgA dans la lamina propria. Ces travaux ont permis de démontrer l'existence d'une population de plasmocytes à IgA indépendante de l'IL-6 qui contribue de manière importante à la réponse intestinale chez les animaux déficients (Beagley *et al*, 1995).

Interactions cellulaires et cytokines impliquées dans l'orientation vers l'IgA



Les caractéristiques originales et les propriétés fonctionnelles, comprenant leur implication dans l'immunité muqueuse intestinale, de cette classe méconnue de lymphocytes

LUMIERE

Echantillonnage
de l'antigène

IgAs

Cytotoxicité

Mort du Pathogène

Renouvellement cellulaire

B naïfs
IgM⁺IgD⁺
B sensibilisés
IgA⁺



LAMINA PROPRIA
50% plasmocytes B2
50% plasmocytes B1
Th2 αβ

EPITHELIUM
LIE T CD8⁺
γδ, αβ

Cadhérine E

SANG

MAdCAM-1/HVE

Extravasation

TGF-β

MAdCAM-1/E

Extravasation

α4β7

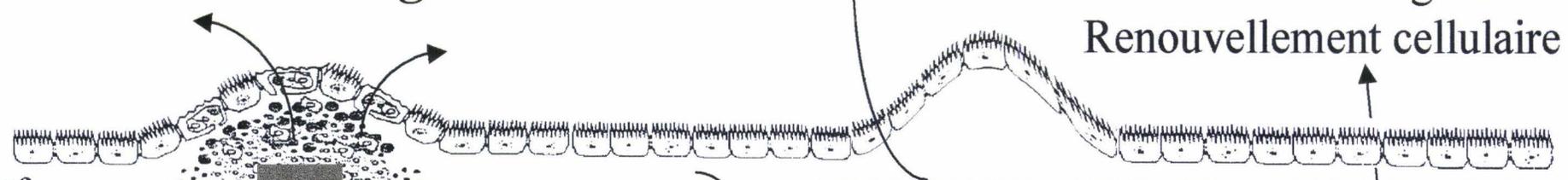
Lymphocytes naïfs

αEβ7

Lymphoblastes activés

Extravasation

Sites inducteurs et effecteurs, migration



B font l'objet d'une grande partie de notre travail de thèse et sont introduites dans le troisième chapitre de cette introduction.

3. La tolérance orale : commentaire

Après avoir décrit la régulation et les propriétés fonctionnelles du GALT, il était impossible de ne pas commenter une de ces plus grandes fonctions : ses propriétés de tolérance orale. Le GALT et les muqueuses en général sont constamment exposées à une variété immense d'antigènes alimentaires et bactériens. En fait, l'induction d'un état de non réponse ou tolérance orale est bien plus fréquent que le développement d'une réponse immunitaire spécifique d'un pathogène. C'est un état qui interrompt la réponse à un antigène exogène et qui relève d'un processus actif. Elle est définie par un status immunologique de non réponse à un antigène, induit par l'absorption orale de cet antigène.

3.1. Caractéristiques majeures de la tolérance orale (Revue par Elson *et al*, 1996)

Une caractéristique importante de la tolérance orale est qu'elle est spécifique de l'antigène introduit par voie orale, à la fois pour les réponses cellulaires et humorales et qu'elle est partielle et non définitive. Différents paramètres sont importants dans l'induction de la tolérance orale, l'antigène lui-même, la dose d'antigène et sa fréquence et la muqueuse concernée influencent son développement et les mécanismes par lesquels le système immunitaire parvient à ne plus répondre à l'antigène.

Pour qu'il y ait induction de la tolérance, l'antigène doit être délivré et apprêté. Les plaques de Peyer et l'épithélium intestinal sont deux sites probables pour l'induction d'une réponse suppressive.

3.2. Mécanismes immunitaires impliqués dans la tolérance orale (Revue par Weiner, 1997)

L'absence de réponse systémique à des antigènes ingérés découle de deux voies de tolérisation possible : soit par délétion clonale ou anergie, quand la dose d'antigène est forte, soit par induction d'une suppression active, quand les doses sont faibles. Cette dernière est engendrée par l'induction, dans les plaques de Peyer, d'un type de lymphocytes régulateurs TCD4⁺ Th3 qui migrent via les ganglions mésentériques dans le compartiment systémique (Weiner, 1997). Cette population de lymphocytes Th3 sécrète du TGF- β , cytokine immuno-suppressive et anti-inflammatoire qui intervient de façon prépondérante au niveau du GALT dans la commutation vers l'IgA et la domiciliation dans les veinules endothéliales des lymphocytes activés. Elle est régulée par l'IL-4 et elle est unique dans le sens où elle possède des fonctions auxiliaires sur la commutation des lymphocytes B dans les centres germinatifs des plaques de Peyer et des propriétés suppressives envers les lymphocytes Th1 et Th2 du système immunitaire. D'une manière générale, les cellules Th1 sont plus faciles à tolérer que les lymphocytes Th2 ou les lymphocytes B.

"The concept of the bystander suppression"

Le développement de mécanismes de tolérance orale représentent un potentiel thérapeutique important dans de nombreuses pathologies auto-immunes, chez l'animal comme chez l'homme. Ainsi, l'administration par voie orale d'antigènes auto-immuns a permis de limiter le développement de la maladie auto-immune. Cependant, dans de nombreuses maladies auto-immunes, les antigènes incriminés ne sont pas toujours connus. L'essentiel est d'induire, selon des protocoles d'administration favorables ou avec un antigène connu, des cellules Th3 régulatrices qui sécréteront alors de manière non spécifique du TGF- β qui supprimera l'inflammation dans le site où se trouve l'épitope propre à l'antigène ingéré. C'est cette induction de lymphocytes Th3 associée à la sécrétion de cytokines suppressives dont l'action concernera plusieurs antigènes pas forcément caractérisés mais potentiellement

inducteurs d'une maladie auto-immune, qu'on appelle Bystander Suppression. Cette propriété de la réponse suppressive est actuellement à l'étude dans de nombreuses maladies auto-immunes humaines.

**LES LYMPHOCYTES B1 :
UNE AUTRE ORIGINE POUR LES
PLASMOCYTES A IgA**

1. La lignée B1

Les lymphocytes B1 diffèrent des lymphocytes B2 conventionnels par leur origine, leur phénotype membranaire, leurs fonctions et leurs localisations. Cette notion de dichotomie au sein des lymphocytes B a émergé dans les années 1980 suite à la découverte du marqueur CD5 sur certains lymphocytes B (Manohar *et al*, 1982). L'antigène CD5, nommé Ly-1 à l'origine, est un antigène de surface initialement reconnu à la surface des cellules T. Sa mise en évidence à la surface des lymphocytes B par Hardy et Hayakawa (Hardy *et al*, 1982), a donné lieu à la classification des lymphocytes B en lymphocytes conventionnels B2, Ly-1 ou CD5 négatifs, qui n'expriment pas ce marqueur et représentent 95 % des cellules B dans la rate et les ganglions des adultes, et en lymphocytes B1 non conventionnels, d'origine distincte, rares dans la rate et abondants dans les cavités péritonéales et pleurales. Ces lymphocytes B1, (ou Ly-1 positifs, ancienne dénomination de moins en moins usitée), se subdivisent en lymphocytes B1a qui expriment l'antigène de surface CD5 et les cellules B1b (Ly-1 "sister") qui n'expriment pas cet antigène mais qui portent toutes les caractéristiques fonctionnelles des cellules B1a.

Les caractéristiques des lymphocytes B1 et plus particulièrement B1a sont abordées dans les paragraphes ci-dessous.

1.1. Phénotype

L'avènement des techniques de cytométrie en flux multichromes (FACS) a permis de caractériser les antigènes exprimés simultanément à la surface des cellules. Ainsi, les lymphocytes B1 expriment fortement les IgM (IgM^{bright}), faiblement les IgD (IgD^{dull}) et le B220 (B220^{low}), trois marqueurs spécifiques de la lignée B mais n'expriment plus le CD23 (CD23⁻) (Herzenberg *et al*, 1986, Rabin *et al*, 1992). Les cellules B1a expriment le CD5 alors que les lymphocytes B1b, de lignée distincte, ne l'expriment pas. Les lymphocytes B1 peuvent également exprimer un marqueur de macrophages : Mac-1 (CD11b) (Herzenberg *et al*, 1987). Ce marqueur est présent uniquement à la surface des lymphocytes B1 péritonéaux

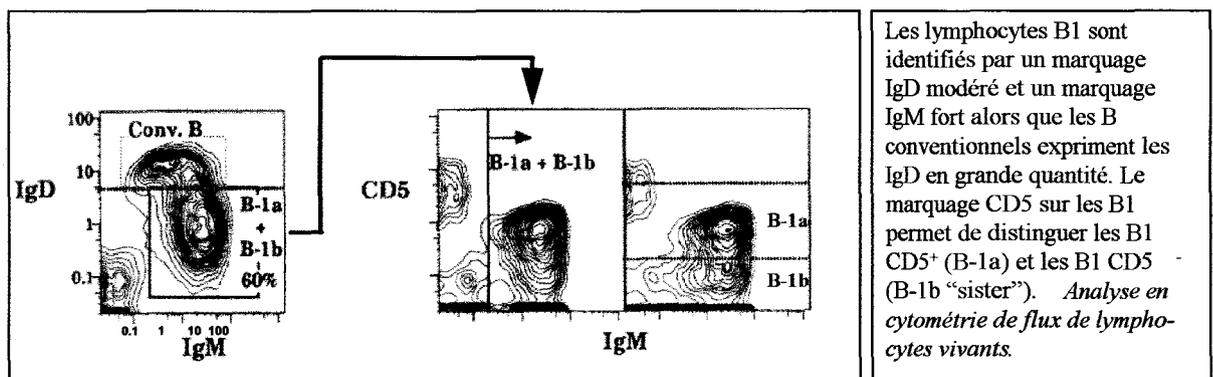
et absent des cellules B1 de la rate. L'identification des cellules B1a nécessite obligatoirement la combinaison d'au moins deux marqueurs de surface. Dans nos travaux, nous avons ciblé la co-expression des IgM et de l'antigène CD5. Pendant plusieurs années, il a été difficile de caractériser les lymphocytes B1b du fait de l'absence de marqueurs spécifiques. Récemment, Wells *et al* ont montré l'expression du marqueur CD43 à la surface des lymphocytes B1 spléniques et péritonéaux, optimisant ainsi la détection des cellules B1b (Wells *et al*, 1994).

La figure ci-contre résume l'expression des marqueurs à la surface des lymphocytes B conventionnels et non conventionnels. L'analyse par cytométrie de flux de cellules péritonéales doublement marquées (CD5 et IgM) est également figurée.

Phénotype des populations B

Phenotype	Designation
IgM ^{bright} — IgD ^{dull} — B220/6B2 ^{dull} — MAC-1 ^{dull} — CD23 ⁻ / CD43 ⁺	CD5 ^{dull} — B-1a (CD5 ⁺) CD5 ⁻ — B-1b ("Sister")
IgM ^{dull} — IgD ^{bright} — B220/6B2 ^{bright} — MAC-1 ⁻ — CD23 ⁺ / CD43 ⁻	CD5 ⁻ — B-2 (Conventional)

Analyse par cytométrie en flux des cellules péritonéales de BALB/c



D'après Stall *et al*. CD5 B cells in development and disease. 1992, 651, p34-35. Ann. N. Y. Acad. Sc.

1.2. Localisation et migration

Une des différences la plus marquée entre les lymphocytes B1 et les lymphocytes B conventionnels est leur distribution anatomique. La détermination de la localisation des cellules B1 a été effectuée par cytométrie de flux pour les lymphocytes B CD5⁺; pendant plusieurs années, l'absence de marqueurs spécifiques pour les plasmocytes ainsi que la difficulté à suivre les B1 "sister" qui n'expriment ni le CD5 ni Mac-1 dans la rate, ont conduit à l'utilisation de modèle de souris chimères irradiées à dose létale et reconstituées par des cellules de cavité péritonéale (PerC) de souris d'allotype différent, et de souris transgéniques (Kroese *et al*, 1992).

Les lymphocytes B1 sont ségrégués dans la cavité péritonéale (30-40% des cellules B totales) et dans la cavité pleurale. On en retrouve très peu dans la rate (<2% chez la BALB/c) ainsi que dans la plupart des ganglions et dans les plaques de Peyer (<1%) bien que 5 à 10% de cellules B CD5⁺ aient été retrouvés dans les plaques de Peyer de souris axéniques jeunes (Ike *et al*, 1992).

La fréquence des lymphocytes B CD5⁺ augmente de 3 à 4 fois dans les ganglions drainant la cavité péritonéale tels que les ganglions caudaux, médiastinaux et péri-aortiques mais elle reste faible suggérant que les cellules B1 migrent, via ces ganglions, vers d'autres sites.

1.2.1 Localisation anatomique

1.2.1.1. Dans les organes périphériques

La majorité des lymphocytes B dans les organes périphériques tels que la rate, les ganglions et les plaques de Peyer appartient à la lignée conventionnelle et est regroupée dans des follicules lymphoïdes constitués d'un centre germinatif et d'un manteau ou corona, séparés dans le cas de la rate, d'une zone marginale par un sinus veineux.

Le peu de lymphocytes B CD5⁺ détectés dans la rate des souris chimères reconstituées par des cellules péritonéales de souris donneuses, est dispersé dans les

follicules lymphoïdes mais également dans la zone marginale (Kroese *et al*, 1989). Quelques-uns ont été retrouvés dans le centre germinatif mais le marquage parallèle des cellules dendritiques ne permet pas de conclure avec certitude de leur présence à cet endroit.

Malgré la représentation très faible de ces cellules dans la zone B des organes lymphoïdes, de nombreux plasmocytes portant l'allotype des souris donneuses sont observés dans la pulpe rouge de la rate et dans la medulla des ganglions. Ces plasmocytes représentent la moitié des plasmocytes à IgM dans la rate. Dans les ganglions, ils sécrètent des IgM et des IgG. Ainsi, une grande partie des IgM sériques proviennent des cellules B1.

1.2.1.2. Dans la lamina propria

Les muqueuses contiennent la majorité des cellules productrices d'anticorps de l'organisme. Nous avons vu dans le chapitre Gut Associated Lymphoid Tissue que les plasmocytes à IgA de la lamina propria de l'intestin proviennent de cellules précurseurs induites dans les plaques de Peyer. Les modèles de souris chimères ou transgéniques développés ci-dessous démontrent que 30 à 40% des plasmocytes à IgA de la lamina propria proviennent de précurseurs B1 présents dans la cavité péritonéale.

Chimères irradiées (Kroese et al, 1992)

Des souris irradiées à dose létale et reconstituées par de la moëlle osseuse de souris syngéniques ont reçu des cellules péritonéales de souris congéniques d'allotype différent. Trente à quarante pour cent des plasmocytes à IgA de la lamina propria portent l'allotype des cellules péritonéales des souris congéniques et ce, 11 mois encore après le transfert.

Chimères néo-natales (Lalor et al, 1989b)

Des souris homozygotes pour leur allotype ont été traitées dès la naissance par un anti-IgM spécifique de *cet* allotype. Ce traitement déplete tous les lymphocytes B,

conventionnels ou non. En parallèle, les animaux ont reçu des cellules péritonéales de souris congéniques. Le traitement anticorps n'affecte pas le développement des cellules B1 à partir des cellules péritonéales congéniques. A l'arrêt du traitement, les lymphocytes B conventionnels réapparaissent alors que les lymphocytes B1 des souris receveuses restent déplétés définitivement. Par contre, 20% des plasmocytes à IgA de la lamina propria portent l'allotype des cellules péritonéales issues des souris congéniques.

Chimères SCID (Severe combined immune deficiency) (Kroese et al, 1995)

Les chimères sont construites par transfert de cellules péritonéales congéniques chez des souris SCID. La souris SCID, du fait d'une mutation dans plusieurs gènes associés au système de recombinaison, n'a ni lymphocytes T, ni lymphocytes B ni aucun plasmocyte. Chez ces chimères, les cellules B périphériques et les plasmocytes à IgA portent alors l'allotype des cellules péritonéales congéniques et sont des lymphocytes CD5⁺.

Ces expériences confirment que les cellules B de la cavité péritonéale sont des cellules B1, qu'elles en conservent le phénotype, même plusieurs mois après le transfert, et qu'elles repeuplent l'intestin en plasmocytes à IgA.

Souris transgéniques μ, κ (Kroese et al, 1993)

Des souris transgéniques B6-Sp6 μ, κ , expriment une molécule IgM de souris BALB/c (Igh-6a) réarrangée, spécifique de l'haptène TNP, dans un fond génétique de C57BL/6. Les organes périphériques, rate, ganglions et plaques de Peyer expriment exclusivement les IgM (Igh-6b) transgéniques alors que 1/3 des lymphocytes B péritonéaux expriment les IgM endogènes (Igh-6b) et appartiennent à la lignée des B1. La moitié des plasmocytes à IgA de l'intestin produisent des IgA issues de la commutation isotypique des IgM endogènes (Igh-6b) et dérivent donc des cellules B1.

Ces différents modèles confirment que les lymphocytes B1, de part leur localisation périphérique et intestinale, contribuent non seulement à la production d'IgM mais également à la sécrétion d'IgA muqueuses.

1.2.2. Migration

La migration des cellules B1 n'est pas bien connue. Cependant, la fréquence plus importante de lymphocytes B CD5⁺ dans les ganglions drainant la cavité péritonéale, suggère que ces cellules quittent la cavité péritonéale via ces ganglions et gagnent la circulation sanguine par le canal thoracique pour rejoindre les sites distants (Kroese *et al*, 1992). Une autre voie, mineure, serait le passage par le diaphragme vers la cavité pleurale comme cela a été décrit pour les macrophages péritonéaux (Pitt et Anderson, 1988). Cependant, la majorité des cellules CD5⁺ demeure dans la cavité péritonéale.

1.3. Répertoire et réponse B1

1.3.1. Spécificité

Les lymphocytes B1 possèdent un répertoire d'anticorps différent des lymphocytes B conventionnels. Ils produisent une grande partie des IgM sériques, ainsi que des IgG et des IgA. Les caractéristiques majeures de ces anticorps sont leur large spécificité et leur faible affinité (Casali et Notkins, 1989). Les cellules B1 reconnaissent les antigènes thymo-indépendants tels que les $\alpha(1-3)$ dextrans ou le ficoll couplés au TNP, les antigènes de micro-organismes (Morrissey *et al*, 1981), les structures répétitives lipopolysaccharidiques portées par les bactéries (Su *et al*, 1991) et les épitopes du groupe des phosphatidylcholines (PtC) (Hayakawa *et al*, 1984)).

Elles produisent des quantités importantes d'anticorps auto-réactifs, dits "naturels", qui reconnaissent des antigènes du soi. Ces auto-anticorps sont principalement dirigés contre l'ADN simple brin, les globules rouges de souris traités à la Broméline (anti-BrMRBC) (Arnold et Haughton, 1992), les thymocytes (Anti-Thymocytes Autoantibodies ou ATA), la

thyroglobuline et les composants du cytosquelette ou des matrices extracellulaires (Cohen et Young, 1991). Cette caractéristique leur confère une implication importante dans les maladies auto-immunes chez l'homme comme chez la souris. Elle sera discutée dans le paragraphe 2.1.1. Lymphocytes B CD5⁺ et auto-immunité.

1.3.2. Répertoire

La lignée B1 apparaît tôt dans l'ontogénie (voir § Origine et développement) et elle s'auto-renouvelle à partir de progéniteurs qui portent déjà des immunoglobulines dont les gènes sont réarrangés, contrairement aux lymphocytes B conventionnels qui se différencient *de novo* à partir de cellules hématopoïétiques pluripotentes. Le répertoire de la lignée B1 s'est établi au contact des antigènes rencontrés dès la vie néo-natale et s'enrichit encore pendant quelques semaines après la naissance. Il persiste chez l'adulte du fait de la capacité de ces cellules à s'auto-renouveler et surtout parce que les régions variables du gène des immunoglobulines ne mutent pas, contrairement aux réarrangements fréquents observés pour les lymphocytes B conventionnels.

De plus, les lymphocytes CD5⁺ ont un nombre restreint de représentation des chaînes VH et VL (utilisation préférentielle des chaînes VH11 et VH12 dans le cas des anticorps naturels murins), ce qui, additionné à l'absence de mutations somatiques, confèrent à la lignée B1 un répertoire "figé" caractérisé par des anticorps polyréactifs et d'affinité faible.

1.3.3. Rôle du CD5

Le CD5 est une glycoprotéine de 67-kDa exprimée à la surface de tous les lymphocytes T matures et des lymphocytes B1a. La liaison du CD5 présent à la surface des lymphocytes T délivre un signal de co-activation et augmente la prolifération induite par le complexe CD3/TCR ainsi que la production d'IL-2 et la libération de Ca²⁺ intracellulaire (Alberola-Ila *et al*, 1992 ; Stanton, 1986 ; June *et al*, 1987). D'autres expériences résumées par Biancone (Biancone *et al*, 1996) indiquent que le CD5 joue un rôle important dans la

transduction des signaux lors des réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T. Par contre, le rôle du CD5 présent à la surface des lymphocytes B est moins documenté.

Sa contre-structure : le CD72

La découverte et les études réalisées sur son contre-récepteur : le CD72 présent exclusivement à la surface des cellules B ont permis de définir l'une de ses fonctions principales (Van de Velde *et al*, 1991; Luo *et al*, 1992). Le CD72 est une protéine membranaire de 45-KDa de type II, homologue au CD23 et appartenant à la superfamille des lectine-C. Sa liaison entraîne, chez l'homme comme chez la souris, la prolifération des lymphocytes B traités par un anti-IgM, une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire suite à l'activation de phosphotyrosine-kinases chez l'homme et de phospholipases C chez la souris, une augmentation de l'expression du CMH classe II en surface et, chez l'homme uniquement, un accroissement de l'expression du CD23 (Katira *et al*, 1992).

Les lymphocytes B1a expriment à la fois le CD5 et le CD72. Aussi l'engagement réciproque de ces structures conduit à l'activation des cellules et contribue à leur auto-renouvellement. Le signal de co-activation engendré par le pontage du CD72 par le CD5 n'est opérationnel que sur des lymphocytes préalablement activés via leur récepteur B (BCR). (Van de Velde et Thielemans, 1996). Cette caractéristique confère au CD5 un rôle-clé dans les réponses thymo-indépendantes (TI). Les antigènes TI-2 sont des antigènes polymériques, souvent polysaccharidiques, de structure répétitive reconnue par les IgM membranaires polyspécifiques et de faible affinité des lymphocytes B $CD5^+$. Ces lymphocytes présentent alors les antigènes TI-2 aux cellules B conventionnelles qui expriment un récepteur plus affin et le CD72. Aussi, le CD5 présent à la surface des cellules B1 interagit avec le CD72 des cellules conventionnelles et augmente le signal délivré via l'occupation du récepteur B par l'antigène (Gordon, 1994). La figure ci-dessous illustre l'interaction T-indépendante entre cellules B1 et lymphocytes B2 conventionnels.

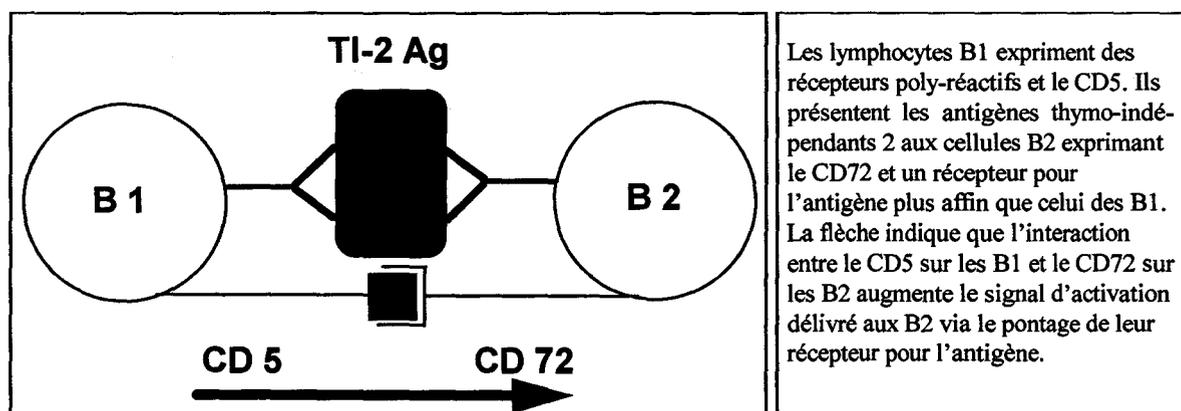
Il faut noter que cette implication du CD5 dans l'activation des réponses thymo-indépendantes est confortée par le modèle de souris *Xid* (X-linked immunodeficiency) déficientes, indirectement, en lymphocytes B $CD5^+$ qui s'avèrent incapables de répondre

aux antigènes TI-2 et dont les lymphocytes B ne sont pas activés suite au pontage des IgM. Cependant, cette observation indirecte n'est pas confortée par les travaux de Tarakhovsky *et al* qui ont construit des souris mutantes n'exprimant pas le CD5 mais capables d'élaborer une réponse immune T-dépendante ou T-indépendante (Tarakhovsky *et al*, 1994).

Malgré cette dernière observation contradictoire, il apparaît clairement que les lymphocytes B CD5⁺ expriment des récepteurs B polyspécifiques et de faible affinité et que la combinaison de ces récepteurs et du CD5 leur confère un rôle dans les réponses thymo-indépendantes. Le CD5 définit-il une sous-population B d'origine distincte et de fonctionnalité particulière ou alors, est-ce l'engagement des récepteurs B polyréactifs qui induit l'expression du CD5 ?

Ces deux questions seront discutées dans le § Origine et Développement.

Implication de l'interaction CD5-CD72 dans les réponses B thymo-indépendantes



D'après Gordon, Immunology Today. 1994, 15, 9, p411.

Récemment, Biancore *et al* (1996) ont mis en évidence un autre ligand du CD5 différent du CD72 : le CD5-ligand. Il est présent à la surface des lymphocytes B et des clones T helper. Contrairement au CD72, son expression à la surface des lymphocytes B n'est pas constitutive, le CD5-ligand apparaît une fois les voies de signalisation du CD3 et du CD28 engagées par leur contre-structure présente sur les lymphocytes T. L'interaction

CD5 ligand(B)-CD5(T) jouerait un rôle co-stimulateur lors des réponses immunes T-dépendantes.

Les lymphocytes CD5⁺ en tant que Cellules Présentatrices de l'Antigène

La présence du CD5 à la surface des cellules B leur confère des capacités à présenter l'antigène, supérieures à celles des lymphocytes conventionnels ou des lymphocytes B1b. Le pontage du CD5 par un anticorps entraîne une augmentation de la présentation des antigènes aux cellules T alors que, à l'opposé, les fonctions de présentation d'antigène des lymphocytes B de souris déficientes en B CD5⁺ (*Xid*) sont très réduites (*Zimecki et al*, 1994).

L'engagement du CD5

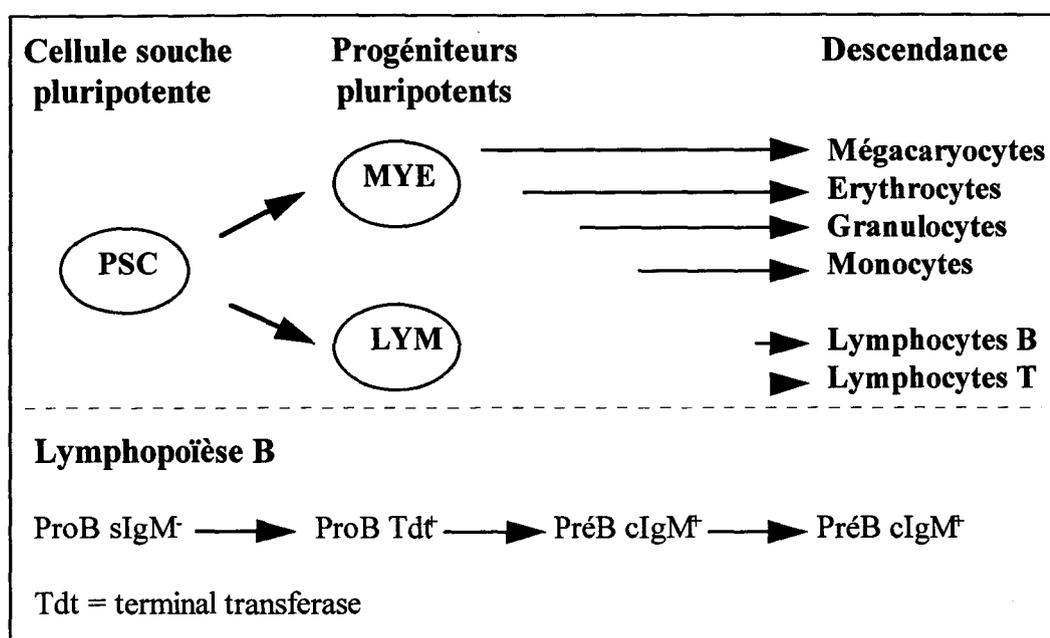
Le CD5 et le récepteur B sont physiquement associés sur les lymphocytes B1 (*Lankester et al*, 1994 ; *Jamin et al*, 1996) et l'engagement du CD5 va prolonger la prolifération des B préalablement activés via le récepteur B et la présence d'IL-2. Au contraire, sur les lymphocytes B1 auto-réactifs, la présence du CD5 induit l'apoptose des lymphocytes dont le récepteur B a fixé des auto-antigènes empêchant ainsi l'expansion de clones auto-immuns (*Bikah*, 1996).

1.4. Origine et développement

L'origine des lymphocytes B1 a été largement débattue suite à l'identification du marqueur CD5 sur les lymphocytes B humains et murins. Le fait que, pendant longtemps, ce marqueur ait été le seul permettant d'identifier les cellules B1 et que son expression soit inductible, *in vitro*, suite à l'engagement du récepteur B par des antigènes T-indépendants (Cong *et al*, 1991), a joué en défaveur d'une origine et d'une lignée distinctes. Selon Wortis *et al*, la même lignée de lymphocytes B peut répondre d'une manière T-indépendante ou T-dépendante, selon la voie de différenciation initiée par le contact avec l'antigène, et exprimer ou non le CD5 (Wortis *et al*, 1992). Malgré ces observations, de nombreux arguments convergents supportent l'existence de trois lignées B indépendantes donnant chacune naissance aux lymphocytes conventionnels, aux lymphocytes B1a et aux lymphocytes B1b (Kantor *et al*, 1992).

1.4.1. Origine

L'hématopoïèse permet de conserver l'homéostasie des populations cellulaires du système immunitaire. Elle commence très tôt, pendant la vie embryonnaire dans le foie du fœtus puis se poursuit tout au long de la vie dans la moëlle osseuse. Des cellules souches pluripotentes, présentes dans la moëlle osseuse de l'adulte et dans le foie du fœtus, donnent naissance à des progéniteurs hématopoïétiques tels que les cellules souches myéloïdes et les cellules souches lymphoïdes. Les cellules pluripotentes myéloïdes engendrent les mégacaryocytes, les érythrocytes, les granulocytes et les monocytes ; les cellules souches lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes B et aux lymphocytes T conservant ainsi l'équilibre des populations lymphocytaires.

Hématopoïèse dans la moëlle osseuse**1.4.1.1. Le foie foetal, une source de lymphocytes B1**

Les arguments les plus marquants en faveur d'une origine distincte pour les lymphocytes B1 proviennent des expériences de reconstitution de souris irradiées, réalisées par K. Hayakawa (Hayakawa *et al*, 1985). Le transfert de moëlle osseuse ou de splénocytes de souris adulte reconstitue tous les lymphocytes B de la rate des animaux irradiés mais ne permet pas de restaurer la population de lymphocytes B1a, alors qu'à l'opposé, si le foie ou la rate proviennent d'animaux nouveau-nés, la reconstitution des souris irradiées est totale. Cette incapacité à restaurer les lymphocytes B1a lorsque l'on transfère de la moëlle osseuse de souris adulte, supporte une source distincte pour ces lymphocytes et indique que les organes de souris adultes ont perdu les progéniteurs capables d'engendrer les lymphocytes B CD5⁺.

Hardy démontre clairement que les lymphocytes pro-B (lymphocytes ayant initié le réarrangement de la chaîne lourde de leurs immunoglobulines) du foie foetal suivent un programme de développement différent des progéniteurs présents dans la moëlle osseuse d'animaux adultes et qu'ils donnent naissance à des cellules B exprimant le CD5 et très peu les IgD alors que, les progéniteurs de la moëlle osseuse se différencient en lymphocytes

conventionnels CD5⁻ exprimant de façon intense les IgD (Hardy et Hayakawa, 1991 ; 1992).

1.4.1.2. L'omentum foetal, un site enrichi en précurseurs de cellules B1

L'omentum est une membrane mésentérique richement vascularisée qui apparaît, chez l'homme, dès la quatrième semaine de gestation. Il représente une source embryonnaire importante de lymphocytes B1a et B1b mais pas de lymphocytes B conventionnels (Solvason *et al*, 1991, 1992). La greffe d'omentum ou de foie provenant de foetus de 13 jours chez des souris SCID a permis de montrer la reconstitution exclusive des populations B1 par l'omentum, et la reconstitution des cellules B conventionnelles et B1 par le foie foetal. De plus, les animaux greffés avec l'omentum présentent également des plasmocytes à IgA et à IgM dans l'intestin et dans la rate dont l'haploype est identique à celui de l'omentum du donneur.

Ces expériences démontrent que les lymphocytes B1 mais pas les lymphocytes conventionnels sont générés dans l'omentum foetal.

L'omentum et le foie foetaux sont donc deux sources majeures de production de lymphocytes B1. Quelle relation existe-t-il entre ces deux sites ? Solvason *et al* (1992) pensent que les précurseurs migrent d'un site à l'autre ou bien qu'ils sont générés indépendamment dans chacun des deux sites par le tissu mésodermique qui borde l'omentum et la cavité péritonéale ou par les cellules mésothéliales du foie.

1.4.1.3. La moëlle osseuse, source de lymphocytes B conventionnels et de lymphocytes B1b

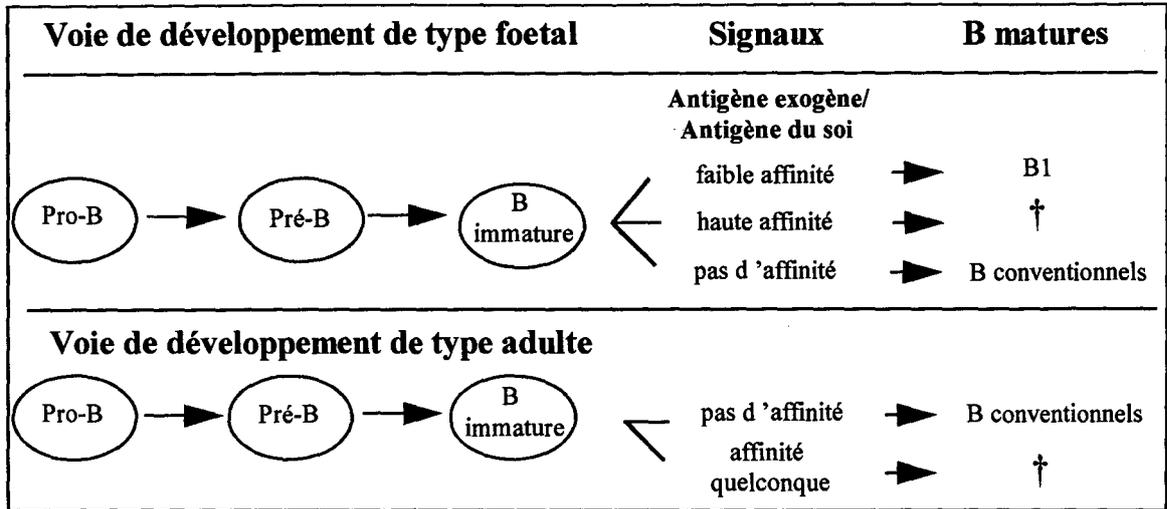
La population de lymphocytes B1b peut être reconstituée à partir du foie foetal ou de l'omentum. Des expériences de transfert adoptif de lymphocytes CD5⁺ ou de lymphocytes CD5⁻ ont montré que chaque population se reconstitue elle-même, au regard de son marqueur CD5, ce qui tend à prouver que ces deux populations ne sont pas simplement en équilibre mais qu'elles procèdent d'un développement distinct (Stall *et al*, 1992).

L'origine distincte de ces deux populations B1 est confortée par la présence de progéniteurs pour les lymphocytes B1b mais non pour les lymphocytes B1a dans la moëlle osseuse (Lalor *et al*, 1989, Kantor *et al*, 1992). La moëlle osseuse élabore donc, chez l'adulte, des progéniteurs pour les lymphocytes B conventionnels et des progéniteurs pour les lymphocytes B1b.

1.4.2. Développement

1.4.2.1. Deux voies de développement pour les lymphocytes B

Une des caractéristiques majeures des lymphocytes B1 par rapport aux lymphocytes B conventionnels est leur génération à partir de progéniteurs foetaux. Stall *et al.*(1996) ont proposé deux voies de développement distinctes pour les lignées B afin de concilier l'origine différente des lymphocytes B1 et la signalisation via les récepteurs pour l'antigène. Les lymphocytes B1 sont issus d'une lignée de type foetal alors que les lymphocytes conventionnels dérivent de la lignée foetale ou de la lignée de type adulte. Les lymphocytes issus de ces deux types d'ontogénie subissent une sélection positive ou négative au cours de l'acquisition de leur répertoire, au contact des antigènes rencontrés. Ainsi, dans le développement de type foetal, les lymphocytes B qui ont une affinité trop forte pour l'antigène sont éliminés afin d'éviter les réactions d'auto-immunité ; si l'affinité est faible, les progéniteurs vont se différencier en cellules B1. En l'absence de réactivité, ils se différencieront en lymphocytes conventionnels ou mourront. Dans le développement à partir du type adulte, les lymphocytes conventionnels sont délétés s'ils réagissent avec des antigènes du soi ou alors ils entament leur maturation et sont sélectionnés positivement au contact d'antigènes exogènes (Stall *et al*, 1996).

Deux voies de développement pour les lymphocytes B

D'après Stall et al. *Seminars in Immunology*. 1996, 8, p53.

1.4.2.2. Renouvellement

Les expériences de transfert adoptif réalisées par Hayakawa (§ Origine) montrent que les lymphocytes B1 sont générés très tôt dans l'ontogénie. On trouve les progéniteurs de ces cellules pendant la vie foetale et quelques semaines encore pendant la vie néo-natale ensuite, la lymphopoïèse a lieu dans la moëlle osseuse qui ne contient pas de précurseurs pour les lymphocytes B1a. Etant donné que 50% des plasmocytes de la rate et de l'intestin dérivent des lymphocytes B1, ces cellules doivent se renouveler de façon active.

La cavité péritonéale est un réservoir de lymphocytes B1 qui expriment des IgM dont la chaîne lourde est réarrangée. Ce sont ces lymphocytes Ig⁺ dont le répertoire a été sélectionné pendant la vie foetale et néo-natale, qui maintiennent la lignée B1 durant toute la vie de l'individu (Hayakawa *et al*, 1986). Le maintien de cette population lymphocytaire ne se fait donc pas à partir d'une cellule progénitrice Ig⁻, comme dans le cas des lymphocytes B conventionnels, mais d'un "pool" de lymphocytes qui s'auto-renouvellent (Hayakawa *et al*, 1986 ; Förster et Rajewsky, 1987). Alors que les lymphocytes B1 sont à l'origine d'un très grand nombre de plasmocytes dont la demi-vie n'excède pas 3 à 5 jours, le taux de prolifération des lymphocytes B1 est très faible dans la cavité péritonéale indiquant que ces

lymphocytes doivent se diviser intensément en dehors de la cavité péritonéale (Deenen et Kroese, 1992).

Tableau récapitulatif

Populations B	Ontogénie	Renouvellement	Localisation chez l'adulte
B1a	Vie foetale et néo-natale,	Auto-renouvellement B Ig ⁺ de la cavité péritonéale	Cavités péritonéale et pleurale
B1b	Vie foetale, néo-natale et adulte,	Pro-B Ig ⁻ de la moëlle osseuse	Cavités péritonéale et pleurale
B conventionnels	Vie néo-natale et adulte	Pro-B Ig ⁻ de la moëlle osseuse	Rate et ganglions

1.4.2.3. Contrôle du développement

Il existe un rétro-contrôle négatif du développement des lymphocytes B1. La présence de lymphocytes B1 matures inhibe le développement des cellules, qu'elles dérivent de progéniteurs foetaux Ig⁻ ou de cellules matures Ig⁺ de la cavité péritonéale. Le contrôle du développement des lymphocytes B1 par une même population mature permettrait de restreindre l'expansion des lymphocytes non conventionnels aux seules cellules qui se sont développées durant la vie foetale et néo-natale (Lalor *et al*, 1989a, 1989b).

1.4.3. Du foetus à l'adulte : un système immunitaire évolutif

Les travaux présentés dans les paragraphes précédents mettent en exergue des différences importantes entre le système immunitaire du foetus et celui de l'adulte. Ces différences s'inscrivent dans une dynamique de développement pendant laquelle le nouveau-né acquiert petit à petit les caractéristiques du système immunitaire adulte tout en conservant à vie la fonctionnalité des lymphocytes B CD5⁺.

1.4.3.1. Caractéristiques des lymphocytes foetaux

Lymphocytes B

Les lymphocytes B foetaux expriment tous le CD5 et ont un répertoire plus limité que le répertoire des lymphocytes B adultes. Une source de diversité dans le répertoire des lymphocytes B provient des multiples associations possibles au niveau des sites de jonction des différents segments de gène qui composent le gène des immunoglobulines. Cette variabilité est encore accrue par l'addition de nucléotides, appelés Région N, aux sites de jonction. Ces nucléotides sont ajoutés grâce à une enzyme, la terminal deoxynucleotidyl transférase ou TdT. Une caractéristique des lymphocytes B1 foetaux est l'absence ou l'utilisation rare de ces régions N par rapport aux lymphocytes adultes. Au stade Pro-B, ils n'expriment pas la terminale transférase (Li *et al*, 1996). Pendant encore plusieurs semaines après la naissance, 60 à 80% des lymphocytes B1a n'ont pas de région N mais une fois adulte, les 2/3 des lymphocytes B1a ont acquis la capacité de l'insérer. Ainsi, chez le fœtus, les progéniteurs présents dans l'omentum ou le foie donnent naissance aux lymphocytes B1 qui n'utilisent pas les régions N. Après la naissance, les progéniteurs génèrent des lymphocytes B1 aux capacités d'auto-renouvellement qui commencent à utiliser les régions N, et les lymphocytes B conventionnels émergent. Pendant la vie adulte, l'expansion de nouvelles cellules B1 est sévèrement contrôlée par la population B1 en place et le répertoire est fixé. Les lymphocytes B2 sont sélectionnés et ont un répertoire diversifié.

Une autre différence entre lymphocytes B foetaux et lymphocytes adultes concerne l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et définit les deux lignées de développement illustrées dans le paragraphe 1.4.2. Développement. L'expression des molécules I-A et I-E du CMH II est retardée sur les lymphocytes pré-B issus des progéniteurs B foetaux par rapport à leurs homologues de la moëlle osseuse. Ces molécules apparaissent bien après l'expression membranaire du récepteur B définissant le développement de type foetal alors qu'elles sont présentes plus tôt pour les lymphocytes B conventionnels et sont une caractéristique du développement de type adulte (Hayakawa *et al*, 1994 ; Stall *et al*, 1996). Le développement de type foetal

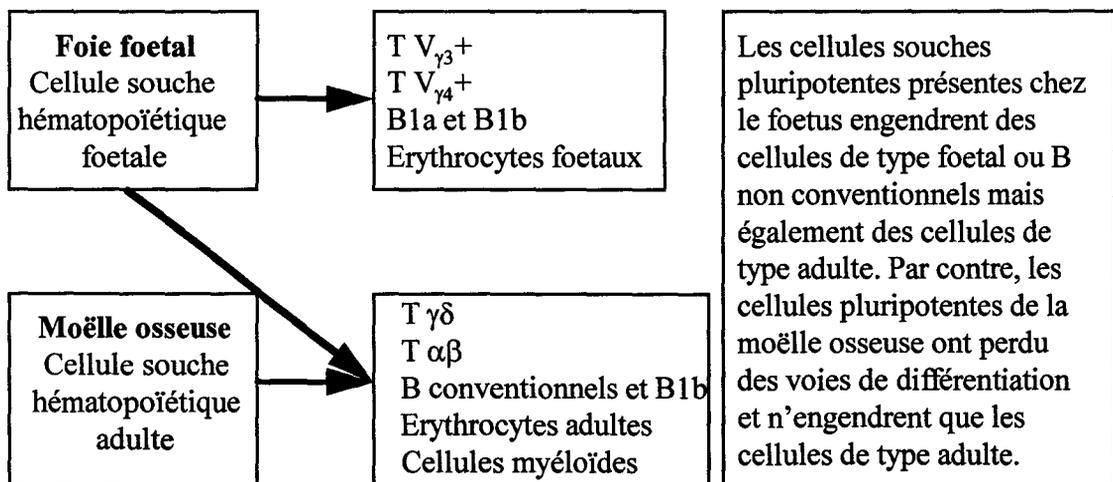
n'est pas uniquement restreint à la période de vie intra-utérine mais se prolonge au delà d'un mois après la naissance (Lam et Stall, 1994).

Lymphocytes T

Les différences entre le système immunitaire foetal et adulte ne concernent pas uniquement les lymphocytes B mais s'illustrent dans le développement des lymphocytes T. Ikuta *et al* (1992) montrent la prédominance de lymphocytes T $V_{\gamma 3}^+$ et $V_{\gamma 4}^+$ pendant la vie foetale et l'absence de ces populations dans le thymus de l'adulte. Le développement de ces lymphocytes nécessitent le micro-environnement du thymus foetal et a lieu à partir d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente du foie foetal.

Ces informations permettent de concevoir un modèle de développement potentiel pour les cellules des systèmes immunitaires foetal et adulte à partir d'une cellule souche pluripotente.

Modèle de développement des systèmes immunitaires foetal et adulte



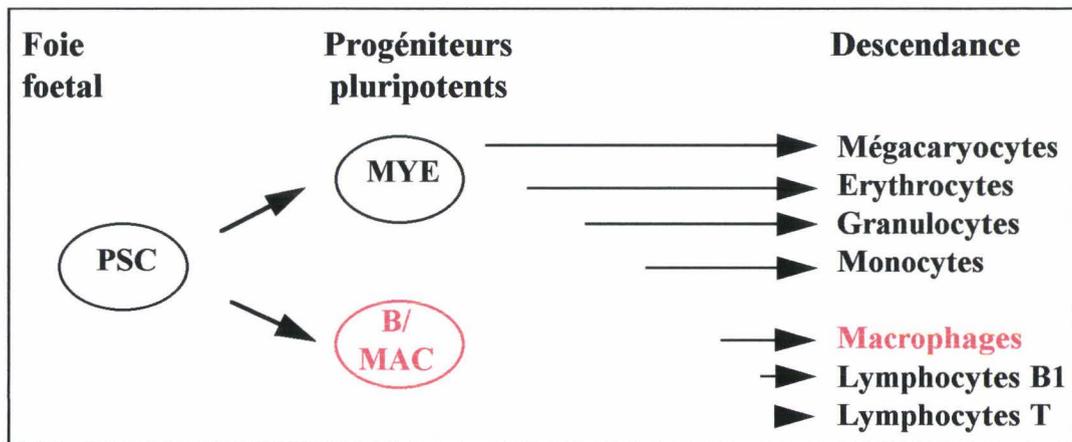
D'après Ikuta et al. CD5 B cells in development and disease. 1992, 651, p30. Ann. N. Y. Acad. Sc.

Le répertoire fixé des lymphocytes B1, contrairement à celui des lymphocytes B2, issus de la moëlle osseuse dont les gènes des immunoglobulines sont constamment

réarrangés, ainsi que leur capacité d'auto-renouvellement assurent une trace des évènements antigéniques rencontrés par le système immunitaire pendant le développement foetal et néonatal.

1.4.4. Les lymphocytes B1 macrophages : une lignée hérétique ?

Au cours de l'ontogénie du système immunitaire, les progéniteurs des macrophages et des lymphocytes B se sont séparés très précocément en cellules pluripotentes myéloïdes et lymphoïdes. Borello et Phipps (1996) rapportent l'existence de lymphocytes B CD5⁺ exprimant le marqueur B220 et des IgM réarrangées à leur surface et présentant les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des macrophages telles que la phagocytose et l'adhérence. Ces lymphocytes B CD5⁺ macrophages enfreignent les schémas connus de l'hématopoïèse car ils conservent les propriétés de deux types cellulaires distincts qui ont divergé très tôt pendant l'ontogénie. De telles observations avaient déjà été rapportées pour des cellules B1a malignes mais il a fallu attendre les travaux de ces auteurs pour montrer la capacité des cellules B1 normales à se différencier en macrophages dans un milieu conditionné. Ainsi, le schéma de l'hématopoïèse présenté dans le § 1.4. Origine et Développement peut être complété par un précurseur commun des lymphocytes B1 et des macrophages, présent dans le foie foetal (Cumano *et al*, 1992).

Un progéniteur ancestral des lymphocytes B CD5⁺ et des macrophages

La différenciation des lymphocytes B1 vers un phénotype de B macrophages est bloquée complètement par l'addition d'IFN- γ et n'est pas inhibée par les cytokines Th2. Ces propriétés permettent de proposer une hétérogénéité dans les populations de macrophages. Les macrophages "conventionnels" fonctionnent de façon optimale dans un environnement Th1 qui permet leur recrutement, l'expression de molécules co-stimulatrices et augmente leur propriétés effectrices dans le contexte de l'immunité à médiation cellulaire. Le développement des B macrophages dans un contexte Th2 leur permet de se substituer aux macrophages "conventionnels", normalement défavorisés dans certaines pathologies allergiques ou parasitaires. De plus, les B/macrophages peuvent présenter de manière efficace l'antigène aux cellules T et induire une immunité humorale (Bretz *et al*, 1992). L'expression du CD5 leur permet également d'interagir avec d'autres cellules B.

La spécificité des lymphocytes B1 pour les antigènes du soi et les bactéries ainsi que la plasticité de ces lymphocytes macrophages en font une composante très importante pendant la vie foetale ou néonatale et dans l'immunité intestinale où prédominent les cellules primitives telles que B CD5⁺ et lymphocytes T $\gamma\delta$.

2. Les lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse

2.1. Auto-immunité et immunité muqueuse

Pour éviter le développement des maladies auto-immunes, le système immunitaire des mammifères a développé de nombreux mécanismes tels que le contrôle des populations T et B auto-réactives et celui de la production d'anticorps naturels.

De nombreux micro-organismes et parasites portent des épitopes communs aux antigènes du soi et pourraient ainsi favoriser l'émergence de maladies auto-immunes. Le système immunitaire met en place des mécanismes de délétion clonale ou d'anergie des cellules auto-réactives susceptibles de proliférer mais également un réseau actif de régulation de ces populations (Cohen et Young, 1991) afin d'éviter les situations pathologiques.

2.1.1. Lymphocytes B CD5⁺ et auto-immunité

Chez les mammifères, les lymphocytes B CD5⁺ prédominent pendant la vie fœtale et néo-natale et sont importants pour la mise en place du répertoire T et B. Quelques semaines après la naissance, leur nombre diminue parallèlement à leur contribution à la réponse immunologique.

Cependant, la réapparition d'un nombre important de cellules B CD5⁺ chez des patients atteints de maladie auto-immune (MAI) est très souvent associée aux manifestations pathologiques de ces affections. De plus, il existe bien souvent une association entre leucémie lymphocytaire chronique, lymphome B et auto-immunité. Aussi, chez l'homme, en plus de facteurs génétiques prédisposant au développement de MAI, on retrouve de façon quasi permanente cette association entre la présence d'un nombre important de lymphocytes CD5⁺ et de leurs anticorps associés, et l'anémie hémolytique, le syndrome de Sjögren ou l'arthrite rhumatoïde. Par contre, dans le cas du lupus érythémateux systémique, il n'y a pas d'augmentation du pourcentage des CD5⁺ (Casali *et al*, 1989).

Les lymphocytes B1 sécrètent des auto-anticorps d'isotype IgM or, dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, on a pu détecter des anticorps d'isotype IgG de haute affinité produits par ces cellules. Casali et Ikematsu montraient pour la première fois un gène VH hypermuté chez les lymphocytes CD5⁺ (Ikematsu *et al*, 1992). Cette propriété d'hypermutation des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines a été confirmée dans le modèle murin NZB (souris qui développe spontanément une anémie hémolytique en vieillissant) où la commutation des anticorps d'isotype IgM à IgG anti-ADN s'effectue parallèlement à la perte du marqueur CD5 (Shirai *et al*, 1992).

Chez la souris, l'implication des lymphocytes B1 dans l'auto-immunité a été révélée par leur capacité à produire des anticorps dirigés contre des composants des globules rouges traités à la Broméline (BrMRBC) (Arnold et Haughton, 1992). L'épitope, mis à jour suite au traitement protéolytique, appartient à la famille des phosphatidylcholine. La distribution des cellules anti-BrMRBC suit celle des lymphocytes B1, aussi sur 30% de cellules B CD5⁺ de la cavité péritonéale, 10 % produisent des auto-anticorps (Mercolino *et al*, 1988). Cette spécificité est le produit du réarrangement génique VH11 et VH12.

Les lymphocytes CD5⁺ sécrètent également des anticorps dirigés contre les gangliosides des thymocytes (ATA).

Le modèle des souris transgéniques exprimant des auto-anticorps anti-globules rouges (anti-RBC tg) (Okamoto et al, 1992)

Le modèle de souris transgéniques exprimant des anticorps anti-globules rouges, établi par Murakami et Honjo, s'est révélé très utile pour confirmer l'implication des B CD5⁺ dans l'auto-immunité et il permet de comprendre la relation entre lymphocytes B1, auto-immunité et immunité muqueuse (Murakami et Honjo, 1995, 1996).

Cinquante pour cent de ces souris souffrent naturellement de maladie hémolytique imputable à la production d'anticorps anti-globules rouges par les lymphocytes CD5⁺.

Chez ces animaux, tous les lymphocytes B périphériques sont tolérants aux antigènes de globules rouges. Si l'on injecte par voie systémique des globules rouges à ces souris, les lymphocytes périphériques subissent une délétion clonale cependant que les lymphocytes B1

de la cavité péritonéale, non confrontés aux globules rouges, en sont préservés. L'injection des globules rouges dans la cavité péritonéale entraîne l'apoptose des cellules CD5⁺. La délétion des lymphocytes B1 par cette voie, améliore l'état de santé des souris et diminue la production d'auto-anticorps confirmant ainsi l'implication des lymphocytes B CD5⁺ dans l'auto-immunité.

2.1.2. Auto-immunité et immunité muqueuse

Les lymphocytes B1 péritonéaux communiquent avec le GALT

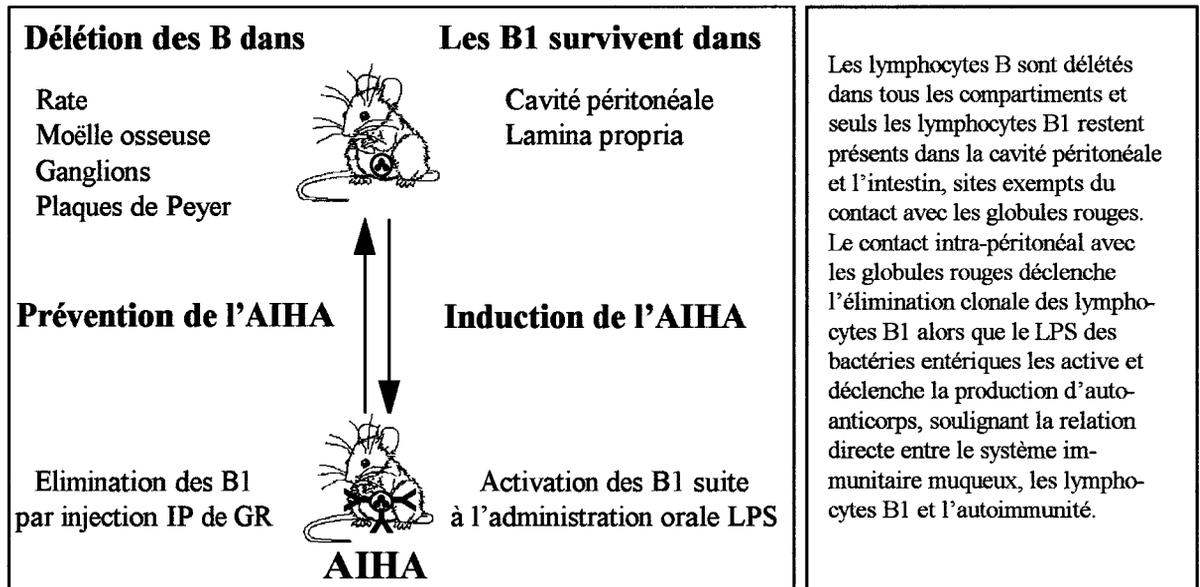
L'analyse du compartiment muqueux intestinal des souris anti-RBC Tg ne montre que très peu de lymphocytes B dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, parallèlement à un nombre normal de cellules T dans ces organes.

A l'opposé, les nombres de lymphocytes B1 de la lamina propria et de la cavité péritonéale sont normaux démontrant donc que les cellules B1 ont échappé à la délétion clonale et se déplacent entre ces deux compartiments sans passer par les plaques de Peyer (Murakami et Honjo, 1996).

Les bactéries entériques activent les lymphocytes B1 et déclenchent l'anémie hémolytique auto-immune

Les souris anti-RBC Tg ne développent pas d'anémie lorsqu'elles sont élevées en conditions d'aseptie. Dans des conditions d'élevage conventionnelles, 50% des animaux souffrent d'anémie hémolytique auto-immune. Le développement de la maladie auto-immune est lié à la présence de lipopolysaccharides bactériens qui activent de façon polyclonale les lymphocytes B1 de la cavité péritonéale et de l'intestin, et déclenchent la production d'auto-anticorps (Cf figure ci-dessous).

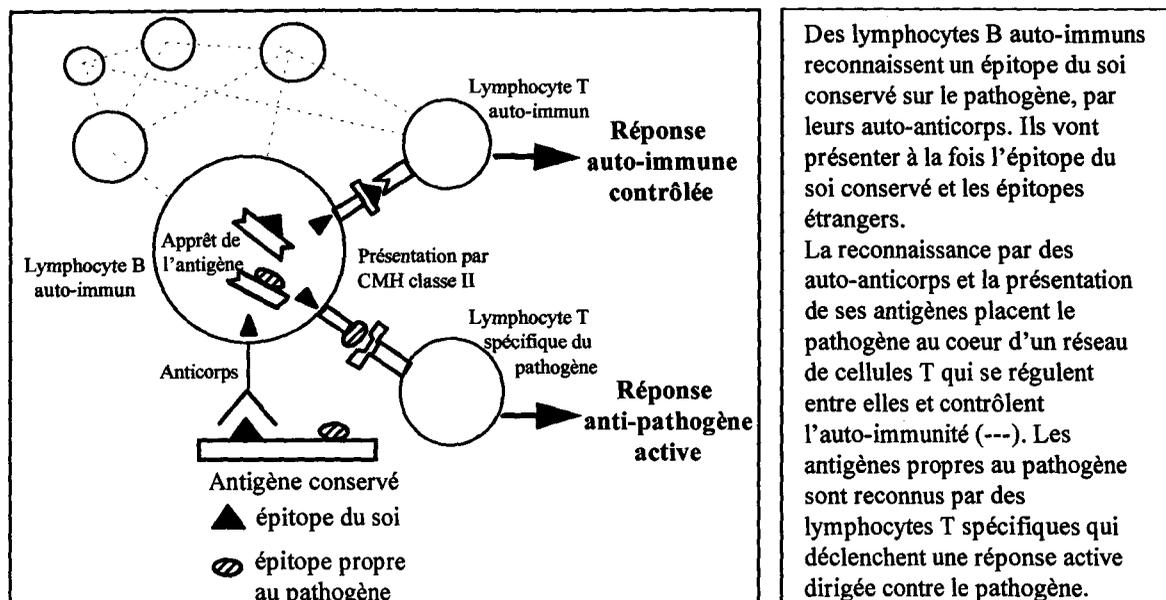
Modèle des souris transgéniques produisant des auto-anticorps anti-globules rouges (anti-RBC Tg)



D'après Murakami et Honjo, Seminars in Immunology. 1996, 8, p4.

Ainsi, les lymphocytes B1 peuvent être activés par des agents infectieux et produire des anticorps dirigés contre le pathogène et/ou des auto-anticorps. Cette association entre auto-immunité et infection peut être expliquée par la polyspécificité des anticorps produits par les cellules B CD5⁺ ou par les similarités antigéniques entre les agents infectieux et les auto-antigènes. Cohen et Young sont en faveur de cette dernière hypothèse (Cohen et Young, 1991). Pour ces auteurs, les antigènes du soi sont des antigènes dominants de part leur place au coeur d'un réseau de lymphocytes auto-réactifs dont l'expansion est régulée par d'autres lymphocytes régulateurs. De la pré-existence d'un tel réseau contrôlant l'auto-immunité, découle la reconnaissance préférentielle d'antigènes exogènes présentant des similarités avec le soi par rapport à d'autres antigènes.

Réseau de lymphocytes contrôlant l'auto-immunité et induisant une immunité anti-microbienne active



D'après Cohen et Young, *Immunology Today*. 1991, 12, p105.

2.2. La cavité péritonéale, un réservoir de plasmocytes à IgA pour l'intestin

La cavité péritonéale et le péritoine ne sont pas seulement des limites physiques sous contenant différents organes. Il existe au sein de la cavité péritonéale des mécanismes de défense immunitaires naturels qui permettent la neutralisation des bactéries l'activation du complément et la phagocytose par les leucocytes et les macrophages. En plus de ces mécanismes de défense naturels ou "innés", la cavité péritonéale peut générer une réponse immune spécifique à l'aide de lymphocytes B et T et interagir avec le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin (GALT). Le développement de mécanismes de défense actifs dans la cavité péritonéale conjointement à la possibilité d'induire une réponse IgA sécrétoire dans l'intestin après immunisation intra-péritonéale font de cette cavité un organe lymphoïde à prendre en considération dans l'immunité des muqueuses.

2.2.1. Le tissu lymphoïde associé au péritoine (PALT) : un organe lymphoïde secondaire ?

Les cellules de la cavité péritonéale forment une population hétérogène. Chez le rat, les cellules dendritiques et les lymphocytes ne représentent que 10% des cellules de la cavité péritonéale, les macrophages en constituent 70%, le reste correspond aux granulocytes et aux mastocytes. Au cours d'infections microbiennes (ou après immunisation intrapéritonéale), ces populations évoluent à la fois quantitativement et qualitativement et vont permettre, en plus du système du complément, d'éliminer les bactéries et les pathogènes.

2.2.1.1. Les mécanismes de défense naturels

Les défenses anti-bactériennes de la cavité péritonéale sont liées d'une part, à la production d'anaphylatoxines C3a et C5a relarguées au cours de l'activation du complément. Ces substances sont induites par la présence de produits bactériens et l'inflammation qui en résulte. D'autre part, le nombre de leucocytes et macrophages de la cavité péritonéale augmente de façon très importante, en réponse à un stress ou à une infection. Ces macrophages, une fois activés, présentent des capacités effectrices envers les agents pathogènes tels que *Candida* ou *Leishmania* (Roitt *et al*, 1993). La libération de substances vasoactives par les mastocytes ainsi que le complément qui recrute les macrophages vont promouvoir la phagocytose des bactéries et entraîner la clairance bactérienne de la cavité péritonéale.

L'existence de pores dans le péritoine au niveau du diaphragme permet une communication entre la cavité péritonéale et les canaux lymphatiques thoraciques. Ces pores assurent une absorption rapide des bactéries et de leurs toxines et entraînent la dissémination des produits pathogènes et l'activation du système immunitaire.



2.2.1.2. Les mécanismes de défense spécifiques

Les "Milky spots"

Au niveau de l'omentum, dans les zones périvasculaires, il existe des agrégats cellulaires ou "Milky spots" composés à l'état basal de 70% de macrophages, de 10% de lymphocytes B et 10% de lymphocytes T et de mastocytes (Krist *et al*, 1995). Au cours d'infections, le nombre et la taille de ces agrégats augmentent très fortement et quelques uns vont développer un centre germinatif et conduire à la production d'anticorps (Shimotsuma *et al*, 1989). Cependant, cette notion est nuancée par les travaux de Krist *et al* (1995) et Van Vugt *et al* (1996) qui montrent que ces infiltrats périvasculaires, bien que développant des zones B et T lors d'infections bactériennes, ne peuvent pas être considérés comme des organes lymphoïdes secondaires au même titre que la rate, les ganglions ou le GALT puisqu'il n'existe pas de cellules interdigitées ou de cellules folliculaires dendritiques au sein de ces structures. Les "Milky spots" sont donc uniquement des sites de prolifération et de maturation locales pour les macrophages et les lymphocytes B activés dans la cavité péritonéale. Ils jouent un rôle important dans la clairance des bactéries de la cavité péritonéale.

Les lymphocytes péritonéaux

La cavité péritonéale renferme une concentration de lymphocytes dont le phénotype est rare dans le sang ou les organes lymphoïdes secondaires. Ce sont, en majorité, des lymphocytes non conventionnels dont le développement est indépendant du thymus ou de la moëlle osseuse.

Plusieurs sites de différenciation extrathymique existent chez la souris (Abo *et al*, 1993). Du foie, des régions intra-épithéliales de l'intestin et de l'omentum dérivent des lymphocytes T à propriétés distinctes des lymphocytes T différenciés dans le thymus. Il existe une fréquence importante de lymphocytes T dont le récepteur T est constitué des chaînes $\gamma \delta$ (>17%) et de cellules T auto-réactives. De plus, la majorité des lymphocytes T

sont CD8⁺ et expriment l'homodimère CD8 α^+ B β^+ . Quatre vingt douze pour cent des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ de la cavité péritonéale portent le marqueur CDw60, caractéristique des fonctions auxiliaires des lymphocytes T (Hartmann *et al*, 1995). Birkhofer *et al* (1996) montrent, au niveau clonal, une fréquence importante de lymphocytes CD8⁺ de type helper 2. Ces lymphocytes CD8⁺ produisent de l'IL-4 et de l'IL-5, ont des fonctions cytolytiques très réduites et induisent la synthèse d'IgG et d'IgA par les lymphocytes B.

Trente à quarante pour cent des lymphocytes B de la cavité péritonéale sont des lymphocytes B1a et B1b et expriment le marqueur de macrophages CD11b. Ces lymphocytes produisent des taux importants d'IgM et d'auto-anticorps et donnent naissance à la moitié des plasmocytes à IgA de l'intestin. Il existe actuellement des évidences (discutées dans le §...), de mutations somatiques dans le gène des immunoglobulines de ces lymphocytes suggérant qu'ils réarrangent leurs gènes au contact de l'antigène et tendent vers une réponse spécifique.

L'ensemble de ces informations permet de considérer la cavité péritonéale comme un tissu lymphoïde tertiaire qui, en dehors d'infections microbiennes ou de traumatisme chirurgical, ne contient que peu de lymphocytes et un taux basal de macrophages. En cas d'inflammation, ce tissu lymphoïde offre un micro-environnement propice à un recrutement cellulaire intense. Les lymphocytes y sont générés en grand nombre et les leucocytes s'y relocalisent grâce aux molécules d'adhérence exprimées par l'endothélium et les cellules mésothéliales du péritoine (Bevilacqua *et al*, 1989 ; Lesley *et al*, 1993). Le tissu lymphoïde associé au péritoine assure également une dissémination des cellules péritonéales ayant rencontré l'antigène via les ganglions parathymiques et les ganglions trachéaux. De plus, ce tissu est en relation étroite avec le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin. Sminia *et al* (1995) ont suivi la migration de cellules péritonéales fluorescentes et montrent la relocalisation des cellules dendritiques et des macrophages péritonéaux dans les plaques de Peyer. Ces cellules présentent donc l'antigène rencontré au niveau péritonéal dans un site majeur d'induction d'une réponse IgA de haute affinité.

2.2.2. Les lymphocytes B1, source de plasmocytes à IgA dans l'intestin

L'association entre les lymphocytes péritonéaux et le GALT est particulièrement bien illustrée lors d'immunisation intrapéritonéale. En effet, l'administration d'antigènes par voie intrapéritonéale est une des meilleures voies pour induire une réponse IgA dans l'intestin associée à une réponse systémique. Ce phénomène est expliqué par les travaux de Kroese démontrant l'origine péritonéale de la moitié des plasmocytes à IgA de la lamina propria.

2.2.2.3. Les cellules B1, source de plasmocytes à IgA intestinaux

Plusieurs modèles expérimentaux décrits en partie dans le paragraphe Localisation anatomique ont permis de démontrer que les lymphocytes B1 de la cavité péritonéale sont des précurseurs de plasmocytes à IgA. La construction de souris chimères reconstituées, après irradiation, par de la moëlle osseuse et des cellules de la cavité péritonéale démontre l'origine péritonéale de 50% des plasmocytes de la lamina propria (Kroese *et al*, 1992). Plus tardivement, d'autres expériences ont confirmé ces résultats. Ce sont des expériences de transfert adoptif de cellules péritonéales ou de lymphocytes B1 chez les souris SCID (Kroese *et al*, 1995). La reconstitution de souris CBA/N *Xid* déficientes en cellules B1 par des cellules péritonéales enrichies ou déplétées en lymphocytes CD5⁺ démontre la participation des lymphocytes B CD5⁺ dans la production d'IgA intestinales suite à une immunisation par *Salmonella typhimurium* (Pecquet *et al*, 1991).

La transplantation d'omentum foetal chez la SCID permet également de repeupler l'intestin en cellules B1 (Solvason *et al*, 1991). L'analyse des souris transgéniques B6-Sp6 μ , κ révèle que l'expression des IgM et IgA endogènes est restreinte aux cellules B1 (Kroese *et al*, 1993).

L'ensemble de ces travaux apportent de nombreuses évidences de la contribution des cellules B1 au tissu lymphoïde associé à l'intestin. L'origine péritonéale et non conventionnelle de 50% des plasmocytes à IgA de l'intestin soulève cependant de nombreuses questions telles que les contributions fonctionnelles relatives des cellules B1 et

des lymphocytes B2 à l'immunité de la muqueuse intestinale. De même, on peut s'interroger sur les facteurs de différenciation commutant la production d'IgM des lymphocytes CD5⁺ de la cavité péritonéale vers la production d'IgA dans l'intestin et sur les sites d'expansion de ces cellules qui, dans la cavité péritonéale ne prolifèrent pas activement.

2.2.2.4. Réactivité avec la flore intestinale

IgM et antigènes microbiens

Les lymphocytes B1 de la cavité péritonéale produisent des IgM sériques dont la spécificité est assez bien documentée. Ce sont des anticorps dirigés contre les auto-antigènes et présentant des réactions croisées avec les antigènes de microorganismes. Ils sont dirigés contre les déterminants antigéniques tels que la phosphatidylcholine, le dextran, les polysaccharides de pneumocoques et certains épitopes de *Salmonella typhimurium* ou de *E. Coli*. Contrairement aux connaissances acquises sur les IgM, la description du répertoire des IgA sécrétées par les lymphocytes B1 est fragmentaire. Le lymphome CH12.LX capable de commuter de la production d'IgM à la production d'IgA réagit contre la phosphatidylcholine alors que le transfert de cellules B1 chez des souris déficientes CBA/N *Xid* restaure les réponses IgA muqueuse et sérique spécifiques de *Salmonella typhimurium* (Pecquet *et al*, 1992).

Réactivité des IgA avec les bactéries intestinales

Alors que les IgM produites par les lymphocytes B1 sont majoritairement multi-réactives et reconnaissent des auto-antigènes, les cellules sécrétrices d'IgA de l'intestin ne réagissent pas contre ces auto-antigènes et ne présentent pas les mêmes propriétés de multi-réactivité. La sécrétion d'IgA est induite par la présence de bactéries dans la lumière intestinale puisqu'elle est sévèrement réprimée chez les souris indemnes de pathogènes (Van der Heijden *et al*, 1989). L'analyse de la flore intestinale indique qu'une grande partie des bactéries est coatée par les IgA sécrétoires (Van der Waaij *et al*, 1994).

Deux études majeures ont permis de caractériser la réactivité des cellules B1 productrices d'IgA avec les bactéries de la microflore intestinale. Kroese *et al* (1996), suite aux expériences de transfert adoptif de cellules péritonéales chez la souris SCID démontrant la capacité des lymphocytes B1 à produire des IgA au niveau intestinal, montrent que les bactéries entériques des souris reconstituées sont coatées par les IgA portant l'allotype des cellules B1, dès la deuxième semaine après le transfert. Sitôt que les plasmocytes à IgA sont arrivés dans la lamina propria, ils sécrètent des anticorps reconnaissant les déterminants antigéniques des bactéries naturellement présentes dans la lumière intestinale. Bos *et al* (1994) confirment ces résultats en étudiant la réactivité d'hybridomes provenant des lymphocytes des ganglions mésentériques (site d'expansion des plasmocytes à IgA associés à l'intestin) (Cebra *et al*, 1994), de souris SCID reconstituées par les cellules péritonéales. Ces hybridomes sécrètent des IgA qui réagissent avec les bactéries fécales alors que des anticorps monoclonaux issus d'hybridomes produits à partir des splénocytes ne reconnaissent pas les épitopes bactériens. De plus, contrairement aux propriétés de non réarrangement du gène des immunoglobulines des lymphocytes B1, 6 hybridomes sur 8 présentent des mutations somatiques traduisant un processus de sélection par l'antigène (Bos *et al*, 1996).

Ainsi, les plasmocytes à IgA de la lamina propria de l'intestin ont une double origine, ils dérivent soit des lymphocytes conventionnels soit des cellules B1. La cible principale de ces anticorps est représentée par les bactéries entériques qui composent la flore intestinale endogène, non pathogène. Cette microflore bactérienne est un écosystème très stable. Kroese pose comme hypothèse que les IgA dérivant des deux lignées permettent de maintenir en équilibre cette flore. Le répertoire fixé des lymphocytes B1 offrirait une première ligne de défense contre les bactéries invasives pathogènes, relayée par la production d'IgA de haute affinité sécrétées par les lymphocytes conventionnels induits dans les plaques de Peyer.

2.3. Cytokines et régulation des lymphocytes B1

Un des points à clarifier dans le lien entre les cellules B1 et le tissu lymphoïde muqueux associé à l'intestin est la capacité des lymphocytes péritonéaux à produire préférentiellement des IgM alors que dans l'intestin, les plasmocytes qui en dérivent sécrètent des IgA. Peu d'études ont été consacrées à l'analyse des facteurs de commutation isotypique pour ces lymphocytes non conventionnels. Par contre, le rôle des interleukines dans le développement, l'activation ou la différenciation de ces cellules est mieux documenté.

2.3.1. Interleukines et orientation isotypique des lymphocytes B1

Observations en faveur de la commutation isotypique

Alors que les lymphocytes B1 reconnaissent beaucoup d'antigènes de manière T-indépendante, certains travaux mettent en évidence un effet auxiliaire des lymphocytes T sur la production d'anticorps et sur la commutation isotypique de ces cellules. Dans les situations pathologiques des maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde) ou des leucémies lymphocytaires chroniques, des mécanismes de mutations somatiques similaires à ceux des lymphocytes B2 ont été rapportés pour les cellules B CD5⁺ productrices d'auto-anticorps conduisant à des anticorps de haute affinité, mono-spécifiques, souvent associés à la sévérité de la pathologie (Ikematsu *et al*, 1992 ; Pater-Zyberk *et al*, 1992 ; Shirai *et al*, 1992). Les fonctions auxiliaires des cellules T auto-réactives sur le changement d'isotype des cellules B1 ont été également suggérées dans le cas du lupus érythémateux (Datta *et al*, 1987; Murakami *et al*, 1992).

Interleukines et orientation isotypique

L'effet des lymphocytes T sur la production d'anticorps a été étudié après transfert de lymphocytes B1 et de cellules T chez la souris SCID (Taki, 1992). Les lymphocytes B1 produisent en absence de lymphocytes T des IgM, des IgG3 et des IgA. Le transfert simultané de lymphocytes T provenant de souris élevées dans des conditions d'élevage conventionnelles augmente la production de ces isotypes et stimule la production d'IgG1 qui apparaît exclusivement dépendante des lymphocytes T. Au contraire, la production d'IgA n'est pas exclusivement conditionnée par des mécanismes T-dépendants mais elle est favorisée dans un contexte T.

Bien que peu d'études aient été consacrées à la description des facteurs favorisant la commutation isotypique des lymphocytes B1, quelques travaux permettent de confirmer, tout en restreignant, le rôle de l'IL-4 observé sur les lymphocytes B conventionnels dans l'orientation vers l'IgG1. Alors que l'IL-4 est un facteur de commutation vers les IgG1 et les IgE pour les lymphocytes B2, les travaux de Waldschmidt *et al* (1992) réalisés sur une population B péritonéale FcεRI⁻, (marqueur dont l'absence différencie les lymphocytes B1 péritonéaux des lymphocytes conventionnels), ont montré la capacité de ces cellules à produire des IgM et des IgG1 mais pas d'IgE, en réponse aux LPS et à l'IL-4. Tarlinton *et al* (1995) confirme que les lymphocytes B1 commutent des IgM vers les IgG1 mais à moindre fréquence par rapport aux lymphocytes B2, l'IL-4 induisant l'expression du transcript Cγ1 stérile, pré-requis indispensable à l'expression des IgG1. Cependant, la commutation des lymphocytes B1 se bloque à cette étape, limitant l'expression de cet isotype. L'expression majoritaire d'IgM par les cellules B CD5⁺ est également confirmée chez l'homme bien que l'activation des lymphocytes B via le CD40 et l'addition d'IL-2 entraîne la sécrétion d'IgG et d'IgA (Defrance *et al*, 1992).

Orientation vers l'IgA

Du lymphome B CD5⁺ CH12.LX dérivent différents clones exprimant des isotypes autres que les IgM. L'utilisation de ces clones a permis de caractériser les facteurs cellulaires impliqués dans la commutation d'un type d'immunoglobuline vers un autre isotype pour les lymphocytes B1 (Whitmore *et al*, 1992). Ce lymphome présente une propension plus importante à commuter vers l'IgA plutôt que vers n'importe quel autre isotype. Dans ce modèle, l'IL-4 apparaît comme un facteur non spécifique qui augmente la production de tous les isotypes. De même, alors que le TGF- β est une cytokine responsable du "switch" vers l'IgA pour les lymphocytes conventionnels, il augmente la fréquence de commutation vers tous les isotypes disponibles.

Les mêmes études réalisées sur des cellules B de la cavité péritonéale versus des lymphocytes B spléniques indiquent une production spontanée plus importante d'IgM, suivie des IgG2b et des IgG3, l'IL-4 augmentant la production d'IgA et d'IgG1 pour les lymphocytes B1.

L'IL-5 a un rôle différent selon l'origine des cellules B. Sur les lymphocytes B de la rate, elle augmente la sécrétion de tous les isotypes et ne favorise pas la production d'IgA proportionnellement aux autres immunoglobulines. Au contraire, sur les lymphocytes B péritonéaux, l'IL-5 augmente préférentiellement la production des IgA ; soit cette cytokine est un facteur de commutation isotypique pour les lymphocytes B1 alors qu'elle n'est qu'un acteur de différenciation terminale pour les lymphocytes B conventionnels déjà commutés vers l'IgA (Harriman *et al*, 1988) soit la cavité péritonéale contient une proportion plus grande de lymphocytes B IgM⁺ engagés vers la commutation pour l'IgA, caractérisant ainsi leur origine anatomique.

Le TGF- β , contrairement à son action pluripotente sur le lymphome CH12.LX, diminue l'expression de tous les isotypes des lymphocytes B1 péritonéaux, à l'exception de l'IgA.

De façon inattendue, l'IFN- γ qui induit la sécrétion d'IgG2a et bloque celle d'IgG1 dans le cas des lymphocytes B2, augmente *in vitro* la production de cet isotype mais aussi des IgM et des IgA (Altbaum *et al*, 1992).

L'IL-6 est une cytokine impliquée tardivement dans la sécrétion d'IgA pour les lymphocytes B conventionnels. Au niveau intestinal, elle induit la différenciation terminale des lymphocytes B IgA⁺ dérivant des plaques de Peyer, en cellules sécrétrices d'IgA (Beagley *et al*, 1989, 1991 ; Ramsay *et al*, 1994). Par contre, la production d'IgA par les lymphocytes B péritonéaux est indépendante de l'IL-6. C'est pourquoi des souris knock out pour le gène de l'IL-6 présentent encore des plasmocytes à IgA dans l'intestin dont l'origine est péritonéale (Beagley *et al*, 1995).

Effets des cytokines sur la commutation, la différenciation ou la production d'anticorps par les lymphocytes B1 et les lymphocytes B2

Interleukines	Lymphocytes B1 non conventionnels	Lymphocytes B2 conventionnels
IFN- γ	Augmentation des IgG1, des IgM et des IgA	Augmentation des IgG2a
TGF- β	Augmentation des IgA et de tous les isotypes	Commutation vers l'IgA Inhibition des autres isotypes
IL-4	Augmentation de tous les isotypes	Augmentation des IgG1 et des IgE, Diminution des IgM et des IgG3
IL-5	Commutation vers les IgA Augmentation de la sécrétion des Ig	Augmentation de la sécrétion des IgA et des Ig
IL-6	Sécrétion d'IgA indépendante	Sécrétion d'IgA dépendante

Les lymphocytes T et la production d'interleukines au niveau de l'intestin activent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'IgA. Il est possible que la présence importante de cellules Th2 dans la lamina propria (Mega *et al*, 1991) joue un rôle dans l'activation et la prolifération des cellules B1 qui, dès le contact avec un pathogène

produiront d'abord des IgM de faible affinité puis, dans le contexte immunitaire du GALT génèreront des IgA de haute affinité.

2.3.2. Interleukines, activation et régulation des cellules B1

L'IL-5 et l'IL-10, deux cytokines largement représentées au cours des infections par les helminthes sont impliquées dans le maintien et l'activation des lymphocytes B1.

Les lymphocytes B1 expriment de manière constitutive le récepteur de l'IL-5. L'utilisation de souris transgéniques pour cette cytokine a permis de démontrer son rôle dans le maintien des lymphocytes B1 qui utilisent des gènes d'immunoglobuline de type foetal (Kato *et al*, 1993). De même, l'expression *in vivo* d'IL-5 par un rétro-virus, augmente la proportion de cellules B1 et l'éosinophilie sans modifier le nombre de lymphocytes conventionnels (Vaux *et al*, 1990). De plus, l'administration d'IL-5 chez les souris transgéniques anti-RBC entraîne une augmentation du nombre des lymphocytes B1 péritonéaux et active leur différenciation en cellules productrices d'anticorps (Nitisani *et al*, 1995). A l'inverse, des souris knock out pour l'IL-5 présentent une déficience en cellules B1a dans les premières semaines de leur vie (Kopf *et al*, 1996).

L'IL-10 active d'une façon autocrine et paracrine les lymphocytes B1. L'administration continue d'anticorps neutralisant l'IL-10 déplete la population des lymphocytes B1 (Ishida *et al*, 1992). En plus, parmi les lymphocytes B, les cellules B1 représentent la source principale d'IL-10 (O'Garra *et al*, 1992). Cette production constitutive expliquerait les propriétés d'auto-renouvellement continu des lymphocytes B non conventionnels. de plus, les cellules B1 sont donc susceptibles d'intervenir dans l'immunorégulation des populations lymphocytaires T helper et la présentation des antigènes.

A l'opposé, l'IFN- γ inhibe l'activité des cellules B1 (Hitoshi *et al*, 1989 ; Chase *et al*, 1993) et l'administration d'IL-12 entraîne une diminution du nombre des cellules B1 et décroît l'activité fonctionnelle de ces lymphocytes (Vogel *et al*, 1996). Le rôle inhibiteur de ces deux cytokines est confirmé dans la schistosomiase expérimentale murine où l'expansion

des lymphocytes B1 est bloquée par l'injection d'IFN- γ ou d'IL-12 ou l'administration d'anti-IL-10 (Velupillai *et al*, 1996).

2.3. Le système immunitaire muqueux : un système primitif et un système moderne

D'une manière générale, le développement des lymphocytes B et T peut être considéré comme un phénomène évolutif et stratifié (Herzenberg et Herzenberg, 1989). En effet, les lymphocytes B1 et les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont générés très tôt pendant l'ontogénie et représentent le premier système immunitaire des vertébrés alors que les lymphocytes B et T conventionnels émergent plus tard dans le développement.

Le GALT est un système immunitaire très ancien que l'on retrouve chez tous les vertébrés, y compris chez le cyclostome (Pasquier, 1989). IL est composé d'un système immunitaire primaire comprenant les lymphocytes intra-épithéliaux T $\gamma\delta$ et les lymphocytes B1 de la lamina propria qui s'auto-renouvellent et sont générés indépendamment du thymus et de la moëlle osseuse ; et d'un système immunitaire plus évolué, qui comprend les lymphocytes conventionnels qui dérivent de cellules souches de la moëlle osseuse et du thymus et qui sont induits dans les plaques de Peyer. Les lymphocytes B1 et T $\gamma\delta$ ont une faible affinité et une large spécificité pour les auto-antigènes et les antigènes de micro-organismes. Les caractéristiques des anticorps exprimés font des cellules B1 la première ligne de défense contre les agressions bactériennes puisqu'ils sont en place, déjà réactifs sans avoir besoin de muter les gènes de leurs immunoglobulines pour reconnaître l'antigène.

Parallèlement, les lymphocytes conventionnels montent une réponse beaucoup plus sophistiquée avec la production d'anticorps spécifiques et de haute affinité, qui relaie le système de défense plus primitif que représentent les lymphocytes B1.

3. La mutation *Xid*

La fonctionnalité biologique des lymphocytes B1 a pu être approchée, *in vivo*, grâce à l'utilisation de souris totalement dépourvue en cellules B CD5⁺ : la souris *Xid* (X-linked immunodeficiency). L'opportunité de ce modèle a permis d'évaluer la participation de ces cellules dans la réponse immune, notamment lors de pathologies infectieuses. De plus, depuis la caractérisation moléculaire du déficit *Xid*, ces souris sont très appréciées pour l'étude des fonctions tyrosine kinase impliquées dans la transduction cytoplasmique d'un signal membranaire.

3.1. Définition et origine

Mise en évidence à l'origine sur des souris CBA/N, la déficience *Xid* est portée par le chromosome X et est donc transmise par les femelles (Wicker et Scher, 1986). Le phénotype *Xid* est associé à la mutation d'un seul acide aminé dans la région N terminale de la protéine Bruton tyrosine kinase (Btk), enzyme sans activité récepteur impliquée dans la phosphorylation des protéines lors de la transduction d'un signal membranaire (Tsukada *et al*, 1993 ; Vetrie *et al*, 1993). Cette mutation conduit, chez l'homme, à un déficit en lymphocytes B très sévère (X-linked agammaglobulinemia ou XLA) et chez la souris à une absence totale de lymphocytes B1 associée à un défaut d'activation et une réduction du nombre de lymphocytes B conventionnels matures (*Xid*) (Rawlings *et al*, 1993 ; Khan *et al*, 1995). Thomas *et al* (1993) ont montré par ailleurs la colocalisation des gènes associés à la déficience XLA ou à la déficience *Xid*.

La réduction du nombre de lymphocytes B matures et l'absence de lymphocytes B1 est lié à un arrêt précoce dans le développement des lymphocytes B après l'apparition du stade pro-B B220⁺ Cμ⁻. A ce stade, les lymphocytes ont réarrangé les gènes de leurs immunoglobulines mais n'expriment pas encore au niveau membranaire les immunoglobulines (Karagogeos *et al*, 1986). Très récemment, Brorson *et al* (1997) ont montré que les lymphocytes B chez les souris *Xid* présentent une activité tyrosine kinase identique à celle des lymphocytes d'animaux non déficients mais qu'une fois activés, les

lymphocytes n'entrent pas dans le cycle de division cellulaire et subissent des phénomènes d'apoptose très fréquents. Ces auteurs confirment le rôle crucial de la Btk dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation du développement et des fonctions des lymphocytes B. Cette enzyme intervient dans les événements immédiats consécutifs à l'activation des lymphocytes B, dans le contrôle de l'apoptose mais également dans les événements liés à l'activation des cyclines. De plus, plusieurs équipes montrent un lien entre les niveaux d'expression de la Btk et la possibilité de corriger le défaut *Xid* en améliorant le développement et l'activation par l'antigène des lymphocytes B (Satterthwaite *et al*, 1997 ; Maas *et al*, 1997)

3.2. La souris *Xid*

Comme précédemment évoqué, la mutation *Xid* a d'abord été mise en évidence sur les souris CBA/N. Actuellement, après de nombreux croisements, cette déficience a pu être transmise dans un fond génétique de BALB/c et nous disposons dans notre laboratoire de souris BALB. *Xid*. Les souris qui portent la mutation *Xid* ont des lymphocytes B qui présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles très différentes des lymphocytes B de souris normales. A l'opposé, le compartiment T ne semble pas affecté par cette mutation et les réponses T sont proches de celles observées chez les animaux non déficients (Wicker et Scher, 1986).

3.2.1. Phénotype des lymphocytes B

Le phénotype *Xid* est associé à une absence complète de lymphocytes B CD5⁺ (Hayakawa *et al*, 1983 ; Herzenberg *et al*, 1986 ; de la Hera *et al*, 1987) et au développement de lymphocytes B2 porteurs d'un phénotype particulier. Chez les souris normales, les lymphocytes B2 périphériques sont divisés en deux sous-populations : une majeure composée de lymphocytes B folliculaires matures (RF) qui recirculent et qui sont CD23⁺ HSA^{lo} sIgD^{hi} et une population très mineure composée de lymphocytes immatures qui viennent de migrer de la moëlle osseuse (TR) et qui sont CD23⁻ sIgD^{lo} sIgM⁺⁺⁺. Les

souris CBA/N comportent une proportion importante (40%) de lymphocytes "transitionnel" TR et des lymphocytes (60%) ressemblant aux lymphocytes RF mais qui expriment encore fortement les IgM (Klaus *et al*, 1997). Les souris *Xid* présentent donc un retard dans le développement de leurs lymphocytes B matures et expriment à l'âge adulte un phénotype B propre à celui de souris néo-natales (Wicker et Scher, 1986) avec la présence du marqueur HSA (anciennement BLA-1) exprimé de manière importante sur les cellules en transition (Hardy *et al*, 1983 ; Klaus *et al*, 1997).

En plus de leur phénotype immature, les lymphocytes B des souris *Xid* ont une faible durée de vie (Oka *et al*, 1996), ils entrent spontanément en apoptose *in vitro* (Woodland *et al*, 1996). La mort de ces lymphocytes est relative à une expression faible de la protéine anti-apoptotique bcl-2 mais peut-être évité par l'introduction du transgène bcl-2 (Klaus *et al*, 1997 ; Woodland *et al*, 1996).

L'ensemble de ces observations conclut à un défaut important dans les mécanismes de maturation des lymphocytes B. Chez la souris *Xid*, la maturation semble s'arrêter aux cellules nouvellement formées dans la moëlle osseuse.

3.2.2. Caractéristiques des immunoglobulines

Une des grandes caractéristiques des souris *Xid* est leur incapacité à répondre aux antigènes thymo-indépendants de type 2 (antigènes polysaccharidiques ou haptènes conjugués au Ficoll) (Wicker et Scher, 1986) et également à monter une réponse primaire efficace suite à une immunisation optimale (Ridderstad *et al*, 1996). De plus, les souris CBA/N sont incapables de produire des anticorps spécifiques des phosphorylcholines, ce qui corrèle avec l'absence de lymphocytes B CD5⁺ (qui sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance de ces épitopes) (Lim *et al*, 1994).

Les animaux déficients produisent des taux d'IgM et d'IgG3 très réduits comparés aux animaux immuno-compétents (2 à 20% et 3 à 15 % des taux normaux d'IgM et d'IgG3) et des réponses IgG1, IgG2a et IgG2b identiques (Wicker et Scher, 1986 ; Brorson *et al*, 1995).

3.2.3. Déficience *Xid* et activation des lymphocytes B

Parallèlement à la présence de cellules B immatures et à l'expression d'un phénotype membranaire particulier, les lymphocytes B des souris *Xid* ne sont pas sensibles aux mêmes signaux d'activation. Aussi, dès 1975, Scher *et al* remarquaient une prolifération très réduite des lymphocytes B de souris *Xid* suite à la stimulation aux LPS (Scher *et al*, 1975). De même, les anticorps anti- μ n'entraînent pas la prolifération des lymphocytes (Sieckmann *et al*, 1978).

La réponse aux stimuli par différents mitogènes est chronologiquement associée au développement des lymphocytes B. Ainsi, chez les souris normales, à 2 semaines, les lymphocytes B répondent aux LPS, l'activation engendrée par la voie du CD40 est positive dès 6 semaines et enfin, les lymphocytes de souris adultes prolifèrent sous l'effet des anti-immunoglobulines (ou anti-CD38) (Klaus *et al*, 1997). Les lymphocytes B "transitionnels" (TR) des souris CBA/N sont incapables de proliférer sous l'effet du LPS contrairement à ceux des souris normales ; par cet aspect, ils ressemblent plutôt à des lymphocytes très immatures que l'on retrouve normalement dans le foie foetal ou la moëlle osseuse (Kearney *et al*, 1975 a, b). A l'opposé, les lymphocytes recirculants (RF) prolifèrent en réponse aux LPS et via le CD40 mais ne synthétisent pas d'ADN lorsqu'ils sont stimulés via le récepteur B ou le CD38 (Mond *et al*, 1983 ; Santos Argumedo *et al*, 1995).

En plus des signaux d'activation membranaires, l'IL-5 et l'IL-10 sont des cytokines qui activent les lymphocytes B et particulièrement les lymphocytes B1. La mutation sur le gène *btk* entraîne une réduction du nombre de cellules B exprimant la chaîne α du récepteur de l'IL-5. Les lymphocytes qui expriment le récepteur sont, en plus, moins sensibles à cette cytokine (Hitoshi *et al*, 1993 ; koike *et al*, 1995 ; Baba *et al*, 1997). De même, les lymphocytes B des souris *Xid* n'augmentent pas l'expression du CMH classe II en réponse à l'IL-10 (Go *et al*, 1990).

L'ensemble de ces différents travaux permet de conclure à une population B très particulière chez la souris *Xid*. D'une part, ces souris déficientes présentent une absence de la population B non conventionnelle, une propension élevée de ses lymphocytes à mourir

par apoptose et une grande proportion de lymphocytes bloqués à un stade immature. D'autre part, les lymphocytes phénotypiquement proches des lymphocytes B de souris normales ne sont pas activables par leur récepteur à l'antigène et ne répondent pas aux facteurs cellulaires tels que l'IL-5 et l'IL-10.

3.3. Implication dans les modèles parasitaires

La disponibilité de souris porteuses de la mutation *Xid* dans un fond génétique contrôlé a permis d'évaluer la participation des lymphocytes B et plus particulièrement des lymphocytes B CD5⁺ à la réponse immune développée au cours de différentes pathologies infectieuses et notamment les infections par les parasites intra-cellulaires tels que *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania major*. Dans ces deux types de parasitose, la résistance à l'infection est vouée à l'expression d'un profil cellulaire Th1 et tout particulièrement à la production d'IFN- γ (Heinzel *et al*, 1989 ; Minoprio *et al*, 1993). L'absence de lymphocytes B CD5⁺ augmente la résistance contre *Trypanosoma cruzi* et diminue la susceptibilité des BALB/c infectées par *Leishmania major* (Minoprio *et al*, 1991 ; Hoerauf *et al*, 1994). Ces travaux indiquent que ces lymphocytes contribuent à l'orientation cellulaire T vers un profil Th2 délétère.

Très récemment, l'équipe de Hoerauf a évalué les répercussions de la mutation *Xid* sur l'évolution d'un parasite extracellulaire (filaire) dont le développement au sein de son hôte conduit à l'expression d'une réponse cellulaire de type Th2 (Al-Qaoud *et al*, 1998). Les souris déficientes présentent une susceptibilité plus grande à l'infection, un plus grand nombre de vers associé à une diminution de la production d'IL-10 et à l'absence d'anticorps spécifiques.

Ces différents modèles révèlent une participation importante de la composante B et notamment B CD5⁺ dans les réponses immunitaires associées à l'expression de la susceptibilité ou de la résistance à un parasite, de façon directe de part la production d'anticorps, mais également indirectement en orientant la réponse cellulaire Th.

Le rôle orientateur des lymphocytes B1 sur la réponse immune, l'origine non conventionnelle de 50% des plasmocytes à IgA de l'intestin et l'exposition intense et continue des surfaces muqueuses aux antigènes de *Schistosoma mansoni* nous ont encouragés, au cours de ce travail de thèse, à évaluer l'implication de cette population lymphocytaire peu connue dans l'immunité muqueuse anti-schistosome.

RESULTATS

Préambule

La démonstration chez l'homme et dans les modèles expérimentaux d'une relation liant la réponse IgA spécifique de l'antigène Sm28GST et l'expression d'une immunité à la schistosomiase, nous a incités à analyser les facteurs susceptibles d'orienter vers cette réponse isotypique. Dans ce contexte, la première partie de nos travaux démontrera le rôle des facteurs parasitaires, et plus particulièrement ceux liés aux oeufs du schistosome, dans l'induction de la réponse IgA, au cours de l'infection murine (*Résultats - Partie I*).

Dans un second temps, nous apporterons différents éléments relatifs à la participation d'une population lymphocytaire B distincte des lymphocytes B conventionnels, les lymphocytes B1 ou B CD5⁺, dans l'installation de la réponse IgA humorale et muqueuse spécifique de ce parasite et à ses conséquences sur l'évolution de l'infection parasitaire (*Résultats - Partie II*).

Influence des facteurs parasitaires sur l'expression de la réponse IgA

L'analyse des mécanismes d'induction et de régulation de la réponse IgA nécessite, en préalable, la définition de schémas d'immunisation susceptible de conduire à l'expression de cet isotype. Le premier point de nos travaux expérimentaux a donc été consacré à l'étude comparative de différents protocoles d'immunisation impliquant des voies d'administration parentérales (sous-cutanées) ou locales (voies muqueuses) de notre antigène d'intérêt.

Progressivement, notre travail a évolué vers la description de facteurs associés aux oeufs du schistosome et de leurs rôles d'une part dans l'induction de la réponse IgA anti-schistosome et d'autre part dans l'orientation du profil T auxiliaire spécifique de l'antigène Sm28GST vers l'expression d'un profil Th2.

1. Incidence de différents protocoles d'immunisation sur la réponse humorale et cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST

L'efficacité du protocole d'immunisation sur l'induction de la réponse IgA sérique ou sécrétoire spécifique de l'antigène Sm28GST a été évaluée sur la base de 2 critères :

- 1) Le suivi cinétique du profil isotypique induit au cours des différents schémas d'immunisation
- 2) L'analyse *in vitro* de la production de cytokines de type Th1 (IFN- γ et IL-2) ou Th2 (IL-4 et IL-5) au niveau des organes lymphoïdes des souris immunisées suite à la stimulation des cellules en présence de mitogène T (ConA) ou d'antigène (Sm28GST), 8 jours après la dernière immunisation.

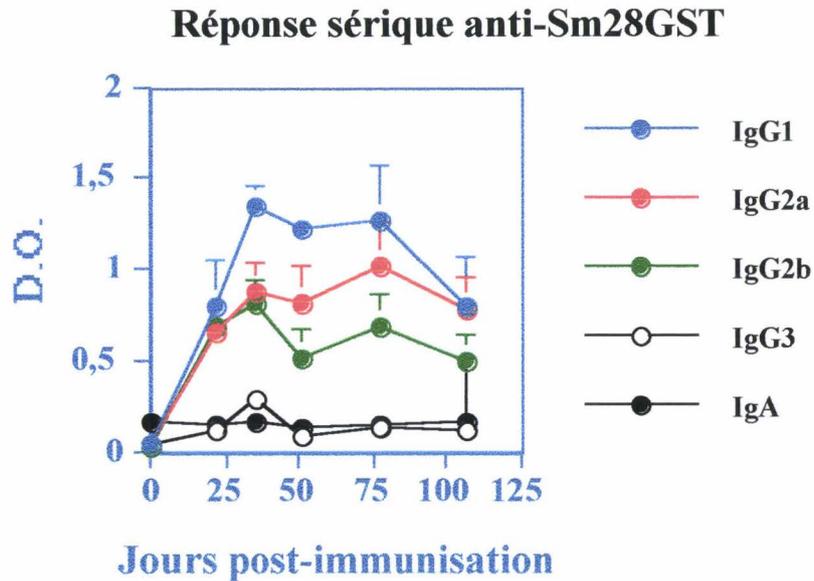
1.1. Administration de l'antigène Sm28GST par voie parentérale

Dans cette première série d'expériences, différents paramètres ont été pris en compte :

- la dose administrée (quantité d'antigènes et effet d'un rappel)
- la nature de l'adjuvant (adjuvant complet de Freund ou hydroxyde d'Alum)
- et le fond génétique des souris, dans leur incidence sur la réponse isotypique

Les expériences d'immunisation par voie parentérale ont été réalisées par voie sous-cutanée, à la base de la queue.

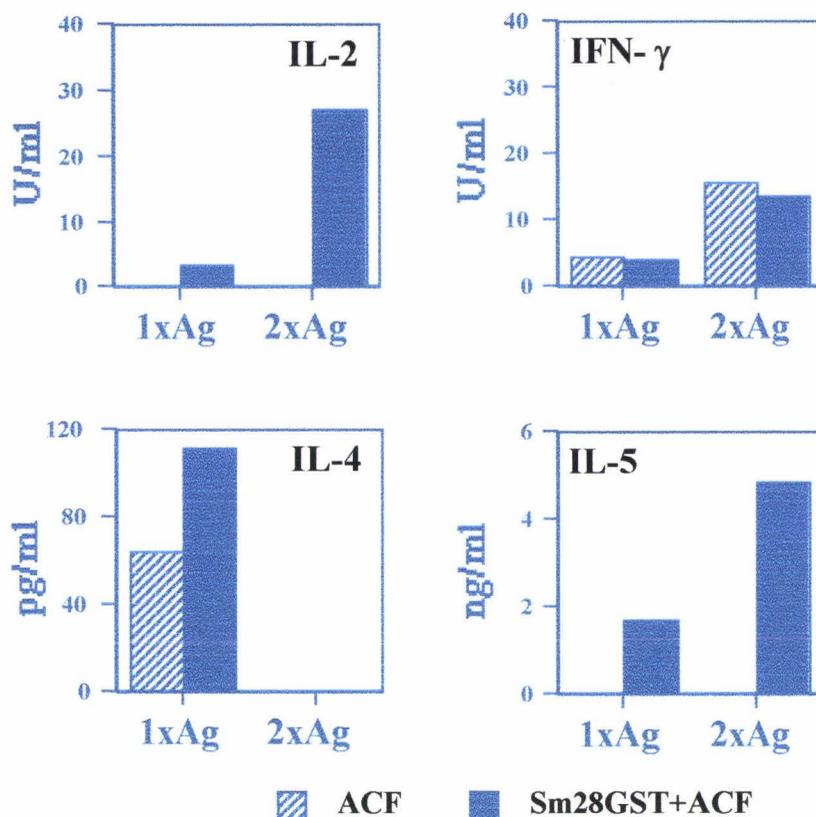
1) Immunisation par l'antigène Sm28GST en présence d'adjuvant complet de Freund



L'analyse de la réponse isotypique chez des souris BALB/c immunisées par 10µg d'antigène Sm28GST en présence d'adjuvant complet, révèle une production majoritaire d'IgG1 accompagnée d'IgG2a et d'IgG2b. Les réponses IgG1 et IgG2a atteignent des taux maximums 30 jours après l'administration de l'antigène et se maintiennent jusqu'à 75 jours après l'immunisation puis décroissent. La réponse IgG2b est également maximale à J30 mais transitoire puisqu'elle diminue par la suite. Les taux d'IgG3 sont proches du seuil de détection à l'exception du J33 où il a été possible de détecter une réponse positive mais fugace. Ce protocole d'immunisation ne conduit pas à l'expression d'IgA spécifique de l'antigène Sm28GST.

L'analyse des cytokines induites par ce protocole (10µg Sm28GST +ACF) ou par le même protocole suivi d'un rappel à J21 en présence d'adjuvant incomplet de Freund, est présentée dans le graphe ci-dessous.

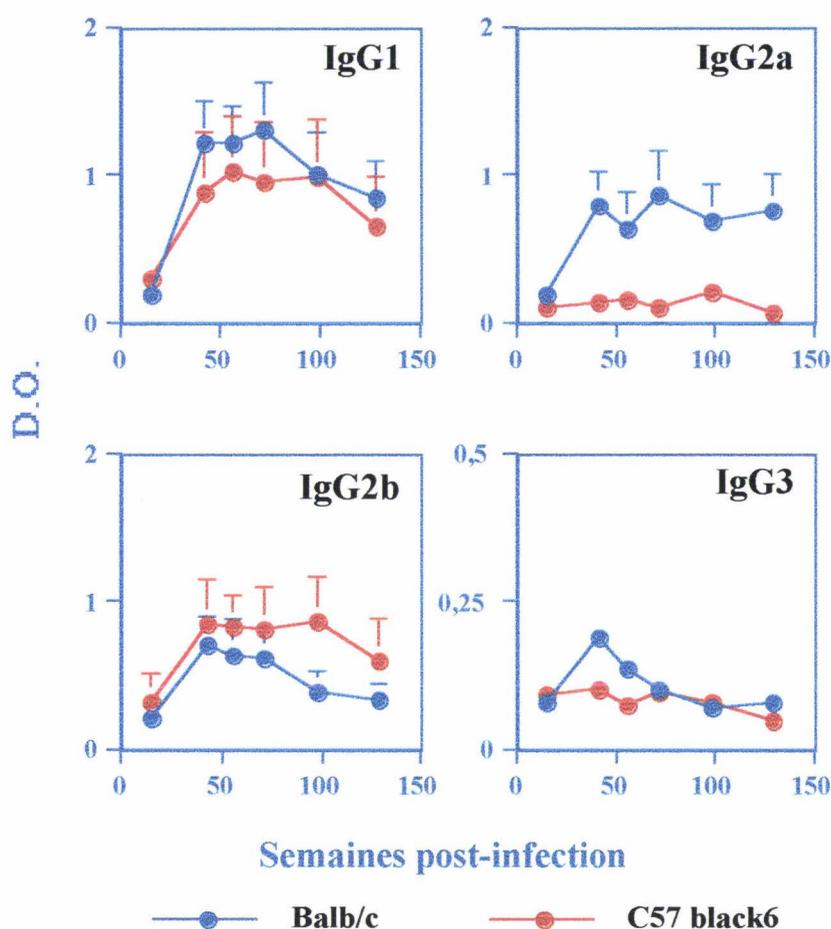
Splénocytes



Les splénocytes des souris immunisées 1 fois produisent de l'IL-5, de l'IL-4 et des taux faibles d'IL-2 en réponse à la stimulation par l'antigène Sm28GST, alors que la ConA en induit une très forte production. On observe une production d'IFN-γ non spécifique de l'antigène, retrouvée dans le groupe contrôle ayant reçu uniquement l'adjuvant. L'administration d'un rappel entraîne une augmentation des taux de cytokines sécrétées à l'exception de l'IL-4 qui n'est plus produite 8 jours après le rappel.

2) Effet de la souche de souris, immunisation par l'antigène Sm28GST en présence d'adjuvant complet de Freund

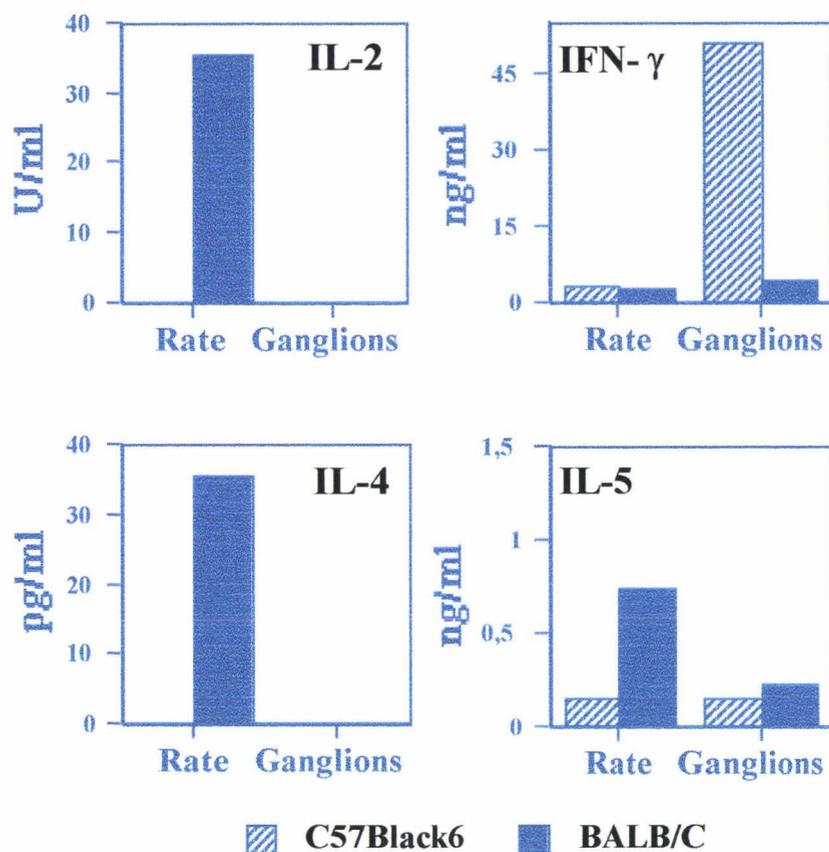
Des souris BALB/c et C57Black6 ont reçu une dose de 25µg d'antigène Sm28GST en présence d'adjuvant complet et les réponses isotypiques ont été analysées à différents temps de cinétique.



L'immunisation par une dose plus élevée d'antigène ne modifie pas le profil isotypique enregistré dans l'expérience précédente. Il n'entraîne pas l'apparition d'isotypes exprimés de façon mineure tels que les IgG3 ou les IgA.

L'utilisation d'une souche de souris différente ne conduit pas à l'expression d'une réponse IgA spécifique mais fait apparaître une différence majeure en ce qui concerne la sous-classe IgG2a qui est totalement absente chez ces animaux. Les souris C57Black6 expriment des taux similaires d'IgG1 et d'IgG2b.

L'analyse du profil cellulaire a été effectuée à la fois sur les splénocytes et les cellules ganglionnaires inguinales des deux souches de souris immunisées en parallèle par 10 μ g de Sm28GST en présence d'ACF. Les résultats sont reportés dans la figure ci-dessous.



Dans le cas de la souris BALB/c, la production de cytokines par les splénocytes, décrite à J8 dans le § précédent est confirmée alors que les organes ont été récupérés à J28. Les ganglions drainant le site d'injection ne produisent que très peu d'IFN- γ , pas d'IL-2 ni d'IL-4 et des taux plus faibles d'IL-5. Ces différences quantitatives entre la rate et les ganglions pourraient être liées aux conditions de culture différentes ($2 \cdot 10^6$ cellules par puits contre 10^7 pour la rate).

Dans les mêmes conditions d'immunisation, les splénocytes de la souche C57Black6 ne produisent aucune cytokine détectable de manière spécifique de l'antigène (bien que les taux d'IL-2 sécrétés lors d'activation mitogénique soient identiques entre les deux souches, indiquant la viabilité et la fonctionnalité des cellules). Seule l'IL-5 produite dans la rate a été détectée en quantité très inférieure par rapport à la BALB/c. L'unique cytokine très fortement exprimée chez les C57Black6 est l'IFN- γ dont les taux sont très importants dans les ganglions inguinaux.

3) Immunisations par l'antigène Sm28GST, en présence d'hydroxyde d'Alum (résultats non présentés)

Une immunisation et deux rappels par 10 μ g de Sm28GST en présence d'hydroxyde d'Alum ont été effectués chez la souris C57Black6. L'absence d'IgG2a est confirmée dans cette souche quelque soit l'adjuvant et les réponses IgG1 et IgG2b observées dans les protocoles avec l'ACF restent les réponses majoritaires. Malgré trois injections de Sm28GST, aucune production d'IgA n'a été caractérisée.

Suite à l'administration de 25 μ g de Sm28GST en présence d'hydroxyde d'Alum, il n'a pas été possible de déterminer le profil lymphocytaire T spécifique de l'antigène Sm28GST du fait d'une expression non spécifique dans le groupe adjuvant. Seule la sécrétion d'IL-5, plus faible que dans le cas d'immunisation en présence d'adjuvant complet, s'avère différente de celle du groupe contrôle (résultats non présentés). L'IL-10, dosée dans cette expérience, est sécrétée de manière spécifique par les splénocytes. Des taux très élevés d'IL-2 sont observés dans le cas d'une stimulation mitogénique.

1.2. Administration de l'antigène Sm28GST par voie muqueuse

L'inefficacité des différents protocoles d'immunisation parentérale à induire des anticorps d'isotype IgA nous a conduits à administrer l'antigène par voie muqueuse et à cibler plus précisément la muqueuse intestinale. Ce choix d'introduire l'antigène au niveau muqueux est justifié par le fait que les IgA sont l'isotype majoritaire produit et sécrété par les muqueuses de l'organisme. Cette approche devait nous permettre de choisir un protocole de référence, sélectionné pour sa capacité à induire une réponse IgA sérique ou muqueuse spécifique de l'antigène Sm28GST qui nous conduirait à étudier les mécanismes cellulaires à la base de l'induction de cet isotype.

1.2.1. Immunisation per os

Deux protocoles d'administration de l'antigène par voie orale ont été utilisés, après diète des animaux et neutralisation préalable des sucs gastriques. La détection d'IgA spécifiques représente le facteur discriminant.

1) L'administration, chez la souris C57Black6, de 100µg d'antigène Sm28GST sans adjuvant à l'aide d'une sonde gastrique, ne conduit pas à la sécrétion d'IgA spécifiques dans les sérums ni dans les lavages intestinaux, 8 ou 15 jours après le gavage.

2) Le deuxième protocole utilise une formulation chimique du peptide 190-211 de l'antigène Sm28GST, les lipopeptidyl-résines 190-211, décrits comme inducteurs d'une réponse IgA muqueuse spécifique (Rollin, thèse de Doctorat). La méthode consiste en 4 administrations de la formulation chez la souris BALB/c et les réponses sont analysées 4 jours après la dernière administration (J32). Bien que scrupuleusement suivie, elle n'a pas conduit à la détection d'IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST. L'utilisation en parallèle de la Sm28GST soluble administrée par voie orale confirme, chez la BALB/c et après plusieurs administrations, les résultats négatifs obtenus dans le premier protocole *per os* effectués chez la souris C57Black/6.

1.2.2. Immunisation intra-plaque de Peyer

Face à l'absence de réponse IgA dans les méthodes par gavage avec l'antigène ou les lipopeptidyl-résines, nous avons introduit l'antigène directement au sein des plaques de Peyer. Cette voie, décrite pour la préparation d'hybridomes sécréteurs d'IgA nous permettait d'éviter le risque de dégradation par les sucs gastriques ou l'induction de mécanismes de tolérance, en ciblant directement les sites d'induction de la réponse muqueuse. L'introduction de l'antigène s'est faite en respectant l'intégrité du mésentère, 9µg de Sm28GST en moyenne ont été administrés par souris, répartis sur 3 ou 4 plaques de Peyer.

Alors que les souris produisent dès le 8^{ème} jour après l'administration une réponse poly-isotypique anti-TTc, la production d'anticorps spécifiques de la Sm28GST est tardive et hétérogène. Tandis que certaines souris commencent à produire des IgA sériques spécifiques de TTc dès 8 jours et que 60% des animaux présentent une réponse positive à J15, la réponse IgA anti-Sm28GST est différée, peu intense et concerne un faible nombre d'animaux.

Réponse IgA intestinale

Lavages intestinaux

	IgA anti-Sm28GST	IgA anti-TTc
Jours		
8	-	-
15	-	-
30	-	1/5
45	-	3/5
60	1/5	3/5

La réponse muqueuse spécifique de TTc apparaît plus tardivement que son homologue sérique soit à 30 jours, seule une souris sur cinq produit, à la fin de l'expérimentation, des IgA intestinales anti-Sm28GST.

La possibilité d'induire des réponses spécifiques de l'antigène Sm28GST, malgré la faible fréquence d'animaux répondeurs et la faible intensité nous a encouragés à évaluer la sécrétion de cytokines par les splénocytes et les ganglions mésentériques des souris traitées par rapport à des animaux naïfs dont les cellules étaient restimulées de la même manière. Deux cytokines, l'IL-2 et l'IFN- γ ont pu être détectées, de manière différentielle par rapport aux souris saines lors d'une restimulation par TTc, la restimulation par l'antigène Sm28GST n'a pas conduit à la sécrétion d'interleukines.

Face aux réelles difficultés que nous avons rencontrées dans l'induction d'une réponse IgA spécifique de l'antigène Sm28GST dans un modèle d'immunisation systémique ou muqueux, nos approches se sont orientées sur le rôle inducteur des oeufs du schistosome dans la réponse IgA observée au cours de l'infection murine par *S. mansoni* (article 1) et sur leur potentiel polarisateur de la réponse cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST.

2. Influence des facteurs parasitaires sur l'orientation cellulaire et isotypique vers l'IgA

Différents travaux ont démontré le rôle des oeufs dans la régulation négative du profil Th1 et l'induction de la réponse Th2 observées au cours de la schistosomiase expérimentale murine, effet exercé également à l'encontre d'antigènes non parasitaires. Ces propriétés des oeufs sur la polarisation Th2, associées à l'importance des cytokines Th2 dans la différenciation et l'activation des lymphocytes B IgA⁺ nous ont encouragés à évaluer leur contribution à l'induction des réponses IgA sériques et intestinales, chez la souris BALB/c infectée. Ces résultats sont présentés, en intégralité dans l'article 1.

2.1. Rôle des antigènes d'oeufs dans l'induction de la réponse IgA anti-*Schistosoma mansoni*

ARTICLE 1

O. Poulain-Godefroy, S. Gaubert, S. Lafitte, A. Capron et J.M. Grzych

Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : Stimulatory role of egg antigen

Infection and Immunity, 1996, 64, 763-768

Contexte :

- 1) Les IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST participent à l'immunité protectrice anti-schistosome
- 2) Les oeufs du schistosome sont responsables de l'émergence du profil Th2 et de la régulation négative du profil Th1
- 3) Les oeufs sont en contact avec les sites inducteurs du système immunitaire muqueux associé à l'intestin (GALT)

Questions posées :

- 1) Comment évoluent les réponses IgA sériques (par rapport aux IgG) et IgA sécrétoires, chez la BALB/c infectée par *S. mansoni* ?
- 2) Quelle est la part des oeufs dans l'induction de la réponse IgA ?

Immunoglobulin A Response in Murine Schistosomiasis: Stimulatory Role of Egg Antigens

ODILE POULAIN-GODEFROY,* SOPHIE GAUBERT, SOPHIA LAFITTE, ANDRÉ CAPRON,
 AND JEAN-MARIE GRZYCH

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U167, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France

Received 25 August 1995/Returned for modification 9 October 1995/Accepted 12 December 1995

The immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses to different *Schistosoma mansoni* antigens have been determined in chronically infected mice as well as in unisexually infected animals. With a panel of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), soluble antigens from furcocercariae, adult worms, and eggs were probed with sera collected at 3-week intervals. Bisexually infected animals developed significant IgG and IgA antibody responses to the antigens tested, which increased after egg deposition. In unisexual infections, no significant differences were recorded in the IgG antibody profile for furcocercaria and adult worm antigens, whereas the IgA antibody response was impaired. Both the IgA and IgG antibody responses toward egg antigens were reduced compared with those in a bisexual infection. Furthermore, a specific mucosal IgA antibody response was observed only in the bisexually infected animals. Histological analysis performed on bisexually infected mice led to the observation of eggs and granulomatous lesions within the Peyer's patch follicles, which are essential sites for the induction of mucosal immunity in the intestine. These data suggest a relationship between egg deposition and the induction of the IgA antibody response toward schistosomes.

The role of immunoglobulin A (IgA) antibodies has been widely investigated during the past decades in various bacterial, viral, and parasitic infections. These studies have allowed the identification of some of the functional properties of this isotype and indicated its participation in several mechanisms involved either in host defense or in pathological events (24). IgA antibodies were shown to inhibit antigen uptake (immune exclusion), to inhibit complement fixation, to stimulate cellular cytotoxicity, and to facilitate antigen clearance (2). In different parasitic diseases, IgA antibodies are associated with protection and participate in cytotoxicity and modulation of various cell types (6, 7, 13, 14).

More recently, investigations of human schistosomiasis shed new light upon unsuspected functions of IgA antibodies. Particularly, IgA antibodies specific to a protective recombinant *Schistosoma mansoni* antigen (glutathione-S-transferase: Sm28GST) (1) were shown to inhibit significantly the enzymatic activity of this antigen and were associated with a reduction in the fecundity of schistosomes (8). These studies revealed a parallel between the age-dependent increase in IgA antibody levels to Sm28GST and the acquisition of resistance to reinfection. This suggested that IgA antibodies might participate in the protective immune response against schistosomiasis.

S. mansoni is a helminthic parasite which produces eggs while residing in the mesenteric vasculature and portal system of the host. Each worm pair continuously produces numerous eggs, which pass through the intestinal wall for excretion in the feces or are carried to the liver, where they induce pathology caused by granuloma formation and subsequent fibrosis. While it has been known for a long time that parasite eggs are in close contact with the gut-associated mucosal system, little interest has been devoted to the analysis of the mucosal response in schistosomiasis and in particular to the effects of egg stimulus

upon the expression of this immune response. To answer these questions, and since IgA antibody represents a major component of mucosal immunity, we monitored the appearance of this isotype in serum and in gut washes both in mice harboring normal bisexual infections (leading to the production of eggs) and in animals carrying unisexual schistosome infections (all male or female worms), in which parasite eggs are absent.

MATERIALS AND METHODS

Animals and parasites. Female BALB/c mice (6 weeks old at the beginning of the experiment) were purchased from Iffa Credo (L'Arbresle, France). Noninfected animals were kept as controls.

A Puerto Rican strain of *S. mansoni* was maintained with *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts (bred in mineral water [Sté des Eaux de Volvic, Volvic, France]) and golden hamsters as definitive hosts. Mice were infected by percutaneous exposure of the abdominal skin to 25 cercariae.

Unisexual infections were performed with cercariae shed from snails infected by a single miracidium. The unisexual nature of the infection was confirmed by the absence of eggs in the feces and in the livers of the animals.

Adult worms were recovered from 40-day-infected hamsters by portal vein perfusion (22).

Antigens. Soluble adult worm antigens (SWAP) were 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 × g. Cercaria antigens (FC) were prepared from cercariae washed in PBS at 4°C, disrupted by 5 min of sonication, and centrifuged for 15 min at 10,000 × g.

Soluble egg antigens (SEA) were extracted from homogenized eggs isolated from the livers of 40-day-*S. mansoni*-infected hamsters. Briefly, frozen eggs were disrupted by eight passages through an X-press (A.B. Biox, Jarfalla, Sweden), and the soluble fraction was collected after centrifugation for 15 min at 10,000 × g.

After protein concentrations were determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), antigenic preparations were sterilized by passage through 0.22-µm membrane filters.

Sample collection. Ether-anesthetized animals were bled and killed by cervical dislocation. Intestinal washes were performed as previously described (18). Briefly, intestines were clamped below the cecum and then removed. After the outside was rinsed with PBS, the intestines were perfused with 2 ml of a solution composed of 25 mM NaCl, 40 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM NaHCO₃, 50 mM EDTA, and 162 mg of polyethylene glycol 3350 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) per ml. Soybean trypsin inhibitors (Sigma), 0.1 mg/ml each, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were added. Washings were cleared by two successive centrifugations (500 × g for 10 min at 4°C and 10,000 × g for 10 min at 4°C). Supernatants were collected, supplemented with 1 mM PMSF, and then stored at -20°C.

* Corresponding author. Mailing address: INSERM U167, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 20 87 77 87. Fax: (33) 20 87 78 88.

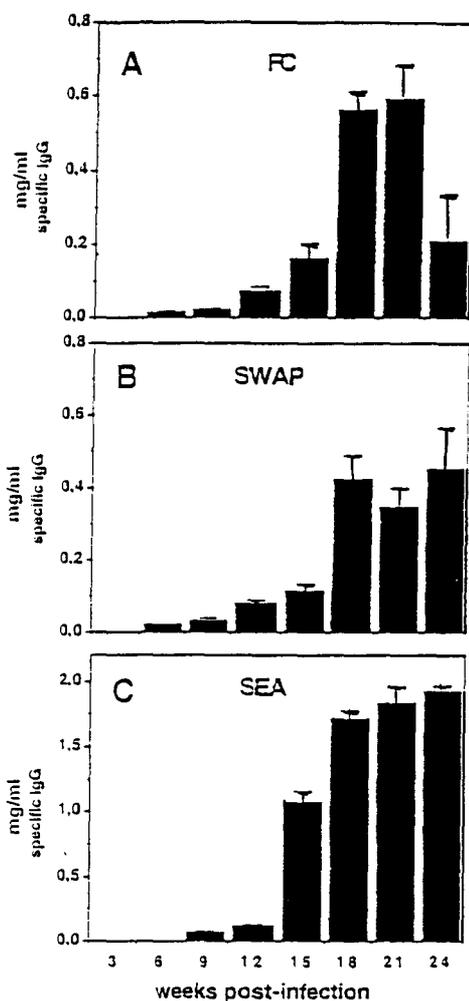


FIG. 1. Evaluation of IgG antibody profiles to *S. mansoni* antigen preparations in BALB/c mice serum after bisexual infection. Data correspond to 10 animals per group (mean \pm standard deviation [SD]).

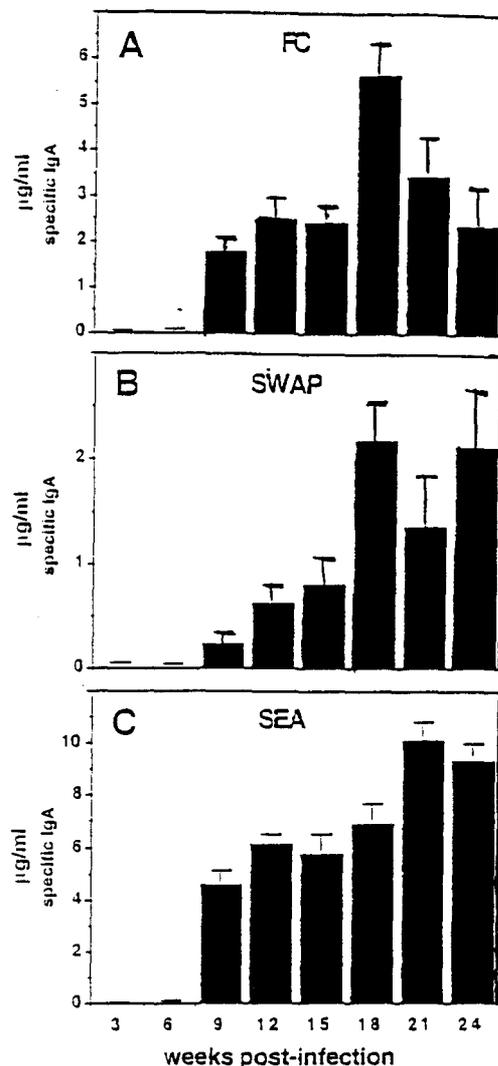


FIG. 2. Evaluation of IgA antibody profiles to *S. mansoni* antigen preparations in BALB/c mice serum after bisexual infection. Data correspond to 10 animals per group (mean \pm SD).

Spleens were removed from infected mice, and single-cell suspensions were prepared as previously described (9). Briefly, spleens were forced through fine wire mesh, and splenic erythrocytes were lysed by osmotic treatment (170 mM Tris-buffered saline, 155 mM ammonium chloride solution) followed by three washes in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France). Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion, and 10^7 cells were resuspended in 1 ml of culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum [JRH BioSciences, Lenexa, Kans.], gentamicin [50 µg/ml; Schering-Plough, Levallois-Perret, France], 2 mM 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]). One milliliter of cell suspension was incubated alone or in the presence of FC (100 µg/ml), SWAP (200 µg/ml), SEA (10 µg/ml), or concanavalin A (5 µg/ml; Seromed) in 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Supernatants were collected after 24 h for interleukin-4 (IL-4) measurement and after 72 h for gamma interferon (IFN- γ) and IL-5 assays.

Reagents. Goat polyclonal antibodies to mouse IgA (Sigma) were biotinylated for detection with biotin-*N*-hydroxysuccinimide ester (Calbiochem, San Diego, Calif.). Briefly, 2 mg of goat antibody to mouse IgA in 1 ml of bicarbonate buffer (0.1 M, pH 8.5) was incubated with 100 µg of biotin-*N*-hydroxysuccinimide ester for 3 h at room temperature. Unbound biotin-*N*-hydroxysuccinimide ester was removed by overnight dialysis against PBS. The conjugate was titrated before use. Biotinylated goat polyclonal antibodies to mouse IgG (γ specific) were purchased from Sigma. The specificity of anti-IgA and anti-IgG biotinylated conjugates was assessed on different mice IgG and IgA monoclonal antibodies (MAB); no cross-reactivity was observed.

Cytokine production was evaluated by two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific MAb to murine cytokines. MAB were all purchased from PharMingen (San Diego, Calif.). For IFN- γ detection, purified anti-IFN- γ

MAB R4-6A2 was used in combination with the biotinylated anti-IFN- γ MAB XMG1-2. Purified anti-IL-4 MAB and biotinylated anti-IL-4 MAB were derived from clones BVD4-1D11 and BVD6-24G2, respectively. Purified anti-IL-5 MAB and biotinylated anti-IL-5 MAB were purified from clones TRFK5 and TRFK4, respectively. Recombinant mouse IL-4 (rIL-4) and rIL-5 were obtained from PharMingen; recombinant mouse IFN- γ (rIFN- γ) was from Genzyme (Cambridge, United Kingdom).

Quantification of immunoglobulins. To detect specific antibodies, ELISAs were performed on Maxisorp plates (Nunc, Intermed S. A., Denmark) coated overnight at 4°C with 100 µl of a 5-µg/ml solution of either SEA, SWAP, or FC diluted in PBS per well. Total IgA or IgG was investigated under the same conditions with 100 µl of a 10-µg/ml solution of anti-mouse IgA or mouse IgG polyclonal antibodies diluted in PBS per well. After three washes with PBS+0.1% Tween 20, blocking of unoccupied sites was performed with 100 µl of a 0.5% gelatin solution in PBS per well. Samples were diluted (serum dilutions from 1:50 to 1:5,000,000) and washes from 1:2 to 1:10 in PBS+0.1% Tween 20 (Prolabo) and were incubated on plates (100 µl per well) overnight at 4°C and washed three times with PBS+0.1% Tween 20. The plates were then incubated with biotinylated anti-mouse IgA or IgG antiserum (100 µl per well) for 1 h at 37°C. After three washes with PBS+0.1% Tween 20, the plates were incubated with 100 µl of streptavidin-peroxidase conjugate (1:2,000; Amersham, Les Ulis, France) per well for 30 min at 37°C and developed with *O*-phenylenediamine dihydrochloride substrate (1 mg/ml) (Sigma). Thirty minutes later, 100 µl of 2 N HCl was added to each well, and the absorbance at 492 nm was determined with an automated microplate reader (Titertek Multiskan; Labsystems). The amount of total IgA or IgG antibody was evaluated by reference to standard curves constructed with

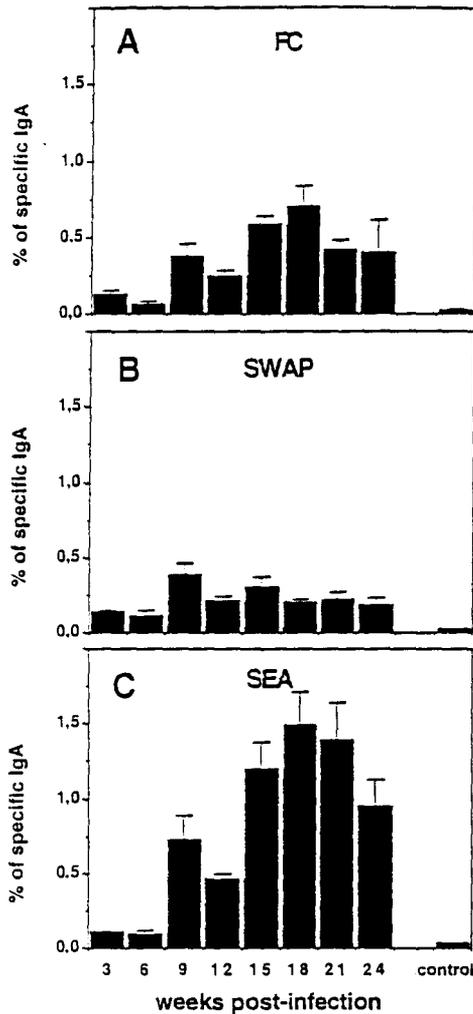


FIG. 3. Comparative analysis of IgA antibody to *S. mansoni* antigen preparations in BALB/c mice gut washes after bisexual infection. Specific IgA is expressed as a percentage of total IgA, and data correspond to 10 animals per group (mean \pm SD). The control bar represents the value obtained for uninfected mice.

known amounts of mouse myeloma IgA (MOPC 315; Sigma) or mouse myeloma IgG(κ) (MOPC 21; Sigma). In our conditions, the detection limits of the ELISA were 0.1 ng/ml for IgA and 0.1 ng/ml for IgG. The concentration of specific IgA and IgG antibodies was defined by comparing the absorbance obtained in the test with a standard curve constructed with the myelomas IgA MOPC 315 and IgG MOPC 21. Since it is difficult to standardize the collection of intestinal lavages, the presence of specific IgA antibodies to schistosome antigens was evaluated as a percentage of the total amount of nonspecific IgA.

Cytokine assays. Cytokine detection was performed on Maxisorp plates coated overnight at 4°C with 100 μ l of purified anticytokine MAb in coating buffer (0.1 M NaHCO₃, 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6) per well at 2 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, and 1 μ g/ml for the anti-IFN- γ MAb, anti-IL-4 MAb, and anti-IL-5 MAb, respectively. After one wash in PBS-0.1% Tween 20, unoccupied sites were blocked with 200 μ l of PBS-0.5% gelatin per well for 1 h. After three washes with PBS-Tween, supernatants were added and incubated overnight at 4°C; the plates were washed and incubated for 90 min at 37°C with biotinylated anticytokine MAb (100 μ l per well) diluted in PBS-0.1% Tween 20 at 0.4 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, and 0.5 μ g/ml for biotinylated anti-IFN- γ , anti-IL-4, and anti-IL-5 MAb, respectively. Amplification and detection were performed as previously described for immunoglobulin quantification. Cytokine levels were calculated by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. Values ranged between 0.1 and 10 ng/ml for IL-5 and IFN- γ and 20 to 1,250 pg/ml for IL-4.

Histological studies. Samples of intestine from infected mice were fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with hematoxylin (Merck).

RESULTS

Analysis of IgG and IgA antibody responses. Mice were infected with only 25 cercariae in order to keep them alive for a protracted period. Every 3 weeks, mice were bled and gut washes were performed.

The total amounts of IgG and IgA as well as the specific IgG and IgA antibody responses have been determined. We observed an increase in production of IgG from week 8 (2 mg/ml) to the end of the experiment (8 mg/ml) compared with the control (0.5 mg/ml). For IgA, a similar increase was recorded, from 20 μ g/ml at week 8 to 170 μ g/ml at week 18.

The results summarized in Fig. 1 and 2 represent the time course of the serum IgG and IgA antibody responses during a bisexual chronic infection. IgG antibodies to FC and SWAP were detected from the 6th week after infection and then increased until the 18th week (Fig. 1A and B). Significant amounts of IgG antibody to SEA were observed after 9 weeks (Fig. 1C). The analysis of the specific serum IgA antibody

TABLE 1. Comparative analysis of specific IgG and IgA antibodies in sera to different stage-specific antigens in bisexual and unisexual infections by *S. mansoni*^a

Antigen	Wk postinfection	IgG (μ g/ml)		Significance ^b	IgA (ng/ml)		Significance ^b
		Bisexual	Unisexual		Bisexual	Unisexual	
FC	3	0	0	NS	0	0	NS
	6	15 \pm 2	10 \pm 3	NS	0	96 \pm 41	NS
	9	23 \pm 4	30 \pm 1	NS	1,794 \pm 334	12 \pm 94	***
	12	73 \pm 11	33 \pm 5	NS	2,520 \pm 477	55 \pm 32	*
	15	161 \pm 40	58 \pm 6	*	2,245 \pm 385	117 \pm 0	***
SWAP	3	0	0	NS	0	0	NS
	6	21 \pm 2	25 \pm 4	NS	0	11 \pm 32	NS
	9	35 \pm 5	62 \pm 4	**	233 \pm 108	82 \pm 20	NS
	12	80 \pm 7	56 \pm 10	NS	623 \pm 178	53 \pm 0	*
	15	116 \pm 17	89 \pm 8	NS	801 \pm 256	0	**
SEA	3	0	0	NS	0	0	NS
	6	0	0	NS	0	48 \pm 31	NS
	9	75 \pm 8	38 \pm 6	*	4,609 \pm 515	29 \pm 102	***
	12	122 \pm 6	28 \pm 7	***	6,130 \pm 382	59 \pm 0	***
	15	1,078 \pm 75	47 \pm 6	***	5,760 \pm 723	0	***

^a Values are means \pm standard deviation for groups of 4 to 10 animals.

^b NS, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ for bisexual versus unisexual infections by Student's *t* test.

TABLE 2. Comparative analysis of specific IgA antibodies in gut washes to different stage-specific antigens in bisexual and unisexual infections by *S. mansoni*

Antigen	Specific IgA ^a (% of total IgA)		
	Bisexual	Unisexual	Control
FC	0.587 ± 0.058 (***)	0.041 ± 0.009 (NS)	0.031 ± 0.005
SWAP	0.306 ± 0.058 (***)	0.035 ± 0.006 (NS)	0.024 ± 0.002
SEA	1.197 ± 0.173 (***)	0.041 ± 0.014 (NS)	0.033 ± 0.005

^a Ratio between specific IgA antibody and total IgA. Values are means ± standard deviation for groups of 4 to 10 animals. NS, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$ versus control by Student's *t* test.

response to the three different preparations of *S. mansoni* antigens (Fig. 2) indicates a similar appearance of this isotype (9 weeks) compared with IgG. In both cases, antibody responses to SEA were higher and seemed to remain stable, while wider fluctuations toward FC and SWAP were observed. Globally, infected animals progressively developed the IgG antibody response between weeks 6 and 12, whereas the appearance of the IgA antibody response is noticed at 9 weeks. The analysis carried out on the gut washes collected from these animals allowed us to follow the production of specific secretory IgA to the same antigens. As shown in Fig. 3, secretory IgA to FC, SWAP, and SEA was detected at different periods after infection, with a higher signal for egg-associated antigens. For SEA, specific secretory IgA represents 1.3% (week 18) of the total IgA contained in the samples, while lower amounts (0.3% at week 18 and 0.5% at week 9) were obtained for FC and SWAP. According to the detection limit of our test, weak but significant IgA antibody responses were detectable earlier in the gut washes than in serum samples.

Quantification of specific IgG and IgA antibodies during unisexual infections. Unisexual infections were performed in different groups of mice with cercariae from snails infected with one miracidium. Mice were bled every 3 weeks. The animals were then killed, and gut washes were performed.

The analysis of the IgG and IgA antibody responses to the different stage-specific antigens is summarized in Table 1. These data indicate differences in the development of the antibody response between bisexual and unisexual infections. Globally, between the 3rd and 6th weeks postinfection, the levels of IgG and IgA are comparable. Thereafter, obvious differences were recorded in specific IgA levels for FC and SWAP between unisexual and bisexual infections. When responses toward SEA were measured, higher levels of IgG and IgA antibodies were found in bisexually infected mice after 6 weeks. Concomitantly, in unisexually infected animals, the level of specific IgA, expressed as a percentage of total IgA in the gut washes, was dramatically reduced to near the background values observed in control mice (Table 2).

Cytokine production. The follow-up study of cytokine production by antigen-stimulated splenocytes collected from infected mice, summarized in Fig. 4, indicates that significant production of IL-4 and IL-5 coincides with the beginning of egg deposition (6 to 8 weeks after the initial cercarial exposure), whereas during the same period, the production of IFN- γ dramatically decreases.

Analysis of gut-associated lymphoid tissue. Since Peyer's patches are the essential site of mucosal IgA antibody induction in the gut, histological analyses were carried out on different samples collected from infected mice. Schistosome eggs were found in the mucosa as well as in the Peyer's patches from 9 weeks to the end of the experiments. Figure 5 shows a

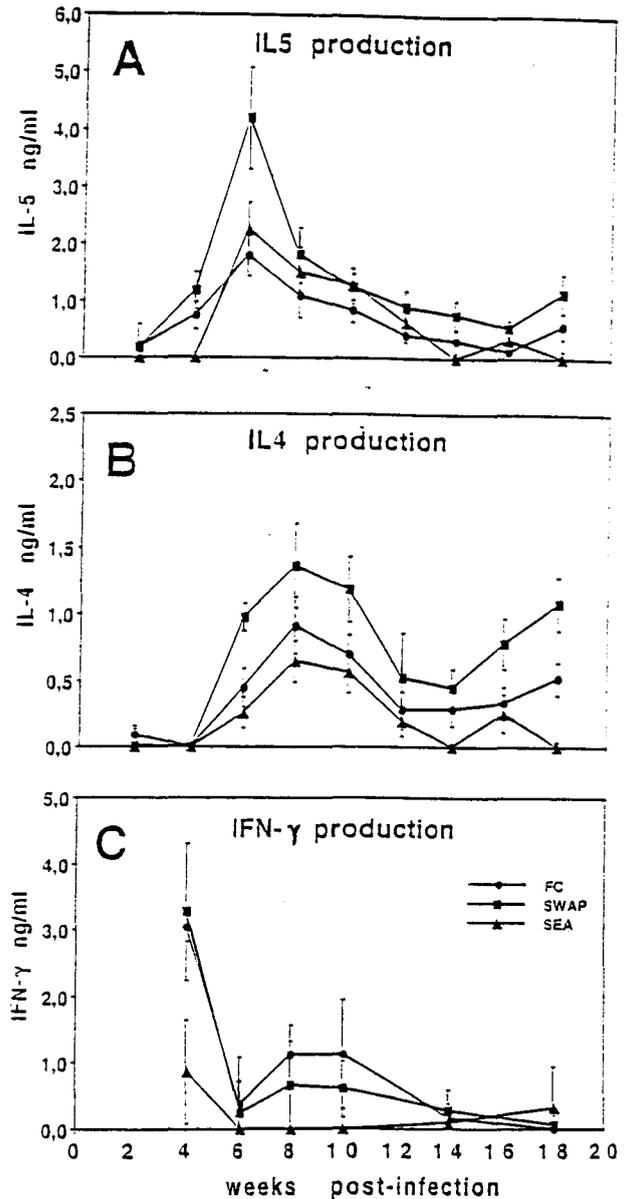


FIG. 4. Cytokine production by spleen cells from bisexually infected BALB/c mice. Cells from infected mice were stimulated with FC (100 μ g/ml), SWAP (200 μ g/ml), or SEA (10 μ g/ml), and cytokine levels in culture supernatants were evaluated. Means (\pm SD) of duplicate analyses of supernatants for five individual mice are presented.

lymphoid follicle of a mouse 21 weeks after infection in which there are several eggs surrounded by a granuloma-like structure.

DISCUSSION

The comparative analysis of the IgA and IgG antibody responses toward schistosome antigens indicated differences in the levels of these two classes during the time course of uni- and bisexual infections. Egg burden was evaluated: no egg was found in unisexual infection either in feces or in the liver (data not shown). Before egg deposition, the two groups developed a similar IgG and IgA response against FC, SEA, and SWAP. Significant differences appeared thereafter in the levels of IgA

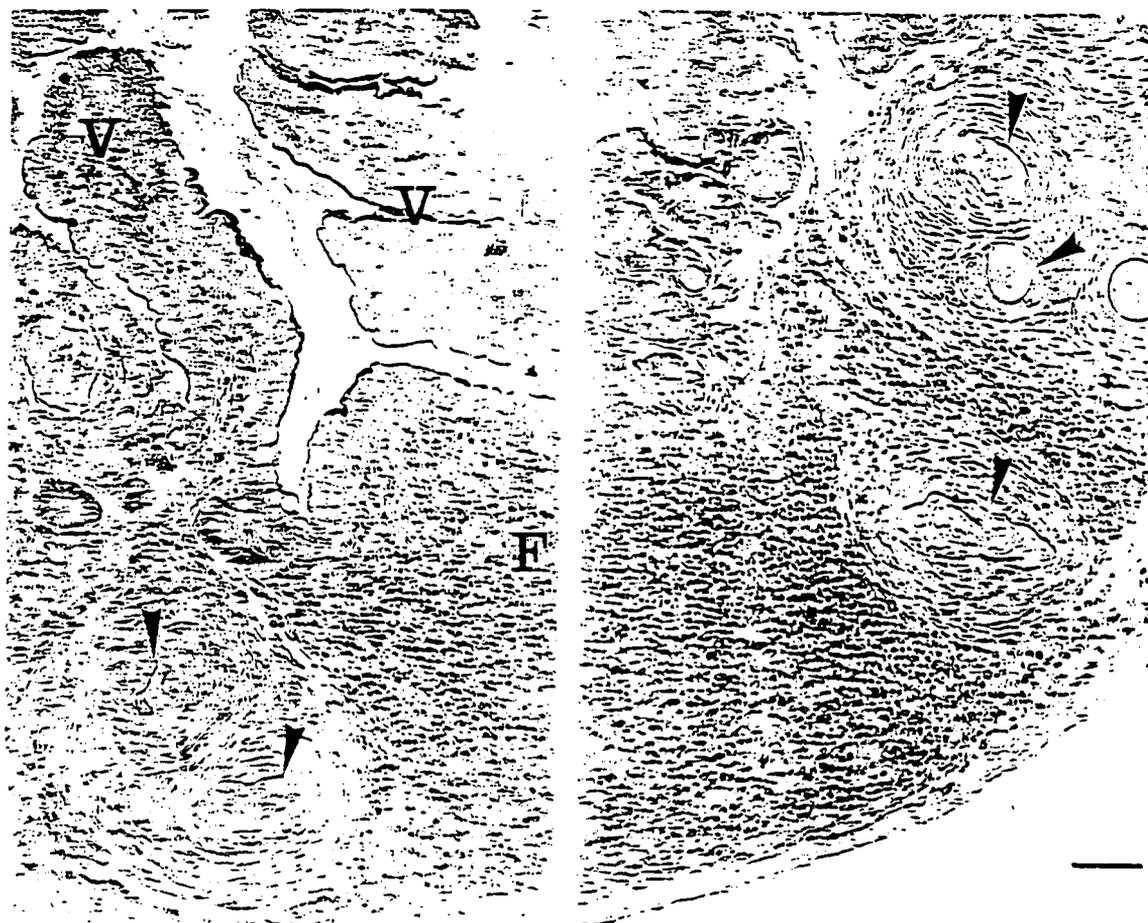


FIG. 5. Cross section of a lymphoid follicle of a Peyer's patch of a 21-week-*S. mansoni*-infected mouse. F, follicle; arrowheads, eggs; V, villosity. Bar, 50 μ m.

antibodies between uni- and bisexual infections. These data suggest that eggs or egg-associated antigens could be responsible for the induction of an IgA antibody response to schistosomes. This hypothesis takes into account previous observations which emphasize the role of eggs in the upregulation of the Th-2 response, accompanied by a downregulation of the Th-1 response (9, 20). This T-cell polarization leads to the production of type 2 cytokines, e.g., IL-4, IL-5, and IL-10, that induce the proliferation of B cells and the expression of a specific isotype profile (16, 17). In the mouse model, the role of IL-4 and IL-5 has been related to the maturation of IgA-expressing cells to IgA-secreting cells (12).

In our experiments performed in BALB/c mice, the Th-1 and Th-2 profiles (evaluated on the basis of IFN- γ and IL-4 and IL-5 production) are comparable to those previously reported in the literature for other strains (9). We observed a downregulation of IFN- γ production and a marked increase in IL-4 and IL-5 release coinciding with the beginning of egg deposition. This phenomenon is accompanied by a significant increase in the IgG1 antibody response (associated with Th-2) to the schistosome antigens, whereas the signal detected for IgG2a (associated with Th-1) remains very weak, near the background level (data not shown). These observations strongly support the hypothesis that in schistosomiasis, eggs might represent an essential factor for installation of the IgA antibody responses via the induction of appropriate cytokines. More precisely, it appears that the potentiating effect for this type 2 response is essentially driven by an oligosaccharide

structure largely expressed in eggs (25). Furthermore, it has been reported (11) that SEA may express a polarizing activity on nonparasitic antigens like sperm whale myoglobin, which is known to induce the characteristic type 1 response. In our model, this phenomenon would explain the major differences recorded in the levels of specific IgA to furcocercaria and adult worm antigens between uni- and bisexual infections, whereas, globally, IgG antibody responses to the same antigens were similar. Furthermore, in both groups, the analysis of the mucosal IgA antibody response indicates a correlation between the levels of IgA antibodies in serum and in gut washes.

IgA antibodies represent a major component of the mucosal immune response (24), and Peyer's patches are the most studied IgA inductive sites (15). They consist of several follicles displaying a dome region, mostly constituted of lymphocytes and macrophages, covered by an epithelium expressing M cells specialized in the uptake and transport of luminal antigen (19). Follicle cells are organized around a follicle germinal center, a site of active cell proliferation. IL-5 secreted by antigen-activated type 2 cells induces B cells to proliferate and to migrate into germinal centers. In response to IL-4, IL-5, IL-6, and transforming growth factor β , which are also produced by type 2 cells, B lymphoblasts express surface IgA molecules as a result of a class switch (10, 15). Afterwards, IgA⁺ cells leave the follicle, enter the circulation, and migrate to mucosal sites, where they differentiate into IgA plasmocytes.

We observed eggs inside the follicles of Peyer's patches (Fig. 4). Since living eggs continuously release antigens which may

locally activate presenting cells, T cells, and B cells in the follicle, this can lead to a strong IgA response. Thus, one can suppose that the IgA antibody response reflects the initial stimulation of the gut-associated lymphoid tissue by egg-associated antigens, followed by plasmacyte migration. The unexplained early but slight IgA response in gut washes could correspond to an initial IgA induction by parasites in other sites before oviposition. Cercariae penetrate the host through the skin and reach the lung as schistosomula within a few days after the initial exposure. As the larvae are in close contact with the lung immune system, a primary stimulation would occur. The IgA response in the gut could be explained by taking into account the fact that activated lymphocytes derived from one mucosal surface can circulate and relocate selectively to other mucosal surfaces (5). Such an induction of IgA secretion has already been reported in *Toxocara canis* and *Nippostrongylus brasiliensis* infections during the migration of parasite larvae through the lung (3, 21) but not in chronically *S. mansoni*-infected mice (4). The discrepancies observed between our data and those already published may be related simply to the limits of detection of the methods. In our hands, the use of biotin-streptavidin allows a limit of detection of 0.1 ng/ml, compared with the 42 ng/ml reported by Crabtree et al. (4).

Despite the interest of these observations, it seems difficult at this time to evaluate the effect of these IgA antibodies on the outcome of the parasite infection. Nevertheless, in schistosome infections, IgA antibodies have already been reported to be involved in the induction of cytotoxicity towards schistosomula in the presence of eosinophils (7). Furthermore, in humans, IgA antibodies to Sm28GST have been related in vitro to other effector functions, such as inhibition of enzymatic activity, inhibition of egg laying, and impairment of egg viability (8), unless the mechanisms by which this isotype acts are still unelucidated. The particular properties of IgA could have deep consequences on the development of a vaccine by preventing the limitation of egg deposition, the expression of the related pathology, and transmission of the infection. It thus appears to be essential to further analyze the real functions of this isotype both at a systemic and at a local level. In this context, murine schistosome infection could be considered an appropriate model to investigate and understand the mechanisms involved in the regulation of mucosal immune responses, since it is generally admitted that human IgA physiology is close to mouse IgA physiology (23). In particular, no blood-to-bile IgA transport occurs in either humans or mice, while there is very active transport in rats (24).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the EEC (Bio2CT-CT930111).

We thank Claudie Verwaerde, Gilles Riveau, and Raymond Pierce for their helpful discussion.

REFERENCES

1. Bailoul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce, and A. Capron. 1987. A purified 28000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138:3448-3453.
2. Befus, D., T. Lee, P. Ernst, T. Egwang, P. McElroy, J. Gaudie, and J. Bienenstock. 1986. Unique characteristics of local responses in host resistance to mucosal parasitic infections. *Ver. Parasitol.* 20:175-194.
3. Buijs, J., W. H. Lokhorst, J. Robinson, and F. P. Nijkamp. 1994. *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluids. *Parasite Immunol.* 16:1-9.
4. Crabtree, J. E., C. E. Pullar, L. K. Trejdosiewicz, and R. A. Wilson. 1992. Murine intestinal humoral responses in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Scand. J. Immunol.* 35:361-367.
5. Croitoru, K., and J. Bienenstock. 1994. Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue, p. 141-149. *In* Handbook of mucosal immunology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
6. Davis, P. A., and P. Porter. 1979. A mechanism for secretory IgA-mediated inhibition of the cell penetration and intracellular development of *Eimeria tenella*. *Immunology* 36:471-477.
7. 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.
8. Grzych, J. M., D. Grezel, C. B. Xu, J. L. Neyrinck, M. Capron, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and D. Capron. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 150:527-535.
9. Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, and A. Sher. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146:1322-1327.
10. Kraehenbühl, J. P., and M. R. Neutra. 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72:853-879.
11. Kullberg, M. C., E. J. Pearce, S. E. Hieny, A. Sher, and J. A. Berzofsky. 1992. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1:Th2 cytokine responses to a non-parasitic antigen. *J. Immunol.* 148:3264-3270.
12. Lebnan, D. A., and L. R. Coffman. 1994. Cytokines in the mucosal immune system, p. 243-250. *In* Handbook of mucosal immunology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
13. Leid, R. W., and J. F. Williams. 1974. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. I. Immunoglobulin classes involved in passive transfer of resistance. *Immunology* 27:195-208.
14. Lloyd, S., and E. J. L. Soulsby. 1978. The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology* 34:939-945.
15. McGhee, J. R., J. Mesteky, M. T. Dertzbaugh, J. H. Eldridge, M. Hirasawa, and H. Kiyono. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10:75-88.
16. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and L. R. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
17. Mosmann, T. R., and L. R. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46:111-147.
18. Nedrud, J. G., X. Liang, N. Hague, and M. E. Lamm. 1987. Combined oral/nasal immunization protects mice from Sendai virus infection. *J. Immunol.* 139:3484-3492.
19. Owen, R. L., and T. H. Ermak. 1990. Structural specializations for antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer Semin. Immunopathol.* 12:139-152.
20. Pearce, E. J., P. Caspar, J. M. Grzych, F. A. Lewis, and A. Sher. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173:159-166.
21. Ramaswamy, K., and D. Befus. 1993. Pulmonary immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*: isotype-specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluids of rats. *Parasite Immunol.* 15:573-582.
22. Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55:695-700.
23. Tomasi, T. B., and H. M. Grey. 1972. Structure and function of immunoglobulin A. *Progr. Allergy* 16:81-213.
24. Underdown, B. J., and J. M. Schiff. 1986. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4:389-417.
25. Velupillai, P., and D. A. Harn. 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.

Les travaux rapportés dans cet article nous ont permis de conclure que :

1) avant la ponte des oeufs, les réponses IgG et IgA sont de même intensité chez les animaux infectés de manière monosexuée ou bisexuée,

2) les réponses IgG et IgA augmentent très fortement après l'oviposition,

3) en absence d'oeufs, chez les animaux soumis à une infection monosexuée, les réponses IgA sériques et intestinales spécifiques des différents stades parasitaires sont très réduites.

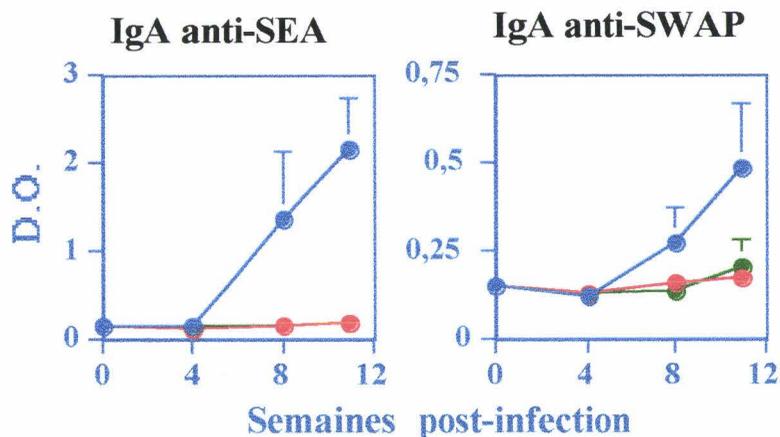
Ces observations suggèrent donc que parallèlement à leur rôle polarisateur de la réponse Th2, les antigènes associés aux oeufs du schistosome stimulent la production d'IgA de spécificité parasitaire.

2.2. Interleukines et orientation isotypique dans l'infection monosexuée

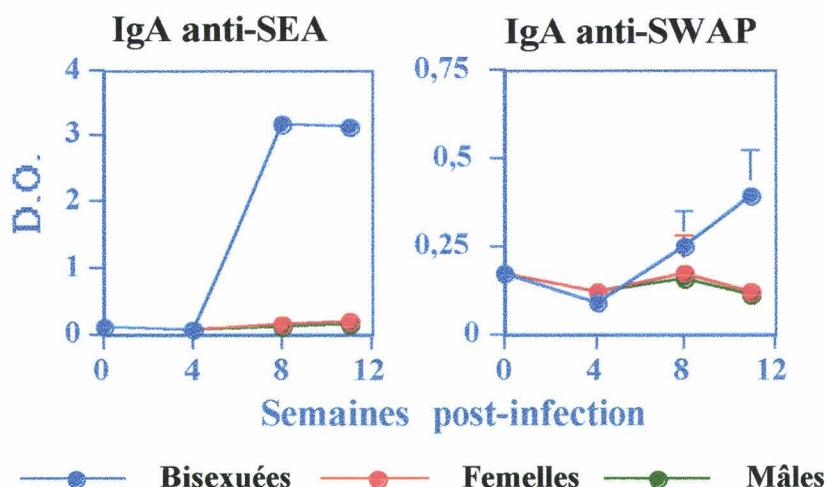
Nous nous sommes intéressés à décrire le profil d'interleukines ainsi que les réponses anticorps associés à une infection monosexuée par rapport à une infection classique bisexuée, à trois temps de la cinétique : à la semaine 4 (S4) où les femelles ne pondent pas encore, à la S8 où l'oviposition est bien établie et plus tardivement à la S11. Cette analyse a été réalisée en tenant compte du genre de l'infection, vers mâles ou vers femelles.

2.2.1. Réponse anticorps dans l'infection monosexuée

Réponse sérique



Réponse muqueuse

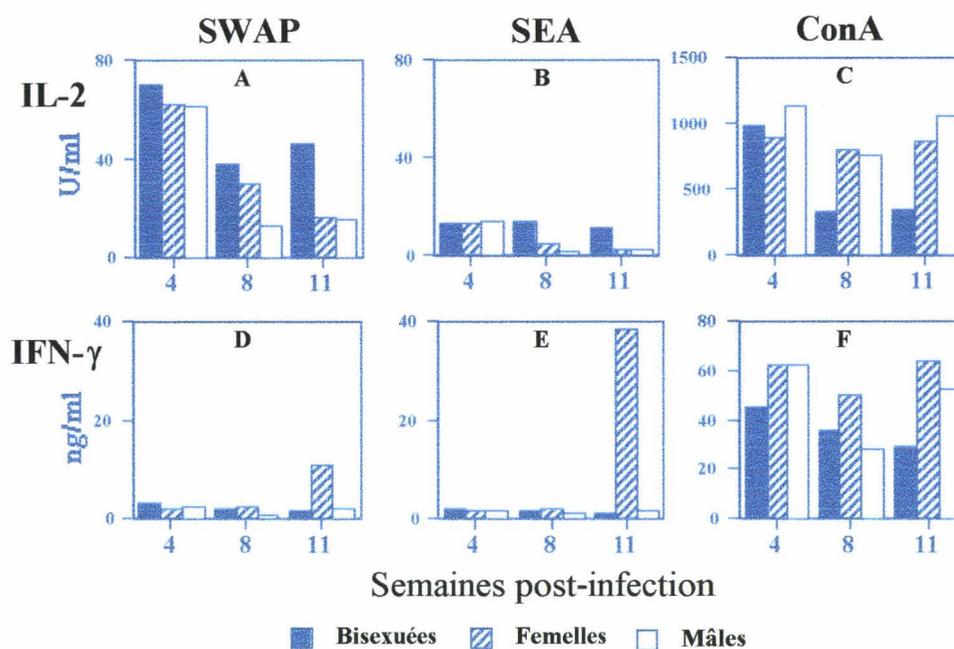


L'analyse des réponses sériques et muqueuses chez les animaux infectés de manière monosexuée confirme les résultats présentés dans l'article 1 et l'absence d'IgA chez les animaux qui ne présentent pas d'oeufs. Les vers mâles ou les vers femelles, indépendamment du genre, n'induisent pas la sécrétion d'IgA anti-SWAP ou anti-SEA. L'étude des sous-classes d'isotype IgG dans les sérums (résultats non présentés) révèle la prépondérance des IgG1 sur les IgG2b, à la S8 comme à la S11 ainsi que l'émergence tardive d'IgG3 spécifiques du SEA (S11). Cette distribution des sous classes d'isotype G est observée chez les animaux infectés de manière bisexuée ou monosexuée, avec la même intensité entre les trois groupes.

2.2.2. Production de cytokines en réponse aux antigènes parasitaires

Les graphes ci-dessous illustrent la sécrétion d'interleukines par les splénocytes de BALB/c qui hébergent soit des couples de vers, soit des vers mâles ou des vers femelles. Les cellules ont été stimulées par différentes préparations antigéniques (SWAP, SEA ou ConA)

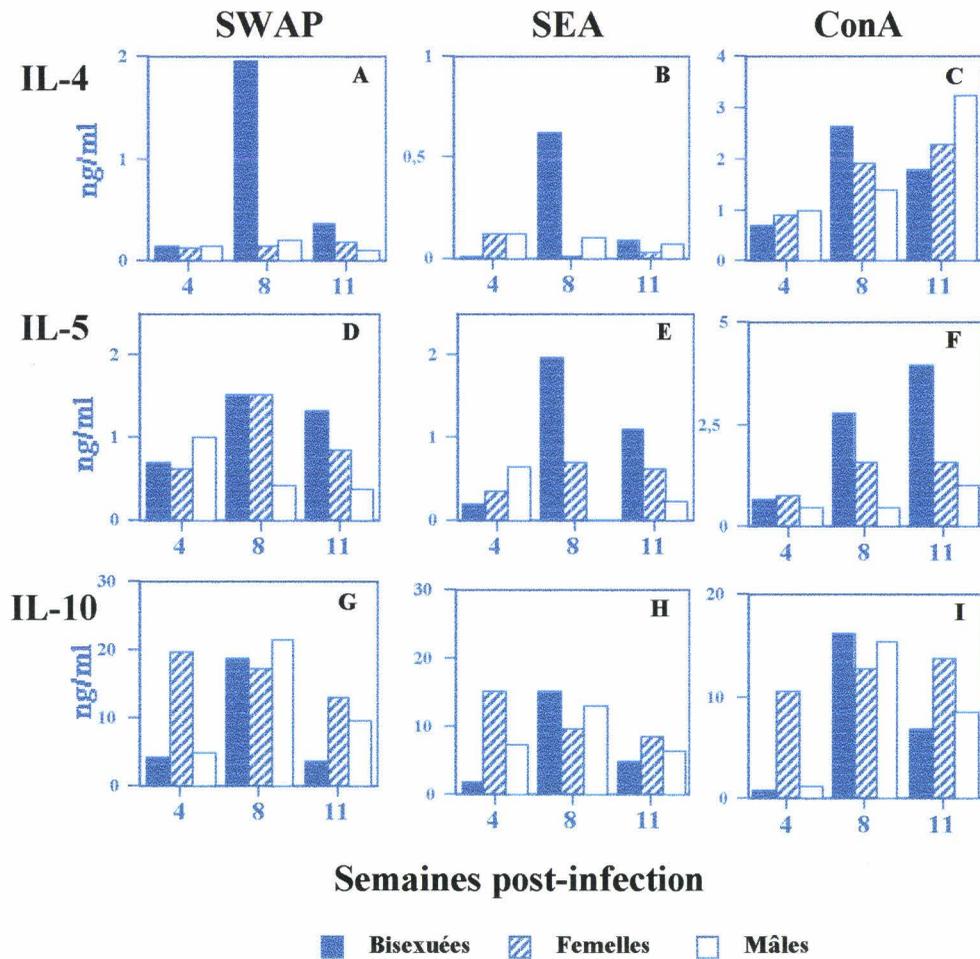
2.2.2.1. Cytokines Th1



D'une manière générale, la production d'IL-2 est maximale dans les trois types d'infection à la S4 avec une sécrétion plus forte chez les souris portant une infection bisexuée et elle décroît avec le temps. Cette diminution des taux d'IL-2 sécrétés est plus marquée chez les souris infectées par des mâles, comparées aux femelles. Les antigènes de vers adultes entraînent une sécrétion plus importante d'IL-2 que les antigènes associés aux œufs. Sous l'effet non spécifique de la ConA, les souris "bisexuées" produisent des taux beaucoup plus faibles d'IL-2 que les souris "monosexuées" (350 contre 1000U/ml).

Au cours de l'infection, nous détectons la présence d'IFN- γ dans les surnageants de culture des trois types d'infection. Cette production est constante en réponse à la ConA chez les animaux infectés de manière monosexuée alors qu'elle diminue avec l'évolution de l'infection chez les animaux "bisexués". Une production importante et tardive d'IFN- γ est rapportée dans le cas d'une infection par les vers femelles.

2.2.2.2. Cytokines Th2



L'évolution de la réponse IL-4 (graphes A et B) est semblable, dans nos conditions expérimentales, à celle déjà décrite dans une autre souche de souris et indique à la S8, chez la souris "bisexuée", un pic d'IL-4 en réponse au SWAP et au SEA. Cette augmentation très marquée au moment de l'oviposition n'est pas observée chez les animaux "monosexués mâles ou femelles" qui expriment des taux constants similaires et faibles.

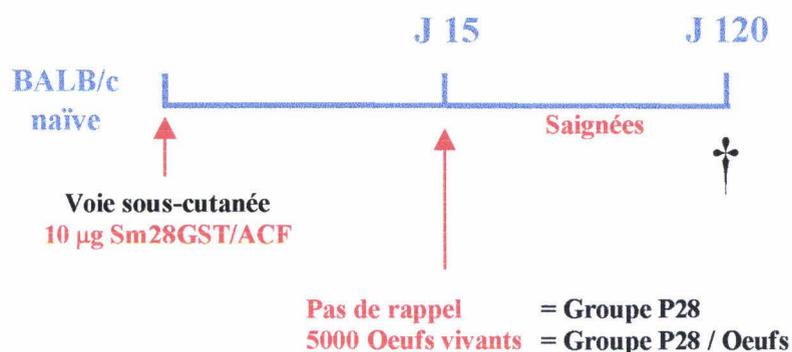
La production d'IL-5 suite à une restimulation par le SEA (graphe E) est maximale à la S8 chez les animaux bisexués et supérieure à celle des souris monosexuées. Curieusement, cette production plus faible chez les animaux monosexués n'est pas rapportée dans le cas d'une restimulation par le SWAP où les souris monosexuées femelles présentent des taux comparables à ceux observés dans l'infection classique (graphe D). De plus, ces taux sont très supérieurs à ceux des souris "monosexués" mâles. Cette différence d'intensité entre infection mâle et infection femelle est également observable tardivement à la S11. Cette capacité plus grande à produire de l'IL-5 observée chez les souris infectées par des vers femelles est retrouvée sous l'effet de la ConA (1,59 ng/ml versus 0,37 pour les souris "monosexuées" mâles, à S8)

L'étude de la production d'IL-10 en réponse aux antigènes parasitaires (graphes G, H, I) révèle une sécrétion dès la S4 dans les trois groupes concernés et des taux beaucoup plus élevés chez la souris infectée par des vers femelles. A la S8, les 2 autres types d'infection conduisent à des taux maximums et similaires à ceux des souris monosexuées femelles. La stimulation mitogénique reflète ces observations et confirme les taux supérieurs observés dès la S4 chez les animaux infectés par des femelles.

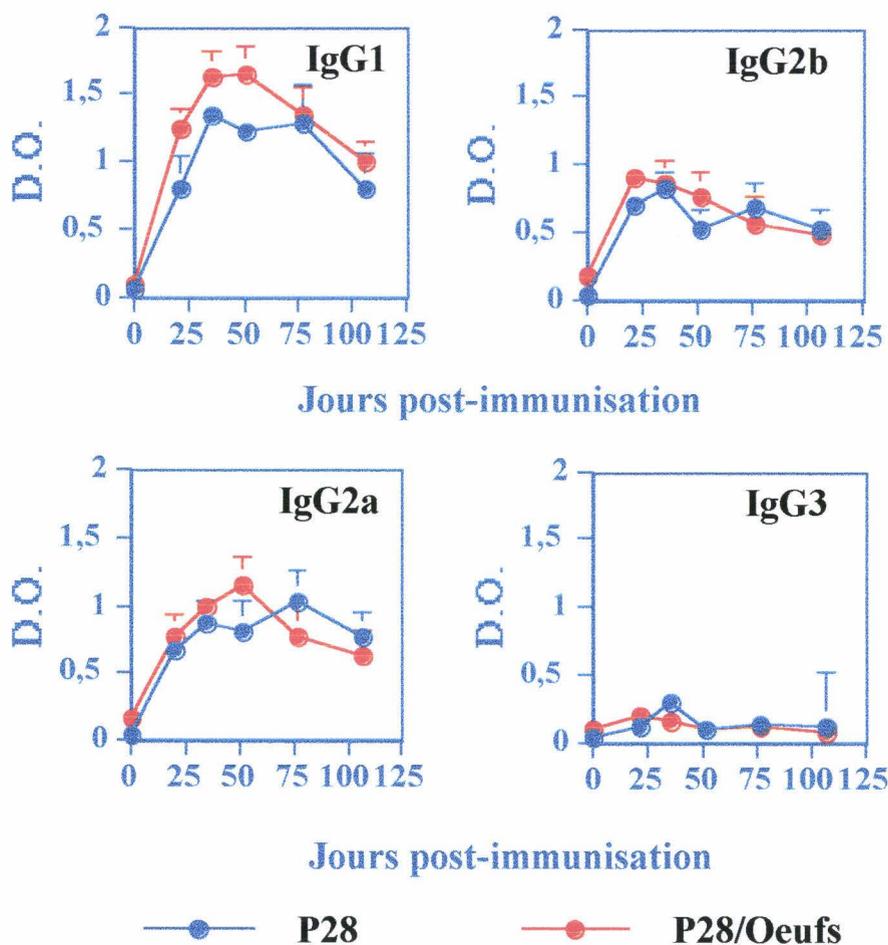
2.3. Les antigènes associés aux oeufs, polarisation de la réponse cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST

Différents arguments tels que le rôle des oeufs dans l'induction de la réponse IgA, la sécrétion de cytokines Th2 ainsi que l'expression tardive (S14) d'IgA anti-Sm28GST au cours de la schistosomiase expérimentale murine (résultats non présentés) nous ont incités à évaluer l'effet d'une administration d'oeufs ou de leurs antigènes associés sur la production d'IgA anti-Sm28GST chez la BALB/c, dans les protocoles d'immunisation parentérale décrits en 1.1.

2.3.1. Incidence des oeufs sur la réponse isotypique spécifique de l'antigène Sm28GST



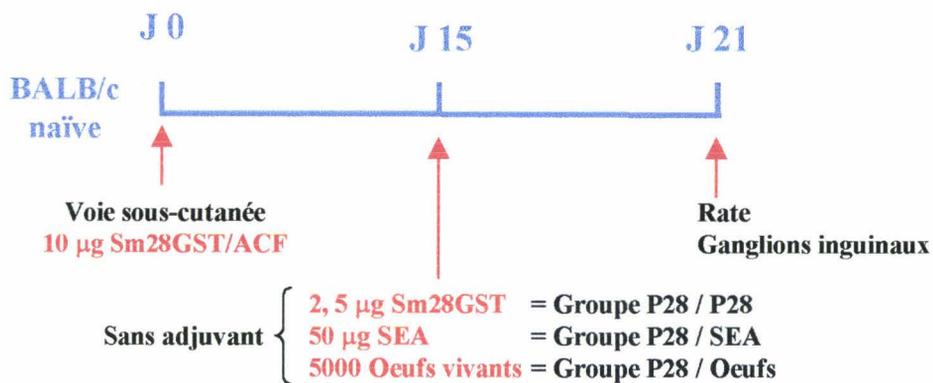
Suite à l'administration d'oeufs par voie sous-cutanée 15 jours après l'injection parentérale de la Sm28GST, nous avons suivi le profil isotypique et la réponse IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST.

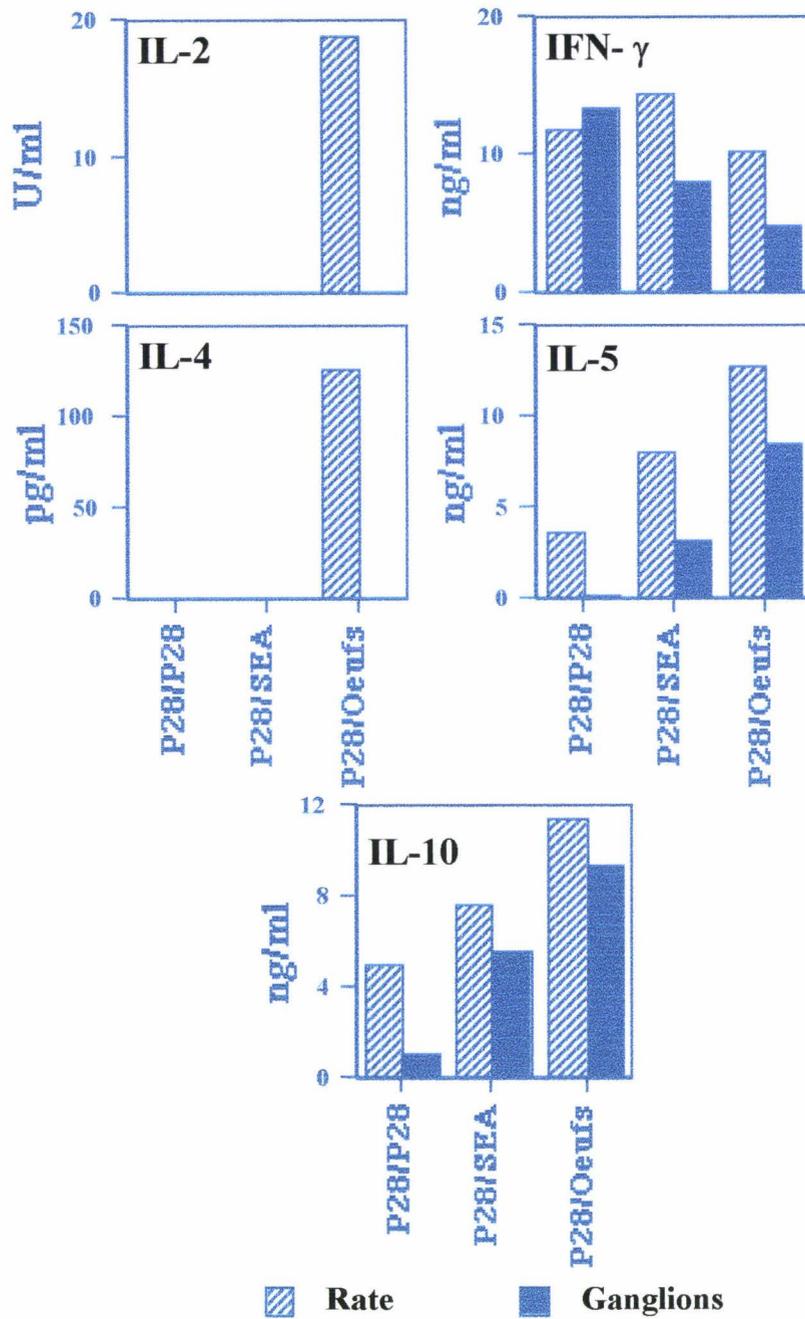


Seule une légère augmentation des IgG1 anti-Sm28GST transparaît dans le groupe ayant reçu les oeufs en seconde injection. Dans l'ensemble, la qualité de la réponse isotypique n'est pas modifiée et l'analyse de la réponse IgA ne révèle pas d'anticorps spécifiques de l'antigène Sm28GST dans les sérums des deux groupes d'intérêts.

2.3.2. Incidence des oeufs et de leurs antigènes associés sur la réponse cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST

Le même protocole d'administration est appliqué, avec un groupe supplémentaire qui reçoit 50µg de SEA, sans adjuvant.





L'analyse du profil de cytokines est réalisée à partir de splénocytes ou de cellules provenant des ganglions inguinaux, drainant le site d'injection, stimulés *in vitro* par l'antigène Sm28GST. Alors que la production d'IFN- γ est peu affectée dans la rate et qu'elle décroît dans les cellules ganglionnaires des animaux ayant reçu des oeufs vivants, on rapporte une production faible d'IL-2 liée à l'administration des oeufs. Les cytokines Th2 sont, par contre, particulièrement augmentées par l'administration sous-cutanée de SEA ou d'oeufs. Aussi, l'injection d'oeufs vivants conduit-elle à la détection d'IL-4 dans la rate des

animaux traités. L'injection de SEA entraîne une sécrétion plus élevée d'IL-5 dans la rate et une augmentation très forte de la production dans les ganglions drainants par rapport aux souris ayant uniquement reçu l'antigène Sm28GST (x46). Parallèlement, les taux d'IL-10 augmentent également, à la fois dans la rate et dans les ganglions.

Ces résultats, représentatifs de plusieurs expériences, démontrent dans un système d'immunisation les effets potentiateurs des antigènes d'oeufs sur la réponse Th2 propre à l'antigène Sm28GST.

Rôle des lymphocytes B1 (B CD5⁺) dans l'immunité anti-schistosome

Plusieurs observations réalisées dans le modèle murin nous ont conduits à évaluer l'implication des lymphocytes B non conventionnels dans l'immunité anti-schistosome.

D'une part, les réponses cellulaires, au cours de la schistosomiase commutent d'un profil de cytokines Th1 vers un profil Th2, suite à l'apparition des oeufs. Parmi les facteurs responsables de ce changement, les oeufs et plus particulièrement les antigènes glycaniques (Lacto-N-fupectose) induisent la production d'IL-10 par les cellules B. L'IL-10, cytokine régulatrice des populations T auxiliaires est produite par de nombreux types cellulaires. Parmi les lymphocytes B, les lymphocytes non conventionnels ou B1 représentent la plus grande source d'IL-10. L'expansion de cette population B1, peu documentée dans les pathologies infectieuses, est dépendante d'un contexte Th2. L'IL-10, de manière autocrine et paracrine, ainsi que l'IL-5, de manière paracrine, sont des facteurs essentiels à leur développement et à leur maintien. La source potentielle d'IL-10 que représentent les lymphocytes B1 ainsi que leur dépendance vis à vis des cytokines Th2, très exprimées dans la schistosomiase après l'oviposition, ont justifié notre intérêt pour cette population mineure de lymphocytes et leur évolution et implication dans les mécanismes immunitaires associés à l'infection par *S. mansoni*.

La deuxième motivation à notre étude découle des travaux présentés dans l'introduction de cette thèse concernant l'origine non conventionnelle de 50% des plasmocytes à IgA de la muqueuse intestinale. Notre intérêt à étudier les paramètres impliqués dans la réponse IgA intestinale associée à la présence des oeufs nous a implicitement conduits à évaluer l'implication des lymphocytes B1 péritonéaux dans cette réponse muqueuse.

1. Rôle des lymphocytes B péritonéaux dans l'immunité muqueuse spécifique du schistosome

L'étude de la possible implication des lymphocytes B1 dans l'immunité muqueuse spécifique du schistosome nécessitait, en pré-requis, l'analyse cinétique de l'évolution de cette population distincte de lymphocytes au cours de l'infection par *S.mansoni*.

1.1. Evolution comparée des lymphocytes de la cavité péritonéale au cours de l'infection par *S. mansoni*

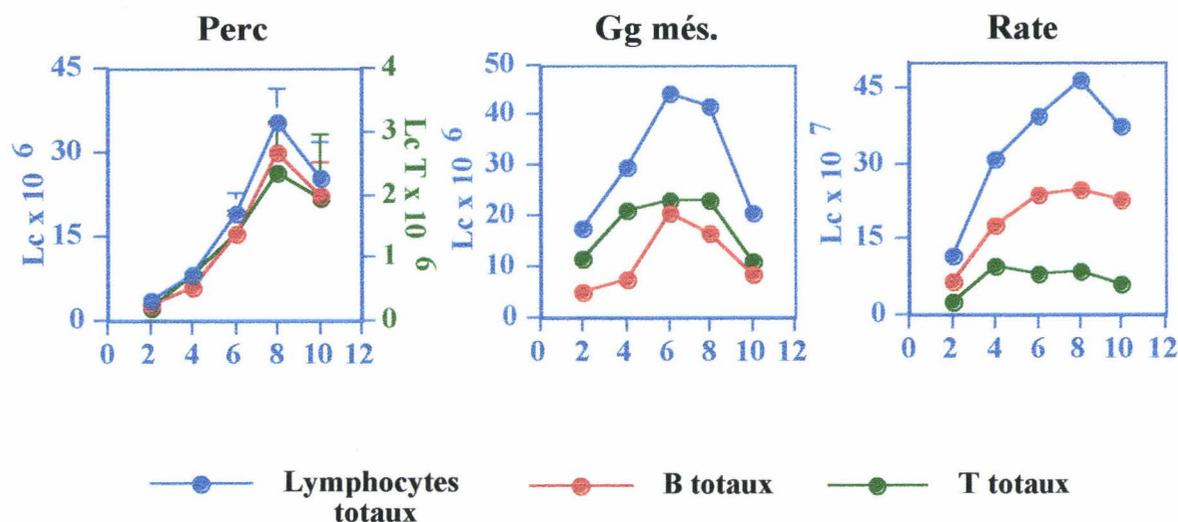
Cette étude a été réalisée par cytométrie en flux. Les lymphocytes BCD5⁺ ont été quantifiés parmi les autres types cellulaires, au sein de la rate, des ganglions mésentériques (Gg mésent.) qui sont les ganglions drainant le GALT et de la cavité péritonéale (Perc) qui, rappelons-le, représente le compartiment lymphoïde le plus riche en lymphocytes B CD5⁺. La cinétique a été conduite pendant 10 semaines après l'infection, sur 4 souris individuellement en ce qui concerne les marquages sur les cellules de la cavité péritonéale, et sur le pool des 4 animaux pour la rate et les ganglions mésentériques. A chaque prélèvement, 4 souris contrôles non infectées ont été traitées de la même manière. Les résultats observés pour chaque contrôle et à chaque point de la cinétique sont représentés, en annexe p , sous la forme d'une moyenne, du fait de leur faible variabilité avec l'âge.

Les lymphocytes B CD5⁺ sont sélectionnés par l'expression forte des IgM et faible du CD5 : IgM^{high} CD5^{low}.

Les lymphocytes B totaux regroupent toutes les cellules qui expriment les IgM : IgM^{high} CD5^{low} (B CD5⁺), IgM^{low} CD5^{low}, IgM^{low ou high} CD5⁻ (BCD5⁻).

Les lymphocytes T sont sub-divisés en fonction de l'expression du CD4 ou du CD8. Les lymphocytes T totaux correspondent aux nombres de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ additionnés

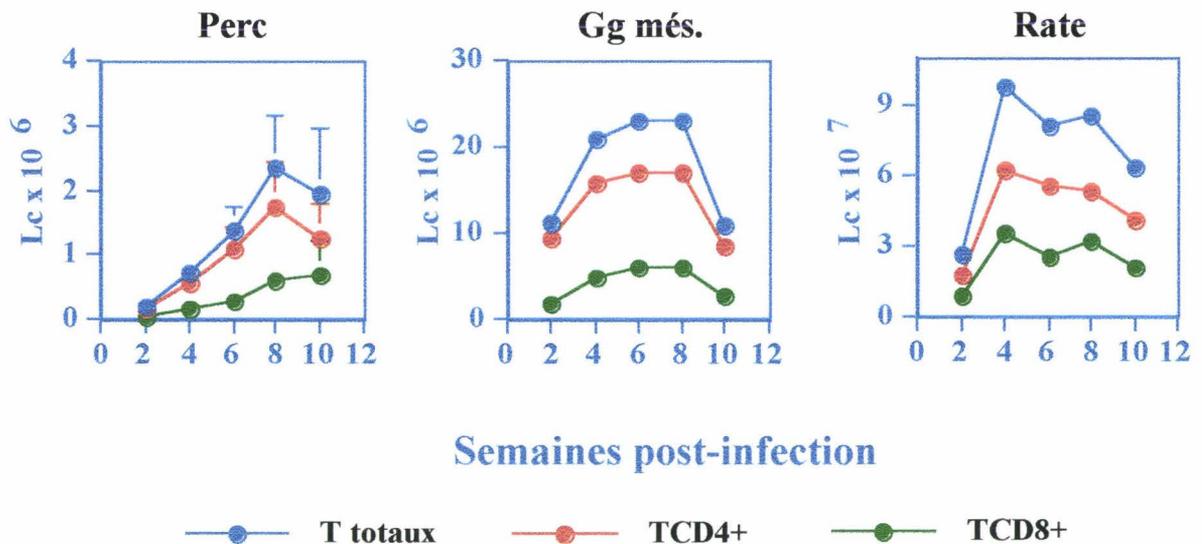
1.1.1. Les lymphocytes totaux



L'infection par *S.mansoni* entraîne une augmentation très importante du nombre de lymphocytes B et T dans tous les organes. Le nombre des lymphocytes péritonéaux atteint un maximum 8 semaines après l'infection (S8) où il est multiplié par 6 par rapport aux contrôles non infectés (présentés en annexe p165) puis il diminue à la S10, tout en restant très supérieur au taux de base. L'activation des populations lymphocytaires est polyclonale et les lymphocytes T augmentent également de 3 fois par rapport aux contrôles. Ce phénomène d'amplification est rapporté pour les ganglions mésentériques et la rate, bien qu'il soit plus progressif. Les ganglions mésentériques présentent un plateau entre la S6 et la S8. Dans cet organe, ce sont les lymphocytes B qui s'accroissent le plus en nombre (3,5 x contrôles) alors que le nombre de lymphocytes T n'est pas tout à fait doublé. Après 6 semaines, le nombre de lymphocytes B diminue progressivement pour revenir à un niveau de base. Dans la rate, ce nombre atteint un maximum à la S8. Il est important de rappeler, et cela est présenté en annexe, que la répartition des lymphocytes d'une souris naïve varie selon l'organe étudié, ainsi, la rate contient le même nombre de lymphocytes B que de lymphocytes T, les ganglions mésentériques ont plus de T que de B et inversement, la cavité péritonéale contient un plus grand nombre de lymphocytes B. D'autre part, les lymphocytes B CD5⁺ d'une souris contrôle représentent 32,4% des lymphocytes B de la cavité péritonéale alors qu'ils ne sont représentés qu'à 1,5% et 0,5% dans la rate et les ganglions mésentériques respectivement. Dans la cavité péritonéale, il faut noter l'expansion très

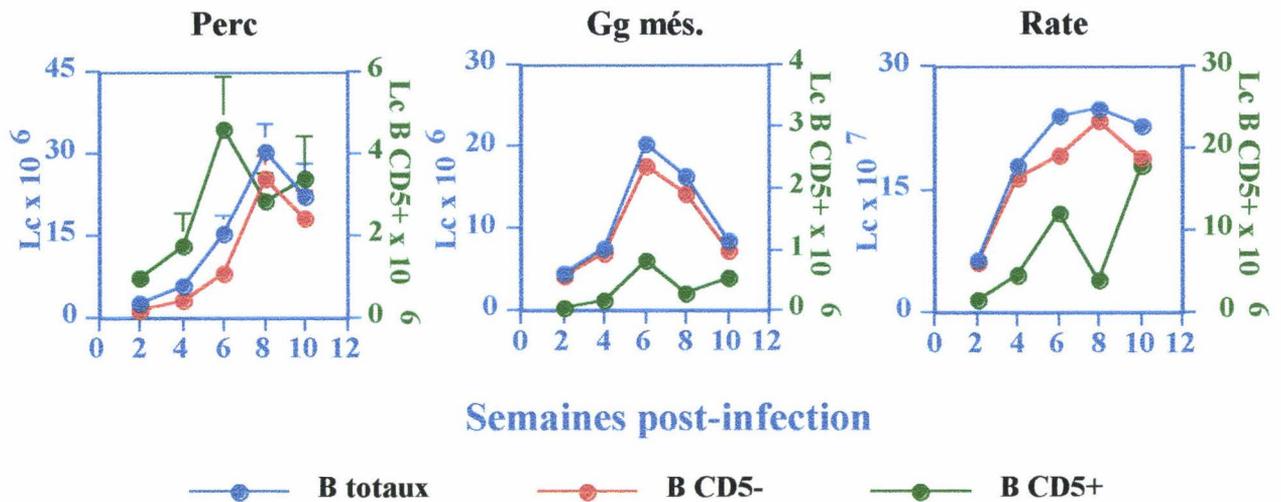
importante, au cours de l'infection surtout après la S6, d'une population non lymphocytaire composée de cellules de grande taille granuleuse qui peuvent correspondre aux macrophages. Ces cellules quantifiées sous le nom "d'autres cellules" (voir annexe p165) peuvent représenter jusqu'à 40% du nombre de cellules totales de la cavité à la S8 et n'ont pas été considérées lors de l'acquisition par FAC'S. Dans la rate et les ganglions mésentériques, cette population est beaucoup plus discrète et ne dépasse pas les 10% au maximum à la S8.

1.1.2. Les lymphocytes T



Le nombre de lymphocytes T dans la cavité péritonéale atteint un pic à la S8 et semble décroître ensuite dans son ensemble. Alors que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ chute après la S8, seuls les lymphocytes CD8⁺ continuent à se multiplier progressivement jusqu'à atteindre 5 fois le nombre de lymphocytes T CD8⁺ présents chez les contrôles ou à la S2. Cette expansion continue des lymphocytes T CD8⁺ n'est pas observée ni dans la rate ni dans les ganglions mésentériques qui voient leur nombre de lymphocytes T atteindre un maximum plus tôt, dès la S4 après l'infection, se maintenir pendant 4 semaines et chuter après la S8 que ce soit pour les T CD4⁺ ou les T CD8⁺. Dans les ganglions mésentériques, ces deux populations reviennent à un taux identique à celui des contrôles ou de la S2.

1.1.3. Les lymphocytes B CD5⁺



Dans la cavité péritonéale, les lymphocytes B conventionnels CD5⁻ augmentent dès la S4 (2x contrôles) et atteignent à la S8 huit fois le nombre des lymphocytes B conventionnels des souris contrôles puis diminuent ensuite. Parallèlement, les lymphocytes B1 augmentent et atteignent un maximum à la S6 avant l'expansion complète des lymphocytes conventionnels et leur nombre diminue puis se stabilise tandis que les lymphocytes B2 continuent à augmenter à la S8. L'évolution des deux populations de lymphocytes B est comparable dans les ganglions mésentériques, à l'exception près que les deux types de lymphocytes B atteignent un maximum ensemble à la S6. Les lymphocytes B1 dans les ganglions mésentériques accusent une chute après la S6 et se stabilisent (3 x contrôles) alors que les cellules B2 décroissent en continu pour rejoindre des proportions semblables à celles des souris non infectées. L'analyse des populations B dans la rate révèle des différences importantes. Les lymphocytes B prolifèrent rapidement pour atteindre un plateau dès la S6. L'évolution des lymphocytes B CD5⁺ fluctue. Comme dans le cas de la cavité péritonéale et des ganglions mésentériques, on observe un pic à la S6 (4 x contrôles) puis leur nombre diminue pour dépasser à S10 (6 x contrôles) le nombre observé à la S6.

L'analyse évolutive des populations lymphocytaires révèle donc une expansion clonale de tous les types lymphocytaires, dans les trois compartiments étudiés. Les lymphocytes B CD5⁺ augmentent dans tous les organes mais leur évolution diffère des

lymphocytes B conventionnels, soit dans leur apparition (pic d'expansion plus précoce dans la cavité péritonéale), soit dans leur cinétique avec une stabilisation de leur nombre dans les ganglions mésentériques alors que les lymphocytes B conventionnels reviennent à un niveau basal, ou une augmentation dans la rate.

1.2. Lymphocytes B péritonéaux et réponse IgA muqueuse intestinale

Après avoir suivi l'évolution des lymphocytes B CD5⁺ pendant l'infection par *S. mansoni* et remarqué leur expansion maximale juste après l'apparition des oeufs (qui a lieu à la S5), nous avons réalisé diverses expériences, *in vitro* en premier lieu, afin de montrer que les lymphocytes péritonéaux des souris infectées peuvent se différencier en cellules productrices d'IgA. Par la suite, l'obtention de souris *Xid*, déficientes en cellules B CD5⁺ nous a permis, par défaut, d'approcher *in vivo* la participation de ces lymphocytes à la production d'IgA intestinales.

1.2.1. Production d'IgA *in vitro*

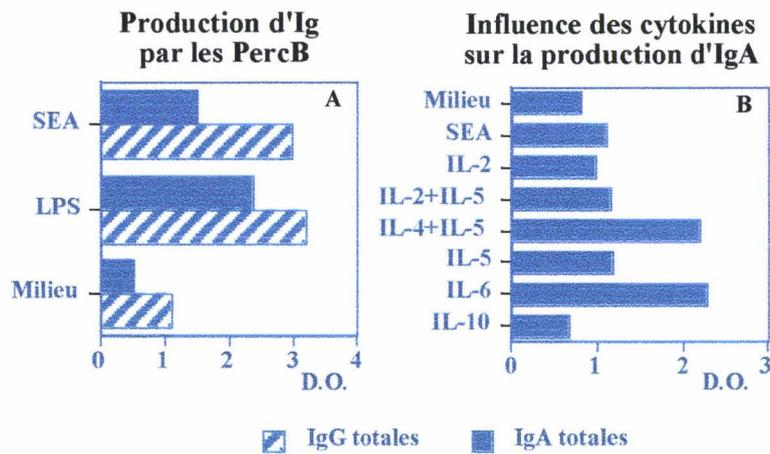
1.2.1.1. Sécrétion d'IgA totales

Grphe A

Nous avons prélevé des cellules PerC sur des BALB/c infectées depuis 7,5 semaines que nous avons cultivées soit uniquement dans le milieu, soit en présence de LPS ou d'antigènes d'oeufs (SEA). Après 5 jours, les taux d'immunoglobulines non spécifiques ont été analysés (graphe A, expérience représentative de plusieurs expériences réalisées toujours après l'apparition des oeufs).

Grappe B

Les lymphocytes B totaux de la cavité péritonéale (S10 post-infection) ont été enrichis par sélection négative à partir de cellules PerC platées 20' à 37°C afin d'éliminer en partie les macrophages et déplétées ensuite en lymphocytes T par la technique du MAC'S. La population enrichie a été mise en contact pendant 5 jours avec différentes cytokines reconnues pour leur effet "helper" sur la production d'IgA.



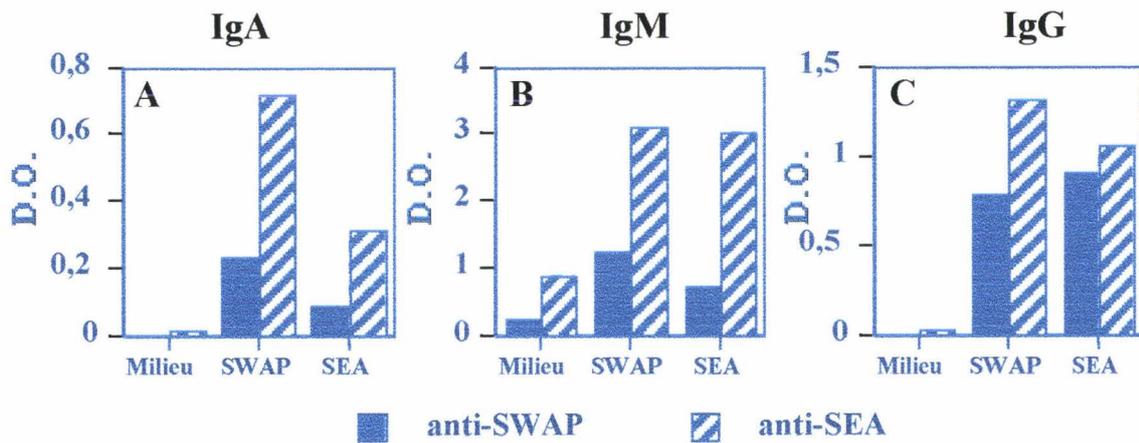
Les lymphocytes de la cavité péritonéale sont capables de produire des IgA et des IgG totales (et une quantité très importante d'IgM, résultats non présentés). Cette production a lieu spontanément et elle est accrue lors de la stimulation mitogénique par le LPS ou lors du contact avec les antigènes parasitaires. La stimulation par un antigène irrelevant (toxoplasmose) ne conduit pas à une augmentation de la sécrétion de la production d'anticorps par rapport au milieu (résultats non présentés).

L'addition d'interleukines a des effets "helper" sur la différenciation ou la sécrétion d'IgA totales. Seule, l'IL-5 n'a pas d'incidence sur la production d'IgA totales alors que cette cytokine agit en synergie avec l'IL-4. La sécrétion d'IgA est également potentialisée en présence d'IL-6.

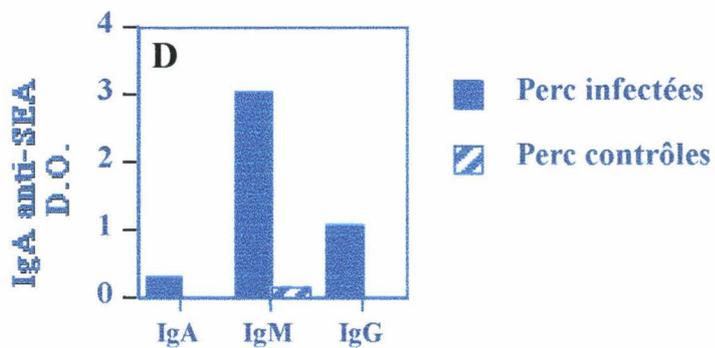
1.2.1.2. Production d'IgA spécifiques de *S. mansoni*

Les PerC de BALB/c infectées depuis 6 semaines ont été cultivées pendant 5 jours simplement dans le milieu ou en présence de SEA ou de SWAP. A J5, les cellules sont lavées afin de retirer l'antigène, et les anticorps nouvellement synthétisés pendant 2 jours sont dosés dans les surnageants.

**Production d'Ig spécifiques de *S.mansoni*
Perc BALB/c infectées S6**



**Production d'IgA spécifiques du SEA
Perc BALB/c infectées / Contrôles**



Les 3 graphes A, B et C mettent en évidence la synthèse d'anticorps spécifiques du parasite, avec une prédominance des immunoglobulines dirigées contre le SEA. L'isotype majeur est constitué d'IgM. La stimulation par le SWAP permet la détection de taux plus importants d'IgA spécifiques du SEA que la stimulation par les antigènes homologues. Le

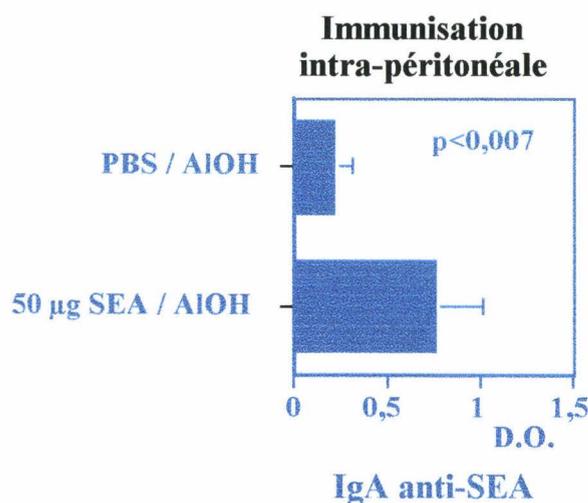
graphe D représente la production d'IgA spécifiques du SEA dans les surnageants de PerC stimulés par le SEA, qu'ils proviennent d'animaux infectés ou non infectés (contrôles). L'absence de sécrétion d'IgA spécifiques du parasite exclut la possibilité d'une sensibilisation *in vitro* des lymphocytes.

1.2.2. Production d'IgA *in vivo*

La première évidence *in vivo* de la participation des lymphocytes péritonéaux dans la production d'IgA muqueuses provient d'expériences d'immunisation intra-péritonéale de BALB/c naïves puis de l'utilisation de souris *Xid* totalement dépourvue de lymphocytes B CD5⁺ de même fond génétique que les BALB/c. Ces expériences nous ont permis de conforter, dans l'infection par *S. mansoni*, l'hypothèse de la production d'IgA locales, partiellement imputable aux lymphocytes B CD5⁺.

1.2.2.1. Immunisation intra-péritonéale

Des BALB/c non infectées (n=4) ont reçu par voie intra-péritonéale 2 fois 50 µg de SEA à dix jours d'intervalle en présence d'hydroxyde d'Alum et la production d'IgA intestinale a été analysée 15 jours après la première injection. Un autre groupe a reçu 1 fois 50 µg de SEA par voie orale.



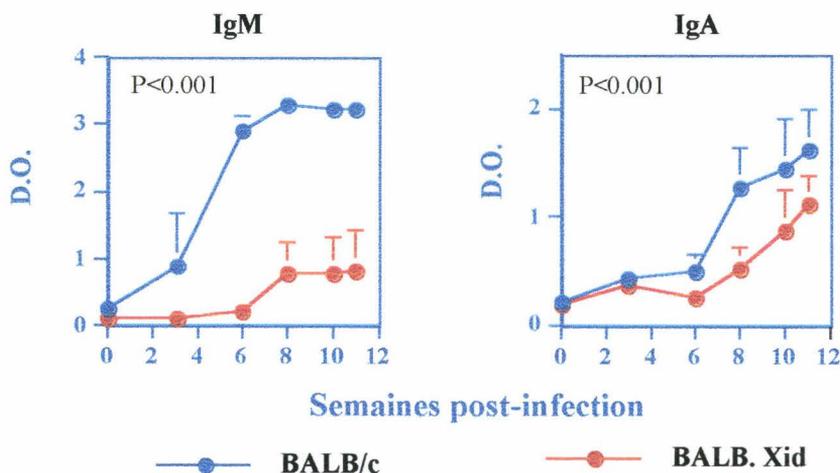
Seule l'administration par voie intra-péritonéale de SEA entraîne, chez la BALB/c non infectée, la production d'IgA spécifiques dans les lavages intestinaux, 20 jours après la dernière immunisation. Ces animaux ne présentent pas d'IgA sériques spécifiques au même titre que les animaux ayant reçu l'antigène par voie orale. Ces expériences représentatives démontrent la possibilité de sensibiliser *in vivo* les lymphocytes péritonéaux aux antigènes de schistosome et sous-tendent leur capacité à migrer, se localiser et se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgA au sein de la muqueuse intestinale.

1.2.2.2. Réponse muqueuse chez la BALB. *Xid* infectée par *S. mansoni*

La déficience totale des BALB. *Xid* en lymphocytes B1 nous a permis d'évaluer par défaut le rôle de cette population qui, chez les souris compétentes infectées augmente de manière importante dans la cavité péritonéale et les autres organes secondaires.

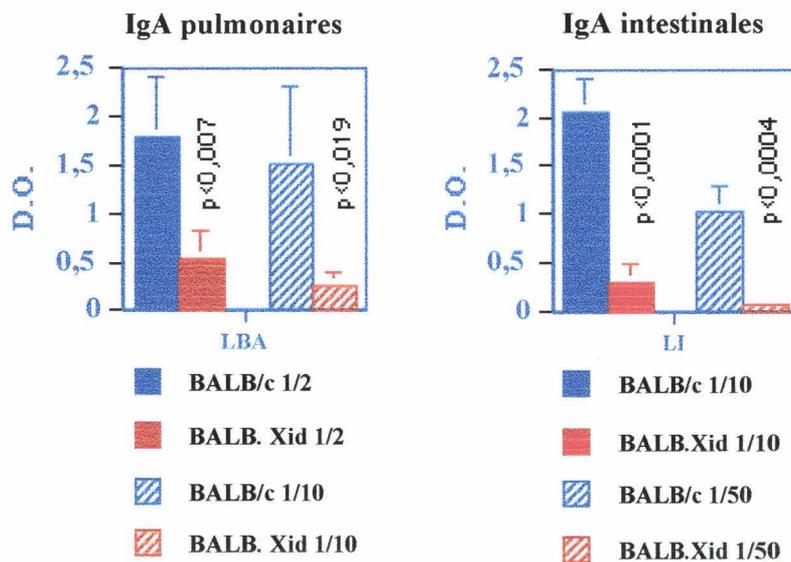
Nous avons infecté parallèlement des BALB. *Xid* et des BALB/c et dosé périodiquement les IgA et les IgM sériques. La réponse humorale muqueuse a été évaluée, à la fin de l'expérimentation à J76 (ou la S11), date à laquelle la réponse IgA intestinale est normalement optimale chez la BALB/c infectée et les IgA présentes dans les lavages broncho-alvéolaires et intestinaux ont été dosées.

Réponse sérique



L'analyse de la réponse sérique montre un défaut très important de production d'IgM au cours de l'infection chez les souris *Xid*. Cette réponse n'est détectable qu'après la S6 alors que cet isotype est sécrété de manière précoce dans l'infection chez la BALB/c et qu'il atteint des taux très élevés à la fin de l'expérimentation. La réponse IgA sérique apparaît chez les deux souches de souris après l'oviposition. Les animaux déficients en cellules B CD5⁺ présentent des taux d'IgA spécifiques des œufs inférieurs à ceux des BALB/c.

Réponse muqueuse



La réponse humorale muqueuse a été étudiée dans deux compartiments muqueux : dans l'intestin mais également au niveau pulmonaire car la cavité pleurale, comme la cavité péritonéale, est un compartiment riche en lymphocytes B CD5⁺ et les poumons sont le deuxième site muqueux, après la peau, à être en contact avec le parasite lors de l'infection et le site d'induction de l'immunité effectrice cellulaire anti-schistosomule.

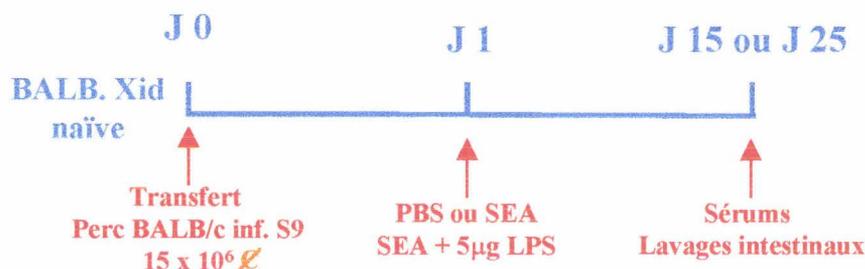
On observe chez les BALB. *Xid* des taux d'IgA spécifiques du parasite considérablement plus faibles, dans les deux muqueuses après 11 semaines d'infection.

Ces différentes observations tendent à prouver *in vivo* que la population de lymphocytes B CD5⁺ qui s'accroît en début d'infection, dans des proportions importantes dans la cavité péritonéale (8 fois les contrôles dans la PerC contre 1,5 fois dans la rate ou les ganglions mésentériques) sécrète des IgA dirigées contre le parasite, ce qui suppose une migration de ces lymphocytes, de la cavité péritonéale vers les sites effecteurs muqueux.

1.2.2.3. Migration des lymphocytes péritonéaux dans l'intestin et sécrétion d'IgA

Le potentiel des lymphocytes péritonéaux à se relocaliser dans la muqueuse intestinale et y sécréter des anticorps anti-parasitaires a été évalué par différentes expériences de transfert de cellules péritonéales, déplétées d'une partie importante des macrophages (par adhérence). Les cellules transférées chez les *Xid* naïves proviennent de BALB/c compétentes infectées depuis 9 semaines, date à laquelle le nombre de lymphocytes B CD5⁺ n'est pas maximal mais en progression et surtout date à partir de laquelle les taux d'IgA sécrétoires sont maximums dans l'intestin des souris donneuses.

1.2.2.3.1. Transfert de PerC infectées chez les BALB. *Xid* naïves

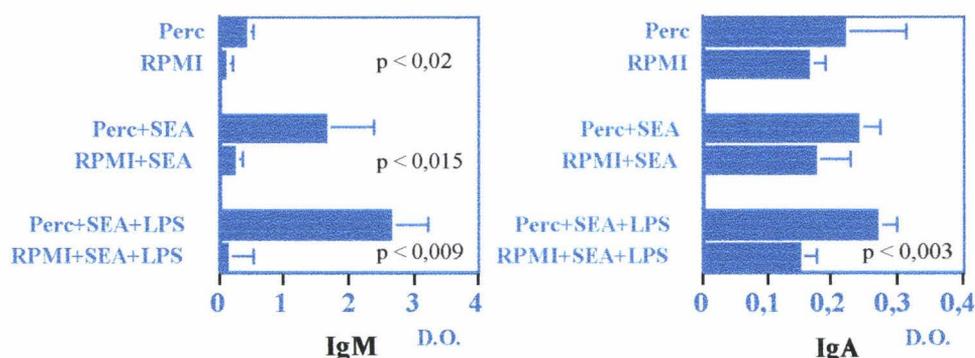


Transfert 1

La première expérience de transfert de PerC a été évaluée 14 jours après l'injection intra-péritonéale (IP) des cellules et les réponses sériques et intestinales IgM et IgA, spécifiques des œufs ont été caractérisées. Un jour après le transfert, nous avons choisi

d'administrer en IP 100µg de SEA ou 100µg de SEA additionné de 5µg de LPS afin de faire proliférer les lymphocytes potentiellement sensibilisés à l'antigène.

Production d'IgM et d'IgA sériques spécifiques du SEA / J 14 après transfert

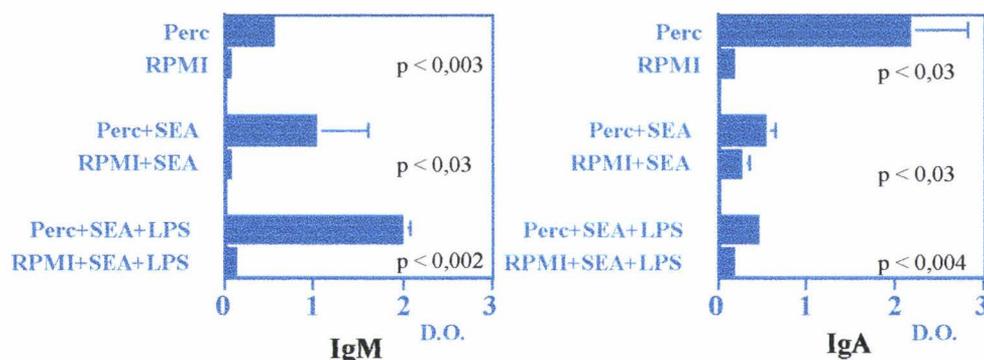


A J14, nous n'avons pas mis en évidence d'anticorps IgA ou IgM spécifiques de *S. mansoni* dans les lavages intestinaux et donc pas pu appuyer l'hypothèse de la migration des lymphocytes vers l'intestin. Le transfert de PerC induit à J14 la production d'IgM sériques. Cette réponse existe en dehors de toute activation *in vivo* par le SEA mais est considérablement augmentée lorsque l'on présente *in vivo* les antigènes du parasite. Nous avons détecté de faibles taux d'IgA dans les sérums lorsque les antigènes parasitaires, additionnés de LPS sont présentés *in vivo*. Ces résultats nous ont encouragés à reconsidérer la date de prélèvement des liquides biologiques afin de vérifier l'hypothèse d'un temps trop court pour la domiciliation dans l'intestin.

Transfert 2

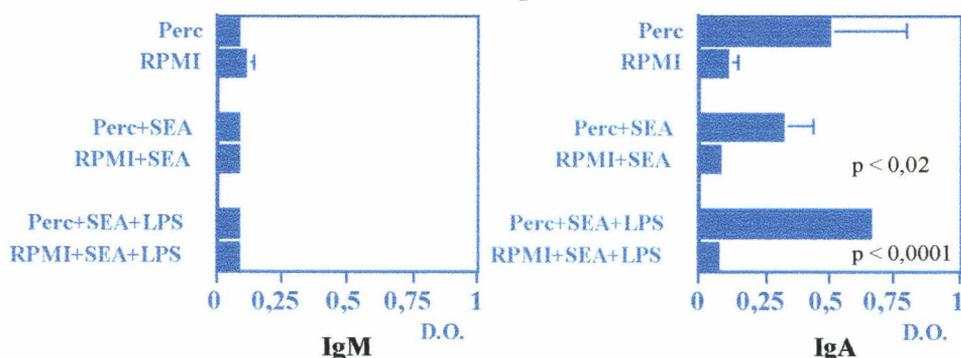
Le même protocole de transfert a été entrepris, à l'exception de la dose de SEA administrée qui est réduite à 50µg par souris et des prélèvements qui ont été effectués à une période plus tardive, soit 25 jours après le transfert des cellules.

Réponse sérique spécifique du SEA J25 après transfert



L'analyse de la réponse sérique montre que les PerC transférées produisent, comme dans la première expérience des IgM spécifiques des antigènes d'oeufs. Cette réponse est amplifiée lorsque l'antigène et du LPS sont administrés. Il est possible, cette fois-ci, de détecter des taux importants d'IgA sériques spécifiques qui sont par contre diminués lorsqu'on restimule *in vivo* les lymphocytes par l'antigène, au profit de la réponse IgM. Il est intéressant de noter que la seule administration de SEA en IP ne conduit pas chez la *Xid* à la sécrétion de taux significatifs d'IgA dans la muqueuse intestinale, que ce soit 14 jours ou 25 jours après l'immunisation contrairement à ce que nous avons décrit, chez la BALB/c, en 1.2.2.1.

Réponse muqueuse spécifique du SEA J25 après transfert



Contrairement au compartiment systémique, dans la muqueuse intestinale, seule la production d'IgA spécifiques a été mise en évidence 25 jours après le transfert. La seule injection de PerC conduit à la sécrétion d'anticorps spécifiques qui s'intensifie lorsque les antigènes parasitaires sont administrés en présence de LPS. Cette expérience indique une

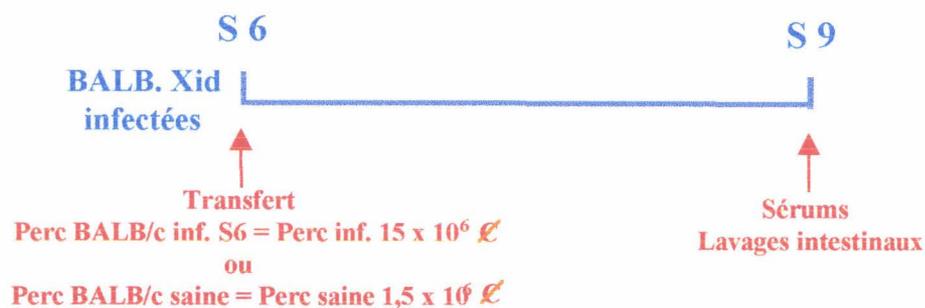
migration des lymphocytes péritonéaux dans les compartiments sanguins et muqueux où ils se différencient et produisent des anticorps de spécificité parasitaire.

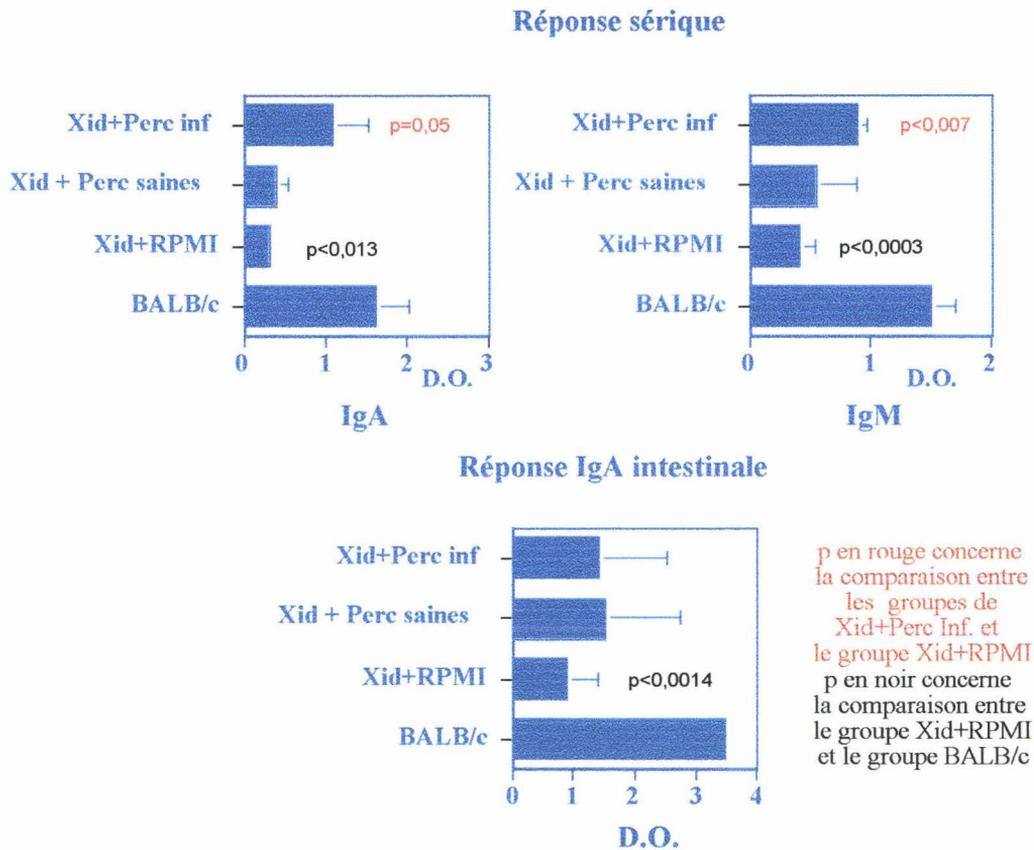
Lorsqu'un rappel de SEA (IP, 50 μ g) est effectué 10 jours avant le prélèvement, les taux d'IgM sériques augmentent très fortement alors que la réponse IgA sérique est inchangée et que la réponse sécrétoire est légèrement amplifiée (résultats non présentés).

1.2.2.3.2. Transfert de PerC infectées chez les BALB. *Xid* infectées

Les différentes expériences de transfert réalisées chez la souris naïve mettaient en évidence la sécrétion *in vivo* d'anticorps par les PerC et la possible domiciliation de ces cellules dans l'intestin. Il apparaissait nécessaire de tester ces deux paramètres chez la BALB. *Xid* infectée qui présente des réponses IgM sériques et IgA intestinales défectueuses par rapport aux BALB/c compétentes. De plus, l'infection par *S. mansoni* et surtout la présence des oeufs du schistosome dans l'intestin entraînent un statut immunitaire différent de celui d'une souris naïve et pourraient modifier ou orienter le recrutement et la migration des cellules ou leur fonctionnalité.

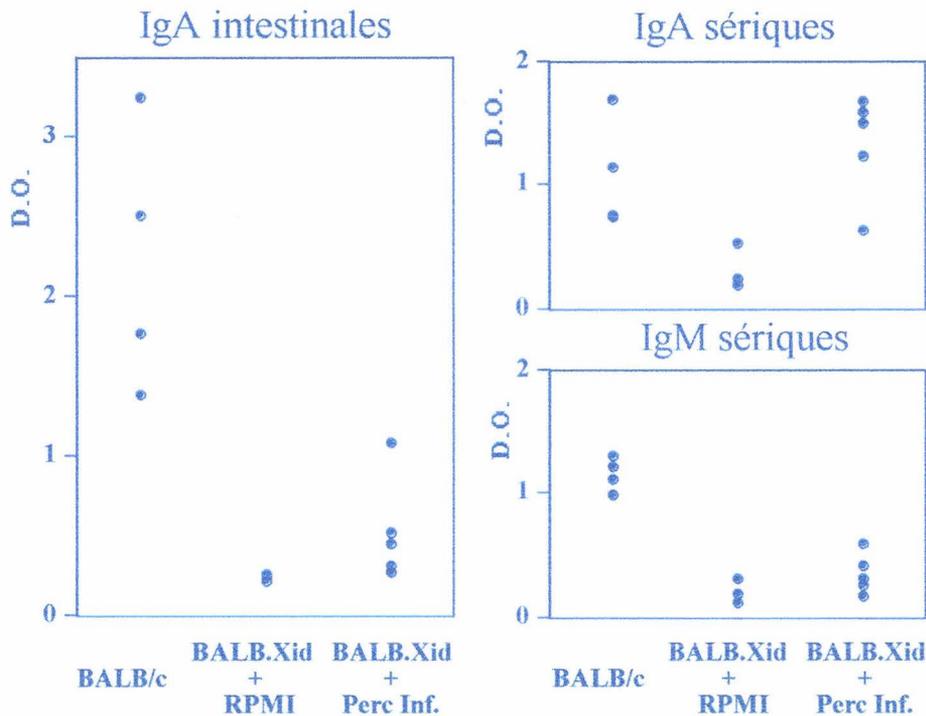
A 6 semaines d'infection, nous avons transféré les PerC des BALB/c infectées (S6) chez les BALB. *Xid* infectées, prélevé les sérums et les lavages intestinaux 3 semaines plus tard et analysé la réponse immune.





L'analyse des réponses sériques à S9 confirme le défaut important des réponses spécifiques IgM et IgA observé chez la *Xid* infectée comparée à la BALB/c. Le transfert de PerC provenant de souris compétentes infectées depuis 6 semaines, augmente significativement la production d'anticorps spécifiques du SEA par rapport aux BALB. *Xid* non traitées et restaure partiellement les réponses IgM et IgA observées chez la BALB/c alors que le transfert de PerC saines ne modifie pas les taux d'anticorps observés chez la *Xid* infectée. Au niveau muqueux, les taux d'IgA anti-SEA sont très inférieurs chez la BALB. *Xid* et ils n'augmentent pas statistiquement lorsque l'on transfère des PerC saines ou infectées, ce résultat décevant pourrait être lié à l'hétérogénéité des réponses dans les groupes reconstitués (1 souris sur 3 présente un taux élevé d'IgA intestinales).

L'expérience a été renouvelée en doublant le nombre de Perc infectées transférées ($30 \cdot 10^6$) et en analysant les différents paramètres à S10.

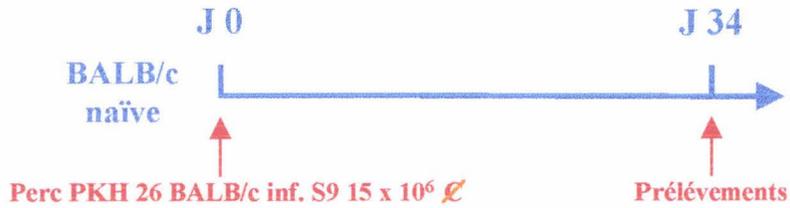


Nous confirmons la participation des Perc infectées dans la réponse IgA sérique qui augmente d'un facteur 4 par rapport aux *Xid* non traitées et atteint des taux similaires à ceux observés chez la BALB/c. La réponse IgM est en partie restaurée chez 3 animaux. L'analyse de la réponse intestinale révèle que 3 animaux sur 5, dans le groupe ayant reçu les PerC, présentent une réponse IgA muqueuse très supérieure à celle observée chez la souris déficiente.

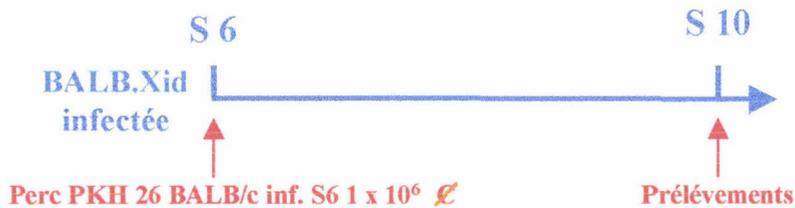
1.2.2.3.3. Transfert de PerC fluorescentes chez la BALB. *Xid*

La possibilité de restaurer ou d'induire une réponse spécifique du parasite, au niveau muqueux suggère une migration des cellules injectées dans la cavité péritonéale vers l'intestin. Afin de confirmer la domiciliation des PerC infectées dans l'intestin, nous avons, avant le transfert, marqué les cellules péritonéales par un composé aliphatique fluorochrome à demi-vie d'un mois, le PKH26, qui s'enchaîne dans les membranes sans affecter la viabilité des cellules ni leur fonctionnalité. Aussi, il est théoriquement possible de détecter les cellules fluorescentes dans différents organes, soit sur des suspensions cellulaires soit sur coupe à congélation. Nous avons entrepris deux protocoles de transfert de cellules marquées :

1) Transfert de Perc chez la BALB/c naïve



Le protocole du transfert est semblable à celui utilisé dans le cas des *Xid* naïve (1.2.2.3.1) avec un prélèvement des organes à J34.

2) Transfert de Perc chez la BALB. *Xid* infectée

Ce protocole est semblable à celui utilisé dans le § 1.2.2.3.2. Un million de cellules marquées a été injecté.

Sur les souris des deux protocoles, nous avons préparé des suspensions cellulaires à partir de différents organes. La cavité péritonéale, le compartiment muqueux intestinal : les plaques de Peyer, l'intestin à partir duquel nous avons purifié les lymphocytes de la lamina propria et les ganglions mésentériques, la rate ainsi que les ganglions médiastinaux qui drainent la cavité péritonéale ont été prélevés.

Les résultats sont semblables dans les deux expériences préliminaires et sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Organes	Marquage PKH26
Lamina propria	±
Plaques de Peyer	-
Ganglions mésentériques	-
Ganglions médiastinaux	+
Cavité péritonéale	+++
Rate	-

Dans nos conditions expérimentales, bien que 100% des cellules injectées étaient marquées, il est difficile de conclure de manière formelle à un marquage dans la lamina propria bien qu'il ait été détecté quelques cellules fluorescentes, absentes chez les contrôles non injectés. L'évaluation par cytométrie en flux du marquage nécessite un plus grand nombre de cellules positives. Des techniques d'immuno-histomarquage sur coupe à congélation sont à l'essai afin de caractériser *in situ* la présence de lymphocytes ou plasmocytes B CD5⁺ IgA⁺ chez les BALB. *Xid* "reconstituées".

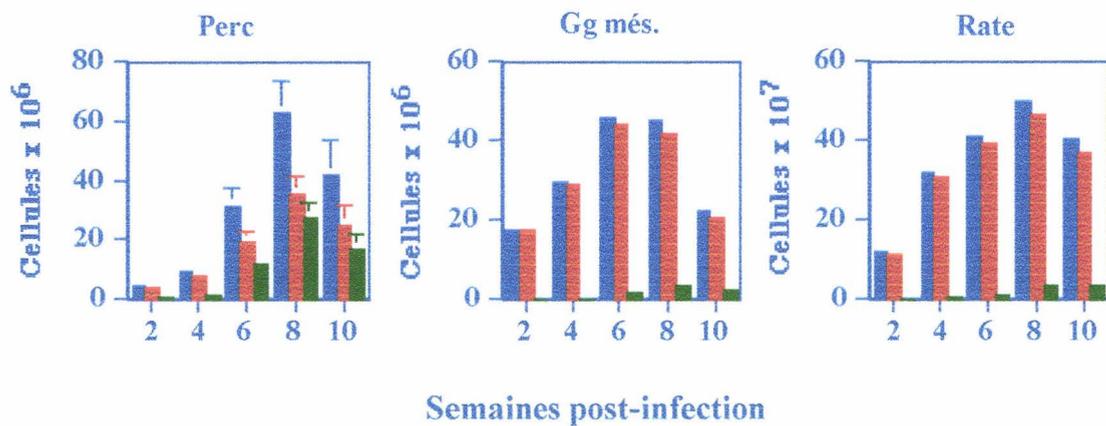
En résumé de ces expériences concernant la participation des lymphocytes B péritonéaux dans la réponse immune muqueuse anti-schistosome, nous pouvons conclure à l'expansion parallèle des lymphocytes B CD5⁺ au cours de l'infection par *S. mansoni*, expansion qui est maximale une semaine après la ponte des oeufs dans les tissus de l'hôte. Le déficit génétique des BALB. *Xid* entraîne une réduction importante des taux d'IgA sériques et surtout muqueuses dirigés contre les antigènes d'oeufs et un défaut très prononcé de la réponse IgM spécifiques. Ce déficit est partiellement corrigé par le transfert de cellules péritonéales provenant de BALB/c compétentes et bien qu'il ne nous ait pas été possible de visualiser au niveau de la muqueuse intestinale les cellules transférées, la production locale d'anticorps nous permet de soutenir l'hypothèse que les lymphocytes

péritonéaux gagnent l'intestin, via les ganglions médiastinaux, où ils expriment leurs propriétés fonctionnelles.

D'un autre côté, le défaut dans la réponse muqueuse chez la BALB. *Xid* ainsi que l'implication potentielle des lymphocytes B1 dans l'orientation T helper, de part leur capacité à sécréter de l'IL-10, nous ont incité à évaluer, parallèlement à ces expérimentations, l'incidence du déficit lié à la mutation *Xid* sur l'évolution des paramètres parasitologiques et immunologiques chez la BALB. *Xid* expérimentalement infectée par rapport à la BALB/c. Ces travaux font l'objet de l'article 2 présenté dans son intégralité.

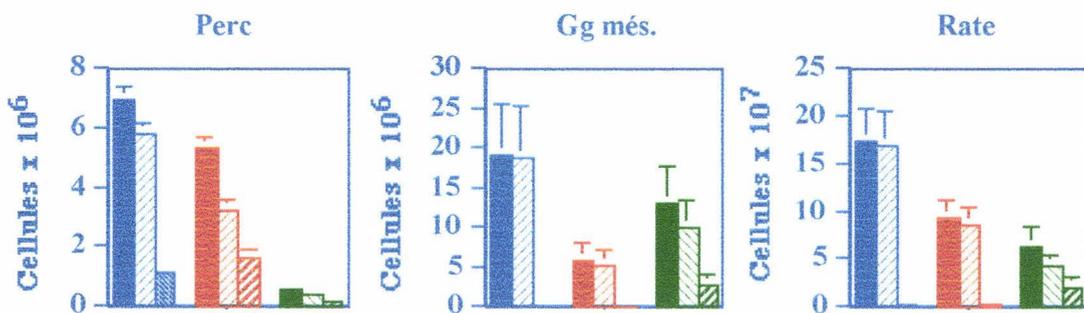
Graphes en annexe

Infectées



■ Cellules totales ■ Lymphocytes totaux ■ Autres cellules

Contrôles



■ Cellules totales ■ B totaux ■ T totaux
 ■ Lymphocytes ■ B CD5- ■ T CD4+
 ■ Autres cellules ■ B CD5+ ■ T CD8+

2. Rôle des lymphocytes B1 dans l'immunité anti-schistosome

ARTICLE 2

S. Gaubert, A. Viana da Costa, C.A. Maurage, E.C. Santos Lima, J. Fontaine, S. Lafitte, P.

Minoprio, A. Capron et J.M. Grzych

*X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model*

Soumis

- Contexte : La polarisation de la réponse T auxiliaire vers un profil Th2 liée à la présence des oeufs
Les oligosaccharides associés aux œufs sont impliqués dans la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B.
La pathologie associée à l'infection par *S. mansoni* est liée la présence des œufs qui entraînent la formation de granulomes hépatiques et intestinaux
- Questions posées : Quelle est la part des lymphocytes B CD5⁺ dans l'orientation Th2 observée dans la schistosomiase ?
Quelle incidence a cette population sur les paramètres parasitologiques : nombre d'oeufs tissulaires, charge parasitaire et pathologie ?

X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model

**Sophie GAUBERT^{1*}, Alexandra VIANA DA COSTA¹, Claude-Alain MAURAGE³,
Eduardo César SANTOS LIMA², Josette FONTAINE¹, Sophia LAFITTE¹,
Paola MINOPRIO², André CAPRON¹ and Jean-Marie GRZYCH¹**

¹ Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM U-167, IFR 17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France

² Unité de Parasitologie Expérimentale, Institut Pasteur de Paris, 25-28, rue du Docteur Roux 75724 Paris, France

³ Laboratoire d'Anatomie Pathologique C, rue du Professeur Jules Leclerc, CHRU 59037 Lille cedex, France

running title : *Xid* immunodeficiency in schistosomiasis

*Corresponding author : Phone : 00 33 3 20 87 78 09

Fax : 00 33 3 20 87 78 88

E-mail : sophie.gaubert@pasteur-lille.fr

KEY WORDS

Schistosoma mansoni, BALB. *Xid*, CD5⁺ B cells, interleukins, susceptibility.

ABSTRACT

The incidence of the X-linked immunodeficiency (*Xid*) on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection has been evaluated through a comparative analysis of parasitological and immune parameters in two different mouse strains : control BALB/c and BALB. *Xid* mice which carry the *Xid* mutation and lack B1 (CD5⁺ B) cells.

This study clearly demonstrates that infected B1 cell-deficient animals display a higher susceptibility to *S. mansoni* infection as revealed by an increase in the tissue egg loads and a significantly elevated mortality, as well as an increase in the granuloma densities.

The analysis of the humoral and the cellular responses, conducted in the same experimental conditions, indicates differences in terms of cytokine production after specific antigenic stimulation of splenocytes. Larger amounts of IFN- γ and IL-4 are observed in BALB. *Xid* mice while IL-10 production is reduced. In parallel, the study of the specific antibody isotype profiles shows higher amounts of specific IgE and IgG1 antibodies and lower amounts of IgM and IgA in BALB. *Xid* mice.

Taken together, these observations strongly support the participation of the B1 cell subset in the mechanism(s) underlying the expression of immunity toward schistosome infection.

INTRODUCTION

Murine infection by *Schistosoma mansoni* is a well-documented model in which a Th1 to Th2 switch occurs during parasite development in the definitive host. Thus, the first 6 weeks of infection are dominated by a Th1-type response, replaced from the onset of egg laying, by a Th2-type response that peaks at 8 weeks (Pearce *et al.* 1991). Spleen cells from 6 weeks-infected mice produce weak amounts of IL-4, IL-5 and IL-10 after *in vitro* stimulation with egg (SEA) and adult worm (SWAP) extracts while they produce high levels of IL-2 and IFN- γ upon stimulation with schistosomula antigens (Pearce *et al.* 1991, Grzych *et al.* 1991). It has been demonstrated that eggs are responsible for the induction of the Th2 response (Grzych *et al.* 1991) but the mechanisms underlying the Th1 to Th2 switch are still the subject of debate. *S. mansoni*-associated pathology consists in chronic granulomatous liver disease leading to fibrosis, portal hypertension, intestinal haemorrhage and death (Smithers & Doenhoff 1982). Granuloma formation around live eggs is driven by an antigen specific hypersensitivity reaction (Boros & Warren 1970) and mediated by both Th1 and Th2 responses since IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 can be detected in the large hepatic egg granulomas during early schistosomiasis (Henderson *et al.* 1992, Bogen *et al.* 1995). While the natural disease progresses, the Th1 response is down-regulated and egg-induced granuloma lesions diminish in size (Andrade & Warren 1964, Colley 1975). T cells having suppressive functions were shown to down-modulate the delayed-type hypersensitivity mediated granulomatous response and IL-2 production in chronically infected mice (Fidel & Boros, 1990). IL-12 has dramatic suppressive effects on granuloma formation by inducing IFN- γ secretion by Natural Killer cells (Oswald *et al.* 1994). On the other hand, IL-10 has been proposed to be partly responsible for the down-regulation of Th1 response since this cytokine inhibits antigen presenting cell (APC) function by down-regulating the expression of major histocompatibility class II molecules, as well as costimulatory molecules and anergizing newly egg-induced Th1 cells (O-Flores Villanueva *et al.* 1994). IL-10 also inhibits accessory cells and T lymphocyte secretion of inflammatory cytokines (O-Flores Villanueva *et al.* 1996). Recent observations have underlined the role of the oligosaccharide Lacto-*N*-fucopentaose present on schistosome eggs in inducing IL-10 production by B cells in *S. mansoni* infected mice (Velupillai & Harn, 1994).

An unconventional subset of B lymphocytes, the B1 subset, predominant in peritoneal and pleural cavities is a major source of IL-10 (O'Garra *et al.* 1992, Herzenberg *et al.* 1986). Antibodies secreted by B1 cells are primarily poly-reactive low affinity IgM which cross-react with a variety of self antigens (Hayakawa *et al.* 1984, Hayakawa *et al.* 1986). B1 expansion is affected by T-cell derived cytokines. Thus, IL-10, in an autocrine way, and IL-5 stimulate B1 subset proliferation and differentiation (Nitisani *et al.* 1995, Kopf *et al.* 1996) while IFN- γ inhibits B1 cell activity and IL-12 causes the loss of peritoneal B1 cells (Hitoshi *et al.* 1989, Jones 1996, Vogel *et al.* 1996).

BALB. *Xid* mice carry an X-linked mutation (*Xid*) originally found in CBA/N mice (Wicker & Scher 1986) and subsequently introduced in the BALB/c background. This mutation results in a detrimental B cell response characterized by a complete lack of B1 cells and a defect in B2 cells due to an early arrest in their development, after the appearance of B220⁺ C μ ⁻ pro-B cells (Karagogeos, Rosenberg & Wortis 1986). This arrest proceeds from defects in events leading to B cell cycle entry (Brorson *et al.* 1997). This immunodeficiency is caused by a point mutation in the pleckstrin domain of the Bruton tyrosine kinase (Btk) gene (Hyvönen & Saraste 1997) that leads to a lower frequency of splenic B cells bearing surface immunoglobulins (sIg) comparable to those of immature newborn mice (Finkelman *et al.* 1975, Scher *et al.* 1980). *Xid* mice display low levels of IgM and IgG3 in their sera (Permultter *et al.* 1979) and their B lymphocytes do not proliferate after sIg cross-linking (Sieckmann 1980). In addition, *Xid* mice fail to respond to certain thymo-independent type II antigens (Wicker & Scher 1986). Conversely, T-cell responses in *Xid* mice are normal since they still keep their ability to act as helper cells as they do in non deficient mice (Janeway & Barthold 1975).

The incidence of *Xid* deficiency has been previously described upon the outcome of infection with intracellular parasites such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. In these models, resistance or control of infection correlated with the induction of a Th1 response (Minoprio *et al.* 1993, Hoerauf *et al.* 1994). We thus addressed the question of the effect of B1 cell-deficiency in the helminth *S. mansoni* infection which induces a strong Th2 response. Here, we evaluated the effects of X-linked immunodeficiency on *S. mansoni* development and its incidence on pathology and we assessed immunological parameters in this experimental infection.

MATERIAL AND METHODS

Mice

BALB. *Xid* mice were obtained from the Unité de Parasitologie Expérimentale (Institut Pasteur, Paris, France) and further breedings were carried out by brother-sister mating in our facilities under conventional conditions. Control BALB/c mice aged 6 to 8 weeks were purchased from Charles River (Saint-Aubin les Elbeuf, France). BALB. *Xid* and BALB/c were age and sex-matched in all experiments.

Parasite and infection

A guadeloupean strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts, bred in mineral water (Société des Eaux de Volvic, France), and OF1 mice as definitive hosts. Mice were anaesthetized and infected with 45 cercariae in the first experiment and 60 cercariae for experiments II and III, as previously described (Smithers & Terry 1965).

Worm recovery and tissue sampling

Forty-six days post-infection, mice from experiments I and II were sacrificed by injection of pentobarbital solution whereas mice from experiment III were sacrificed at day 55. Adult worms were recovered after total blood perfusion. Egg loads in livers and intestines were evaluated after an overnight alkali digestion of tissues in a 4% KOH solution at 37°C. Eggs present in the resulting digested samples were counted under light microscopy.

Serum sampling

Blood samples were collected every two weeks by intra-orbital puncture up to 76 days post-infection, from BALB. *Xid* and BALB/c controls infected with 45 cercariae. Sera were aliquoted and stored at -20°C until tested.

Antigens

Adult worm antigenic extracts (SWAP) were prepared from adult worms washed in phosphate buffered saline (PBS), homogenized with an Ultra-turax (Janke and Kundel, IKA Labortechnik, Sweden) for 1 min, disrupted by a 5 min sonication (Labsonic U., B. Braun), and centrifuged for 20 min at 10.000xg. Egg antigens (SEA) were prepared from homogenized eggs isolated from the livers of 46 days-*S. mansoni* infected hamsters. Briefly, frozen eggs were disrupted by 10 passages through an X-press (A.B. Biox, Jarfalla, Sweden) and the soluble fraction collected after centrifugation for 15 min at 10,000 x g. Cercariae soluble antigens (FC) were prepared from cercariae washed in PBS at 4°C, disrupted by a 5 min sonication, and centrifuged for 15 min at 10.000xg. Protein concentrations were evaluated by the BCA protein assay (Pierce, IL, USA).

Antibodies and reagents

Horseradish peroxidase-labelled goat antibodies to mouse IgG1, IgG2b, IgG2a and IgM heavy chains were from Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, A.L.). Biotinylated rat anti-mouse IgE was from PharMingen (San Diego, C.A.), biotinylated goat anti-mouse IgA from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and streptavidin-horseradish peroxidase from Amersham (Les Ulis, France). Monoclonal antibodies (mAb) specific for cytokines were obtained from PharMingen. Recombinant murine IL-4 (rIL-4), rIL-5 and rIL-10 were from PharMingen, rIFN- γ and rIL-2 were purchased from Genzyme (Cambridge, MA, USA).

Immunoglobulin detection

Microtiter plates (Nunc, Intermed S.A., Denmark) were incubated overnight at 4°C with SEA diluted in PBS (100 μ l/well, 10 μ g/ml) and then washed with PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T). Plates were saturated for 1 h with a 0.5% PBS-gelatine solution. The amounts of specific mouse antibodies bound to SEA were measured with the different class-specific peroxidase-labelled goat antisera (murine sera were diluted at 1/2500 and 1/50 respectively for IgM and IgG subclasses detection). The enzyme substrate was then added and optical density (O.D. at 492 nm) determined with a Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems, France). Values correspond to the mean of

duplicate assays. For IgE and IgA detection (sera were diluted respectively at 1/20 and 1/250), streptavidin-horseradish peroxidase was added after biotinylated antibodies for 30 mn.

Cell cultures for cytokine production

Single spleen cell suspensions were prepared as previously described (Poulain-Godefroy *et al.* 1996). Briefly, spleens were forced through fine wire mesh and erythrocytes were lysed by osmotic treatment (170 mM Tris-buffered saline, 155 mM ammonium chloride solution). Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion and 10^7 cells were resuspended in 1 ml of culture medium (Poulain-Godefroy *et al.* 1996). Cells were incubated with or without parasite antigens, either SEA (10 μ g/ml), SWAP (100 μ g/ml) or FC (100 μ g/ml) or Concanavalin A (ConA, 5 μ g/ml) (Seromed, Berlin, Germany) in 24-well plates at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. Supernatants were collected after 24 h for IL-4 and IL-2 measurement and after 72 h for IFN- γ , IL-5 and IL-10 assays.

Cytokine assays

Cytokine detection was performed using specific ELISA assays. Microtiter plates were coated overnight at 4°C with purified anti-cytokine mAb diluted in coating buffer (100 μ l/well, R4-6A2, BV4-1D11, JES6-1A12, TRFK5 and JES5-2A5 for anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-2, anti-IL-5 and anti-IL-10 mAb respectively). Wells were saturated with 200 μ l of a 0.5% PBS-gelatine solution for 60 min. Supernatants were added and incubated overnight at 4°C, plates were then incubated for 90 min at 37°C with biotinylated anti-cytokine mAb (100 μ l/well diluted in PBS-T, XMG1-2, BVD6-24G2, JES6-5H4, TRFK4 and SXC-1B for anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-2, anti-IL-5 and anti-IL-10 biotinylated mAb respectively). Amplification and detection with streptavidin-peroxidase conjugate were performed as described above for Immunoglobulin detection. Cytokine concentrations were calculated by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. Values ranged between 0.1 to 10 ng/ml for IL-5, IL-10 and IFN- γ , 1.56 to 100U/ml for IL-2 and 20 to 1250 pg/ml for IL-4.

Morphological analysis of hepatic granulomas

Liver samples were fixed in Bouin's fluid for 72H and paraffin-embedded. Samples were processed by routine histopathologic techniques : 5µm thick sections were deparaffinized and then stained with hematoxylin-eosin for cytological analysis and Saffron Masson's Trichrome for collagen deposition. Slides were examined on a DMRB light microscope and serial 0.25 mm² fields were analyzed. All the granulomas which contained an egg were measured. Other granulomas were just counted. Analyse were performed on the liver of mice from Experiment IV i.e. at day 55 and from an independent experiment at day 70 after infection.

Statistical analysis

Student's-t test was used for the mean comparisons in worm burdens, tissue egg loads and granuloma densities. Probability values ≤ 0.05 were considered significant.

The z-test was used for analysing the differences in % survival and the Mann-Whitney test for antibody responses. Probability values ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS

Parasitological parameters

Worm burden

Fig. 1 summarizes the total and female worm burdens recovered after total perfusion of BALB. *Xid* and BALB/c mice, 46 or 55 days post-infection. In the experiments I and II, *Xid* mice show respectively 31% and 30% more worms than control BALB/c mice. However, no difference was observed in worm burdens between BALB/c and BALB. *Xid* mice, in experiment III. In the two first experiments, significantly higher female worm burdens were recorded but the ratio between males and females was comparable between BALB/c and BALB. *Xid* mice. The number of immature parasites was not different in the two groups of mice, in any experiments (data not shown).

Infection with a higher dose of cercariae (60FC in experiments II and III versus 45 FC in experiment I) led to heavier parasitemia in deficient mice as in BALB/c.

When all the data of the three independent experiments are pooled, no significant difference in the worm numbers emerges between BALB. *Xid* and BALB/c infected mice.

Tissue egg loads

Tissue egg loads were evaluated in livers or intestines and total tissue egg counts are summarized in Table 1. In all experiments, BALB. *Xid* mice displayed heavier egg loads when compared to BALB/c. The increase in egg numbers reaches 75% in the BALB. *Xid* liver and 45% in the intestine for experiment I and 21% and 30% respectively for the livers and the intestines of the experiments II and III. When all the data are taken into account, an overall significant increase in liver and tissue eggs (33% and 30% respectively) is observed.

As naïve *Xid* mice tend to be smaller than control BALB/c of the same age and in order to limit individual variations, egg counts have been adjusted per gram of tissue (Table 2, A, C). The three experiments emphasized a significant difference in egg loads per gram of liver or intestinal tissue. The larger egg numbers per gram in *Xid* mice represent an overall 37% increase in the liver and 41% in the intestine.

While no difference in the number of female worms was recorded for experiment III (Fig. 1), a significant increase in liver or intestinal egg number /gr and per female worm was observed in BALB. *Xid* mice from this experiment (Table 2, B, D), and this was confirmed when all the data of every experiment were combined.

Increasing the dose of cercariae in experiment II resulted in heavier total tissue egg loads in the two strains of mice (Table I). Whereas the egg numbers increased both in the livers and in the intestines of BALB/c mice infected with 60 cercariae (versus 45 cercariae in experiment I), egg counts (total or adjusted per gram) increased only in the BALB. *Xid* intestines in contrast to the liver where egg loads remained stable.

Mouse susceptibility

To compare the susceptibility of both mice strains to *S. mansoni* infection, mortality was studied in mice infected with 45 cercariae, in an independent experiment conducted during 120 days. Fig. 2 shows that infected *Xid* mice suffered increased mortality compared with BALB/c mice. While most infected BALB/c mice were still alive at the end of the experiment, none of the *Xid* mice survived after day 120. The onset of mortality began at day 44 post-infection in BALB. *Xid* mice, after egg deposition, while BALB/c mortality was delayed (occurring at day 70) and remained stable (17%) until the end of the experiment. The difference in survival in the two groups is highly significant ($p \leq 0.01$) after day 44.

The dose of cercariae used affects survival and, as expected, a heavier infection resulted in increased mortality from day 44 in the group of BALB. *Xid* mice (data not shown).

Morphological analysis of hepatic granuloma

All granulomas observed in the sections were counted and the density of granulomas i. e. number of granulomas per mm^2 analyzed. Only hepatic granulomas centered by an egg were measured and enumerated and the counts adjusted per mm^2 . At day 55, the number of total granulomas per mm^2 was slightly higher in BALB. *Xid* than in BALB/c mice (Fig. 3A). This tendency was confirmed fifteen days later (at day 70) when the density of granulomas became significantly greater in BALB. *Xid* mice, although increasing in both strains. Fig. 3B shows the granuloma distribution

according to their size. At days 55 and 70, most of granulomas measured between 200- 250 μ M in BALB. *Xid* mice while in BALB/c controls at day 55, larger lesions ranging 250 to 300 μ M were observed. At day 70, inflammatory lesions diminished in size in BALB/c mice while remaining stable in BALB. *Xid* mice. Granuloma cell population recruitment was comparable in controls and *Xid* mice at days 55 and 70 (data not shown). Similar fibrosis and collagen deposition were already present at day 55 with the same intensity in the two strains of mice (data not shown). At day 55, rare eggs, probably recently trapped, were not surrounded by collagen but inflammation was already present in the two strains.

Immune parameters

Antibody response to soluble egg antigens

As the analysis of the parasitological parameters shows that *S. mansoni* infected BALB. *Xid* mice displayed higher egg loads in tissues (Table 1), we detailed the egg-specific antibody response.

As shown in Fig. 4, IgE, IgM and IgA antibody levels increase between day 46 and day 76. While the levels of specific IgE antibodies to SEA were higher in BALB. *Xid* mice, the IgM antibody response was very weak when compared to the levels observed in BALB/c mice. This response became significant in *Xid* mice only 10 days after egg deposition (occurring at day 35) while, in BALB/c mice, these specific antibodies were detected at day 20 and reached maximal levels after day 44. A marked deficit in the IgM response was also observed in *Xid* animals on the day of perfusion confirming the weak response towards egg or adult worm antigens in infected BALB. *Xid* mice (data not shown). Concerning the IgA response, *Xid* mice displayed significantly lower levels of this isotype. Other independent experiments performed at day 65 confirmed an approximate 5-fold decrease in IgA levels in BALB. *Xid* versus BALB/c mice (data not shown).

The distribution of SEA specific IgG subclasses in infected BALB. *Xid* mice compared to infected BALB/c is depicted in Fig. 5. IgG3, IgG2a, IgG2b responses are comparable in the two groups, whereas the levels of SEA-specific IgG1 are higher in *Xid* mice after day 42 post-infection.

Cellular response

Cytokine secretion by splenocytes from 46 days-infected mice, stimulated with parasite antigens is summarized in Fig. 6. No difference was observed in IL-2 production after stimulation with parasite antigens between *Xid* or BALB/c mice, however higher IL-2 secretion was observed for cells from infected BALB/c after ConA stimulation (Fig. 6A). IFN- γ production is parasite stage-specific. Cercariae antigens stimulated spleen cells to produce larger amounts of IFN- γ than adult worm or egg antigens (Fig. 6B). This observation concerned both *Xid* and BALB/c mice. Interestingly, splenocytes from infected *Xid* mice produced more IFN- γ after infection when compared to splenocytes from infected BALB/c mice. Besides, spleen cells from BALB/c are weak producers of IFN- γ and, in our experiments, BALB/c splenocytes only produced this cytokine when cercarial antigens were used for stimulation.

Splenocytes produced more IL-5 when stimulated with adult or egg antigens than with cercariae antigens but no pronounced differences between the two strains were observed except a slight increase in IL-5 secretion after *in vitro* culture of *Xid* splenocytes with SWAP (Fig. 6C). *Xid* mice produced larger amounts of IL-4 under any antigenic stimulation but not under mitogenic conditions where levels were similar between the two groups (Fig. 6D).

Splenocytes from *Xid* mice stimulated with different parasite antigens produced lower amounts of IL-10 than those from BALB/c mice (Fig. 6E). In both groups, egg antigens are stronger inducers of IL-10 than adult worm or cercariae extracts.

Under mitogenic stimulation, infected BALB. *Xid* mice showed a greater production of IFN- γ and lower levels of IL-2 than BALB/c mice (data not shown).

Spleen cells from non-infected mice failed to produce any cytokines when stimulated with parasite stage-specific antigens. Only activation with ConA triggered splenocytes from non-infected BALB/c or BALB. *Xid* mice to secrete higher levels of IL-2 and IFN- γ and lower amounts of IL-4, IL-5 and IL-10 than spleen cells from infected animals under the same conditions (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that B1-cell deficient *Xid* mice are more susceptible to *S. mansoni* infection, present higher egg loads in the liver and the intestine and suffer increased mortality when infected by *S. mansoni* compared to BALB/c infected mice. The larger egg loads recorded in tissues may be explained by a higher rate of trapping or a lower excretion rate of eggs in BALB. *Xid* mice. Recently, it has been shown that B cell-defective mice (μ MT) displayed a reduced egg excretion indicating a role of the humoral response in the transport of eggs across the intestinal wall into the lumen (Jankovic *et al.* 1998, Doenhoff *et al.* 1978). Interestingly, in *Xid* mice, eggs preferentially concentrate in the intestine rather in the liver as the infecting cercarial dose increases. Another hypothesis could be that, while BALB. *Xid* and BALB/c mice present comparable worm burdens, female fertility could be increased in deficient mice leading to the greater numbers of eggs per female worm and per gram of tissue observed. Despite our *in vivo* observations, no modifications in female worm fertility *in vitro* supported this hypothesis (numbers of eggs laid *in vitro* by worm pairs from BALB/c or BALB. *Xid* mice remained similar, data not shown).

Concurrently to differences in egg numbers, infected BALB. *Xid* displayed higher levels of IL-4 and IFN- γ accompanied by, in contrast, a reduced IL-10 secretion. According to the dichotomy of cytokine secretion in Th CD4⁺ cells (Mosmann & Coffman 1989), we observed, at day 46, a dominant Th2-type of response in infected BALB/c mice, characterized by IL-4, IL-5 and IL-10 secretion and by a down-regulation of IFN- γ in response to parasite antigens, as previously described (Grzych *et al.* 1991). In contrast, *Xid* mice still presented a sustained Th1 cytokine secretion at this time. It is accepted that CD5⁺ B cells are involved in the T helper type-regulation by producing particular lymphokines involved in Th2 responses or by mimicking Th2 activity (Go *et al.* 1990, Hardin *et al.* 1990, Okumara *et al.* 1982). IL-10 is a Th cell-cross-regulatory cytokine that, in addition to its inhibitory activities, can indirectly inhibit the synthesis of Th1 cytokines (Mosmann & Moore 1991). This property has been already reported in schistosomiasis (O-Flores Villanueva *et al.* 1994). The lower levels of IL-10 recorded in infected BALB. *Xid* mice may explain why these mice concomitantly produce more IFN- γ . Various cell

populations produce IL-10 i.e. macrophages, Th2 cells and B cells. Among the B lymphocytes, CD5⁺ B cells are the main source of IL-10 (O'Garra *et al.* 1992). Although B1 cells are rare in spleens from normal BALB/c mice, it is possible that the total lack of CD5⁺ B lymphocytes associated with a partial deficiency in conventional B cells in *Xid* mice, leads to lower levels of IL-10 which subsequently affects the down-regulation of IFN- γ secretion. Recently, Velupillai *et al.* showed that B1, themselves, regulate their expansion via IL-10 and are down-regulated by IL-12 or IFN- γ (Velupillai, Sypek & Harn 1996). Another explanation for the higher expression of IFN- γ may be linked to the *Xid* defect in these animals since it has been reported that high levels of IFN- γ during the early development of the B1 lineage inhibit or eliminate these cells (Ishida *et al.* 1992). Our observation of higher secretion of IFN- γ by splenocytes from non infected *Xid* mice under mitogenic activation support this hypothesis (data not shown). Similar increases of IFN- γ production in *Xid* mice have been reported in Chagas disease and Leishmaniasis (Minoprio *et al.* 1993, Horeauf *et al.* 1994).

The expansion of Th1 and Th2 cells is also influenced by the nature of the antigen-presenting cell (APC) (Gajewski *et al.* 1991). B cells can act as APC for Th2 lymphocytes : in Leishmaniasis as in Schistosomiasis, B lymphocytes are required for T helper 2 cell response (Horeauf *et al.* 1995, Hernandez, Wang & Stadecker 1997). In consequence, *Xid* animals may have a limited ability to present antigen to antigen-specific T cells since CD5⁺ B cells have been described to be more efficient APC than splenic or CD5⁻ B cells (Zimecki *et al.* 1994). Nevertheless, B cell-deficient mice (μ MT) injected with *S. mansoni* eggs present higher proliferative capabilities and efficient T cell priming despite their deficiency and, as in our deficient model, enhanced IFN- γ and IL-4 secretions (Epstein *et al.* 1995).

Although we did not study the differential proliferative responses in infected *Xid* or BALB/c mice, higher levels of these two mutually exclusive cytokines in *Xid* mice suggest that the T-cell response may be temporarily blocked in a Th0-like stage as observed by Vella *et al.* (Vella & Pearce 1992). The analysis of cytokine production at a later time point (day 80) reveals that the production of IFN- γ decreases thereafter in infected *Xid* mice and leads to a Th2-type profile, with nevertheless a less intense IL-10 secretion compared to BALB/c mice (data not shown). This

profile is associated with clinical manifestations requiring help from Th2 cells, as well as an IgE antibody response and the granulomatous reaction around eggs observed in both groups.

The specific humoral response in *Xid* mice is characterized by a weak IgM response to egg antigens, an increased SEA-specific IgE and IgG1 production and by a less intense IgA antibody response during the time course of infection. While the increase in IgM levels is precocious in infected BALB/c mice, a weak IgM response in *Xid* mice was expected because non conventional B cells are involved in seric IgM production. B1 lymphocytes secrete IgM antibodies that react with thymo-independent antigens such as bacterial antigens, $\alpha(1-3)$ dextran (Su *et al.* 1991, Forster & Rajewsky 1987) and polysaccharides (Herzenberg *et al.* 1986) abundantly present on *S. mansoni* larvae and eggs.

Contrasting with the very low level of IgM, larger amounts of IgE and IgG1 antibodies may be a consequence of the elevated IL-4 secretion in *Xid* animals. In conventional murine B cells, IL-4 enhances switching to IgE and IgG1 while IFN- γ reduces germline $\gamma 1$ and ϵ transcripts upon LPS activation (Coffman *et al.* 1986, Snapper, Finkelman & Paul 1988, Snapper & Paul 1987).

The IgA antibody response increases after egg deposition in accordance with our recent observations describing the major role of eggs in the induction of IgA antibody response during schistosomiasis (Poulain-Godefroy *et al.* 1996). In spite of higher tissue egg loads in *Xid* animals, the specific IgA antibody response to SEA is significantly lower, likely related to the lack of CD5 B cells which express the IgA isotype. In fact, isotype switching in CD5⁺ B cells is rather different than in conventional B lymphocytes. B1 cells switch spontaneously *in vitro* from IgM to any of the IgG subclasses and with a greater magnitude to IgA. IL-4 as well as TGF- β which acts on IgA switching in conventional B cell cultures, increase the frequency of switching to all available isotypes (Whitmore, Haughton & Arnold 1992, Lebman, Nomura & Coffman 1990). Interestingly, IFN- γ synergizes the effect of IL-4 on IgG1 secretion and has no effect on IgG2a production in contrast with its effect on non CD5 B cells (Altboum, Porat & Zan-bar 1992). Although TGF- β has not been assessed in our experiments, no difference in IL-5 production, an IgA⁺ B cell-activating factor, was observed. Moreover, B1 cells are less responsive to IL-5 than their B2 counterpart because of a lower expression of α and β chains of the IL-5 receptor and due to the defect in their signaling pathway (Hitoshi *et al.* 1993, Sato *et al.* 1994).

Surprisingly, the depression in IgG3 previously reported in X-linked deficient-CBA/N mice is not observed in our *S. mansoni*-infected *Xid* mice model. Nevertheless, studies performed with infected BALB/c (data not shown) during 120 days show maximal level of IgG3 around day 100 and IgG2b antibodies being detectable after day 76 but the high mortality occurring after day 46 in *Xid* mice limited the scope of our study and increased the variability.

The high mortality observed in infected BALB. *Xid* mice led us to analyze liver pathology. Macroscopical observations allowed us to show that the livers of *Xid* mice are of the same size as those from controls indicating that the *Xid* defect probably does not impair hepatomegaly. This indicates that the increase of the egg loads does not depend on the size or the weight of the organs and could reflect the higher relative *in vivo* fecundity of the female worms. Although no differences in granuloma cell populations, collagen deposition and fibrosis were noticed between the two strains, the BALB. *Xid* mice livers displayed, at days 55 and 70, higher granuloma densities. Even if the difference is limited to a 15% increase in BALB. *Xid* ($p \leq 0.023$), extrapolation to the entire organs may result in more pronounced hepatic dysfunctions. Since only viable eggs are responsible for the induction of granuloma-associated pathology, it seems important to mention that eggs collected from the livers of *Xid* mice displayed higher rates of maturation and hatching when compared to eggs from BALB/c mice (data not shown). This preliminary observation should also be taken into account to explain the susceptibility of *Xid* mice to *S. mansoni* infection.

In addition, more severe intestinal damage i. e. red foci and turgidities were encountered in infected BALB. *Xid* mice. The preferential accumulation of eggs in the BALB *Xid* intestine and the possible lower excretion of eggs need to be further investigated with a particular emphasis to the specific role of CD5⁺ B cells at the mucosal intestinal level. Indeed, these cells appear to play a key role in the immune response of the gut (Kroese *et al.* 1989). Preliminary experiments already indicate the participation of B1 cells, from the peritoneal cavity, in the egg-specific IgA antibody response in the gut of *S. mansoni*-infected BALB/c mice (Gaubert *et al.*, manuscript in preparation).

In conclusion, our data suggest that both the genetic defect and the increased egg burdens are involved in the high mortality scores observed. The egg load by itself cannot affect the survival of

mice since BALB/c mice infected with a high dose of cercariae (leading to approximately the same number of eggs as in BALB. *Xid* mice, data not shown) did not suffer the same mortality. Our data provide evidences that B1 cells participate in mechanism(s) underlying the expression of immunity toward *S. mansoni* infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. I. Wolowczuk for helpful suggestions in preparing the manuscript and to Dr. R. J. Pierce for his critical reading. We acknowledge J.L. Neyrinck for statistical analysis and discussions.

This work receives a financial support by the Conseil Régional Nord-Pas de Calais and the Institut Pasteur de Lille, IFR 17, INSERM U167 and a grant from EEC STD3, 910030.

- Altboum I., Porat Y. & Zan-bar I. (1992) In *CD5 B cells in development and disease*, ed. B.Boland, p. 152, The New York Academy of Sciences, New York.
- Andrade Z.A. & Warren K.S. (1964) Mild prolonged schistosomiasis in mice : alteration in host response with time and the development of portal fibrosis. *The Transaction of Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene.* **58**, 53-56
- Bogen S.A., O-Flores Villanueva P., Mccusker M.E. *et al.* (1995) *In situ* analysis of cytokine responses in experimental murine schistosomiasis. *Laboratory Investigation.* **73**, 252-258
- Boros D.L. & Warren K.S. (1970) Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs *The Journal of Experimental Medecine.* **132**, 488-507
- Brorson K., Brunswick M., Ezhevsky S. *et al.* (1997) *Xid* affects events leading to B cell cycle entry. *The Journal of Immunology.* **159**, 135-143
- Coffman R.L., Ohara J., Bond M. *et al.* (1986) B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *The Journal of Immunology.* **136**, 4538-4541
- Colley D.G. (1975) Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology.* **115**, 150-156
- Doenhoff M.J., Musallam R., Bain A. *et al.* (1978) Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni* -infected mice : The immunological dependence of parasite egg excretion. *Immunology.* **35**, 771-778

Epstein M.M., Di Rosa F., Jankovic D. *et al.* (1995) Successful T cell priming in B-cell deficient mice. *Journal of Experimental Medecine.* **182**, 915-922

Fidel P.L. & Boros D.L. (1990) Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. IV : Antigen-induced suppressor T cells down-regulate proliferation and IL-2 production. *The Journal of Immunology.* **145**, 1257-1264

Finkelman F.D., Smith A.H., Scher I *et al.* (1975) Abnormal ratio of membrane immunoglobulin classes in mice with an X-linked B lymphocyte defect. *Journal of Experimental Medecine.* **142**, 1316-1321

Forster I. & Rajewsky K. (1987) Expansion and functional activity of Ly-1⁺ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *European Journal of Immunology.* **17**, 521-528

Gajewski T.F., Pinnas M., Wong T. *et al.* (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *The Journal of Immunology.* **146**, 1750-1758

Go N.F., Castle B.E., Barrett R. *et al.* (1990) Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor : unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *Journal of Experimental Medecine.* **176**, 1625-1631

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. *The Journal of Immunology.* **146**, 1322-1327

Hardin J.A., Gibson M., Kawano Y. *et al.* (1990) Characterization of a B cell helper factor(s) derived from CD5⁺ B cell hybridomas. *Cellular Immunology.* **126**, 304-321

Hayakawa K., Hardy R.R. & Herzenberg L.A. (1986) Peritoneal Ly-1 B cells : genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *European Journal of Immunology*. **16**, 450-456

Hayakawa K., Hardy R.R., Honda M *et al.* (1984) Ly-1 B cells : Functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **81**, 2494-2498

Henderson G.S., Lu X., McCurley *et al.* (1992) *In vivo* molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. II. Quantitation of IL-4 mRNA, IFN- γ mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous liver, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. *The Journal of Immunology*. **148**, 2261-2269

Hernandez H. J., Wang Y. & Stadecker M.J. (1997) In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *The Journal of Immunology*. **158**, 4832-4837

Herzenberg L.A., Stall A.M., Lalor P.A. *et al.* (1986) The Ly-1 B cell lineage. *Immunological Reviews*. **93**, 81-102

Hitoshi Y., Mita S., Tominaga A. *et al.* (1989) Interferon-gamma inhibits the proliferation but not the differentiation of murine B cells in response to IL-5. *International Immunology*. **1**, 185-190

Hitoshi Y., Sonoda E., Kikuchi Y. *et al.* (1993) IL-5 receptor positive cells, but not eosinophils, are functionally and numerically influenced in mice carrying the X-linked immune defect. *International Immunology*. **5**, 1183-1190

Hoerauf A., Solbach W., Lohoff M. *et al.* (1994) The *Xid* defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *International Immunology*. **6**, 1117-1124

Hoerauf A., Solbach W., Röllinghoff M. *et al.* (1995) Effect of IL-7 on *Leishmania major* -infected BALB.*Xid* mice : enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *International Immunology*. **7**, 1879-1884

Hyvönen M. & Saraste M. (1997) Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase : molecular explanations for X-linked agammaglobulinemia. *Embo*. **16**, 3396-3404

Ishida H., Hastings R., Kearney J. *et al.* (1992) Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *Journal of Experimental Medicine*. **175**, 1213-1220

Janeway C.A. & Barthold D.R. (1975) An analysis of the defective response of CBA/N mice to T-dependent antigens. *The Journal of Immunology*. **127**, 898-900

Jankovic D., Cheever A.W., Kullberg M.C. *et al.* (1998) CD4⁺ T Cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine*. **187**, 619-629

Jones B.M. (1996). Effect of 12 neutralizing anti-cytokine antibodies on *in vitro* activation of B-cells. Interleukin-12 is required by B1a but not B2 cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. **43**, 64-72

Karagogeos D., Rosenberg N. & Wortis H.H. (1986) Early arrest of B cell development in nude, X-linked immune-deficient mice. *European Journal of Immunology*. **16**, 1125-1130

Kopf M., Brombacher F., Hodgkin P. *et al.* (1996) IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5⁺ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*. **4**, 15-24

Kroese F.G.M., Butcher E.C., Stall A. *et al.* (1989) Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *International Immunology*. **1**, 75-84

Lebman D.A., Nomura D.Y., Coffman R.L. *et al.* (1990) Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type β -induced isotype switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **87**, 3962-3266

Minoprio P., Cury El Cheikh M., Murphy E. *et al.* (1993) *Xid*-Associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent. *The Journal of Immunology*. **151**, 4200-4208

Mosmann T.R. & Coffman R.L. (1989) Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*. **7**, 145-173

Mosmann T.R. & Moore K.W. (1991) The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunology Today*. **12**, 49-53

Nisitani S., Tsubata T., Murakami M. *et al.* (1995) Administration of interleukin-5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice. *European Journal of Immunology*. **25**, 3047-3052

O'Garra A., Chang R., Go N. *et al.* (1992) Ly-1 B (B1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European Journal of Immunology*. **22**, 11-717

O-Flores Villanueva P., Harris T.S., Ricklan D.E. *et al.* (1994) Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th1 lymphocytes *in vitro* and down-regulate schistosomal granulomatous disease *in vivo*. *The Journal of Immunology*. **153**, 1847-1855

O-Flores Villanueva P., Zheng X.X., Strom T.B. *et al.* (1996) Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. **156**, 315-3320

Okumara K., Hayakawa K. & Tada T. (1982) Cell-to-cell interaction controlled by immunoglobulin genes. Role of Thy-1⁻ Lyl-1⁺, Ig⁺ (B') cell in allotype restricted antibody production. *Journal of Experimental Medecine*. **156**, 443-453

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

Pearce E.J., Caspar P., Grzych J.M. *et al.* (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medecine*. **173**, 159-166

Perlmutter R.M., Nahm M., Stein K.E. *et al.* (1979) Immunoglobulin subclass-specific immunodeficiency in mice with an X-linked B-lymphocyte defect. *Journal of Experimental Journal*. **149**, 993-998

Poulain-Godefroy O., Gaubert S., Lafitte S. *et al.* (1996) Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : Stimulatory role of egg antigen. *Infection and Immunity*. **64**, 763-768

Sato S., Katgiri T., Takaki S. *et al.* (1994) IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases. *Journal of Experimental Medicine*. **180**, 2101-2111

Scher I., Berning A.K., Kessler S. *et al.* (1980) Development in B lymphocytes in the mouse : studies of the frequency and distribution of surface IgM and IgD in normal and immune-defective CBA/N F1 mice. *The Journal of Immunology*. **125**, 1686-1693

Sieckmann D.G. (1980) The use of anti-immunoglobulins to induce a signal for cell division in B lymphocytes via their membrane IgM and IgD. *Immunological Review*. **52**, 55-74

Smithers S.R. & Doenhoff M.J. (1982) In *Immunology of Parasitic Diseases*, ed. Blackwell Scientific, p. 527, Oxford.

Smithers S.R., & Terry R.J. (1965) Acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the albinos rat. *Parasitology*. **55**, 711-717

Snapper C.M. & Paul W.E. (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*. **236**, 944-947

Snapper C.M., Finkelman F.D. & Paul W.E. (1988) Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin-4. *Journal of Experimental Medicine*. **167**, 183-196

Su S.D., Ward M.M., Apicella M.A. *et al.* (1991) The primary B cell response to the O/core region of bacterial lipopolysaccharide is restricted to the Ly-1 lineage. *The Journal of Immunology*. **146**, 327-331

Vella A.T. & Pearce E.J. (1992) CD4⁺ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *The journal of Immunology*. **148**, 2283-2290

Velupillai P., Sypek J. & Harn D.A. (1996) Interleukin-12 and -10 and gamma interferon regulate polyclonal and ligand-specific expansion of murine B-1 cells. *Infection and Immunity* **64**, 4557-4560

Velupillai P. & Harn D.A. (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice : A mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**, 18-22

Vogel L.A., Lester T.L., Van Cleave V.H. *et al.* (1996) Inhibition of murine B1 lymphocytes by interleukine-12. *European Journal of Immunology*. **26**, 219-223

Whitmore A.C., Haughton G. & Arnold L.W. (1992) In *CD5 B cells in development and disease*, ed. B.Boland, p. 143, The New York Academy of Sciences, New York.

Wicker L.S & Scher I. (1986) X-Linked immune deficiency (*Xid*) of CBA/N mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **124**, 87-101

Zimecki M., Whiteley P.J., Pierce C.W. *et al.* (1994) Presentation of antigen by B cells subset. I. Lyb-5⁺ and Lyb-5⁻ B cells differ in ability to stimulate antigen specific T cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **42**, 115-123

FIGURE LEGENDS

- Figure 1 :** Determination of total worm and female worm burdens in BALB. *Xid* mice (●) and control BALB/c mice (○) infected with *S. mansoni*. Mice from Exp. I and II were perfused at day 46, mice from Exp. III were sacrificed at day 55. Data are presented as means of worm burden values \pm S.D. (n=7, 5 and 10 respectively for Exp. I, II and III). Probability values ≤ 0.05 were considered significant (Student's-t test).
- Figure 2 :** Comparative analysis of BALB. *Xid* (●) versus BALB/c (○) mice susceptibility to *S. mansoni* infection (number alive/number infected). BALB. *Xid* (n=6) and BALB/c (n=6) were percutaneously exposed to 45 cercariae. Survival % in the two groups was significantly different after day 44 (z-test, $p \leq 0.01$).
- Figure 3 :** Number of granulomas per mm^2 in the liver of BALB.*Xid* mice (●) or BALB/c (○). A. Liver granuloma density at day 55 in BALB. *Xid* mice or BALB/c (n=13 and n=9, respectively) and at day 70 (n=6 and n=3, respectively). B. Distribution of liver granulomas according to their size in BALB. *Xid* mice (●) or BALB/c (○) at day 55 (—) and at day 70 (- - -). Student's-t test was used for statistical analysis.
- Figure 4 :** Specific IgE, IgA and IgM antibody responses to SEA in serum of deficient BALB. *Xid* (●) and BALB/c mice (○) infected with 45 cercariae. At the beginning of the experiment, n=6 for BALB/c and BALB. *Xid* mice. At the end, n=5 for BALB/c and 3 for BALB. *Xid* mice. The IgE response was determined on a pool of sera at each sampling. IgM and IgA responses are expressed as mean of individual values \pm S.D. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. Probability values ≤ 0.05 were recorded after day 44 for IgE and from day 0 for IgA and IgM antibodies.

- Figure 5 :** Specific IgG isotype profile to SEA during *S. mansoni* infection in BALB. *Xid* (●) and BALB/c mice (○). Mice were infected with 45 cercariae. Values are means obtained from individual mice \pm S.D. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. Probability values ≤ 0.05 were observed after day 44 for IgG1.
- Figure 6 :** Comparative analysis of cytokine production of total splenocytes from BALB. *Xid* (●) and BALB/c mice (○) infected with 45 cercariae. Spleen cells collected at 46 day post-infection were stimulated *in vitro* with mitogen (ConA) or parasite antigens Spleen suspensions are a pool of 7 spleens in each group and results are representative of 4 independent experiments.

Table 1 : Evaluation of tissue egg counts (liver, intestine and total) in BALB. *Xid* and BALB/c mice infected with *S. mansoni*.

^{a)} Data are presented as means of values \pm S.D. of the three independent experiments

^{b)} represents the mean values \pm S.D obtained when data from mice of the three experiments were pooled. Student's-t test was used for statistical analysis. (* corresponds to a $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Table 2 : Tissue egg load expressed in eggs per gram of tissue (A, C) and expressed in eggs per gram and per female worm (B, D) in BALB. *Xid* and BALB/c mice infected with *S. mansoni*. Student's-t test was used for statistical analysis. (* corresponds to a $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

^{a)} Data are presented as means of values \pm S.D. of the three independent experiments

^{b)} represents the mean values \pm S.D obtained when data from mice of the three experiments were pooled. Student's-t test was used for statistical analysis. (* corresponds to a $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

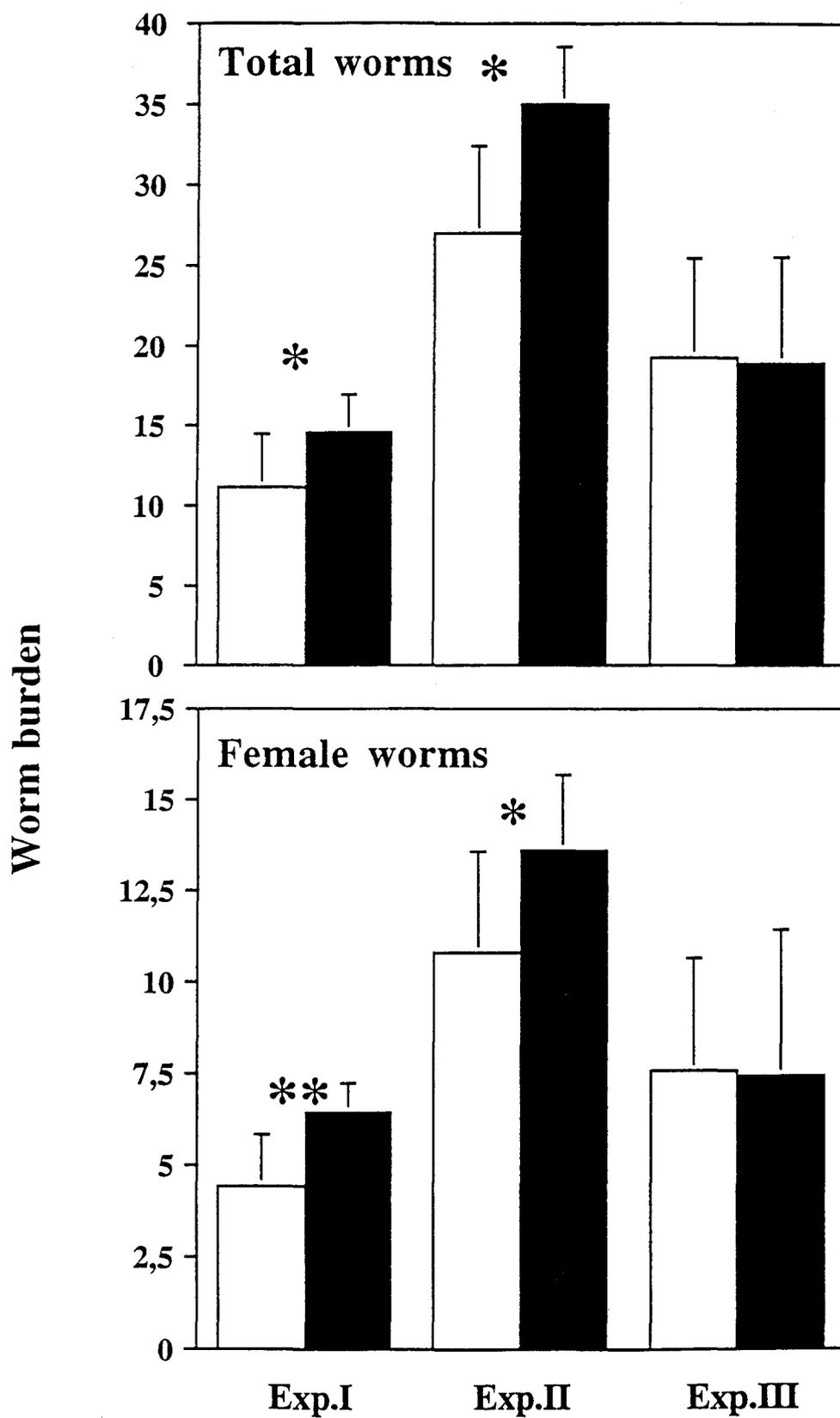


FIGURE 1

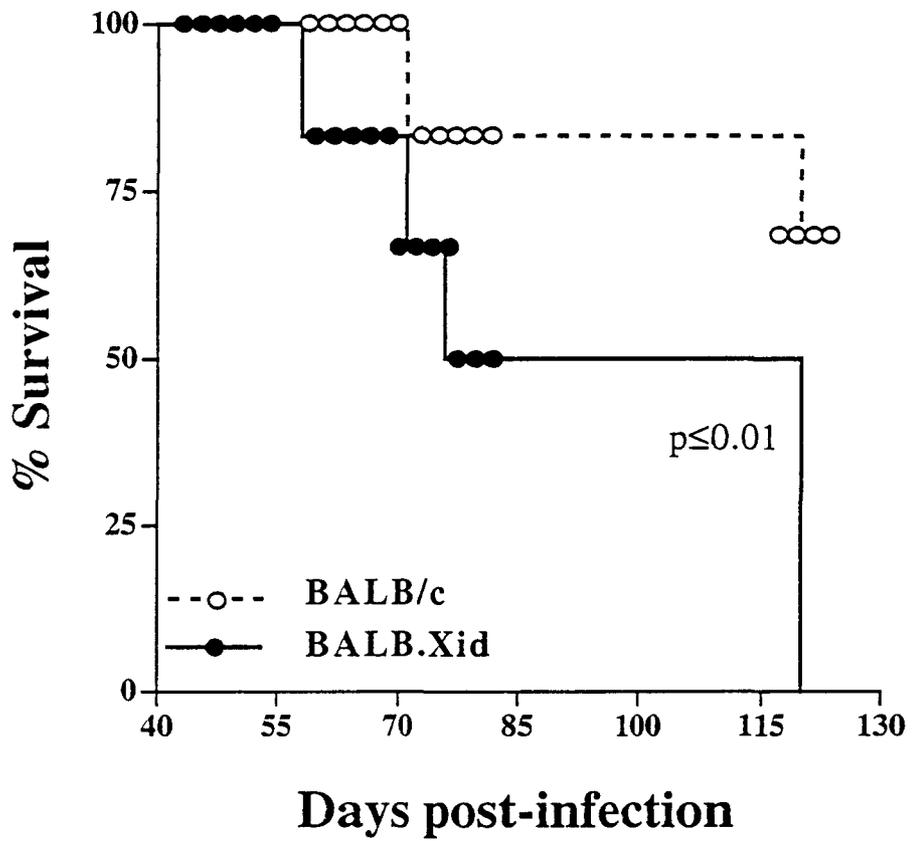


FIGURE 2

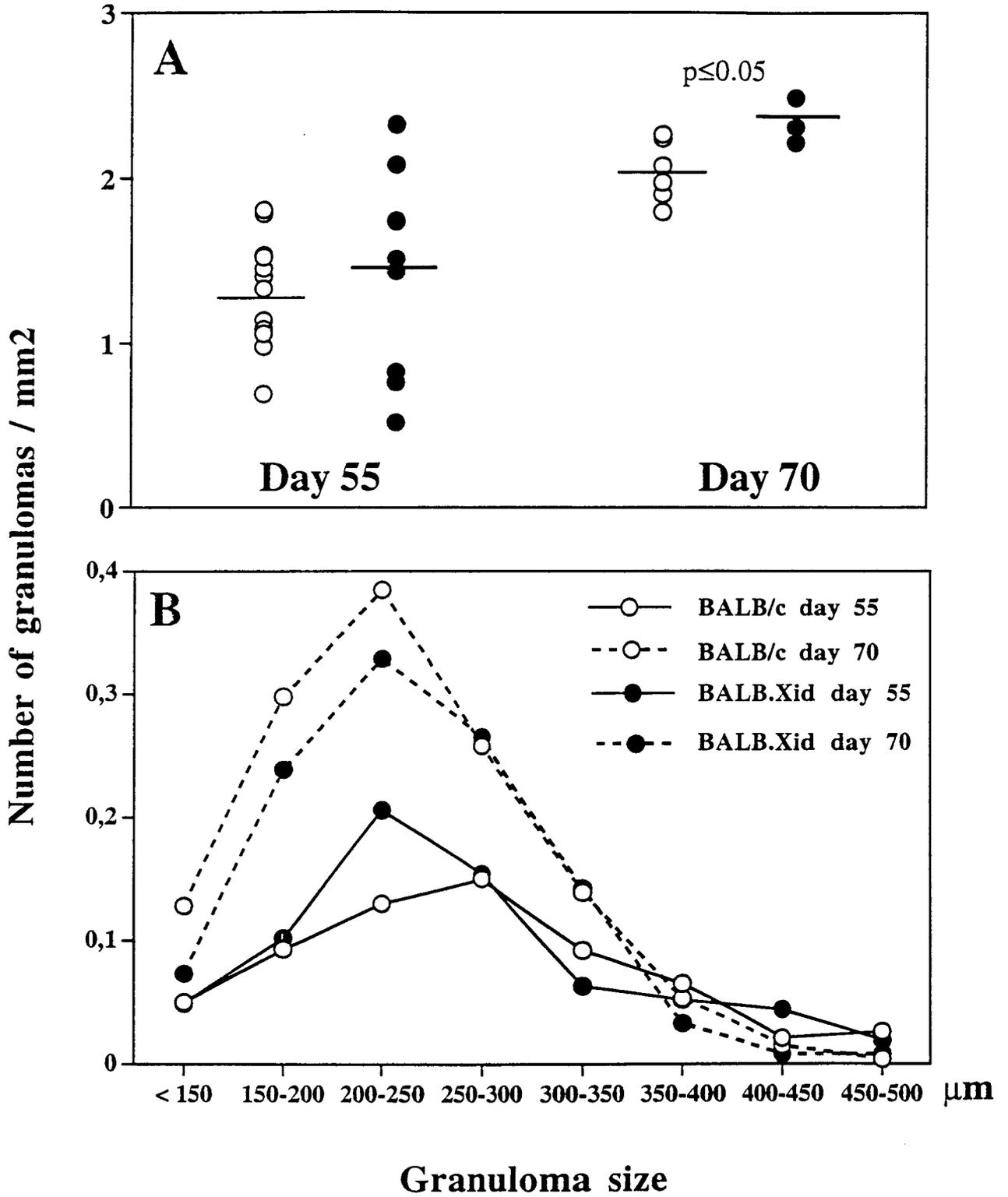


FIGURE 3

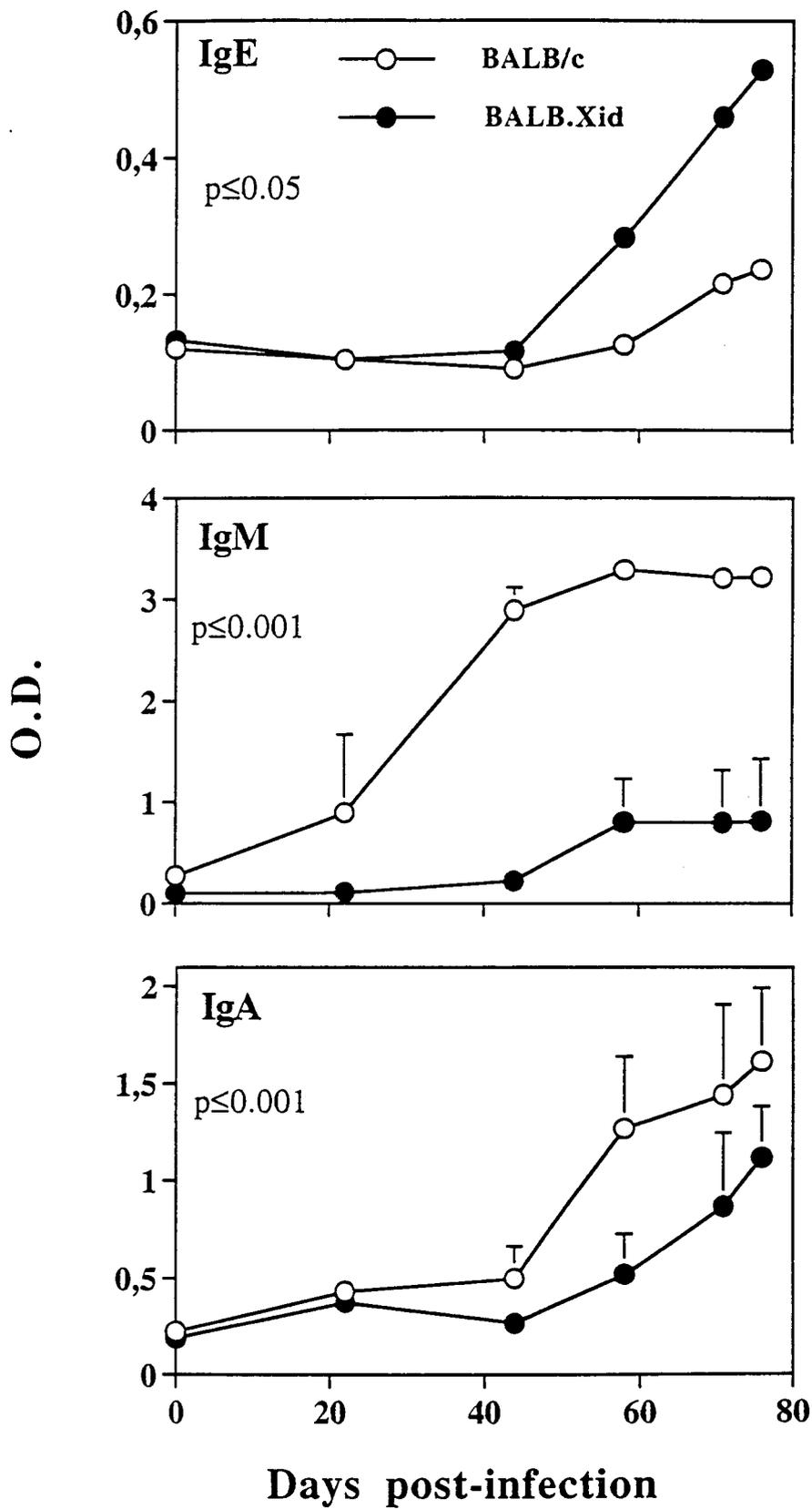


FIGURE 4

O.D.

O.D

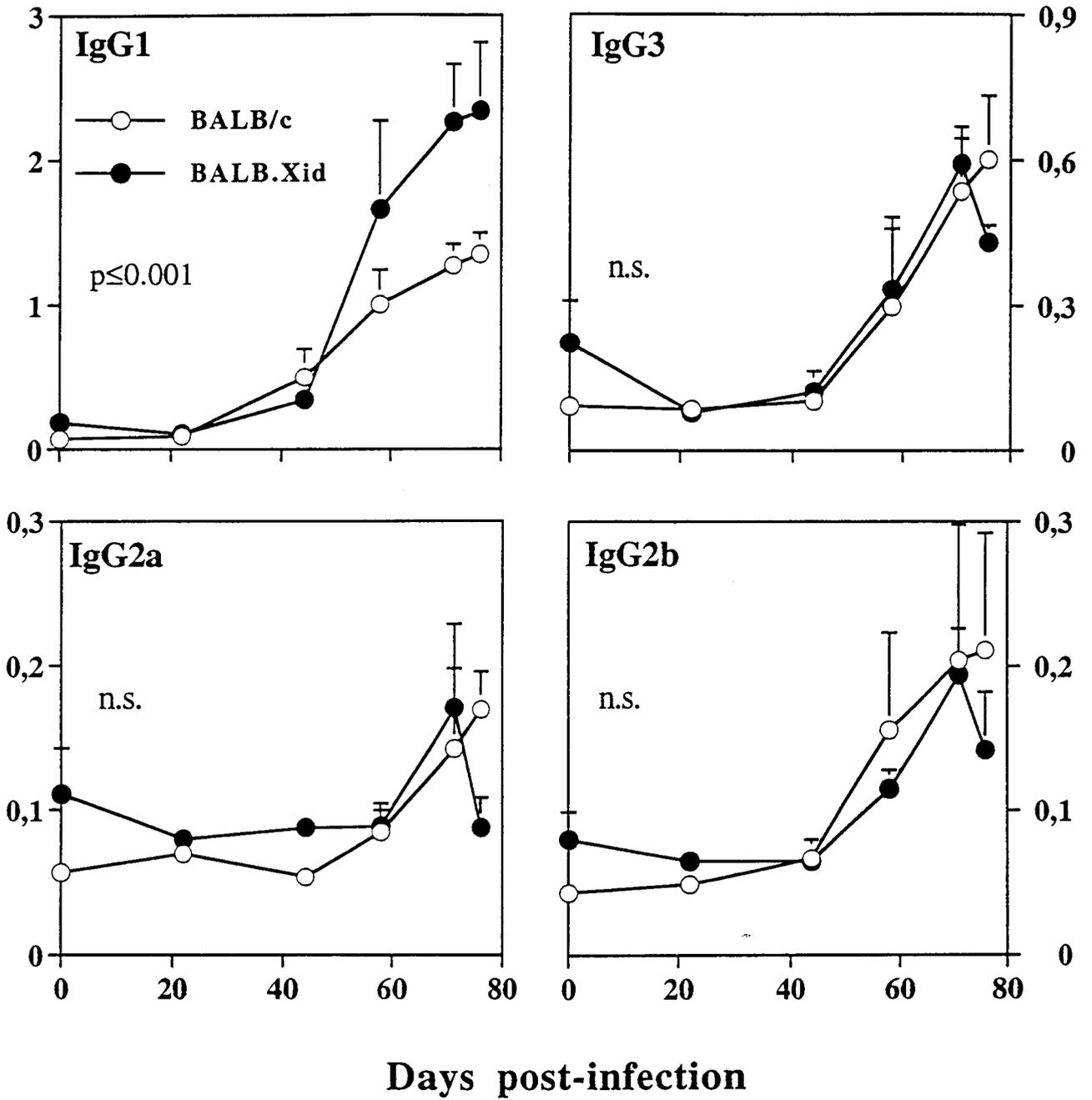


FIGURE 5

FIGURE 6

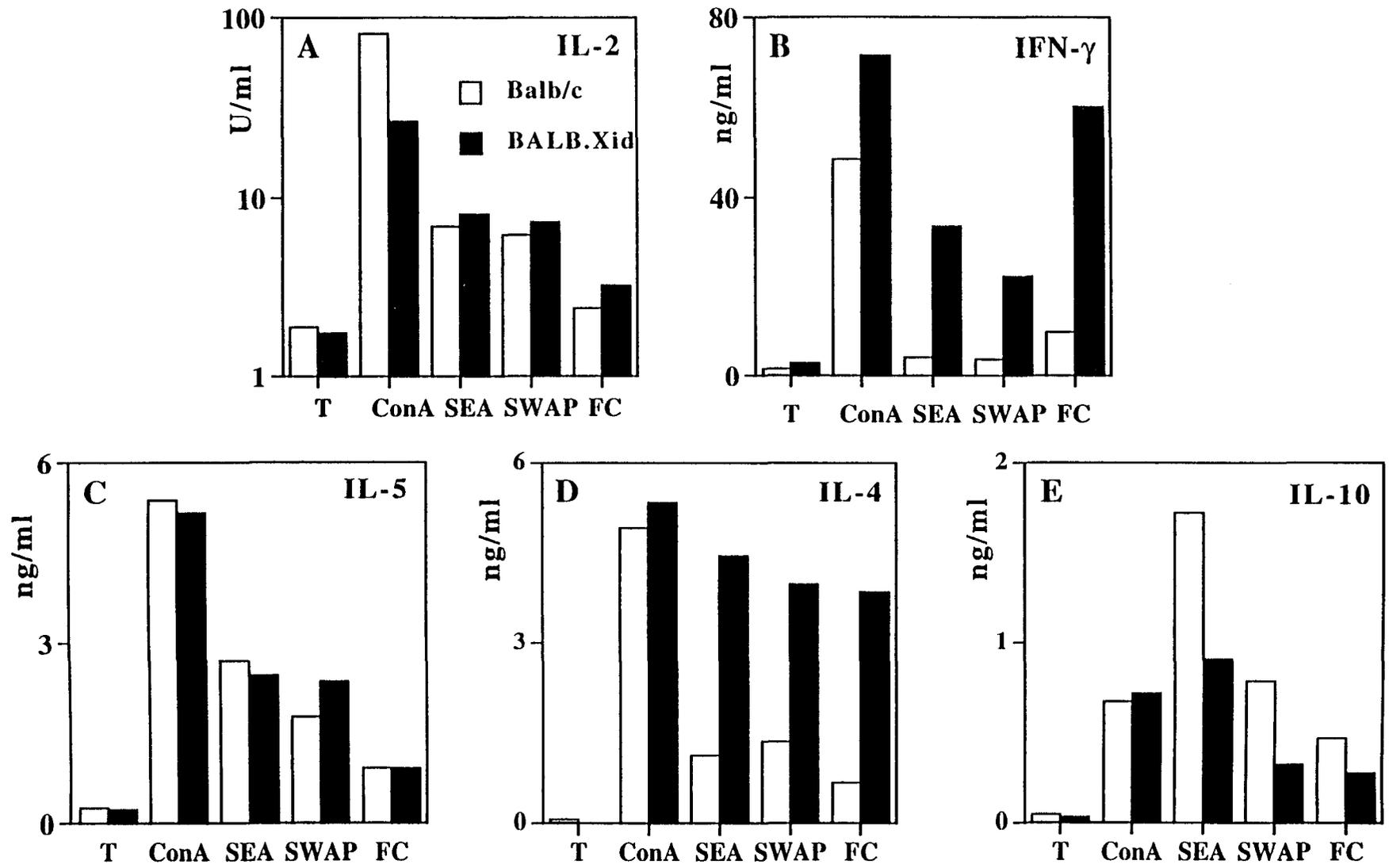


TABLE I

	Liver eggs			Intestine eggs			Total tissue eggs		
	BALB/c	BALB.Xid	% increase	BALB/c	BALB.Xid	% increase	BALB/c	BALB.Xid	% increase
Exp.I ^{a)} n=7	7877 ± 2423	13851 ± 3525	75% *	12134 ± 3825	17497 ± 7574	44%	20011 ± 5910	31348 ± 1077	57% *
Exp.II ^{a)} n=5	9712 ± 3208	11871 ± 1267	22%	31061 ± 11572	39366 ± 4420	27%	40773 ± 14555	51237 ± 4799	26%
Exp.III ^{a)} n=10	10989 ± 4170	13161 ± 5259	20%	28283 ± 11558	37455 ± 22583	32%	39272 ± 15438	50616 ± 27255	29%
All data ^{b)} n=21	9815 ± 3675	13084 ± 3961	33% **	24152 ± 12419	31257 ± 18031	29%	33967 ± 15619	44341 ± 20622	30% *

TABLE II

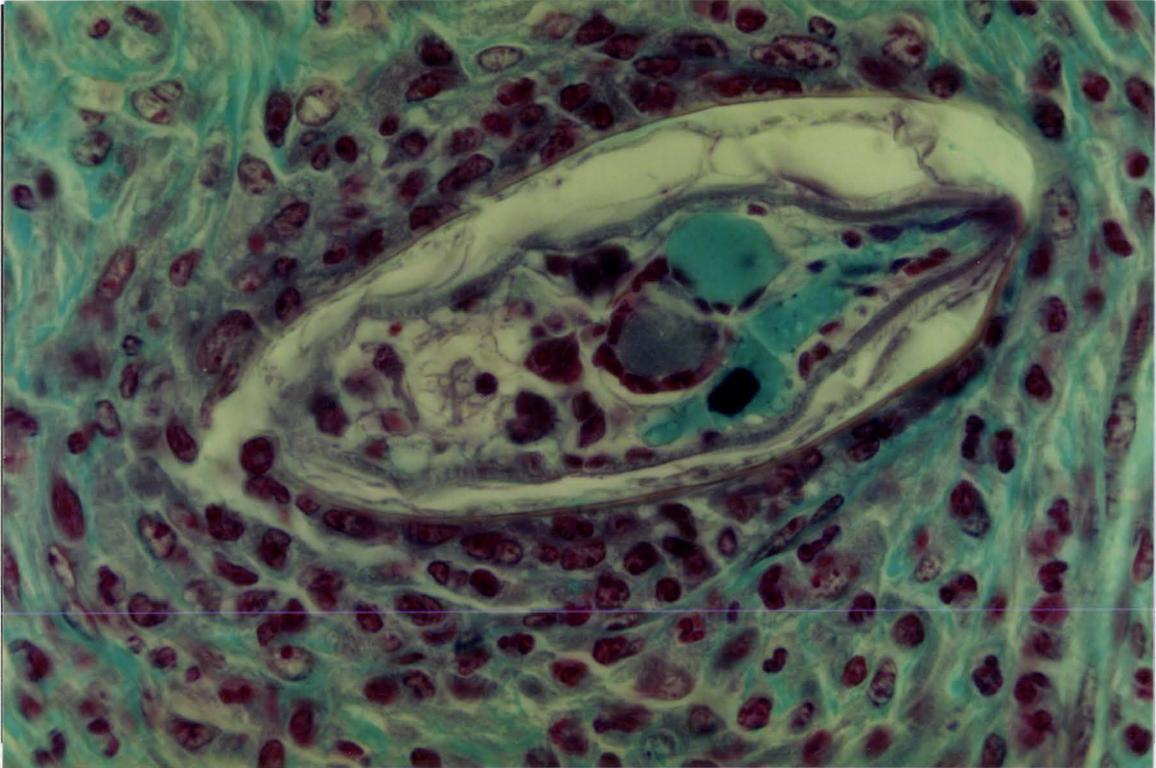
	Liver						Intestine					
	A eggs/gr			B eggs/gr/female			C eggs/gr			D eggs/gr/female		
	BALB/c	BALB.Xid	% increase	BALB/c	BALB.Xid	% increase	BALB/c	BALB.Xid	% increase	BALB/c	BALB.Xid	% increase
Exp.I ^{a)} n=7	3672 ± 1189	6240 ± 1171	70% ***	860 ± 293	971 ± 73	13%	5279 ± 1704	8059 ± 3258	53% **	1216 ± 282	1240 ± 415	2%
Exp.II ^{a)} n=5	4608 ± 1258	5979 ± 642	30% *	433 ± 95	443 ± 51	2%	11473 ± 3367	14650 ± 861	28% *	1056 ± 59	1093 ± 144	3%
Exp.III ^{a)} n=10	5691 ± 2079	7479 ± 2886	31% *	799 ± 170	1176 ± 490	47% *	10209 ± 3834	15323 ± 3834	50% *	1390 ± 251	1985 ± 441	43% ***
All data ^{b)} n=22	4880 ± 1869	6709 ± 2074	37% **	741 ± 254	927 ± 446	25% *	9035 ± 4008	12741 ± 6894	41% *	1270 ± 264	1525 ± 552	20% *

résultats - Partie II

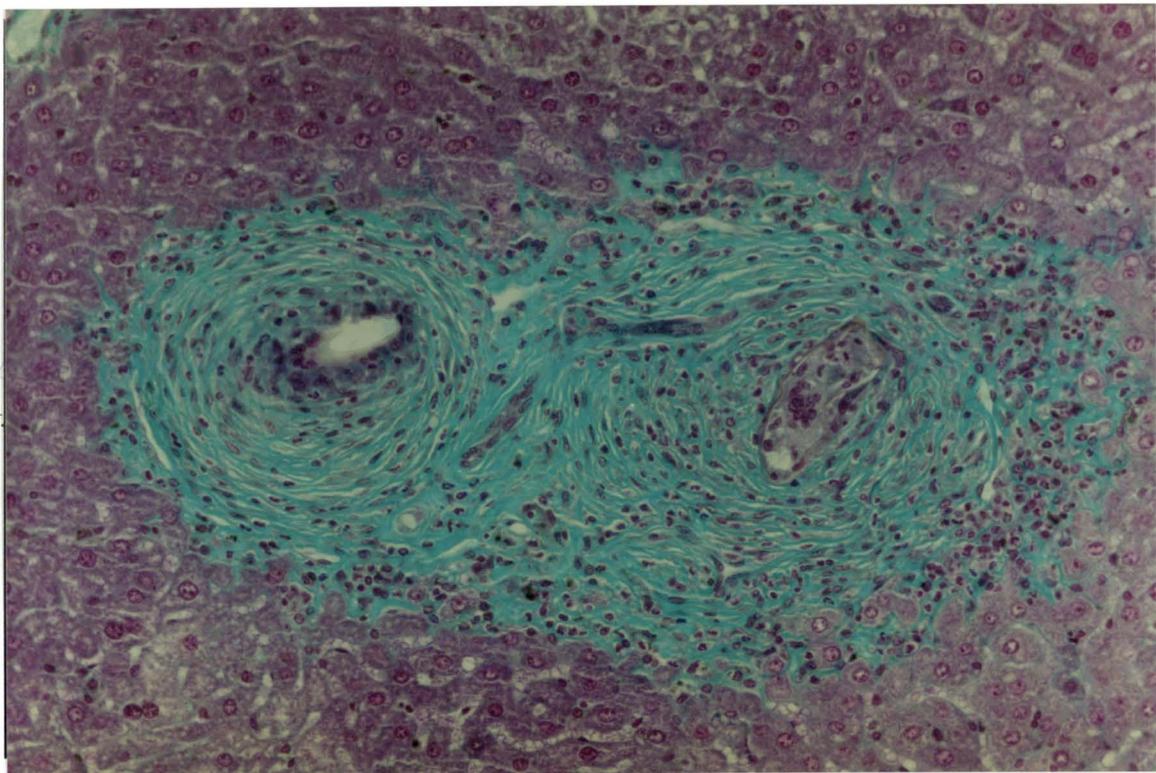
Les travaux rapportés dans cet article nous ont permis de conclure que la déficience en lymphocytes B CD5⁺ entraîne :

- 1) une susceptibilité plus grande à l'infection par *S. mansoni* qui se traduit par un nombre d'œufs tissulaires plus important et une mortalité accrue
- 2) un défaut des réponses IgM et IgA spécifiques des œufs du schistosome
- 3) une production d'IL-10 réduite associée à une sécrétion accrue d'IFN- γ et d'IL-4

**Œufs de *Shistosoma mansoni* piégés dans le foie d'une souris BALB/c (J70)
(Trichrome de Masson)**



X 1280



X 328

Les œufs suscitent l'afflux de macrophages, de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles en périphérie. Le granulome évolue vers une fibrose riche en collagène, les éléments inflammatoires forment une couronne périphérique qui épargne les lobules adjacents.

DISCUSSION

Les différentes expériences présentées dans ce travail de thèse mettent en exergue 4 points majeurs exposés ci-dessous concernant l'induction et la régulation de la réponse IgA observée au cours de la schistosomiase expérimentale murine :

- 1) Les différents protocoles d'immunisation, en particulier la voie parentérale sous-cutanée, ne nous ont pas permis d'induire une réponse IgA spécifique de l'antigène Sm28GST,
- 2) Les antigènes associés aux oeufs du schistosome stimulent la production d'IgA sériques et sécrétoires spécifiques du parasite et polarisent la réponse cellulaire spécifique de l'antigène Sm28GST
- 3) Les lymphocytes responsables de la sécrétion d'IgA muqueuses sont, en partie, des lymphocytes B1 CD5⁺ non conventionnels, d'origine péritonéale,
- 4) L'absence de lymphocytes B1 et le défaut partiel en lymphocytes B chez les souris *Xid* sont associés à une plus grande susceptibilité à l'infection par *S. mansoni*, caractérisée par un nombre d'oeufs tissulaires plus important et une mortalité supérieure chez les BALB *Xid* infectées.

1. Inefficacité des protocoles d'immunisation à induire la production d'IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST

L'administration de l'antigène Sm28GST par voie parentérale, quelque soit la dose, 10 ou 25 µg, quelque soit l'adjuvant expérimenté, adjuvant complet de Freund ou hydroxyde d'Alum, ne nous a pas permis de détecter des IgA sériques spécifiques de cet antigène. Mis à part le fait que nous n'avons pas testé des méthodes de détection plus sensibles (RIA), nos résultats, tributaires de la sensibilité de notre méthode de détection, confirment le consensus général concernant l'incapacité ou la grande difficulté à induire des IgA suite à l'introduction systémique d'un antigène. Dans le cas de la Sm28GST, Grezel (1992) montrait une très faible production de cet isotype, chez la souris immunisée et non infectée, que ce soit en présence d'hydroxyde d'Alum, d'adjuvant complet et même de la sous-unité B de la toxine cholérique, adjuvant le plus favorable à l'induction d'une réponse IgA muqueuse (voie orale) et associé en parallèle au développement possible d'une tolérance orale systémique (Czercinsky, 1995).

De même, les différentes voies d'administration muqueuse de cet antigène se sont révélées décevantes, tant de part l'absence d'IgA dans le sérum que dans les lavages intestinaux des souris. L'induction d'une réponse IgA dans les sites muqueux est en partie conditionnée par la prise en charge de l'antigène par des cellules épithéliales spécialisées : les cellules M observées en nombre plus important au niveau de l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer qui sont les sites préférentiels d'induction de la réponse immune intestinale. Le transport de l'antigène par ces cellules épithéliales spécialisées permet sa libération et son apprêt par les cellules présentatrices d'antigène que l'on trouve soit au niveau du dôme des follicules, soit dans les poches extra-cellulaires que forment les cellules M (Kato et Owen, 1994). Ces cellules, bien qu'exprimant les molécules de CMH classe II ne possèdent pas un équipement enzymatique suffisant qui permette comme les macrophages et les cellules dendritiques, la dégradation et l'apprêtement de l'antigène (Owen *et al*, 1986a). La prise en charge de l'antigène par les cellules M dépend de

différents facteurs tels que la nature physico-chimique de l'antigène, sa taille, son aspect particulaire et sa possibilité d'interagir de manière spécifique par reconnaissance de récepteur et de ligand, exprimés sur les cellules M et certains micro-organismes pathogènes (Kato et Owen, 1994) et aura pour conséquence finale la sensibilisation et l'activation des lymphocytes T et B des plaques de Peyer conduisant à la différenciation de lymphoblastes IgA⁺. L'administration de l'antigène Sm28GST sous forme libre ne conduit pas à la synthèse d'IgA et il est possible que cette administration puisse entraîner des phénomènes de tolérance orale et l'induction d'un état de non réponse. En effet, la présentation de la Sm28GST en raison de sa petite taille et de sa forme soluble n'est pas optimale pour une prise en charge par les cellules M. Par contre, les cellules épithéliales dont la fonction première est un rôle d'adsorption peuvent présenter l'antigène (Mayer et Shlien, 1987 ; Kaiserlian *et al*, 1989) aux lymphocytes T intra-épithéliaux, puisqu'elles expriment les molécules de CMH classe II (Bland, 1988). La plus grande partie des lymphocytes T de l'épithélium sont des lymphocytes T CD8⁺ dont le rôle dans la suppression active de la réponse immune et l'induction d'un état de tolérance a été démontré par différentes équipes (Ke *et al*, 1997 ; Mayer, 1997 ; Grdic *et al*, 1998).

A l'opposé, les doses d'antigène administré *in situ* dans les plaques de Peyer, même si elles ciblent directement les sites inducteurs ont peut-être été insuffisantes pour conduire à une réponse IgA détectable. La seule voie d'administration favorable à l'induction de notre réponse a été l'utilisation du vecteur vivant *Salmonella typhimurium* recombinant. Ce vecteur a conduit à la détection précoce (J15) d'IgA sériques spécifiques de la toxine tétanique et plus tardivement (J45) d'IgA sécrétoires chez 60% des animaux infectés par les Salmonelles. Les salmonelles atténuées ont démontré dans de nombreux cas (Curtiss *et al*, 1989) leur potentiel à induire non seulement une réponse immune locale, elles s'attachent aux cellules M qu'elles envahissent (Carter et Collins, 1974), mais également systémique du fait de leur caractère invasif et de leur progression dans les ganglions mésentériques, le foie ou la rate. La pénétration des bactéries dans l'organisme au niveau des plaques de Peyer ainsi que l'induction potentielle de cytokines inflammatoires (associées aux endotoxines et LPS des parois bactériennes), rapportée dans le cas d'une infection par *Bordetella pertussis*

(Remoué *et al*, 1997) sont deux arguments en faveur de la production d'IgA muqueuses. Par contre, nous avons été déçus par la grande hétérogénéité des réponses IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST et la faible fréquence des animaux répondeurs, imputable à l'immunogénicité plus faible de la Sm28GST par rapport à la sous-unité C de la toxine tétanique. Pendant notre travail de thèse, d'autres vecteurs ont montré leur efficacité à induire une réponse IgA spécifique de notre protéine d'intérêt : le vecteur vivant *Bordetella pertussis* recombinant exprimant la protéine de fusion FHA-Sm28GST engendre la production d'IgA anti-Sm28GST dans la muqueuse pulmonaire (Renaud-Mongénie *et al*, 1996 ; Mielcarek *et al*, 1997) et les liposomes en tant que vecteur synthétique induisent la sécrétion d'IgA intestinales spécifiques de l'antigène Sm28GST (Ivanoff *et al*, 1996).

Malgré l'absence d'IgA spécifiques dans nos différents protocoles d'administration, l'administration parentérale de l'antigène Sm28GST ou l'infection par les salmonelles recombinantes ont conduit à la sécrétion d'anticorps dont le profil isotypique est en accord avec des travaux récemment publiés (Comoy *et al*, 1997a). Ainsi, l'utilisation d'adjuvant complet de Freund, quelque soit la dose d'antigène entraîne la production d'IgG1, d'IgG2a et d'IgG2b anti-Sm28GST chez la souris BALB/c et les mêmes taux d'anticorps chez la souris C57 Black 6, à l'exception des IgG2a non détectables. Différents travaux réalisés dans des systèmes d'activation polyclonale *in vitro* ont montré que l'IL-4 stimule la production d'IgG1 et d'IgE (Mosmann *et al*, 1986), que l'IL-5 seule ou en synergie avec l'IL-4 augmente la sécrétion d'IgA (Coffman *et al*, 1987 ; Sonoda *et al*, 1989 ; Ehrhardt *et al*, 1992) et que l'IFN- γ conduit à l'expression préférentielle d'IgG2a (Snapper et Paul, 1987). Dans nos modèles d'immunisation en présence d'ACF, nous observons un profil T auxiliaire mixte caractérisé par la présence de cytokines Th1 et Th2, en accord avec l'isotypie observée chez la BALB/c. Des différences notables dans les quantités d'interleukines libérées sont observées entre les souches de souris immunisées. Ainsi, la souris Balb/c sécrète des taux plus importants d'IL-5 que la souris C57Black6. Cette différence d'expression d'IL-5 en fonction du fond génétique des souris a déjà été rapportée dans les travaux de Dieli et al (1995) qui montrent qu'une expression plus importante d'IL-5

est corrélée à une production plus forte d'IgA. Dans notre modèle d'immunisation, cette différence n'entraîne pas chez la BALB/c une production différente d'IgA, cependant, il faut rappeler que l'IL-5 n'intervient qu'en tant qu'agent de maturation terminale des lymphocytes B IgA⁺ et que les étapes préalables de différenciation n'ont probablement pas été optimales dans ces protocoles. Malgré l'absence d'IgA, la souris BALB/c restera notre modèle expérimental du fait de sa production plus importante d'IL-5 et plus faible d'IFN- γ . En effet, alors que chez la souris BALB/c, il n'est pas possible d'observer une production d'IFN- γ différente du contrôle adjuvant et donc spécifique de la Sm28GST, les souris C57Black 6 sont de très bonnes productrices d'IFN- γ , que ce soit dans le cas d'une stimulation mitogénique ou spécifique. Par ailleurs, cette production d'IFN- γ n'est pas en accord avec l'absence d'IgG2a reportée dans ce modèle d'immunisation parentérale. Parallèlement, l'infection des souris C57 Black6 par *Salmonella typhimurium* entraîne des taux non spécifiques d'IFN- γ très importants, et bien que non détectable dans nos conditions de culture, l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 (Comoy *et al*, 1997b). Ces deux cytokines antagonistes n'empêchent pas l'expression d'un profil isotypique mixte marqué par la dominance des IgG2b sur les IgG2a. Ces observations indiquent que l'expression du profil isotypique n'est pas exclusif de la présence ou de l'absence de l'une des deux cytokines mais plutôt fonction d'une balance entre les taux d'expression des interleukines. D'autre part, en plus des facteurs solubles, la nature des cellules présentatrices d'antigènes intervient également dans l'orientation du profil isotypique, les cellules dendritiques entraînant la production d'IgG2a et d'IgG1 alors que les macrophages favorisent l'expression d'IgE et d'IgG1 (De Becker *et al*, 1994).

2. La réponse IgA dans l'infection murine par *S. mansoni*

Les différentes observations rapportées dans l'article 1 et la partie 2 de nos résultats nous permettent de proposer plusieurs facteurs impliqués à différents niveaux dans la

réponse IgA observée au cours de la schistosomiase murine. Il apparaît très nettement que 1) l'apparition des oeufs du schistosome est le facteur déclenchant pour la production d'IgA sériques et intestinales et que 2) deux populations lymphocytaires B d'origine distincte sont impliquées dans la sécrétion d'IgA dans les muqueuses.

2.1. Les oeufs du schistosome, inducteurs de la réponse IgA

Plusieurs expériences d'infection classique chez la souris BALB/c indiquent que la production d'IgA sériques et sécrétoires spécifiques du parasite augmente très fortement après la semaine 6 (dès la S8) et que la réponse la plus intense est dirigée contre les antigènes associés aux oeufs du schistosome. En parallèle, l'infection monosexuée ne conduit pas à la détection de taux d'IgA différents des taux de base observés dans les premières semaines d'une infection classique. Ces observations sont en faveur du rôle stimulateur des oeufs sur la réponse IgA. Il est important de rappeler que les schistosomes matures quittent les veinules du foie vers la S4 (J28) pour gagner la veine porte et les veines mésentériques où la ponte débute vers la S5 (J35). Différentes molécules associées aux oeufs ainsi que certains facteurs dérivés des plaquettes permettent la fixation active des oeufs aux cellules endothéliales des veines mésentériques et leur extravasation vers les tissus hépatiques et intestinaux (Ngaiza *et al*, 1993). C'est à partir de l'intestin qu'ils gagnent la lumière et sont éliminés. Une partie des oeufs qui reste piégée entraîne la formation de granulomes. L'amplification de la réponse IgA intervient donc 2 à 3 semaines après l'oviposition et est parallèle au développement du profil Th2 observé dans la schistosomiase une fois l'oviposition établie (Grzych *et al*, 1991).

2.1.1. Les oeufs et la polarisation Th2

L'analyse de la réponse cellulaire associée à l'infection bisexuée, en cinétique (article 1) ou sur 3 points de l'infection (S4 : avant la ponte des oeufs, S8 et S11 postérieures à la

ponde), confirme chez une souche différente de souris, l'émergence après l'oviposition de cytokines de type 2. En effet, l'expression de l'IL-4 et de l'IL-5 est maximale à la S8. Parallèlement, les taux d'IL-2 diminuent, en réponse au SWAP ou suite à la stimulation par la ConA indiquant une régulation négative de la capacité des splénocytes à exprimer cette cytokine Th1. L'analyse de la production d'IFN- γ , plus délicate sur 3 points que sur toute la cinétique, révèle dans l'ensemble une diminution des taux sécrétés principalement en réponse au SWAP ou aux antigènes de furcocercaire, après la S4. La sécrétion de taux importants d'IFN- γ en réponse à la ConA indique cependant la présence de cellules Th1 ou Th0 après l'oviposition. Différents travaux rapportent la persistance de l'expression d'ARNm codant pour l'IFN- γ de manière concomitante à l'expression des ARNm pour l'IL-4 dans la phase aiguë de la schistosomiase (Henderson *et al*, 1991) ainsi que la sécrétion *in vitro* d'IFN- γ après restimulation alors que la réponse cellulaire *ex vivo* était de type Th2 dominant (Vella et Pearce, 1992). Contrairement aux cytokines associées au développement de l'infection bisexuée, l'infection monosexuée ne conduit pas à l'expression d'un profil Th2 caractéristique, de part l'absence d'IL-4 et la présence de taux constants d'IL-5.

De nombreux travaux documentent l'émergence du profil Th2 et la régulation négative de la production d'IL-2 et d'IFN- γ associées à l'apparition des oeufs. Plusieurs études démontrent que les lymphocytes Th1 et Th2 CD4⁺ émergent de cellules précurseurs communes (Street *et al*, 1990) dont la polarisation vers un profil donné est liée, parmi de nombreux facteurs, à la présence ou à l'absence précoces de cytokines polarisatrices telles que l'IL-4, l'IFN- γ ou l'IL-12. Ainsi, l'induction d'un profil Th2 semble conditionnée par la présence précoce d'IL-4 (Gollob et Coffman, 1994) et un contact répété avec de faibles doses d'antigène, ce qui est le cas des schistosomes et de leurs oeufs qui délivrent de façon permanente au système immunitaire leurs antigènes. L'administration d'oeufs s'accompagne d'un stade d'expression de cytokines Th0 qui évolue au bout de 10 jours vers un profil Th2 (Vella et Pearce, 1992). L'IL-4 sécrétée par des cellules non T non B telles que les mastocytes, les basophiles ou les éosinophiles serait à l'origine de la polarisation vers un profil Th2 (Williams *et al*, 1993 ; Kullberg *et al*, 1996 ; Sabin *et al*, 1996). La polarisation de la réponse cellulaire, par les oeufs du schistosome, vers un profil Th2 s'exerce à

l'encontre d'antigènes parasitaires mais également à l'égard d'antigène inducteur d'une réponse Th1 (Kullberg *et al*, 1992). Ainsi dans nos protocoles d'immunisation par l'antigène Sm28GST, l'administration sous-cutanée d'oeufs entraîne, lors d'une restimulation par l'antigène Sm28GST, la sécrétion d'IL-4 par les splénocytes, une augmentation importante des taux d'IL-5 dans les ganglions et la rate et une diminution de la production d'IFN- γ . Conjointement à l'augmentation des taux d'IL-5, nous avons détecté la présence d'IL-2 chez les animaux ayant reçu des oeufs en rappel. Cette cytokine est par ailleurs impliquée dans la sécrétion d'IL-5 dans les lésions granulomateuses (Metwali *et al*, 1993).

L'installation du profil Th2 dans la schistosomiase s'accompagne d'une régulation négative de la sécrétion d'interleukines Th1. L'IL-10 produite par différents types cellulaires, notamment par les lymphocytes B (et majoritairement B1), par les lymphocytes Th2 ou par les macrophages activés est au centre de cette régulation. Cette cytokine inhibe la production de cytokines Th1 *in vitro* et *in vivo* (Fiorentino *et al*, 1989 ; Sher *et al*, 1991), par une action indirecte via les macrophages (Fiorentino, 1991a). Par contre, elle n'interviendrait pas dans l'induction des cellules productrices d'IFN- γ (Seder *et al*, 1992). Dans la schistosomiase, l'IL-10 produite par les lymphocytes des souris infectées altère la capacité des macrophages à présenter l'antigène aux cellules Th1, en régulant négativement l'expression de leurs molécules costimulatrices (Flores-Villanueva, 1996). Très récemment, Estaquier *et al* (1997) ont montré que les lymphocytes Th1 persistaient même après l'oviposition et qu'ils sécrétaient lors de l'activation de leur TCR de l'IL-2 et de l'IFN- γ . La régulation négative des fonctions effectrices des lymphocytes Th1 ne proviendrait pas d'une absence de ces lymphocytes mais d'un processus actif d'apoptose des cellules Th1 ou Th0 dépendant de l'IL-10.

Parmi différents facteurs, les antigènes polysaccharidiques et plus particulièrement le Lacto-*N*-fucopentaose qui contient le trisaccharide Lewis^X, présent en grande quantité sur les oeufs du schistosome sont à la base de l'induction de cette cytokine régulatrice (Velupillai et Harn, 1994). Ces sucres, en plus d'induire la prolifération des lymphocytes B, entraînent la production d'IL-10 et de prostaglandine E2 qui régule négativement les populations Th1 CD4⁺.

Dans nos expériences, l'analyse cinétique de la production d'IL-10 en réponse aux antigènes parasitaires révèle, à la S8, un pic d'IL-10 chez les animaux infectés classiquement, quelque soit le stade parasitaire. Curieusement, il apparaît très clairement que l'infection monosexuée par des vers femelles engendre, aux trois temps de la cinétique, des taux très importants d'IL-10, équivalents aux maxima observés à la ponte des oeufs dans l'infection bisexuée. L'apparition précoce d'IL-10, avant la ponte des oeufs est également rapportée dans l'infection par *Schistosoma bovis* (Viana da Costa *et al*, 1998) et elle soulève des questions quant à son rôle dans la polarisation Th2. L'analyse du SWAP et du SEA montre que le Lewis^x est plus représenté dans le SEA que dans le SWAP (résultats non présentés), ce qui suggère que d'autres molécules, oligosaccharidiques ou non, présentes chez les vers (et surtout chez la femelle) puissent être à l'origine de l'induction d'IL-10. Dans ce contexte, la KLH qui présente une communauté antigénique avec un épitope oligosaccharidique de l'antigène Gp38 présent à la surface des schistosomules (Dissous *et al*, 1986 ; Grzych *et al*, 1987) entraîne, lors d'une immunisation, la sécrétion de cytokine Th2 (IL-10 en quantité importante, IL-5 et IL-4) et la présence d'IL-2 (résultats non présentés).

L'ensemble de ces données confirme le potentiel inducteur de la réponse Th2 par les oeufs du schistosome, caractérisé par la sécrétion de taux élevés d'IL-4 et d'IL-5, tant dans les modèles d'immunisation par l'antigène Sm28GST associé à l'injection d'oeufs que dans les infections classiques. Il est probable que ce soit l'association de ces deux cytokines, et principalement de l'IL-4 avec l'IL-10 déjà présente avant l'apparition des oeufs qui engendre la régulation négative du profil Th1 observée après l'oviposition.

2.1.2. Cytokines Th2 et réponse IgA dans l'infection par *S. mansoni*

L'expression d'un profil Th2 dominant lié à la qualité intrinsèque des oeufs de schistosome offre un contexte favorable au développement de la réponse IgA. En effet, il est reconnu que l'induction de la réponse IgA est dépendante de l'interaction cognitive des cellules T CD4⁺ avec les lymphocytes B (Kawanishi *et al*, 1983) et que dans les muqueuses, la réponse cellulaire T est principalement orientée vers une réponse Th2 (Taguchi *et al*,

1991) suggérant l'importance des cytokines Th2 dans la prédominance de cet isotype. Plusieurs études réalisées *in vitro* ou en utilisant des souris déficientes en cytokines ont permis d'appréhender le rôle des différentes cytokines dans l'induction et la production d'IgA au niveau des muqueuses.

Des évidences *in vitro* suggèrent que l'IL-4 puisse être un facteur de commutation important pour l'IgA (Lin *et al*, 1991 ; Wakatsuki et Strober, 1993) ; cependant, l'utilisation de souris KO pour cette cytokine indique un nombre identique de cellules sécrétrices d'IgA dans les muqueuses démontrant que la commutation isotypique vers l'IgA est normale chez ces animaux. Par contre, Vajdy *et al* (1995) démontrent que la déficience en IL-4 entraîne une incapacité des animaux à monter une réponse IgA muqueuse spécifique d'un antigène administré par voie orale et un nombre réduit de plaques de Peyer ainsi qu'un défaut dans le développement des centres germinatifs des follicules lymphoïdes. L'absence d'IL-4 conduit à des réponses B très faibles ou inexistantes dans la rate, la lamina propria ou les sérums des animaux immunisés, liées à une mauvaise interaction fonctionnelle entre les lymphocytes B et T. La sécrétion d'IL-4 chez les souris infectées de manière bisexuée est maximale entre les semaines 6 et 8 et elle coïncide, non seulement avec l'apparition des oeufs dans les tissus mais également avec l'expression d'IgA sériques et muqueuses. *A contrario*, ce pic d'expression d'IL-4 n'est pas observé dans nos expériences d'infection monosexuée (pour lesquelles les souris ne présentent pas d'oeufs) et les taux faibles et constants d'IL-4 ne suffisent pas à engendrer une réponse IgA spécifique du parasite. D'autre part, l'analyse, par RT-PCR, de l'expression des ARNm codant pour cette cytokine (résultats non présentés) révèle dans les ganglions mésentériques drainant le GALT l'expression plus forte des messagers pour l'IL-4 chez les animaux porteurs d'une infection bisexuée que chez les animaux "monosexués" et confirme les pics d'expression observés à la S8 par Henderson *et al* (1991). Les taux faibles de cette cytokine tant dans la rate qu'au niveau muqueux chez les animaux qui ne présentent pas d'oeufs, pourraient être à l'origine d'un défaut d'activation des populations Th2 et pourraient bloquer l'émergence des taux importants d'IgA observés dans le cas d'une infection bisexuée.

L'IL-5 est également une cytokine de type 2 dont les taux augmentent fortement une fois l'oviposition établie. Il est clair que cette cytokine n'agit pas sur les lymphocytes B IgA⁺ mais elle augmente la réactivité des cellules exprimant déjà des IgA, soit seule (Beagley *et al*, 1988) ou en synergie avec l'IL-4 (Murray *et al*, 1987), l'IL-6 (Kunimoto *et al*, 1989) ou le TGF- β (Coffman *et al*, 1989). Elle agit donc en tant qu'agent de maturation terminale. L'analyse cinétique de cette cytokine révèle, à partir de la S8, des taux moins importants en réponse au SEA ou à la stimulation mitogénique, chez les animaux "monosexués". Curieusement, l'infection par des schistosomes femelles induit des taux plus élevés d'IL-5 que l'infection par les mâles, taux par ailleurs identiques lors d'une restimulation par le SWAP à ceux observés chez la souris infectée classiquement. Ces résultats confirment que les oeufs sont les antigènes les plus puissants dans l'induction du profil Th2 mais pourraient laisser supposer une différence dans la réponse IgA en fonction du genre de l'infection. D'une part la réponse IgA sérique et intestinale spécifique du stade des vers est beaucoup moins importante que celle dirigée contre les oeufs et d'autre part, malgré des taux d'IL-5 plus importants, les vers femelles ne stimulent pas plus la production d'IgA spécifiques du stade schistosome que les vers mâles. L'absence d'IgA chez les souris infectées par des femelles malgré des taux d'IL-5 similaires à ceux des souris "bisexuées" nous permettent d'avancer que, seule, l'IL-5 n'est pas le facteur essentiel au développement de la réponse IgA anti-parasitaire. D'autre part, même si l'IL-5 est produite en quantité importante dans les tissus muqueux et qu'elle stimule la réponse muqueuse, son absence *in vivo* chez des souris déficientes n'a pas d'effets délétères sur la production d'IgA (Ramsay *et al*, 1996). Par contre, ces animaux présentent une réduction importante de leurs lymphocytes B CD5⁺ et une absence d'éosinophiles tissulaires et sanguins lors d'infection par les helminthes (Kopf *et al*, 1996).

D'autres cytokines, telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-6 souvent associées dans la régulation des processus inflammatoires, sont impliquées à différents niveaux dans les évènements cellulaires qui conduisent aux plasmocytes à IgA et à la production de cet isotype.

L'IL-10, très bien exprimée dans l'infection par *S. mansoni* a une action positive sur l'expression de la réponse IgA aussi bien dans le modèle murin que chez l'homme (Lagoo *et al*, 1994 ; Okahashi *et al*, 1996 ; Defrance *et al*, 1992 ; Brière *et al*, 1996). La présence, chez les souris infectées par des vers femelles, de taux similaires à ceux observés chez les animaux "bisexués" à la S8 n'est pas associée à la détection d'IgA sériques ni sécrétoires. Cette observation parallèle à celle de l'IL-5, dans le cas d'une infection par les vers femelles, démontre que la femelle du schistosome présente une capacité à induire des cytokines Th2 plus importante que le mâle et suggère que, dans le cas d'une infection bisexuée, ce sont les antigènes liés au système reproducteur de la femelle ainsi que l'émission des oeufs qui conduisent à l'expression d'un profil Th2 et à la production subséquente d'IgA anti-parasitaires. Lors d'une infection monosexuée, le système reproducteur des femelles est immature (i.e. glandes vitellines atrophiées) mais l'ovaire et l'ootype sont développés (Erasmus, 1973) et leurs antigènes associés pourraient entraîner une "pré-polarisation" de la réponse immune qui s'orienterait définitivement vers un profil Th2 établi, dès l'apparition des oeufs et de l'IL-4 associée et qui conduirait à l'expression d'IgA.

2.2. Deux origines pour les plasmocytes à IgA de l'intestin

Alors qu'il apparaît clairement que les oeufs du schistosome sont le facteur déclenchant de la réponse IgA sérique et intestinale, différents arguments nous permettent d'avancer que l'induction de cette réponse nécessite également l'activation du système immunitaire muqueux : en effet, l'administration sous-cutanée d'oeufs suite à l'immunisation par l'antigène Sm28GST, bien qu'entraînant la polarisation de la réponse cellulaire vers un profil Th2 favorable, ne s'accompagne pas d'une production d'IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST ni du SEA. Inversement, l'administration par voie intra-veineuse d'oeufs chez le rat, conduit à la production locale d'IgA spécifiques dans la muqueuse pulmonaire (Petitprez *et al*, article soumis). Les oeufs, par cette voie d'injection, se trouvent bloqués dans les

poumons où ils engendrent une réaction inflammatoire et le développement d'un profil Th2 associés à la sécrétion d'IgA.

Nos travaux révèle l'origine différente et la participation de deux types de lymphocytes B dans la réponse IgA intestinale et soulèvent des questions quant aux sites d'induction de cette réponse.

2.2.1. Les lymphocytes B conventionnels et la réponse muqueuse

L'apparition des oeufs dès la S5 dans les tissus hépatiques et intestinaux entraîne le recrutement de cellules inflammatoires et le dépôt progressif de collagène autour de l'oeuf piégé (voir photos Résultats Partie II). L'observation macroscopique de l'intestin des souris infectées de manière bisexuée révèle la présence de foyers hémorragiques, de nombreuses boursouflures et un aspect rigidifié. L'analyse histologique du tissu intestinal montre la dispersion des oeufs dans la muqueuse intestinale et leur présence au sein des follicules lymphoïdes. L'exposition continue de la muqueuse intestinale aux micro-organismes entériques implique une activation chronique des centres germinatifs dans les plaques de Peyer et cet état d'activation permanent offre un micro-environnement favorable au développement des lymphocytes B IgA⁺ (Weinstein *et al*, 1991 a, b). Il est très probable que la libération continue d'antigènes par les oeufs vivants directement au sein des sites inducteurs entraîne l'activation des lymphocytes B et que la production locale de cytokines induise leur commutation isotypique. Les lymphocytes activés dans les plaques de Peyer gagnent ensuite les ganglions mésentériques où ils continuent leur maturation puis le canal thoracique et la circulation sanguine à partir de laquelle ils se relocalisent dans différents compartiments muqueux. L'étude cinétique des populations cellulaires T et B dans les ganglions mésentériques montrent un pic (3,5 x contrôles non infectés) du nombre des lymphocytes B totaux dans ces organes à la S6, soit une semaine après l'apparition des oeufs dans les tissus, reflétant l'activation des lymphocytes B de la muqueuse intestinale et leur migration vers d'autres sites via les ganglions mésentériques. Parallèlement, le nombre de lymphocytes T augmente également tout en se maintenant constant pendant plusieurs

semaines, suggérant soit un équilibre entre les populations migrant des plaques de Peyer soit au contraire, une activation *in situ*.

2.2.2. Les lymphocytes B1 et la réponse muqueuse

Très peu d'études ont été consacrées à l'évaluation du rôle des lymphocytes B CD5⁺ dans l'immunité muqueuse, notamment dans les modèles infectieux. Cette population de lymphocytes a une origine ontogénique distincte des lymphocytes B conventionnels et possède des caractéristiques fonctionnelles spécifiques. Chez la BALB/c naïve, ces lymphocytes ne représentent que 0,5 à 1,5% des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions mésentériques ou la rate et ils sont particulièrement concentrés dans les cavités coelomiques : péritonéale (32% des lymphocytes B) ou pleurale.

Notre intérêt dans l'étude de cette population découle des observations inérentes à la régulation de leur expansion et des travaux de Kroese et Herzenberg révélant l'origine non conventionnelle de 50% des plasmocytes à IgA.

2.2.2.1. Expansion des lymphocytes B1 lors de l'infection par *S. mansoni*

Les lymphocytes B1 sont des lymphocytes dont le développement est conditionné par la présence des cytokines Th2 très bien exprimées dans le contexte d'une infection par *S. mansoni*. Le suivi cinétique des populations T et B dans les différents organes lymphoïdes met en évidence une activation de toutes les populations en réponse à l'infection. En effet, les lymphocytes B et T augmentent très fortement en nombre dès la S4 pour atteindre selon les organes un plateau (rate) ou un maximum aux environs de la S6 et de la S8. La cavité péritonéale est le système lymphoïde qui subit la plus importante augmentation de sa cellularité avec un nombre de lymphocytes multiplié par 6 à la S8. Parallèlement, la présence des schistosomes entraîne la prolifération des cellules non lymphocytaires de grande taille telles que les macrophages. L'infection par *S. mansoni* entraîne donc une activation très

intense des populations cellulaires de la cavité péritonéale. L'expansion cellulaire la plus forte concerne les lymphocytes B, parmi eux, la population de lymphocytes B non conventionnels CD5⁺ augmente progressivement dès la S4 pour atteindre un maximum à la S6. Cette expansion est maximale une semaine après l'apparition des oeufs coïncidant avec l'établissement du profil Th2 dans la rate. Parallèlement à l'accroissement de ces cellules dans la cavité péritonéale, les taux de lymphocytes B CD5⁺ atteignent des proportions importantes à la S6. Le développement de ces lymphocytes est particulièrement dépendant de l'IL-10, qu'ils sécrètent également en grande quantité et qui agit de manière autocrine, et de l'IL-5. En effet, différentes expériences de sur-expression ou de déplétion de ces deux cytokines affectent largement la proportion des lymphocytes B1 (Vaux *et al*, 1990 ; Kopf *et al*, 1996 ; Ishida *et al*, 1992). A l'inverse, les cytokines Th1, IFN- γ , IL-2 et IL-12 inhibent le développement et l'activité de ces cellules (Hitoshi *et al*, 1989 ; Chase *et al*, 1993 ; Vogel *et al*, 1996). L'expression accrue de l'IL-5 et de l'IL-10 ainsi que la régulation négative de l'IL-2 et de l'IFN- γ au moment de l'oviposition représente donc un contexte particulièrement propice à l'activation des lymphocytes B CD5⁺. Récemment, Velupillai *et al* (1996) ont montré, dans le contexte de la schistosomiase, le rôle régulateur de ces interleukines sur l'expansion des cellules B1.

Les anticorps exprimés majoritairement par les lymphocytes B1 de la cavité péritonéale sont des IgM et une grande part des IgM sériques proviennent de cette lignée indépendante. Ces IgM sont souvent de faible affinité et reconnaissent les antigènes T-indépendants tels que les oligosaccharidiques. Les oeufs du schistosome sont riches en glycannes et il est clairement reporté que les épitopes sucrés des oeufs, et particulièrement le Lacto-N-fucopentaose, stimule l'expansion de cette population B et sa sécrétion d'IL-10 (Velupillai *et al*, 1997). A la différence de ces auteurs qui observent l'expansion de la population B1 à la S2 ou 4, avant la ponte des oeufs, nous rapportons le maximum de ces cellules simultanément ou postérieurement à l'oviposition. Nous n'avons pas suivi leur évolution au cours d'une infection monoséxuée mais il est probable que leur nombre augmente légèrement dans le cadre d'une infection monosexuée femelle, de part la présence

des taux importants d'IL-10 associés, et se stabilise sans pour autant atteindre l'expansion maximale simultanée à l'oviposition.

La possibilité d'une expression du marqueur CD5 à la surface des lymphocytes B conventionnels dans des conditions d'activation particulière, et non de l'expansion d'une population indépendante, comme l'ont suggérée Wortis *et al* (1992), nous paraît peu probable dans nos expériences car l'évolution des lymphocytes B conventionnels n'est pas superposable à celle des lymphocytes B1. En effet, les taux de lymphocytes B2 sont maximums 15 jours après ceux des B1 et inversement, cette population décroît après la S6.

2.2.2.2. Les lymphocytes péritonéaux, une autre origine pour les plasmocytes à IgA

La relation triangulaire qui unit l'apparition des oeufs à l'expansion maximale des lymphocytes B1 et à l'induction de la réponse IgA intestinale et sérique, nous a encouragés à évaluer l'implication de ces cellules dans la réponse IgA anti-schistosome, en terme de cellules effectrices dans la muqueuse intestinale.

Les évidences les plus convaincantes d'une telle participation proviennent de l'utilisation des souris BALB. *Xid* qui sont totalement dépourvues en lymphocytes B1 et présentent un défaut partiel en lymphocytes B conventionnels. Alors que les souris BALB/c présentent des taux élevés d'IgA muqueuses spécifiques du SEA, les souris déficientes ont une réponse très réduite que ce soit dans la muqueuse pulmonaire ou la muqueuse intestinale. Ces animaux présentent également une réponse IgM mineure et une réduction des taux d'IgA sériques. Ces observations montrent que l'absence de lymphocytes B1, (l'infection par *S. mansoni* n'entraîne pas d'augmentation du nombre faible de lymphocytes B1 observé chez ces animaux déficients, Velupillai *et al*, 1997), a des effets délétères marqués principalement sur la production d'IgA muqueuses. La réduction moins spectaculaire de la réponse IgA sérique suggère que, soit les lymphocytes B1 prennent part de manière plus importante dans l'immunité intestinale que ne laissent supposer les travaux de Kroese et Herzenberg, soit que la déficience *Xid* affecte plus particulièrement l'intestin.

Dans les deux cas, ces hypothèses supposent un tropisme préférentiel des lymphocytes B1 pour l'intestin ou les muqueuses.

En plus de ces expériences révélant, *in vivo*, l'implication des lymphocytes B1 dans la production d'IgA intestinales spécifiques du parasite, différents arguments nous permettent de soutenir l'hypothèse d'une migration des lymphocytes B1 de la cavité péritonéale vers l'intestin. D'une part, l'expansion importante de ces cellules à la S6 puis la diminution soudaine de leur nombre alors que l'amplification des lymphocytes B2 est encore maximale, indiquent soit la mort de ces cellules, soit leur migration vers d'autres sites où elles exerceraient leurs propriétés fonctionnelles. Cette diminution des lymphocytes B1 de la cavité péritonéale intervient à la S8, 15 jours après leur expansion massive suite à l'oviposition et au moment où les réponses IgA intestinales et sériques s'amplifient fortement. D'autre part, il est possible de restaurer partiellement les réponses IgA intestinales et sériques spécifiques des oeufs du schistosome en transférant des cellules péritonéales provenant de BALB/c infectées, à des BALB. *Xid* naïves ou infectées. Les différentes expériences de transfert réalisées montrent qu'il faut attendre plus de 15 jours pour pouvoir détecter une réponse IgA spécifique dans l'intestin. La présence d'IgM spécifiques du SEA dans les sérums des souris *Xid* reconstituées et l'absence d'IgA intestinales 14 jours après le transfert montrent que ces cellules sont une source importante d'IgM, ce qui soutient l'observation des taux très faibles de cet isotype chez la *Xid* infectée, et que les cellules péritonéales n'ont pas eu le temps de se relocaliser dans l'intestin ou alors qu'elles ne se sont pas encore différenciées. En effet, l'isotype préférentiel dans les lavages intestinaux est l'IgA et d'une manière générale, chez la BALB/c infectée, on ne détecte que des taux très faibles d'IgM dans ces sécrétions (résultats non présentés). Kroese *et al* (1989) ont montré lors d'expériences de reconstitution qu'il faut attendre 15 jours afin de détecter par immuno-histochimie les cellules transférées. Dans nos expériences pour lesquelles le paramètre d'évaluation est un paramètre fonctionnel de sécrétion d'anticorps, nous pensons que les lymphocytes n'ont pas eu le temps de se différencier en cellules productrices d'IgA. En effet, si le prélèvement a lieu 10 jours plus tard, il est possible, dans ces conditions, de détecter, à la fois la présence d'IgA et d'IgM, dans les sérums, et d'IgA dans les lavages

intestinaux. Face à ces résultats encourageants, nous avons voulu suivre la migration des cellules transférées et les localiser dans leur site de domiciliation fonctionnelle. Pour cela, nous avons marqué, dans des expériences préliminaires, les PerC par une molécule fluorescente qui est stable 1 mois *in vivo* et qui n'altère pas la fonctionnalité biologique des cellules. Cette technique nous a permis de suivre les cellules dans différents organes et bien qu'un grand nombre de cellules demeurent dans la cavité péritonéale, il a été possible de détecter de manière certaine des cellules fluorescentes dans l'intestin des BALB. *Xid* reconstituées. La détection de cellules positives dans les ganglions médiastinaux est en faveur d'une migration vers l'intestin via ces sites (Kroese *et al*, 1992).

L'administration parallèle de SEA, simultanément aux cellules péritonéales, augmente la production d'IgM dans les sérums, en contrepartie des IgA, indiquant une synthèse *de novo* d'anticorps et la prolifération des lymphocytes B en réponse aux antigènes parasitaires. Par contre, dans l'intestin, l'isotype majoritaire reste l'IgA, suggérant une différenciation locale des lymphocytes B IgM⁺ en lymphocytes B exprimant des IgA.

Plusieurs expériences ont été réalisées *in vitro*, afin de caractériser la production d'anticorps par les PerC de BALB/c infectées. Les lymphocytes de la cavité péritonéale produisent des IgM, des IgG, des IgA totales dont les expressions (IgG et IgA) peuvent être amplifiées par l'action synergique de l'IL-5 et de l'IL-4, en dehors de toute stimulation mitogénique. Curieusement, l'IL-6 stimulent la production d'IgA, contrairement aux observations réalisées par Beagley *et al* qui démontrent l'indépendance des lymphocytes B1 vis à vis de l'IL-6 (Beagley *et al*, 1995). Cependant, ces expériences ont été réalisées sur des populations enrichies en lymphocytes B mais dont les deux populations B1 et B2 n'ont pas été séparées. Les PerC de BALB/c infectées depuis 6 semaines produisent également des anticorps spécifiques du parasite, après restimulation. Cette production est propre aux lymphocytes des souris infectées et ne résulte pas d'une sensibilisation *in vitro* par les antigènes puisque les PerC de souris naïves cultivés dans les mêmes conditions n'engendrent pas la production d'anticorps spécifiques. Une analyse *in vitro* sur trois temps d'une cinétique d'infection conforte le rôle des oeufs dans l'induction de la réponse IgA anti-parasitaire (mais également IgG et IgM) car il nous a été impossible de détecter des

anticorps spécifiques avant 6 semaines et demi d'infection (résultats non présentés). Cette étude menée simultanément sur des souris *Xid* infectées montre l'incapacité de leurs lymphocytes péritonéaux à sécréter des anticorps spécifiques du schistosome, quelque soit leur isotype.

2.2.2.3. La mutation *Xid* est associée à une susceptibilité plus grande dans l'infection par *S. mansoni*

Le développement de *Schistosoma mansoni* chez la souris *Xid* s'accompagne d'un nombre d'oeufs tissulaires accru et d'une mortalité très importante, comparés à l'évolution du parasite chez la BALB/c. Ces animaux présentent des réponses humorales défectueuses : la production d'IgM sérique est extrêmement réduite, les taux d'IgA sériques sont inférieurs à ceux observés chez la BALB/c et la réponse muqueuse spécifique du parasite est particulièrement diminuée. Le rôle fonctionnel et protecteur des IgA a été démontré dans de nombreuses infections virales, bactériennes ou parasitaires. Une caractéristique importante des IgA est leur incapacité à activer le système du complément, à l'opposé des autres immunoglobulines, ce qui implique qu'elles n'entraînent pas de réaction inflammatoire lors de leur interaction avec les antigènes. Les IgA intestinales sont souvent dimériques et elles partagent leur capacité à se lier au récepteur des immunoglobulines des cellules épithéliales avec les IgM afin d'être transportées vers la lumière intestinale. Lors de l'infection par *S. mansoni*, les oeufs piégés dans l'intestin provoque une réaction inflammatoire et nous avons pu observer par immuno-histochimie la présence de plasmocytes à IgA à la périphérie de granulomes. Par ailleurs, certains auteurs ont rapporté la présence d'IgA et surtout d'IgG à l'intérieur d'oeufs tissulaires (Hirata *et al*, 1986). D'autres suggèrent que les IgM, en association avec le complément C3, seraient responsables de la destruction du miracidium si l'anticorps arrive à pénétrer dans la coque (Sogandares-Bernal et Brandt, 1976). Dans notre laboratoire, plusieurs travaux soulignent les propriétés originales des IgA spécifiques de l'antigène Sm28GST, capables d'inhiber l'activité glutathion S-transferase et de réduire la ponte des femelles et les capacités d'éclosion des oeufs. Dans nos expériences, nous ne

rapporçons pas de différence dans la fertilité des femelles (nombres d'oeufs émis *in vitro* / femelle identiques) mais une augmentation significative du pourcentage de maturation et d'éclosion des oeufs provenant des foies des BALB. *Xid* infectées. Nous n'avons pas testé, *in vitro*, l'action directe des anticorps sériques ou sécrétoires des BALB/c ou des BALB. *Xid* sur les paramètres d'éclosion et de maturation mais il est possible que l'absence d'IgM et d'IgA chez la *Xid* infectée explique les taux de viabilité plus importants des oeufs.

Il est probable que la présence, chez la BALB. *Xid*, d'un nombre plus important d'oeufs dans les tissus, avec une accumulation préférentielle au niveau de l'intestin, affecte l'intégrité de la barrière intestinale. De plus, l'absence de lymphocytes B CD5⁺ résulte en une production d'IgA très faible qui n'est pas compensée par la sécrétion d'IgM, comme cela peut être observé dans le cas de pathologies associées à une déficience en IgA (Plebani *et al*, 1983). L'absence de ces deux isotypes qui partagent les propriétés physico-chimiques de polymérisation et de fixation au composant sécrétoire et qui ne peuvent pas remplir leur rôle primordial de barrière contre les multiples agressions de la muqueuse intestinale ainsi que la pathologie liée à la présence des oeufs pourraient expliquer la mortalité plus grande des animaux déficients.

En dehors de la réponse humorale, il est maintenant clairement établi que la susceptibilité ou la résistance à un pathogène est associée à l'expression d'un profil T helper défini. Ainsi, dans le cas des parasites intra-cellulaires, tels que *Leishmania major* ou *Trypanosoma cruzi*, la résistance ou le contrôle de l'infection dépendent de l'expression d'un profil Th1. L'état clinique ou la résistance à l'infection sont améliorés chez la BALB. *Xid* du fait de l'expression plus importante des cytokines Th1 (Minoprio *et al*, 1993 ; Hoerauf *et al*, 1994 et 1995). Notre travail chez la BALB. *Xid* nous permet d'avancer que dans le cas de la schistosomiase, la présence d'un profil Th0 ou la sécrétion accrue d'IFN- γ et diminuée d'IL-10, ont des effets délétères sur la viabilité des souris. Très récemment, Al-Qaoud *et al* (1998) ont également démontré, dans le cas d'une parasitose Th2, l'augmentation de la susceptibilité associée au défaut de la réponse humorale et cellulaire chez la BALB. *Xid*.

3. Conclusion générale et perspectives

En conclusion générale à ce travail de thèse concernant l'étude de la réponse IgA au cours de l'infection murine, il est possible de soulever certains paramètres impliqués dans la régulation de cette réponse. Le déroulement de l'infection par *S. mansoni* peut être scindé en deux grandes périodes à partir de l'apparition des œufs, dès la S5. Il apparaît très clairement que les œufs pondus dans les tissus, et notamment au niveau de la muqueuse intestinale, sont le facteur déclenchant de la réponse IgA spécifique détectable 3 semaines après le début de la ponte qu'elle soit sérique ou muqueuse, cette réponse étant par ailleurs majoritairement dirigée contre les œufs du schistosome. Pendant les premières semaines d'infection, on observe une expansion progressive des lymphocytes B1 de la cavité péritonéale et des autres compartiments jusqu'à atteindre un pic une semaine après l'oviposition. Ces premières semaines sont caractérisées par la présence d'un profil de cytokines Th1, à l'exception de l'IL-10 qui est très bien exprimée lors d'infection monosexuée et qui représente un facteur d'activation important pour les lymphocytes B1. Le développement maximal de cette population coïncide avec l'émergence, à la S6, de cytokines Th2 et particulièrement de l'IL-4 et de l'IL-5. Les expériences d'infection monosexuée laisse supposer que l'IL-4 ait un rôle essentiel dans l'induction de la réponse IgA. L'émergence du profil Th2 dans la schistosomiase ainsi que la stimulation des sites muqueux (absente dans les expériences d'immunisation parentérale) sont donc nécessaires à l'induction d'un tel isotype. Il est toutefois possible de déclencher la production d'IgA dans des contextes Th1 liés à l'utilisation de vecteurs vivants recombinants (*B. pertusis* ou *S. typhimurium*) qui serait alors conditionnée par le développement transitoire d'une inflammation locale.

Après la S6, le nombre de lymphocytes B CD5⁺ diminue et différents arguments sont en faveur d'une migration vers des sites fonctionnels de domiciliation tels que l'intestin qui subit en permanence l'effraction des œufs. Il faut attendre 15 jours pour que les lymphocytes se soient relocalisés via les ganglions médiastinaux, et/ou différenciés dans le

micro-environnement favorable de l'intestin où ils produisent des IgA spécifiques du parasite, contribuant à l'immunité anti-parasitaire.

Les différentes expériences présentées dans ce travail de thèse ont tissé la trame de ce schéma général qui illustre la régulation de la réponse IgA spécifique observée au cours de l'infection par *S. mansoni* et soulèvent de nombreuses voies de prospection ainsi que des approches complémentaires. Une première voie d'analyse consisterait à approfondir le rôle de l'IL-4 sur l'induction de la réponse IgA par l'utilisation de souris K.O. pour cette cytokine. Rosat Brunet *et al* (1997) ont démontré par ailleurs chez ces animaux une plus grande susceptibilité à l'infection et des dommages intestinaux exacerbés. Il apparaît donc crucial d'entreprendre l'étude de la pathologie au niveau intestinal et d'analyser les processus inflammatoires liés à l'activation chronique de ce site par les antigènes parasitaires. Un deuxième volet de perspectives concerne la cavité péritonéale et les populations lymphocytaires. Nos travaux indiquent qu'elle jouerait un rôle plus important qu'on ne lui ait attribué et qu'elle représente un site inducteur de la réponse immunitaire muqueuse. Plusieurs questions restent posées quant au site de sensibilisation des lymphocytes B1 avec les antigènes parasitaires et sur les cytokines impliquées dans leur commutation isotypique. Quinze jours après l'apparition des œufs, il est possible de détecter *in vitro* des IgA spécifiques du SEA, il est important de caractériser l'isotypie dans la cavité péritonéale afin de savoir si les lymphocytes sont déjà différenciés en cellules productrices d'IgA. Il est possible qu'une population de type Th3, productrices d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- β soit à la base de leur différenciation. Un point majeur sera donc consacré à l'étude des populations T de la cavité péritonéale qui, avec les lymphocytes B1, ont conservé des caractéristiques ancestrales et sont connus, au niveau de l'intestin, pour promouvoir l'orientation isotypique vers l'IgA.

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. Animaux

Les souris utilisées dans nos expériences sont majoritairement des souris femelles, âgées de 6 à 8 semaines. A chaque expérience les groupes comparés sont toujours de sexe et d'âge identiques.

1.1. BALB/c

Les BALB/c proviennent de Charles River (France)

1.2. C57 Black 6

Les C57 Black 6 viennent d'Iffa Credo (L'Abresles, France)

1.3. BALB.Xid

Les BALB.Xid de même fond génétique que les BALB/c nous ont été aimablement fournies par le Dr. Paola Minoprio et ont été reproduites dans notre animalerie.

2. Les parasites

Une souche guadeloupéenne de *S.mansoni* est maintenue au laboratoire par passages successifs sur des mollusques *Biomphalaria glabrata* comme hôtes intermédiaires, eux-mêmes plongés dans de l'eau minérale (Société des Eaux de Volvic, France) et sur des souris OF1 comme hôtes définitifs

3. Les antigènes

3.1 Schistosome

3.1.1. Sm28GST

L'ADN complémentaire codant pour l'antigène de 28 000 daltons de *S. mansoni* a été cloné et inséré directement dans un vecteur d'expression suivant la méthode décrite par Balloul et coll.(1987). L'induction de la synthèse de la protéine a été réalisée par l'incubation à 42° C des cultures d'*Escherichia coli* (*E.coli*) portant l'insert. La purification de la molécule a été effectuée par chromatographie d'affinité par passage sur une colonne de glutathion (GSH) (Sigma, St Louis, MO, USA) couplé à des billes de sépharose; cette technique donne une pureté supérieure à 95 %. L'antigène recombinant est ensuite passé sur une colonne de polymixine B (Sigma) afin d'éliminer les traces potentielles de LPS liées à sa production en système procariote.

3.1.2. FC

Les antigènes solubles de cercaires (FC) sont préparés à partir de cercaires lavées dans du PBS à 4° C, dispersées par sonication pendant 5 minutes. L'antigène est récolté après centrifugation pendant 15 minutes à 10 000 g.

3.1.3. SWAP

Les antigènes solubles de vers adultes sont préparés à partir des vers adultes lavés dans du PBS, homogénéisés avec un disperseur de type Ultra-turax (Janke and Kundel, IKA Labortechnik, Suède) pendant 1 minute. L'homogénat est alors soumis à 5 minutes de sonication puis centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes.

3.1.4. SEA

Les œufs sont récoltés à partir d'homogénats de foie de souris OF1 infectées depuis 40 jours. Ils sont centrifugés, lavés plusieurs fois avec du Hanks Wallace jusqu'à l'obtention d'un culot propre, congelés et puis homogénéisés par une dizaine de passages dans une X-Press (A.B. Biox, Jarfalla, Suède) permettant l'éclatement de la coque. La suspension obtenue est alors centrifugée pendant 15 minutes à 10 000 g. Le surnageant constitue l'antigène SEA.

Les concentrations protéiques de tous les antigènes ainsi produits sont évaluées par la méthode BCA (Pierce, BCA protein assay, IL USA).

3.2. KLH

La protéine "Keyhole Limpet Hemocyanin" de *Megatura crenulata* est commercialisée par Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA USA sous forme lyophilisée à 30 mg/ml.

4. L'infection

Les expériences d'infection sont réalisées, par passage transcutané de cercaires sur la peau de l'abdomen rasé de souris anesthésiées au pentobarbital sodique. En général, les infestations ont lieu par 45 ou 60 furcocercaires selon la durée de la cinétique à respecter.

4.1. Monosexuée

L'infection monosexuée implique que la souris infectée ne porte que des vers femelles ou des vers mâles, elle nécessite l'infection préalable des mollusques avec un seul miracidium. Cette infection monomiracidial conduit à l'émission de cercaires d'un seul genre. Nous avons vérifié sur chaque souris au moment de la perfusion la qualité de l'infection monosexuée et noté le genre de l'infection.

4.2. Bisexuée

L'infection bisexuée implique que la souris a été infectée par un mélange de cercaires et qu'elle porte des vers femelles et des vers mâles.

5. Evaluation des paramètres parasitologiques

5.1. Perfusion totale

A la fin de l'expérimentation, les souris ayant reçu une dose létale d'anesthésique sont perfusées, après section de la veine mésentérique, en injectant par l'aorte le liquide de perfusion (NaCl 0,9%, héparine 1%).

5.2. Charge en vers

Les vers récoltés par perfusion totale sont comptés sous loupe binoculaire, après qu'ils aient sédimenté. Les vers mâles, femelles et immatures sont quantifiés à chaque expérimentation.

5.3. Nombre d'oeufs tissulaires

L'intestin et le foie de chaque souris sont prélevés et pesés. Les organes sont digérés dans la potasse à 4% une nuit, à 37°C. Les oeufs sont alors comptés sous le

microscope dans une fraction aliquote de la suspension. Leur nombre est rapporté pour chaque souris par gramme de tissu, et par gramme de tissu par femelle.

5.4. Test d'éclosion

Pour connaître la proportion d'oeufs matures, immatures et morts, les organes sont broyés à l'Ultraturax dans du tampon Hanks Wallace, toutes les étapes sont réalisées à 4°C afin d'éviter l'éclosion lors de la préparation. Les échantillons sont lavés 3 fois dans le tampon afin d'éliminer le maximum d'impuretés et de débris. Une fraction aliquote (environ 200 oeufs, approximativement 50% d'oeufs matures) est prélevée, diluée dans de l'eau de Volvic (Société des eaux de Volvic, Volvic, France) et exposée à la lumière et à la chaleur (30°C) pendant 30 minutes. Le processus d'éclosion est arrêté par addition de lugol à 1% qui colore en brun. Les oeufs matures, immatures, morts et les coques sont comptabilisés.

Le pourcentage de maturation est calculé selon le rapport :

$$\% \text{ maturation} = \frac{\text{nombre d'oeufs matures} + \text{nombre de coques}}{\text{nombre total d'oeufs}} \times 100$$

Le pourcentage d'éclosion est calculé selon le rapport :

$$\% \text{ éclosion} = \frac{\text{nombre de coques}}{\text{nombre d'oeufs matures et de coques}} \times 100$$

5.5. Pathologie hépatique

Confère article 2

6. Immunisation

Les immunisations parentérales ont eu lieu à la base de la queue par voie SC.

6.1. AIOH

L'antigène Sm 28GST (10 ou 25µg selon les expériences) plus 1,25mg de AIOH ont été mélangés dans un volume final de 100µl pendant 30 minutes avant l'injection afin d'adsorber l'antigène dans l'adjuvant.

6.2. ACF

La préparation de l'antigène se fait en mélangeant volume à volume la solution aqueuse d'antigène avec la phase huileuse de l'adjuvant, par vortex, jusqu'à l'obtention d'une émulsion épaisse blanche.

6.3. Salmonelles

La souche de *Salmonella typhimurium* AroA a été généreusement fournie par les Docteurs C. Anjam Khan et C. Hormaeche (Cambridge, Royaume-Uni). La souche de salmonelles atténuée que nous avons utilisée est SL3261 (pTech1-P28), qui exprime la protéine de fusion TTC-Sm28 GST (Anjam Khan *et al*, 1994). Ces deux protéines sont uniquement retrouvées dans le compartiment intracellulaire, et ne sont pas excrétées par les bactéries. Les plasmides insérés dans les souches

recombinantes présentent le gène de résistance à l'ampicilline comme facteur de sélection.

Le stock de la souche est conservé en glycérol à -20°C . Les bactéries sont mises en pré-culture pendant la nuit à 37°C , sous forte agitation, dans du milieu LB en présence ou non d'ampicilline ($50\ \mu\text{g/ml}$). Une culture est réensemencée avec une fraction de cette pré-culture, jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont alors récupérées, et leur densité est estimée par mesure de la densité optique (DO=1 correspond à $1,6.10^9$ bactéries /ml à une longueur d'onde de 600nm). Cette densité sera confirmée *a posteriori*, par étalement de dilutions successives des cultures sur boîtes de LB-agar +/- ampicilline ($50\ \mu\text{g/ml}$). Après incubation sur la nuit à 37°C , les colonies formées sont comptées, une colonie correspondant à une bactérie.

L'immunisation se fait par administration de 3.10^{10} bactéries par voie orale (sonde gastrique) par souris.

7. Cellules péritonéales

7.1. Prélèvement

Les cellules de la cavité péritonéale sont récupérées par injection énergétique de 10 ml de RPMI froid chez la souris préalablement tuée par dislocation cervicale, puis lavées 4°C deux fois dans le RPMI.

7.2. Production d'anticorps *in vitro*

Les cellules totales sont cultivées, dans des plaques de 96 puits à fond rond, dans du milieu de stimulation (Cf §12), à raison de 1.10^5 cellules par puits ($200\ \mu\text{l}$), en présence de SEA ($5\ \mu\text{g/pt}$), de SWAP ($5\ \mu\text{g/pt}$) ou de LPS ($500\ \text{ng/pt}$). L'antigène est en contact pendant 5 jours puis les cellules sont lavées 2 fois et remises en suspension dans du milieu, pour une synthèse *de novo*.

Pour les expériences testant l'influence des cytokines sur la production d'anticorps, les cellules ont été plâtées 30mn à 37°C et enrichies en lymphocytes B par déplétion au MAC'S des cellules T (Tebu France, anti-Thy1.2).

Les anticorps spécifiques ont été dosés purs par ELISA.

8. Analyse des populations cellulaires par cytofluorimétrie de flux

Les cellules du péritoine, de la rate ou des ganglions mésentériques ont été comptés après coloration au bleu trypan et 10^6 cellules ont été marquées par des anticorps directement fluorescents ou conjugués à la biotine, nécessitant alors une incubation avec la streptavidine-PE. Dans chaque expérience, les cellules sont pré-incubées avec un anti-récepteur Fc (anti-CD32/16, clone 2.4G2). Les analyses ont été réalisées sur un FACScan (Becton Dickinson Rungis, France). Les cellules mortes ont été exclues dans chaque échantillon par un marquage à l'iodure de propidium. 10^4 évènements ont été acquis et l'analyse a été réalisée sur la fenêtre des lymphocytes, selon leur caractéristique de taille et de granulométrie.

9. Transfert de cellules

Le transfert de cellules de la cavité péritonéale a toujours été réalisé à partir de cellules plâtées 20mn à 37°C et lavées plusieurs fois pour éliminer le sérum de veau. Le nombre de cellules injectées est précisé dans le texte. En moyenne, une BALB/c compétente a servi à reconstituer une BALB. *Xid* déficiente. Les réponses anticorps spécifiques dans les sérums et lavages intestinaux ont été dosées par

ELISA en diluant à 1/25, 1/250 respectivement pour les IgA et les IgM sériques et au 1/2 pour les lavages intestinaux.

10. Lavages intestinaux

L'intestin (de l'estomac au caecum) des animaux est prélevé, rincé au PBS, coupé longitudinalement récupéré dans 1 ml de tampon de lavage intestinal, contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF, STI). Il est ensuite agité au vortex pendant 2 minutes et centrifugé à 3500 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et ajusté à une concentration de 2mM final en PMSF, puis centrifugé à 10000 tr/mn pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C until tested.

11. Purification des lymphocytes de la lamina propria

La préparation des lymphocytes de la lamina propria est réalisée selon la méthode de Davies et Parrott (1981). La seule différence consiste en l'utilisation de la dispase (0.8 U/ml) au lieu de la collagénase.

12. Production des cytokines *in vitro*

Les conditions de culture, milieu, doses d'antigènes et temps de prélèvement sont référencées dans l'article 1.

13. Dosage des cytokines par ELISA

Des plaques de microtitration (Nunc, Intermed S.A., Danemark) sont incubées toute la nuit à + 4° C avec 100 µl par puits de différents anticorps monoclonaux purifiés de souris anti-cytokines, dilués dans le tampon de coating (R4-6A2, BV4-1D11, JES6-1A12, TRFK5 et JES5-2A5 pour respectivement l'anti-IFN-γ, l'anti-IL-4, l'anti-IL-2, l'anti-IL-5 et l'anti-IL-10). Les puits sont alors saturés pendant 1h à la température du laboratoire avec 200 µl d'une solution de PBS additionnée de 0.5 % de gélatine. Après 3 lavages avec du tampon PBS-T (PBS 0.1 % Tween 20), les surnageants à doser sont disposés et incubés pendant la nuit à + 4° C. Une nouvelle série de 3 lavages en PBS-T précède l'incubation pendant 90 minutes à 37° C avec 100 µl d'anticorps monoclonaux de souris biotinylés anti-cytokines (respectivement XMG1-2, BVD6-24G2, JES6-5H4, TRFK4 et SXC-1B pour l'anti-IFN-γ, l'anti-IL-4, l'anti-IL-2, l'anti-IL-5 et l'anti-IL-10 biotinylé). Trois autres lavages en PBS-T seront nécessaires avant l'addition de la streptavidine-peroxydase incubée 30 minutes à 37° C. Puis 5 lavages supplémentaires permettront la révélation de l'enzyme par son substrat OPD (orthophenyldiamine) à 1 mg/ml dilué en tampon acide citrique 0.05 M - Na₂HPO₄ 0.1 M pH 5.5 pendant 30 minutes à 37°C. Les densités optiques sont ensuite enregistrées sur un lecteur de plaque (Titertek Multiskan) pour être analysées. Les concentrations des surnageants à doser sont calculées à partir de courbes standard obtenues avec des cytokines purifiées recombinantes et diluées dans du milieu de culture. Les valeurs sont comprises entre 0.1 et 10 ng/ml pour l'IL-5, l'IL-10 et l'IFN-γ, de 1.56 à 100 U/ml pour l'IL-2 et de 20 à 1250pg/ml pour l'IL-4.

14. Dosage des anticorps par ELISA

Les plaques sont incubées toute la nuit à + 4° C avec les différents antigènes dilués dans du PBS à une concentration de 10 µg/ml pour un volume de 100 µl. Les plaques sont alors lavées une seule fois par du PBS-T. La saturation des sites actifs

non recouverts d'antigène est réalisée par du PBS-gélatine à 0.5 %, pendant 1 h à la température du laboratoire. Une série de 3 lavages successifs est alors entreprise avant l'incubation des sérums à tester dilués dans du PBS-T. Elle se poursuivra pendant toute la nuit à + 4° C. Après 3 nouveaux lavages en PBS-T, les taux d'anticorps spécifiques sont alors déterminés par addition d'immunoglobulines de chèvre anti-isotypes de souris marqués à la peroxydase pendant 1h.30 à 37° C. Les plaques sont alors rincées 3 fois avec le PBS-T avant la révélation de l'enzyme.

La détection des anticorps d'isotypes IgE et IgA suit un protocole légèrement différent. La révélation se poursuit d'abord par l'incubation d'anti-IgE et d'anti-IgA de souris biotinylés dilués dans du PBS-T pendant 1h.30 à 37° C puis par l'addition de streptavidine marquée à la peroxydase. Cinq lavages par du PBS-T sont alors nécessaires avant la réaction colorée obtenue par l'action du substrat OPD (orthophenyldiamine) à 1 mg/ml dilué en tampon acide citrique 0.05 M - Na₂HPO₄ 0.1 M pH 5.5 pendant 30 minutes à 37°C. Les densités optiques sont ensuite enregistrées sur un lecteur de plaque (Titertek Multiskan) pour être analysées.

BIBLIOGRAPHIE

A

ABEL L., DEMENAIIS F., PRATA A. *et al* Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48, 959-970.

ABO T., WATANABE H., HAI T. *et al* Extrathymic pathways of T-cell differentiation in the liver and others organs. *Int. Rev. Immunol.*, 1993, 11, 1, 61-102.

ABREU-MARTIN M.T. & TARGAN S.R. Lamina propria lymphocytes: A unique population of mucosal lymphocytes. *In* Essentials of mucosal immunology. San Diego : Academic Press. Inc., 1996, p. 227.

ACTOR J.K., MARSHALL M.A., ELTOUM I.A. *et al* Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 3050-3056.

ACTOR J.K., SHIRAI M., KULLBERG M.C. *et al* Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, 90, 948-954.

ALBEROLA-ILA J., PLACES L., CANTREL D.A. *et al* Intracellular events involved in CD5-induced human T-cell activation and proliferation. *J. Immunol.*, 1992, 148, 1287-1293.

AL-QAOU D K.M., FLEISCHER B. & HOREAUF A. The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis-association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. *Int. Immunol.*, 1998, 10, 1, 17-25.

ALTBOUMI., PORAT Y. & ZAN-BAR I. IFN- γ induces CD5⁺ lymphoma B-cell line 29M10 to differentiate to IgG1-bearing cells and to secrete IgG1 isotype. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 152-154.

AMIRI P., LOCKSLEY R.M., PARSLow T.G. *et al* Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 1992, 356, 604-607.

AMORY-SOISSON L.M., MASTERSON C.P., TOM T D. *et al* Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.*, 1992, 149, 3612-3620.

ANJAM KHAN C.M., VILLAREAL-RAMOS B., PIERCE R.J. *et al* Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J. Immunol.*, 1994, 153, 5634-5642.

ARMSTRONG S.J. & DIMMOCK M.J. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. *J. Virol.*, 1992, 66, 3823-3832.

ARNOLD L.W. & HAUGHTON G. Autoantibodies to phosphatidylcholine, the murine antibromelain RBC response. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 354-359.

AURIAULT C., CAPRON M., CESARI I.M. *et al* Enhancement of eosinophil effector function by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* : role of proteases. *J. Immunol.*, 1983a, 131, 464-470.

AURIAULT C., GRAS-MASSE H.H., PIERCE R.J. *et al* Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 1918-1924.

AURIAULT C., JOSEPH M., TARTAR A. *et al* Regulatory role of tripeptide (TKP) from the constant domain of immunoglobulin G. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1985, 7, 1, 73-79.

AURIAULT C., PESTEL J., JOSEPH M. *et al* Interaction between macrophage and *Schistosoma mansoni* schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of b-glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.*, 1981, 62, 15-19.

B

BABA M., KIKUCHI Y., MORI S. *et al* Mouse germinal center B cells with the xid mutation retain responsiveness to antimouse CD40 antibodies but diminish IL-5 responsiveness. *Int. Immunol.*, 1997, 9, 10, 1463-1473.

- BALLOUL J.M., BOULANGER D., SOUDERMEYER P. *et al* Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S.mansoni* expressed in *E.coli*. In: Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites. New York : Alan R.Liss Inc., 1987a, -77p.
- BALLOUL J.M., GRZYCH J.M., PIERCE R.J. *et al* A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1987c, 138, 3448-3453.
- BALLOUL J.M., SONDERMEYER P., DREYER D. *et al* Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*, 1987b, 326, 149-153.
- BAO S., GOLDSTONE S. & HUSBAND A.J. Localisation of IFN- γ and IL-6 in murine intestine by *in situ* hybridisation. *Immunology*, 1993, 80, 666-670.
- BASTIAN A., KRATZIN H., ECKART K. *et al* Intra- and interchain disulfide bridges of the human J chain in secretory immunoglobulin A. *Biol. Chem Hoppe-Seyler*. 1992, 373, 1253-1263.
- BEAGLEY K.W., BAO S., RAMSAY A.J. *et al* IgA production by peritoneal cavity B cells is IL-6 independent: implications for intestinal IgA responses. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 2123-2126.
- BEAGLEY K. W., ELDRIDGE J.H. & AICHER W.K. Peyer's patch B cells with memory cell characteristics undergo terminal differentiation within 24 hours in response to interleukin-6. *Cytokine*, 1991, 3, 2, 107-116.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., KIYONO H. *et al* Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.*, 1988, 141, 2035-2042.
- BEAGLEY K.W., ELDRIDGE J.H., LEE F. *et al* Interleukins and IgA synthesis: Human and murine IL-6 induce high rates of IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.*, 1989, 169, 2133-2148.
- BEAGLEY K.W., MURRAY A.M., MCGHEE J.R. *et al* Peritoneal cavity CD5 (B1a) B cells: cytokine induced IgA secretion and homing to intestinal lamina propria in SCID mice. *Immunol. Cell Biol.*, 1995, 73, 5, 425-432.
- BERGQUIST N.R. Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option. *Parasitol. Today*, 1995, 11, 191-194.
- BEVILACQUA M.P., STENGLIN S., GIMBRONE M.A. *et al* Endothelial leukocyte adhesion molecule 1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 1989, 243, 4895, 1160-1165.
- BIANCONE L., BOWEN M.A., LIM A. *et al* Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 811-819.
- BIKAH G., CAREY J., CIALLELLA J.R. *et al* CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B1 B cells. *Science*, 1996, 274, 1906-1909.
- BIRKHOFFER A., REHBOCK J. & FRICKHE H.T. Lymphocytes from the normal human peritoneum contain high frequencies of Th2-type CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 957-960.
- BLAND P. MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol. Today*, 1988, 9, 174-178.
- BORRELLO M.A. & PHIPPS R. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5⁺ B lymphocytes and macrophages. *Immunol. Today*, 1996, 17, 10, 471-475.
- BOS N.A., BUN J., BIJMA H. *et al* Analysis of IgA-producing hybridomas derived from peritoneal B1 cells. 1994, *In Vivo Immunology*. Edited by E. Heinen *et al.*, Plenum Press, New York.
- BOS N.A., BUN J., POPMA S.H. *et al* Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 616-623.
- BOULANGER D., REID G.D.F., STURROCK R.F. *et al* Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.*, 1991a, 13, 473-490.
- BOULANGER D., TROTTEIN F., MAUNY F. *et al* Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.*, 1994, 16, 399-406.

- BOULANGER D., WARTER A., TROTTEIN F. *et al* Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S.mansoni*. *Parasite Immunol.*, 1995, 17, 361-369.
- BRANDTZAEG P. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells. In *handbook of mucosal immunology*. San Diego : Academic Press Inc., 1994, p. 251.
- BRETZ J.D., CHEN S-C. & SCWARTZ R.C. Antigen presentation after macrophages lineage switch of CD5 pre-B cells. In : *CD5 B cells in development and disease*. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 155-156.
- BRIERE F., CHEVET D., BRIDON J.M. *et al* B lymphocytes of patients with complete IgA deficiency secrete IgA in response to interleukin 10. *Nephrologie*, 1996, 17, 5, 289-295.
- BRORSON K. BRUNSWICK M., EZHEVSKY S. *et al* Xid affects events leading to B cell cycle entry. *J. Immunol.*, 1997, 159, 135-143.
- BRORSON K.A., KRASNOKUTSKY M.V. & STEIN K.E. Immunoglobulin isotype switching in xid mice. *Mol. Immunol.*, 1995, 32, 7, 487-494.
- BUSHARA H.O., BASHIR M.E.N., MALIK K.H. *et al* Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasit. Immunol.*, 1993, 15, 383 -390.
- BUTOR C., COUËDEL-COURTEILLE A., VENET A. *et al* Immunité locale et vaccination. *M/S.*, 1995, 11, 703-711.
- BUTTERWORTH A., VADAS M.A., WASSOM D.L. *et al* Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.*, 1979b, 150, 1456-1471.
- BUTTERWORTH A.E., BENSTED-SMITH R., CAPRON A. *et al* Immunity in human schistosomiasis mansoni. Prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*, 1987, 94, 281-300.
- BUTTERWORTH A.E., CAPRON M., CORDINGLEY J.S. *et al* Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 79, 393-408.
- BUTTERWORTH A.E., STRURROCK R.F., HOUBA V. *et al* Antibody dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. *Nature*, 1974, 252, 503-505.
- BYRAM J.E. & VON LICHTENBERG F. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 26, 944-956.

C

CAPRON A. La bilharziose: du papyrus à l'ordinateur. *Le généraliste*, 1993, 1411, 8-18.

CAPRON A. Le langage moléculaire des parasites. *Médecine & Sciences*, 1995b, 11, 431-433.

CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M. *et al* Immunity to schistosomes : progress toward vaccine. *Science*, 1987, 238, 1065-1072.

CAPRON A., DESSAINT J.P., CAPRON M. *et al* Involvement of specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 1975, 253, 474-475.

CAPRON M. & CAPRON A. Rats, mice and men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 1986, 2, 69-75.

CAPRON M., BAZIN H., JOSEPH M. *et al* Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.*, 1981, 126, 1764-1768.

CAPRON M., CAPRON A., ABDEL-HAFEZ S.K. *et al* Immunological response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. *J. Immunol.*, 1983, 131, 1475-1480.

CAPRON M., CAPRON A., TORPIER G. *et al* Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 1978, 8, 127-133.

CAPRON M., NOGUEIRA-QUEIROZ J.A., PAPIN J.P. *et al* Interactions between eosinophils and antibodies: *In vivo* protective role against rat schistosomiasis. *Cell. Immunol.*, 1984, 83, 1, 60-72.

CARTER P.B. & COLLINS F.M. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 1189-1203.

- CASALI P. & NOTKINS A.L. Probing the human B-cell repertoire with EBV : Polyreactive antibodies and CD5⁺ B lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, 1989, 7, 513-535.
- CEBRA J.J., BOS N.A. CEBRA E.R. *et al* Development of components of the mucosal immune system in SCID recipient mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994, 355, 255-259.
- CEPEK K.L., SHAW S.K., PARKER C.M. *et al* Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and an integrin α E β 7. *Nature*, 1994, 372, 190-193.
- CERF-BENSUSSAN N., JARRY A., GNERAGBE T. *et al* Monoclonal antibodies specific for intestinal lymphocytes. *Monogr. Allergy*, 1988, 24, 167-172.
- CHASE J.H., ABED N.S., ADEL G.L. *et al* Regulation of differentiation in CD5⁺ and conventional B cells. Sensitivity to LPS-induced differentiation and interferon-gamma-mediated inhibition of differentiation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1993, 63, 3, 327-332.
- CHEEVER A.W., FINKELMAN F.D., CASPAR P. *et al* Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology eosinophilia in *Schistosoma mansoni* infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.*, 1992, 148, 3244-3248.
- CHEN Y., KUCHROO V.K., INOBE J.I. *et al* Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994, 265, 1237-1240.
- CHENSUE A.W., TEREBUH P.D., WARMINGTON K.S. *et al* Role of IL-4 and IFN- γ in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function. *J. Immunol.*, 1992, 148, 900-906.
- CHENSUE A.W., WARMINGTON K.S., HERSHEY S.D. *et al* Evolving T-cell response in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8⁺ T cells *in vivo*. *J. Immunol.*, 1993, 151, 1391-1400.
- CHERWINSKI H.M., SCHUMACHER J.H., BROWN K. D. *et al* Two types of mouse help T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1987, 139, 1229-1244.
- CLEGG J.A., SMITHERS S.R. & TERRY R.J. Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.*, 1971, 1, 43-49.
- COFFMAN R.L., LEBMAN D.A. & SHRADER B. Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 1039-1044.
- COFFMAN R.L., SHRADER B., CARTY J. *et al* A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J. Immunol.*, 1987, 139, 3685-3690.
- COHEN I.R. & YOUNG D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homonculus. *Immunol. Today*, 1991, 12, 4, 105-110.
- COMOY E.E., CAPRON A. & THYPHRONITIS G. *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Intern. Immunol.*, 1997a, 9, 4, 523-531.
- COMOY E.E., VENDEVILLE C., CAPRON A. *et al* Infection with *Salmonella typhimurium* modulates the immune response to *Schistosoma mansoni* glutathione-S-transferase. *Infection and Immunity*, 1997b, 65, 8, 3261-3266.
- CONG Y.Z., RABIN E. & WORTIS H.H. Treatment of murine CD5-B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5 : two B-cell activation pathways. *Int. Immunol.* 1991, 3, 5, 467-476.
- COUSSINIER-PARIS & DESSEIN A.J. Schistosoma specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 2295-2302.
- CUMANO A., PAIGE C.J., ISCOVE N.N. *et al* Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature*, 1992, 356, 6370, 612-615.
- CUNNINGHAM-RUNDLES C., BRANDEIS W.E., GOOD R.A. *et al* Milk precipitine, circulating immune complexes, and IgA deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1978, 75, 3387-3389.

CURTISS III.R., KELLY S.M., GULIG P.A. *et al* Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Cur. Top. Microbiol. Immun.*, 1989, 146, 34-49.

CZAJA M.J., WEINER F.R. & EGHBALI M. The differential effects of gamma-interferon on collagen and fibronectin gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 13348-13351.

CZAJA M.J., WEINER F.R., STAKAHASHI *et al* γ -interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.*, 1989, 10, 795-800.

CZERKINSKY C., RUSSELL M.W., LYCKE N. *et al* Cholera toxin B subunit as transmucosal carrier-delivery and immunomodulating system for induction of anti-infectious and anti-pathological immunity. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1995, in press.

D

DATTA S.K., PATEL H. & BERRY D. Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies. Role of T helper cells with classical and novel phenotypes in three murine models of lupus nephritis. *J. Exp. Med.*, 1987, 165, 5, 1252-1268.

DAVIES M.D.J. & PARROTT D.M.V. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut*, 1981, 22, 481-488.

DE BECKER G., SORNASSE T., NABAVI N. *et al* Immunoglobulin isotype regulation by antigen-presenting cells *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 1523-1528.

DE BONT J., VERCRUYSSSE J., GRZYCH J.M. *et al* Potential of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. I. Parasitological results. *Parasitology*, 1997, 115, 249-255.

DE LA HERA A., MARCOS M.A., TORIBIO M.L. *et al* Development of Ly-1⁺ B cells in immunodeficient CBA/N mice. *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 3, 804-809.

DEAN D.A. *Schistosoma mansoni* : adsorption of human blood group A and B antigens by schistosomula. *J. Parasitol.*, 1974, 60, 260-263.

DEENEN S.K. & KROESE F.G. Murine peritoneal Ly-1 B cells do not turn over rapidly. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 70-71.

DEFRANCE T., VANBERVLIET B., BRIERE F. *et al* Interleukin-10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.*, 1992, 175, 671-682.

DEFRANCE T., VANBERVLIET B., DURAND I. *et al* Proliferation and differentiation of human CD5⁺ and CD5⁻ B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 11, 2831-2839.

DEMEURE C.E., RIHET P., ABEL L. *et al* Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans : influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J. Infect. Dis.*, 1993, 168, 1000-1011.

DESSAINT J.P., CAMUS D., FISHER E. *et al* Inhibition of lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.*, 1977, 7, 624-629.

DIELI F., ASHERSON G.L., SIRECI G. *et al* IL-5 enhances *in vitro* and *in vivo* antigen specific IgA production in MHC genetically determined low IL-5 responder mice. *Cell. Immunol.*, 1995, 163, 309-313.

DISSOUS C., GRZYCH J. M. & CAPRON A. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, 1986, 323, 6087, 443-445.

DUNKLEY M.L. & HUSBAND A.J. Routes of priming and challenge for IgA antibody-containing cell responses in the intestine. *Immunology Letters*, 1990, 26, 165-170.

DUNNE D.W., BUTTERWORTH A.E., FULFORD A.J. *et al* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 6, 1483-1494.

DUNNE D.W., GRABOWSKA A.M., FULFORD A.J.C. *et al* Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *Eur. J. Immunol.*, 1988, 18, 123-131.

DUVAUX-MIRET O., STEFANO G.B., SMITH E.M. *et al* Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1992, 89, 778-787.

E

EHRHARDT R.O., STROBER W. & HARRIMAN G.R. Effects of transforming growth factor (TGF)- β on IgA isotype expression. TGF- β induces a small increase in sIgA⁺ cells regardless of the method of B cell activation. J. Immunol., 1992, 148, 3830-3836.

ERASMUS D.A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. Parasitology, 1973, 67, 165-183.

ERMAK T.H., BHAGAT H.R. & PAPPO J. Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbit mucosal lymphoid organs. Am. J. trop. Med. Hyg., 1994, 50, 5, 14-28.

ERNST P.B., BEFUS A.D. & BIENENSTOCK J. Leukocytes in the intestinal epithelium : an unusual immunological compartment. Immunol. Today, 1985, 6, 50-55.

ESTAQUIER J., MARGUERITE M., SAHUC F. *et al* Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine schistosoma mansoni parasite infection. Eur. Cytokine Netw., 1997, 8, 2, 153-160.

EUZEBY J. Les Maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine. Vigot Frères. 1970

F

FALLON P.G. & DOENHOFF M.J. Drug-resistant schistosomiasis : resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1994, 51, 83-88.

FALLON P.G., STURROCK R.F., NIANG A.C. *et al* Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1995, 53, 61-72.

FARSTAD I.N., HALSTENSEN T.S., LIEN B. *et al* Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue. Immunology, 1996, 89, 2, 227-237.

FAYETTE J., DUBOIS B., VANDENABEELE S. *et al* Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. J. Exp. Med., 1997, 185, 11, 1909-1918.

FINKELMAN F.D., SMITH A.H., SCHER I. *et al* Abnormal ratio of membrane immunoglobulin classes in mice with an X-linked B-lymphocyte defect. J. Exp. Med., 1975, 142, 5, 1316-1321.

FIORENTINO D.F., BOND M.W. & MOSMANN T.R. Two types of mouse T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med., 1989, 170, 2081-2095.

FIORENTINO D.F., ZLOTNIK A., MOSMANN T.R. *et al* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol., 1991b, 147, 11, 3815-3822.

FIORENTINO D.F., ZLOTNIK A., VIEIRA P. *et al* IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J. Immunol., 1991a, 146, 10, 3444-3451.

FIRESTEIN G.S., ROEDER W.D., LAXER J.A. *et al* A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. J. Immunol., 1989, 143, 518-525.

FISHELSON Z. Novel mechanisms of immune evasion by *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 1995, 90, 289-301.

FLORES-VILLANUEVA P., HARRIS T.S., RICKLAN D.E. *et al* Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and down-regulate schistosomal granulomatous disease in vivo. J. Immunol., 1994, 152, 1847-1855.

FLORES-VILLANUEVA P., ZHENG X.X., STROM T.B. *et al* Recombinant IL-10 and IL-10/FC treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and eggs granuloma formation in schistosomiasis. J. Immunol., 1996, 156, 9, 3315-3320.

FORSTER I & RAJEWSKY K. Expansion and functional activity of Ly-1⁻ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. Eur. J. Immunol. 1987, 17, 521-528.

FUJHASHI K., MCGHEE J.R., KWEON M. *et al* $\gamma\delta$ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. J. Exp. Med., 1996, 183, 1929-1935.

G

GEARHART P.J. & CEBRA J.J. Most B cells that have switched surface immunoglobulin isotypes generate clones of cells that do not secrete IgM. *J. Immunol.*, 1981, 127, 1030-1034.

GO N.F., CASTLE B.E., BARRETT R. *et al* Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor : unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.*, 1990, 1172, 6, 1625-1631.

GOLDRING O.L., CLEGG J.A., SMITHERS S.R. *et al* Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 26, 181-187.

GOLLOB K.J. & COFFMAN R.L. A minority subpopulation of CD4⁺ T cells directs the development of naive CD4⁺ T cells into IL-4 secreting cells. *J. Immunol.*, 1994, 152, 5180-5188.

GORDON J. B-cell signalling via the C-type lectins CD23 and CD72. *Immunol. Today*, 1994, 15, 9, 411-417.

GRDIC D., HORNQUIST E., KJERRULF M. *et al* Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8⁺ T cells in the normal gut mucosa. *J. Immunol.*, 1988, 160, 2, 754-762.

GREZEL D. Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes de défense contre le schistosome au cours d'infestations expérimentales. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé. Option immunologie. Lille I, 1992.

GREZEL D., CAPRON M., GRZYCH J.M. *et al* 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.*, 1993, 23, 454-460.

GRZYCH J.M., CAPRON M., BAZIN H. *et al* In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S.mansoni* antibodies. *J. Immunol.*, 1982, 129, 2739-2743.

GRZYCH J.M., CAPRON M., DISSOUS C. *et al* Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1984, 133, 998-1004.

GRZYCH J.M., DISSOUS C., CAPRON M. *et al* *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.*, 1987, 165, 865-878.

GRZYCH J.M., GREZEL D., XU C.B. *et al* IgA antibodies to a protective antigen in human Schistosomiasis Mansoni. *J. Immunol.*, 1993, 150, 2, 527-535.

GRZYCH J.M., PEARCE E., CHEEVER A. *et al* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, 1991, 146, 1322-1327.

GUY-GRAND D., DY M., LUFFAU G. *et al* Gut mucosal mast cells. Origin, traffic and differentiation. *J. Exp. Med.*, 1984, 160, 12-28.

H

HAGAN P., BLUMENTHAL U.J., DUNNE D. *et al* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 1991, 349, 243-245.

HARDY R.R. & HAYAKAWA K.A. developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88, 24, 11550-11554.

HARDY R.R. & HAYAKAWA K.A. Generation of Ly-1 B cells from developmentally distinct precursors. In : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 99-111.

HARDY R.R., HAYAKAWA K.A., HAAIJMAN J. *et al* B-cell subpopulation identified by two-colour fluorescence analysis. *Nature*, 1982, 297, 589-591.

HARRIMANG R., KUNIMOTO D.Y., ELLIOTT J.F. *et al* The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.*, 1988, 140, 9, 3033-3039.

HARTMANN J., MAABEN V., RIEBER P. *et al* T lymphocytes from normal human peritoneum are phenotypically different from their counterparts in peripheral blood and CD3⁻ lymphocyte subsets contain mRNA for the recombination activating gene RAG-1. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 2626-2631.

HAURY M., KASAHARA Y., SCHALL S. *et al* Intestinal lymphocytes in the chicken express an integrin-like antigen. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 313-319.

- HAYAKAWA K., HARDY R.R., HERZENBERG L.A. *et al* Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J. Exp. Med.* 1985, 161, 1554-1568.
- HAYAKAWA K., HARDY R.R., PARKS D.R. *et al* The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.*, 1983, 157, 1, 202-218.
- HAYAKAWA Y., HARDY R.R. & HONDA M. Ly-1B cells : functionally distinct lymphocytes that secrete IgM auto-antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1984, 81, 2494-2498.
- HAYAKAWA Y., HARDY R.R. & STALL A.M. *et al* Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* 1986, 16, 1313-1316.
- HAYAKAWA Y., TARLINTON D. & HARDY R.R. Absence of MHC class II expression distinguishes fetal from adult B lymphopoiesis in mice. *J. Immunol.* 1994, 152, 10, 4801-4807.
- HEEL K.A. & HALL J.C. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *British Journal of Surgery*, 1996, 83, 1031-1036
- HEINZEL F.P., SADICK M.D., HOLADAY B.J. *et al* Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 1989, 169, 59-65.
- HENDERSON G.J., CONARY J.T., SUMMAR M. *et al* In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. I. IL-4 mRNA, not IL-2 mRNA, is abundant in the granulomatous livers mesenteric lymph nodes, and spleens of infected mice. *J. Immunol.*, 1991, 147, 3, 992-997.
- HERZENBERG L.A. & HERZENBERG L.A. Toward a layered immune system. *Cell*, 1989, 59, 953-954.
- HERZENBERG L.A., STALL A.M., BRAUN J. *et al* Depletion of the predominant B-cell population in immunoglobulin mu heavy-chain transgenic mice. *Nature*, 1987, 329, 71-75.
- HERZENBERG L.A., STALL A.M., LALOR P.A. *et al* The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.*, 1986, 93, 81-102.
- HEXHAM J.M., CARAYANNOPOULOS L. & CAPRA J.D. Structure and function in IgA. *Chem. Immunol.*, 1997, 65, 73-87.
- HIGGINS J.M., MANDLEBROT D.A., SHAW S.K. *et al* Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin. *J. Cell. Biol.*, 1998, 140, 1, 197-210.
- HIRATA M., HIEDA T. & TSUTSUMI H. Immunoglobulins inside *Schistosoma japonicum* eggs from the livers of mice. *J. Parasit.*, 1986, 72, 4, 578-582.
- HIROI T., FUJHASHI K., MCGHEE J.R. *et al* Polarized Th2 cytokine expression by both mucosal gamma delta and alpha beta T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 10, 2473-2751.
- HITOSHI Y., MITA S., TOMINAGA A. *et al* Interferon-gamma inhibits the proliferation but not the differentiation of murine B cells in response to IL-5. *Int. Immunol.*, 1989, 1, 2, 185-190.
- HITOSHI Y., SONODA E., KIKUCHI Y. *et al* IL-5 receptor positive B cells, but not eosinophils, are functionally and numerically influenced in mice carrying the X-linked immune defect. *Int. Immunol.*, 1993, 5, 9, 1183-1190.
- HOREAUF A., SOLBACH W., LOHOFF M. *et al* The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *Int. Immunol.*, 1994, 6, 8, 1117-1124.
- HOREAUF A., SOLBACH W., RÖLLINGHOFF M. *et al* Effect of IL-7 treatment on *Leishmania major*-infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *Int. Immunol.*, 1995, 7, 11, 1879-1884.
- HUGHES A.L. Rates of amino acid evolution in the 26- and 28-kDa glutathione S-transferases of *Schistosoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, 8, 43-52.

I

IKE F., NAGASAWA T., MIZUTANI T. *et al* Detection of CD5 B cells in Peyer's patches of mice. In : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 165-167.

IKEMATSU H., HARINDRANATH N. & CASALI P. Somatic mutations in the VH genes of high-affinity antibodies to self and foreign antigens produced by human CD5⁺ and CD5⁻ B lymphocytes. In : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 319-327.

IKUTA K., KINA T., MACNEIL I. *et al* Development of γ T-cell subsets from fetal hematopoietic stem cells. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 21-31.

ISHIDA H., HASTINGS R. & HOWARD M. Multiple IL-10 antibody treatment blocks the development of Ly-1 lineage B cells. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 264-265.

ISMAIL M.M., TAHA S.A., FARGHALY A.M. *et al* Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 1994, 24, 685-693.

IVANOFF N., PHILLIPS N., SCHATCH A.M. *et al* Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine*, 1996, 14, 12, 1123-1131.

J

JAMES S.L. & SHER A. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 1990, 155, 21-31.

JAMES S.L., CORREA-OLIVEIRA R. & LEONARD E.J. Defective vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. II. Analysis of cellular responses. *J. Immunol.*, 1984, 133, 1587-1593.

JAMIN C., LYDYARD P.M., LE CORRE R. *et al* CD5⁺ B cells : differential capping and modulation of IgM and CD5. *Scand. J. Immunol.*, 1996, 43, 73-80.

JOSEPH M., AURIAULT C., CAPRON A. *et al* A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 1983, 303, 810-811.

JOSEPH M., CAPRON A., BUTTERWORTH A.E. *et al* Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomes *in vitro* : induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, 1978, 33, 48-56.

JUNE C.H.; RABINOVITCH P.S. & LEDBETTER J.A. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J. Immunol.*, 1987, 138, 2782-2792.

K

KAGAN I.G. Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice. Inst. Pamph.*, 1958, 45, 151.

KANTOR A.B., STALL A.M., ADAMS S. *et al* Adoptive transfer of murine B-cell lineages. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 168-169.

KARAGOGEOS D., ROSENBERG K. & WORTIS H.H. Early arrest of B cell development in nude, X-linked immune-deficient mice. *J. Immunol.*, 1986, 136, 1125-1130.

KASERLIAN D., VIDAL K. & REVILLARD J.P. Murine enterocytes can present soluble antigens to specific class-II restricted CD4⁺ T cells. *Erur. J. Immunol.*, 1989, 19, 1513-1516.

KATIRA A., KAMAL M. & GORDON J. Occupancy of CD72 (the CD5 counterstructure) enhances interleukin-4 -dependent CD23 expression in resting B lymphocytes. *Immunology*, 1992, 76, 422-426.

KATO T. & OWEN R.O. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. *In* handbook of mucosal immunology. San Diego : Academic press inc., 1994, . 11-23..

KATOH S., BENDIG M.M., KANAI Y. *et al* Maintenance of CD5⁺ B cells at an early developmental stage by interleukin-5: evidence from immunoglobulin gene usage in interleukin-5 transgenic mice. *DNA Cell Biol.*, 1993, 12, 6, 481-491.

KAWANISHI H., SALTZMAN L. & STROBER W. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to SIgA B cells *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 1983, 157, 437-450.

KE Y., PEARCE K., LAKE J.P. *et al* Gamma delta lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J. Immunol.*, 1997, 158, 8, 3610-3618.

KEARNEY J.F. & LAWTON A.R. B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, 1975a, 115, 3, 671-676.

- KEARNEY J.F. & LAWTON A.R. B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. II. Response of fetal lymphocytes. *J. Immunol.*, 1975b, 115, 3, 677-681.
- KELSALL B.L. & STROBER W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.*, 1996, 183, 1, 237-347.
- KERNER J.D., APPLEBY M.W., MOHR R.N. *et al* Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity*, 1995, 3, 3, 301-312.
- KHALIFE J., CAPRON M., CAPRON A. *et al* Immunity in human schistosomiasis. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.*, 1986, 166, 1626-1640.
- KHALIFE J., DUNNE D.W., RICHARDSON B.A. *et al* Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1989, 142, 4422-4427.
- KHAN W.N., ALT F.W., GERSTEIN R.M. *et al* Defective B cell development and function Btk-deficient mice. *Immunity*, 1995, 3, 283-299.
- KILSHAW P.J. & MURANT S. Expression and regulation of $\beta 7(\beta p)$ integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 2591-2596.
- KIYONO H., FUJISHI K., YAMAMOTO M. *et al* Intraepithelial $\gamma\delta$ T cell and epithelial cell interactions in the mucosal immune system. In *Essentials of mucosal immunology*. San Diego : Academic Press. Inc., 1996, p. 195.
- KLAUS G.G.B., HOLMAN M., JOHNSON-LEGER C. *et al* A re-evaluation of the effects of X-linked immunodeficiency (xid) mutation on B cell differentiation and function in the mouse. *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2749-2756.
- KOIKE M., KIKUCHI Y., TOMINAGA A. *et al* Defective IL-5-receptor-mediated signaling in B cells of X-linked immunodeficient mice. *Int. Immunol.*, 1995, 7, 1, 21-30.
- KOPF M., BROMBACHER F., HODGKIN P.D. *et al* IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5⁺ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*, 1996, 4, 15-24.
- KOSHLAND M.E. The coming age of the immunoglobulin J chain. *Annu. Rev. Immunol.*, 1985, 425-453.
- KOSTER B., HALL M.R. & STRAND M. *Schistosoma mansoni*: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. *Exp. Parasitol.*, 1993, 77, 3, 282-294.
- KRIST L.F., EESTERMANS I.L., STEEBERGEN J.J. *et al* Cellular composition of milky spots in the human greater omentum : an immunochemical and ultrastructural study. *Anat. Rec.*, 1995, 241, 2, 163-174.
- KROESE F.G.M., AMMERLAAN W.A.M. & DEENEN G.J. Location and function of B-cell lineages. In : *CD5 B cells in development and disease*. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 44-57.
- KROESE F.G.M., AMMERLAAN W.A.M. & KANTOR A.B. Evidence that intestinal IgA plasma cells in μ , κ transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1B) cells. *Int. Immunol.*, 1993, 5, 1317-1327.
- KROESE F.G.M., BUTCHER E.C., STALL A.M. *et al* Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.*, 1989, 1, 1, 75-84.
- KROESE F.G.M., CEBRA J.J., VAN DES GAMMEN M.J.F. *et al* Contribution of B-1 cells to intestinal IgA production in the mouse. *Methods*, 1995, 8, 37-43.
- KULLBERG M.C., BERZOFKY J.A., JANKOVIC D.L. *et al* T cell-derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B, non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.*, 1996, 156, 1482-1489.
- KULLBERG M.C., PEARCE E.J., HIENY S.E. *et al* Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.*, 1992, 148, 10, 3264-3270.
- KUNIMOTO D.Y., NORDAN R.P., & STROBER W. IL-6 is a component cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.*, 1989, 143, 2230-2235.

L

- LAGOO A.S., ELDRIDGE J.H., LAGOO-DEENADAYLAN S. *et al* Peyer's patch CD8⁺ memory T cells secrete T helper type 1 and type 2 cytokines and provide help for immunoglobulin secretion. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 12, 3087-3092.

- LALOR P.A., HERZENBERG L.A., ADAMS S. *et al* Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur. J. Immunol.* 1989b, 19, 507-513.
- LALOR P.A., STALL A.M., ADAMS S. *et al* Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur. J. Immunol.* 1989a, 19, 501-506
- LAM K.P. & STALL A.M. Major histocompatibility complex class II expression distinguishes two distinct B cell developmental pathways during ontogeny. *J. Exp. Med.*, 1994, 180, 2, 507-516.
- LAMM M.E., NEDRUD J.G., KAETZEL C.S. *et al* IgA and mucosal defense. *APMIS.*, 1995, 103, 241-246.
- LANKESTER A.C., VAN SCHIJNDEL G.M.W., CORDELL J.L. *et al* CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 812-816.
- LARIVIERE M. Epidémiologie des bilharzioses humaines. *La Revue du Praticien*, 1993, 43, 417-423.
- LEBMAN D.A., GRIFFIN P.M. & CEBRA J.J. Relationship between expression of IgA by Peyer's patch cells and functional IgA memory cells. *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 1405-1418.
- LEBMAN D.A., LEE F.D. & COFFMAN R.L. Mechanism for transforming growth factor β and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol.*, 1990, 144, 952-959.
- LEFRANCOIS L. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa : curioser and curioser. *Semin. Immunol.*, 1991, 3, 2, 99-108.
- LESLEY J., HYMAN R. & KINCADE P.W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.*, 1993, 54, 271-335.
- LI T., RAWLINGS D. J., PARK H. *et al* Constitutive membrane association potentiates activation of Bruton tyrosine kinase. *Oncogene*, 1997, 15, 12, 1375-1383.
- LI T., TSUKADA S., SATTHERWAITE A. *et al* Activation of Bruton's tyrosine kinase (BTK) by a point mutation in its pleckstrin homology (PH) domain. *Immunity*, 1995, 2, 5, 451-460
- LI Y., HAYAKAWA K. & HARDY R.R. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J. Exp. Med.* 1993, 178, 951-960.
- LIM P. M., CHAN S. T. LEUNG D. T. *et al* Production of anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idiootype in CBA/N xid mice : investigation of the defect using a T15 immunoglobulin transgene. *Mol. Immunol.*, 1994, 31, 5, 351-359.
- LIN Y., SHOCKETT P. & STAVNEZER J. Regulation of the antibody class switch to IgA. *Immunol. Res.*, 1991, 10, 376-380.
- LUKACS N.W. & BOROS D.L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine *schistosomiasis mansoni*. *Clinical. Immunol. Immunopathology*, 1993, 68, 57-63.
- LUO W., VAN DE VELDE H., VON HOEGEN I. *et al* Ly-1 (CD5), a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells, is a natural ligand of the B cell surface protein Lyb-2 (CD72). *J. Immunol.*, 1992, 148, 6, 1630-1634.
- LYCKE N., ERIKSEN L. & HOLMGREN J. Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.*, 1987, 25, 413-419.

M

- MAAS A., DINGJAN G.M., SAVELKOUL H.F. *et al* The X-linked immunodeficiency defect in the mouse is corrected by expression of human Bruton's tyrosine kinase from a yeast artificial chromosome transgene. *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 9, 2180-2187.
- MACDONALD T.T., SPENCER J., VINEY J.L. *et al* Selective biopsy of Peyer's patches during ileal endoscopy. *Gastroenterology*, 1987, 93, 1356-1362.
- MADDISON S.E., NORMAN L., GEIGER S.J. *et al* *Schistosoma mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, reexposed and antigen sensitized animals. *J. Parasitol.*, 1970, 56, 1058-1065.
- MAJUMBAR A.S. & GHOSE A.C. Evaluation of the biological properties of different classes of human antibodies in relation to cholera. *Infect. Immun.*, 1981, 32, 9-14.

- MANGOLD B.L. & DEAN D.A. Passive transfert with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J. Immunol.*, 1986, 136, 2644-2647.
- MANOHAR V., BROWN E., LEISERSON W.M. *et al* Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. *J. Immunol.*, 1982, 129, 532-536.
- MARIKOVSKY M., ARNON R. & FISHELSON Z. Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *J. Immunol.*, 1988b, 141, 273-278.
- MATHEW R.C. & BOROS D.L. Anti L3T4 antibody treatment supresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin 2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immunity*, 1986, 54, 820-826.
- MATHEW R.C., RAGHEB S. & BOROS D.L. Recombinant IL-2 therapy reverses diminished granulomatous responsiveness in anti-L3T4-treated, *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.*, 1990, 144, 4356-4361.
- MAYER L. Review article: Local and sytemic regulation of mucosal immunity. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 1997, 11, 3, 81-85.
- MAYER L. & SHLIEN R. Evidence for fuction of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 1471-1483.
- MAZANEC M.B., COUDRET C.L. & FLETCHER D.R. Intracellular neutralization of influenza virus by Immunoglobulin A antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 6901-6905.
- MAZANEC M.B., NEDRUD J.G. & LAMM M.E. Immunoglobulin A monoclonal antibodies protect against Sendai virus. *J. Virology*, 1987, 61, 2624-2626.
- MAZANEC M.B., NEDRUD J.G., KAETZEL C.S. *et al* A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today*, 1993, 14, 9, 430-434.
- MAZINGUE C., DESSAINT J.P., SCHMITT-VERHULST A.M. *et al* Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a schistosome-derived inhibitory factor is dependent of an inhibition of the production of interleukin 2. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, 1983, 72, 22-29.
- MAZINGUE C., STADLER B., QUATANNENS B. *et al* Schistosome-derived inhibitory factor: an immunosuppressive agent preferentially active on T-lymphocytes. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, 1986, 80, 347-354.
- MEGA J., BRUCE M.G., BEAGLEY K.W. *et al* Regulation of mucosal responses by CD4⁺ lymphocytes: effects of anti-L3T4 treatment on the gastrointestinal immune system. *Int. Immunol.*, 1991, 3, 8, 793-805.
- MERCOLINO T.J., ARNOLD L.W. & HAUGHTON G. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1 (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline : Relationship to cells that secrete antibody specific for autologous erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 1988, 168, 687-698.
- MESTECKY J. Secretory antibodies : molecular and cellular aspects. *In* *Immunité et tube digestif*. Paris : John Libbey Eurotext, 1992, p. 13.
- MESTECKY J. & MCGHEE J.R. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.*, 1987, 40, 153-245.
- MESTECKY J. & RUSSEL M.W. IgA subclasses. *Monogr. Allergy.*, 1986, 19, 277-301.
- METWALI A., ELLIOTT D., MATHEW R. *et al* IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *S.mansoni*. *J. Immunol.*, 1993, 150, 536-542.
- MIELCAREK N., CORNETTE J., SCHACHT A.M. *et al* Intranasal priming with a recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infection and Immunity*, 1997, 65, 2, 544-550.
- MINOPRIO P., COUNTINHO A., SPINELLA S. *et al* *Xid* immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Internation. Immunol.*, 1991, 3, 5, 427-433.
- MINOPRIO P., EL CHEIKH M.C., MURPHY E. *et al* *Xid*-associated resistance to experimental chagas' disease is IFN- γ dependent. *J.Immunol.*, 1993, 151, 4200-4208.
- MOND J.J., SCHAEFER M., SMITH J. *et al* Lyb-5-cells of CBA/N mice can be induced to synthesize DNA by culture with insolubilized but not soluble anti-Ig. *J. Immunol.*, 1983, 131, 5, 2107-2109.

MOORE D.L., GROVE D.I. & WARREN K.S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantification of cell population. *J. Pathol.*, 1976, 121, 41-50.

MORRISSEY P.J., BOSWELL H.S., SHER I. *et al* Role of accessory cells in B cell activation. IV. Ia⁺ accessory cells are required for the in vitro generation of thymic independent type 2 antibody responses to polysaccharide antigens. *J. Immunol.*, 1981, 127, 1345-1347.

MOSMANN T.R., CHERWINSKI H., BOND M.W. *et al* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 1986, 136, 2348-2357.

MOSTAFA M.H., BADAWI A.F. & O'CONNOR P.J. Bladder cancer associated with schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 1995, 11, 87-89.

MOSTOV K.E. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, 12, 63-84.

MOSTOV K.E. & BLOBEL G. A transmembrane precursor of secretory component. The receptor for transcellular transport of polymeric immunoglobulins. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 11816-11821.

MOSTOV K.E., FRIEDLANDER M. & BLOBEL G. The receptor of transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature*, 1984, 308, 37-43.

MOUNTFORD A.P., COULSON P.S., PEMBERTON R.M. *et al* The generation of interferon-gamma T lymphocytes in skin draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology*, 1992, 75, 250-256.

MURRAY P.D., MCKENZIE D.T., SWAIN S.L. *et al* Interleukin-5 and interleukin-6 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.*, 1987, 139, 2669-2674.

N

NARENDRA A., RAMSDEN D., CUMANO A. *et al* B cell developmental defects in X-linked immunodeficiency. *Int. Immunol.*, 1993, 5, 2, 139-144.

NDHLOVU P., CADMAN H., VENNERVALD B.J., *et al* Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community in Zimbabwe. *Parasite Immunol.*, 1996, 18, 181-192.

NEUTRA M.R. & KRAEHNBUHL J.P. Cellular and molecular basis for antigen transport in the intestinal epithelium. In *handbook of mucosal immunology*. San Diego : Academic press inc., 1994, p. 27.

NGAIZA J.R., DOENHOFF M.J. & JAFFE E.A. *Schistosoma mansoni* egg attachment to cultured human umbilical vein endothelial cells: an invitro model of an early step of parasite egg excretion. *J. Infect. Dis.*, 1993, 168, 6, 1576-1580.

NITISANI S., TSUBATA T., MURAKAMI M. *et al* Administration of interleukin-5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 3047-3052.

O

O'GARRA A. & HOWARD M. IL-10 production by CD5 B cells. In : *CD5 B cells in development and disease*. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 182-183.

OKA Y., ROLINK A., ANDERSON J. *et al* Profound reduction of mature B cell numbers, reactivities and serum Ig levels in mice which simultaneously carry the XID and CD40 deficiency genes. *Int. Immunol.*, 1996, 8, 11, 1675-1685.

OKAMOTO M., MURAKAMI M., SHIMIZU A. *et al* A transgenic of autoimmune hemolytic anemia. *J. Exp. Med.*, 1992, 175, 71-79.

OKAHASHI N., YAMAMOTO M., VANCOTT J.L. *et al* Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant Salmonella strain or cholera toxin reveals that CD4⁺ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 5, 1516-1525.

OSWALD I.P., ELTOUM I., WYNN T.A. *et al* Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3, 999-1003.

OWEN R.L., APPLE R.T. & BHALLA D.K. Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: Their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat. Rec.*, 1986a, 216, 521-527.

OWEN R.L., PIERCE N.F., APPLE R.T. *et al* M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: A mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J. Infect. Dis.*, 1986b, 153, 1108-1118.

P

PAGANELLI R., LEVINSKY R.J. & ATHERTON D.J. Detection of specific antigen within circulating immune complexes: validation of the assay and its application to food antigen-antibody complexes formed in healthy and food-allergic subjects. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, 46, 1, 44-53.

PANCRE V., WOLOCZUK I., BOSSUS M. *et al* Evaluation of the effect of Sm 28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis : interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Mol. Immunol.*, 1994b, 31, 1247-1256.

PANCRE V., WOLOCZUK I., GUERRET S. *et al* Protective effect of rSm 28GST-specific T cells in schistosomiasis : role of gamma interferon. *Infect. Immunity*, 1994a, 62, 3723-3730.

PANJA A., BLUMBERG R.S., BALK S.P. *et al* CD1d is involved in T cell-epithelial cell interactions. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 1115-1119.

PARKER C.M., CEPEK K.L., RUSSELL G.J. *et al* A family of $\beta 7$ integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 1924-1928.

PASQUIER L.D. *In* Fundamental immunology. ed. W. Paul, Raven Press, 1989, 139-165.

PEARCE E.J. Proselytizing with immunity. *Nature*, 1993, 363, 6424, 19-20.

PEARCE E.J., CASPAR P., GRZYCH J.M. *et al* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, 1991, 173, 159-166.

PEARCE E.J., CHEEVER A., LEONARD S. *et al* *Schistosoma mansoni* in IL-4-deficient mice. *Internat. Immunol.*, 1996, 8, 435-444.

PEARCE E.J., JAMES S.L., HIENY S. *et al* Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 1988, 5678-5682.

PECQUET S.S., EHRAT C. & ERNST P.B. Enhancement of mucosal antibody responses to *Salmonella typhimurium* and the microbial hapten phosphorylcholine in mice with X-linked immunodeficiency by B-cell precursors from the peritoneal cavity. *Infection and Immunity*. 1992, 503-509.

PETITPREZ K., KHALIFE J., CETRE C. *et al* Cytokine mRNA expression involved in the induction of a mucosal IgA response in the rat. 1998, soumis

PFÄFFENBACH G., LAMM M.E., & GIGLI I. Activation of the guinea pig alternative complement pathway by mouse IgA immune complexes. *J. Exp. Med.*, 1982, 155, 231-247.

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

PHILLIPS S.M., BENTLEY A.G., LINETTE G. *et al* The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. *In vivo* studies of resistance. *J. Immunol.*, 1983, 131, 1466-1474.

PIKE, M.C. Association, pid, miologique entre infection ... *Schistosoma haematobium* et cancer de la vessie. *Bulletin OMS.*, 1986.

PIRZER U.C., SCHURMANN G., POST S. *et al* Differential responsiveness to CD3-Ti vs. CD2-dependent activation of human intestinal T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1990, 20, 2339-2342.

PITT M.L. & ANDERSON A.O. Direct transdiaphragmatic traffic of peritoneal macrophages to the lung. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1988, 237, 627-632.

PLATOR-ZYBERCK C., BROWN C.M.S., ANDREW E.M. *et al* CD5⁺B in rheumatoid arthritis. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 540-550.

PLEBANI A., MIRA E., MEVIO E. *et al* IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective deficiency. *Clin. Exp. Immunol.*, 1983, 53, 3, 689-696.

Q

QIAO L., SCHURMANN G., AUTSCHBACH F. *et al* Human intestinal mucosa alters T-cell reactivities. *Gastroenterology*, 1993, 105, 814-819.

QIAO L., SCHURMANN G., BETZLER M. *et al* Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology*, 1991, 101, 1529-1536.

R

RABIN E., YING-ZI C. & WORTIS H.H. Loos of CD-23 is a consequence of B-cell activation. Implications for the analysis of B-cell lineages. *In* : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 130-142.

RAMSAY A.J., BAO S., BEAGLEY K.W. *et al* Cytokine gene knockout mice – Lessons for mucosal B-cell development. *In* Essentials of mucosal immunology. San Diego : Academic Press. Inc., 1996, p. 247.

RAMSAY A.J. & KOHONEN-CORISH M. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 3141-3145.

RAMSAY A.J., HUSBAND A.J., RAMSHAW I.A. *et al* The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo*. *Science*, 1994, 264, 5158, 561-563.

RAWLINGS D.J., SAFFRAN D.C., TSUKADA S. *et al* Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, 1993, 261, 358-361.

REMOUE F., POULAIN-GODEFROY O., MIELCAREK N. *et al* Local transient induction of inflammatory cytokines after intranasal administration of recombinant *Bordetella pertussis*. *Microbial Pathogenesis*, 1997, 22, 305-313.

RENAULD-MONGENIE G., MIELCAREK N., CORNETTE J. *et al* Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93, 7944-7949.

RENEGAR K.B. & SMALL JR. PA. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J. Virol.*, 1991a, 65, 2146-2148.

RENEGAR K.B. & SMALL JR.P.A. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J. Immunol.*, 1991b, 146, 1972-1978.

REYNOLDS S.R., SHOEMAKER C.B. & HARN D.A.T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1992, 149, 3995-4001.

RICHARD-LENOBLE D., KOMBILA M., DUONG T.H. *et al* Bilharziose à *Schistosoma intercalatum*, bilharziose récente et oubliée. *La Revue du Praticien*, 1993, 42, 432-439.

RIDDERSTAD A., NOSSAL G.J. & TARLINTON D.M. The xid mutation diminishes memory B cell generation but does not affect somatic hypermutation and selection. *J. Immunol.*, 1996, 157, 8, 3357-3365.

RIHET P., DEMEURE C.E., BOURGOIS A. *et al* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 11, 2679-2686.

RIHET P., DEMEURE C.E., DESSEIN A.J. *et al* Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4 revealed a new methodology in subjects from a *Schistosoma mansoni* endemic area. *Eur. J. Immunol.*, 1992, 22, 2063-2070.

RIZZO L.V., DEKRUYFF R.H., UMETSU D.T. *et al* Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 708-716.

ROBERTS M., BUTTERWORTH A.E., KIMAGI G. *et al* Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immunity*, 1993, 61, 4984-4993.

ROITT I.M., BROSTOFF J. & MALE D.K. *Immunology* 3rd ed. London: Mosby-Year Book Europe 1993.

ROLLIN C. Etude de différentes constructions d'intérêt vaccinal ou diagnostique dérivé d'une séquence peptidique issue de la protéine Sm28GST de *Schistosoma mansoni*. Thèse de doctorat en chimie organique et macromoléculaire. Lille I, 1995.

ROSA BRUNET L., FINKELMAN F. D., CHEEVER A.W. *et al* IL-4 protects against TNF- α mediated cachexie and death during acute schistosomiasis. *J. Immunol.*, 1997, 159, 777-785.

S

- SABIN E.A., KOPF M.A. & PEARCE E.J. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 1871-1878.
- SANTOS-ARGUMEDO L., LUND F.E., HEATH A.W. *et al* CD38 unresponsiveness of xid B cells implicates Bruton's tyrosine kinase (btk) as a regular of CD38 induced signal transduction. *Int. Immunol.*, 1995, 7, 2, 163-170.
- SATTERTHWAITE A.B., CHEROUTRE H., KHAN W.N. *et al* Btk dosage determines sensitivity to B cell antigen receptor cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 24, 13152-13157.
- SCHUSTER J. Pepsin hydrolysis of IgA Delineation of two population of molecules. *Immunochem.*, 1971, 8, 405-411.
- SEDER R.A., PAUL W.E., DAVIS M.M. *et al* The presence of interleukin-4 during *in vitro* priming determine s the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 1992, 176, 1091-1098.
- SHAW S.K. & BRENNER M.B. The beta 7 integrins in mucosal homing and retention. *Semin. Immunol.*, 1995, 7, 5, 335-342.
- SHER A., COFFMAN R.L., HIENY S. *et al* Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.*, 1990, 145, 3911-3916.
- SHER A., FIORENTINO D., CASPAR P. *et al* Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.*, 1991, 147, 2713-2716.
- SHER A., HALL B.F. & VADAS M.A. Acquisition of murine major histocompatibility genius products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, 1978, 148, 46-57.
- SHER A., JAMES S.L., CORREA-OLIVEIRA R. *et al* Schistosomes vaccines : current progress and future prospects. *Parasitology*, 1989, 98, 61-68.
- SHER I., AHMED A., STRONG D.M. *et al* X-linked B lymphocyte immune defect in CBA/HN mice. I. Studies of the function and composition of spleen cells. *J. Exp. Med.*, 1975, 141, 788-803.
- SHIMOTSUMA M., KAWATA M., HAGIWARA A. *et al* Milky spots in the human greater omentum. Macroscopic and histological identification. *Acta Anat. (Basel)*, 1989, 136, 3, 211-216.
- SHIRAI T., OKADA T. & HIROSE S. Genetic regulation of CD5+ B cells in autoimmune disease and in chronic lymphocytic leukemia. In: CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Houghton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 509-524.
- SHOEMAKER C., GROSS A., GEBREMICHAEL A. *et al* cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 1842-1846.
- SIECKMANN D.G., SCHER I., ASOFSKY R. *et al* Activation of mouse lymphocytes by anti-immunoglobulin II. A thymus-independent response by a mature subset of B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1978, 148, 1628-1643.
- SMINIA T., SOESATYO M., GHUFRON M. *et al* The migration of peritoneal cells towards the gut In: Advances in mucosal immunology. Ed. J. Mestecky *et al.*, Plenum Press, New-York, 1995, 61-65.
- SMITH T.J. & WEIS J.H. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. *Immunol. Today*, 1996, 17, 2, 60-63.
- SMITH T.J., DUCHARME L.A., SHAW S.K. *et al* Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity*, 1994, 1, 5, 393-403.
- SMYTHIES L.E., COULSON, P.S. & WILSON R.A. Monoclonal antibody to IFN- γ modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J. Immunol.*, 1992b, 149, 3654-3661.
- SMYTHIES L.E., PEMBERT R.M., COULSON P.S., *et al* T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1992a, 148, 1512-1518.
- SNAPPER C.M. & PAUL W.E. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987, 236, 944-947.

SOBHON P. The light and the electron microscopic studies of Peyer's patches in non germ-free adult mice. *J. Morphol.*, 1971, 134, 4, 457-481.

SOGANDARES-BERNAZL F. & BRANDT S. Antibodies sequestered in the liver granulomata of 8-week infection of CF mice by *Schistosoma mansoni*. Sambon 1907. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1976, 50, 331-334.

SOLVASON N., CHEN X., SHU F. *et al* The fetal osmentum in mice and humans. A site enriched for precursors of CD5 B cells early in development. *In*: CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 10-20.

SOLVASON.N., LEHUEN A. & KEARNEY J. An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int. Immunol.* 1991, 3,6, 543-550.

SONODA E., MATSUMOTO R., HITOSHI E. *et al* Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.*, 1989, 170, 1415-1420.

SPALDING D.M. & GRIFFIN J.A. Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell*, 1983, 44, 507-515.

SPENCER J., FINN T. & ISAACSON P.G. Expression of HLA-DR antigens on epithelium associated with lymphoid tissue in the human gastrointestinal tract. *Gut*, 1986, 27, 153-157.

STALL A.M., ADAMS S., HERZENBERG L.A. *et al* Characteristics and development of the murine B1b (Ly-1 B sister) cell population. *In*: CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 33-43.

STALL A.M., WELLS S.M. & LAM K.P. B1 cells: unique origins and functions. *In*: Seminars in Immunology / ed. M. Stall, S. M. Wells. UK: Academic Press, 1996, 8-1, 45-59.

STANTON T., STEVENS T.L. LEDBETTER *et al* Anti-Ly-1 antibodies induces interleukin 2 release from T cells. *J. Immunol.*, 1986, 136, 1734-1737.

STENGER R.J., WARREN K.S. & EVANS A.S. An unstructural study of hepatic granulomas and shistosome egg shells in murine *Schistosomiasis mansoni*. *Exp. Mol. Pathol.*, 1967, 8, 116-132.

STREET N.E., SCHUMACHER J.H., FONG T.A.T. *et al* Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bunk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.*, 1990, 144, 1629-1639.

SU S.D., WARD M.M., APICELLA M.A. *et al* The primary B cell response to the O/core region of bacterial lipopolysaccharide is restricted to the Ly-1 lineage. *J. Immunol.*, 1991, 146, 1, 327-331.

I

TAEDE S., SOESATYO M., GHUFRON M. *et al* The migration of peritoneal cells towards the gut. 1995, *Advances in Mucosal Immunology*. Edited by J. Mestecky *et al.*, Plenum Press, New York.

TAGUCHI T., MCGHEE J.R., COFFMAN R.L. *et al* Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that secrete IFN γ and IL-5. *J. Immunol.*, 1991, 147, 3736-3744.

TAKI S., SCHMITT M., TARLINTON D. *et al* T cell-dependent antibody production by Ly-1 B cells. *In*: CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 328-335.

TARAKHOVSKY A., MULLER W. & RAJEWSKY K. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 1678-1684.

TARGAN S.R., DEEM R.L., LIU M. *et al* Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J. Immunol.*, 1995, 154, 664-675.

TCHUEM TCHUENTE L.A. Change of mate and mating competition between males of *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni*. *Parasitology*, 1995, 110, 45-52.

TCHUEM TCHUENTE L.A., SOUTHGATE V.R., COMBES C. *et al* Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful. *Parasitol. Today*, 1996, 12, 231-236.

TENDLER M., BRITO C.A., VILAR M.M. *et al* A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93, 269-273.

THOMAS J.D., SIDERAS P., SMITH C.L. *et al* Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, 1993, 261, 355-358.

TOMANA M., NEIDERMEYEIER W., MESTECKY J. *et al* The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins. *Immunochemistry*, 1976, 13, 324-328.

TROTTEIN F., GODIN C., PIERCE R.J. *et al* Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992a, 54, 63-72.

TSUKADA S., SAFFRAN D., RAWLINGS O. *et al* Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*, 1993, 72, 279.

U

UNDERDOWN B.J. & DORRINGTON K.J. Studies on the structural and conformational basis for the relative resistance of serum and secretory immunoglobulin A to proteolysis. *J. Immunol.*, 1974, 112, 949-959.

V

VAJDY M., KOSCO-VILBOIS M.H., KOPF M. *et al* Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 1, 41-53.

VAN DE VELDE H. & THIELEMANS K. Native soluble CD5 delivers a costimulatory signal to resting human B lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 1996, 172, 84-91.

VAN DE VELDE H., VON HOEGEN I., LUO W. *et al* The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature*, 1991, 351, 662-667.

VAN DER HEIDJEN P.J., STOK W., & BIANCHI A. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total "background" immunoglobulin production. *Immunology*, 1987, 62, 551-555.

VAN DER HEIJDEN P.J., BIANCHI A.T.J., HEIDT P.J. *et al* Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine before and after weaning. *J. Reprod. Immunol.*, 1989, 15, 217-227.

VAN DER WAAIJ L.A., MESANDER G., LIMBURG P.C. *et al* Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry*, 1994, 16, 3, 270-279.

VAN VUGT E., VAN RIJTHOVEN E.A.; KAMPERDIJK E.W. *et al* Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat. Rec.*, 1996, 244, 2, 235-245.

VAUX D.L., LALOR P.A., CORY S. *et al* In vivo expression of interleukin 5 induces an eosinophilia and expanded Ly-1 B lineage populations. *Int. Immunol.*, 1990, 2, 10, 965-971.

VELLA A.T. & PEARCE E.J. CD4⁺ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J. Immunol.*, 1992, 148, 7, 2283-2290.

VELUPILLAI P. & HARN D.A. 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.*, 1994, 91, 18-22

VELLUPILAI P., SECOR W.E., HORAUF A.M. *et al* B-1 cell (CD5+B220⁺) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. *J. Immunol.*, 1997, 158, 1, 338-344.

VELUPILLAI P., SYPEK J. & HARN D. A. Interleukin-12 and -10 and gamma interferon regulate polyclonal and ligand-specific expansion of murine B-1 cells. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 11, 4557-4560.

VERWAERDE C., AURIAULT C., DAMONNEVILLE M. *et al* Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scan. J. Immunol.*, 1986, 24, 509-516.

VETRIE D., VORECHOVSKY I., SIDERAS J. *et al* The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein tyrosine kinases. *Nature*, 1993, 361, 226-233.

VIANA DA COSTA A., GAUBERT S., FONTAINE J. *et al* Murine *Schistosoma bovis* infection: analysis of parasitic and immune parameters. *Parasite Immunol.*, 1998, 20, 143-153.

VOGEL L.A., LESTER T.L., VAN CLEAVE V.H. *et al* Inhibition of murine B1 lymphocytes by interleukin-12. *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26, 219-223.

W

WAKATSUKI Y. & STROBER W. Effects of down regulation of germline transcripts on immunoglobulin A isotype differentiation. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 129-138.

- WALDSCHMIDT T., SNAPP K., FOY T. *et al* B-cell subsets defined by the FcεR. In : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 70-71.
- WARREN K.S., DOMINGO E.O. & COWAN R.T.B. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Pathol.*, 1967, 51, 735-756.
- WEINER H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today*, 1997, 18, 7, 335-343.
- WEINSTEIN P.D. & CEBRA J.J. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J. Immunol.*, 1991, 147, 12, 4126-4135.
- WEINSTEIN P.D., SCHWEITZER P.A., CEBRA-THOMAS J.A. *et al* Molecular genetic features reflecting the preference for isotype switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells. *Int. Immunol.*, 1991, 3, 12, 1253-1263.
- WELLS S.M., KANTOR A.B. & STALL A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, 153, 12, 5503-5515.
- WHITMORE A.C., HAUGHTON G. & ARNOLD L.W. Isotype switching in CD5B cells. In : CD5 B cells in development and disease. ed. L.A. Herzenberg, G. Haughton, K. Rajewsky. New York : Annals of the New York Academy of Sciences, 1992, 651, 143-151.
- WICKER L.S. & SCHER I. X-linked immune deficiency (*xid*) of CBA/N mice. *Cur. Top. Microb. Immunol.*, 1986, 124, 87-101.
- WIEST P.M. The epidemiology of morbidity of schistosomiasis. *Parasitol. Today*, 1996, 12, 215-220.
- WILLIAMS M.E., KULLBERG M.C., BARBIERI S. *et al* Fcε receptor-positive cells are a major source of antigen-induced interleukin-4 in spleens of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.*, 1993, 23, 1910-1916.
- WINNER L., MACK J., WELTZIN R. *et al* New model of analysis of mucosal immunity : intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect. Immun.*, 1991, 59, 977-982.
- WOLOWCZUK I. Détermination et analyse des épitopes T fonctionnels de l'antigène protecteur Sm 28GST du parasite trématode *Schistosoma mansoni*. Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lille I, 1991b.
- WOLOWCZUK I., AURIAULT C., BOSSUS M. *et al* Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm28 GST antigen in rat, mouse and monkey. Partial protection of Fischer rats after active immunization. *J. Immunol.*, 1991a, 146, 1987-1995.
- WOLOWCZUK I., AURIAULT C., GRAS-MASSE H. *et al* Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.*, 1989, 142, 1342-1350.
- WOODLAND R.T., SCHMIDT M.R., KORSMEYER S.J. *et al* Regulation of B cell survival in *xid* mice by the proto-oncogene *bcl-2*. *J. Immunol.*, 1996, 156, 6, 2143-2154.
- WORTIS H.H., TEUTSCH M., HIGER M. *et al* B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 8, 3348-3352.
- WYNN T.A., CHEEVER A.W., JANKOVIC D. *et al* An IL-12 based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*, 1995, 376, 1987-1995.
- WYNN T.A., ELTOUM I., CHEEVER A.W. *et al* Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 1993, 151, 1430-1440.
- WYNN T.A., ELTOUM I., CHEEVER A.W. *et al* Endogenous IL-12 regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 1551-1561.

X

- XU C.B., VERWAERDE C., GRAS-MASSE H. *et al* *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.*, 1993, 150, 940-949.

XU C.B., VERWAERDE C., GRZYCH J.M. *et al* A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 1801-1807.

XU-AMANO J., BEAGLEY K.W., MEGA J. *et al* Induction of T helper cells and cytokines for mucosal IgA responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1992, 327, 107-117.

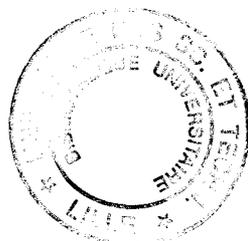
Y

YAMAMOTO M., FUJHASHI K., BEAGLEY K.W. *et al* Cytokine synthesis by intrainestinal epithelial lymphocytes. Both *gamma/delta* T cell receptor-positive and *alpha/beta* T cell receptor-positive T cells in the G1 phase of cell cycle produce IFN-gamma and IL-5. *J. Immunol.*, 1993, 150, 1, 106-114.

YAMASHITA T. & BOROS D.L. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J. Immunol.*, 1992, 149, 11, 3659-3664.

Z

ZIMECKI M. & KAPP J. Presentation of antigen by B cell subsets. II The role of CD5 B cells in the presentation of antigen to antigen-specific T cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 1994, 42, 349-353.



*Far away there in the sunshine are my highest aspirations,
I may not reach them, but I can look up and see their beauty,
believe in them and try to follow where they lead*

Louisa May Alcott (1832-1888)