

Université des Sciences et Technologies de Lille
Flandres-Artois

N° d'ordre:

Loïc DUPRE

**Thèse de Doctorat en
Sciences de la Vie et de la Santé
- Immunologie -**

**STRATEGIES DE VACCINATION ADN CONTRE LES
SCHISTOSOMIASES**

INSERM U167
Institut Pasteur de Lille

Présentée le 16 décembre 1998 devant la commission d'examen composée de:

Président	Pr. G. Spik
Rapporteurs	Dr. K. Huygen Dr. G. Inchauspé
Directeur	Pr. A. Capron
Examineurs	Pr. Y. Lemoine Dr. G. Riveau Dr. I. Wolowczuk



**Je dédie l'aboutissement de ce travail et de mes études
à mes parents, papa et maman, merci infiniment...**

**A mes soeurs Florence, Caroline et Valérie,
vous m'avez apporté tant de richesses !**

**A mes grands-parents, et à Léonie,
Un jour viendra où je serai
sabotier ou charron...**

A Josipa.

Remerciements

A Monsieur le Professeur CAPRON,

Merci de votre accueil au sein de votre laboratoire et de la confiance que vous m'avez accordée dès notre première entrevue. J'ai été particulièrement touché par votre chaleur humaine, votre enthousiasme toujours neuf et rayonnant et votre esprit visionnaire si brillant. Je vous suis enfin très reconnaissant d'avoir suivi pas à pas les progrès de mon travail, malgré vos journées bien remplies.

A Madame le Professeur SPIK,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider au jury de ma thèse.

A Madame le Docteur Kris HUYGEN,

Je vous exprime ma sincère reconnaissance pour vos critiques et commentaires constructifs. Merci beaucoup d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

A Madame le Docteur Geneviève INCHAUSPE,

Je vous exprime ma sincère reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci beaucoup d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Professeur Yves LEMOINE,

Vous avez été mon Professeur à l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg. Au-delà de vos connaissances sans bornes dans le domaine de la génétique, j'admire votre regard sur les avancées de la science.

A Mademoiselle le Docteur Isabelle WOLOWCZUK,

Tu as régulièrement suivi le déroulement de mon travail. Tes conseils et ton expérience m'ont aidé à forger ma propre personnalité de chercheur. Merci pour ton exemple.

A Monsieur le Docteur Gilles RIVEAU,

Je ne te serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces quatre riches années. Merci surtout pour ce merveilleux esprit de liberté que tu insuffles aux membres de ton équipe. Cet esprit est un message de vie qui place le métier de chercheur comme outil de développement personnel et intellectuel, qui situe le chercheur au coeur de la société. Merci Gilles, car la lumière du phare ne cessera de me guider.

A Larry, J'ai en quelque sorte suivi tes traces depuis nos études à Strasbourg. Notre amitié, sans aucun doute, a été profitable à une rencontre scientifique productive. Au-delà de cette amitié, j'apprécie en toi l'esprit de fonceur, le flair scientifique, ton efficacité au travail et ta grande honnêteté.

A Isabelle, J'ai énormément appris à ton contact notamment au cours de nos folles journées de culture cellulaire. Je souhaite ici te marquer mon respect pour ta droiture, ton calme, ta patience, et l'exemple de sincérité avec laquelle tu effectues tous les jours ce travail de petite fourmi.

Au Docteur Nigel Phillips et aux membres de son laboratoire, Merci de l'accueil que vous m'avez réservé à deux reprises à Montréal, ainsi que de vos compétences dans le domaine des liposomes.

Je tiens également à remercier **les personnes du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire** que j'ai côtoyées tout au long de mon parcours d'apprenti chercheur et qui m'ont apporté leur aide.

Ainsi, mes remerciements vont à **Josette Fontaine**, toi qui es toujours disponible et prête à apporter le service de tes doigts habiles et de ta connaissance biblique de notre modèle d'étude. Merci pour ce dévouement, ta gentillesse et ton grand cœur.

Le travail que je présente n'aurait jamais vu le jour sans le travail de l'équipe de l'animalerie emmenée par **Pierre Billaut** et animée en particulier par **Francis Lepage, Jean-Claude Deudon, Gilles Waroquier** et **Bruno Couvreur**, qui ont choyé près de 1000 rongeurs.

Je remercie chaleureusement toutes les dames de la laverie: **Danièle Fache, Nicole Braquehais, Patricia Delcroix, Marie-Andrée Drolez** et **Myriam Pollet** qui ont, entre autre, stérilisé plus d'une centaine de litres de milieu de culture pour la préparation de plasmides.

La base de mon travail repose entièrement sur l'entretien du cycle parasitaire dont s'est occupée l'équipe de choc constituée des adorables **Monique Leroux, Suzanne VanWingène, Michèle Courtois, Isabelle Roland** et **Anita Caron**. Merci de tout cœur!

Il a été si agréable de rendre visite aux secrétaires de charme pour une commande, un petit service ou même un petit bobo: merci à **Maria Houzé, Nadine Vantouroux, Charlotte Vincent, Monique Serry, Claudine Coulson** et **Nathalie Debruyne**.

Le développement et le tirage des photographies présentes dans ce manuscrit, ainsi que toutes celles qui sont venues illustrer mes articles, posters ou présentations, je les dois à la compétence énergique de notre reporter scientifique **Jean-Marc Merchez**; merci également à **Arnaud Waeghe**.

Je salue également le travail ordonné des gardiennes du savoir écrit, merci donc aux bibliothécaires **Jacklyn Derick** et **Chantal Kizonzolo**.

J'adresse un grand merci à ceux et celles qui m'ont plus particulièrement aidés: **Jean-Marie Grzych** et **Ray Pierce** pour la correction de mes articles, **Jacques Trolet** pour les maxi-preps, **Jean-Paul Papin** pour les tests d'ADCC, **Jean-Loup Neyrinck** pour les analyses statistiques, **Brigitte Quatannens** pour la cytométrie de flux, **Raphaële Neveu** pour les cultures de fragments de peau et **David Dombrowicz** pour la préparation de feuillets épidermiques.

Enfin, j'en arrive au noyau dur de l'équipe d'**Immuno-Pharmacologie Vaccinale** au sein de laquelle j'ai effectué ce travail. Il s'agit d'une équipe formidable animée par un réel esprit d'entraide et de stimulation réciproque.

Merci à **Nathalie Ivanoff**, toi qui est en fait la véritable initiatrice de ce projet de vaccination ADN et qui m'a mis sur les rails.

Merci à **Nathalie Mielcarek**, car ton caractère fait de douceur et de poigne mis au service de la recherche est un exemple à suivre.

Merci à **Odile Poulain-Godefroy** pour ton esprit cartésien qui m'a souvent évité de m'embarquer pour des manipulations trop bancales.

Merci à **Elisabeth Ban**, pour ta maturité conduisant à des expériences forcément fructueuses.

Merci à **Catherine Vendeville**, pour ta gentillesse et ton application minutieuse.

Merci à **Christelle Leportier** pour ta pêche d'enfer et mes premières saignées.

Merci à **Mohamed Mékranfar**, tu m'as tellement apporté, toi le grand-chef sous-marinier!

Merci à **Jean-Pierre Gazet**, sans toi je n'aurais jamais survécu au rythme fou des immunisations, infestations et perfusions.

Merci à **Florence Rivenet**, je te reprends en stage quand tu veux!

Merci à **Benoît Baras**, toi le quatre fois belge qui n'arrête pas de nous faire rire.

Merci à **Maxime Hervé**, grâce à ta venue tout s'est mis à marcher...depuis, c'est le délire (enfin, moins depuis que tu es au Sénégal).

Merci à **Franck Remoué**, toi l'homme du terrain, compagnon fidèle de nos délires explosifs et sacré soutien pour toutes ces dures journées de labeur.

Merci à **Anne-Marie Schacht**, tu es celle qui a au plus près suivi mon travail dans son ensemble avec, tous les jours, une si forte volonté d'aider et de tirer le maximum d'enseignements de nos expériences.

Enfin merci encore à **Gilles Riveau**, tu vois ton groupe s'est agrandi, mais son architecture abrite toujours et toujours plus un souffle magnifique, celui qui anime chaque membre de ton équipe et qui est l'élément moteur d'un travail consciencieux au service de l'homme et de sa santé.

Table des matières

<i>Abréviations</i>	<i>page 1</i>
<i>Cadres du travail</i>	<i>page 5</i>
<i>Introduction</i>	<i>page 11</i>
1. Les schistosomiasés	<i>page 13</i>
1.1. UN PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE	<i>page 13</i>
1.2. UNE RELATION DE COHABITATION HOMME/PARASITE	<i>page 14</i>
1.2.1. Historique	<i>page 14</i>
1.2.2. Notion de parasitisme	<i>page 15</i>
1.2.3. Schistosomes: classification	<i>page 15</i>
1.2.4. Spécificité d'hôtes	<i>page 17</i>
1.3. BIOLOGIE DES DIFFERENTS STADES PARASITAIRES	<i>page 18</i>
1.3.1. Cycle parasitaire	<i>page 18</i>
1.3.2. Miracidium et stade intra-mollusque	<i>page 18</i>
1.3.3. Cercaires	<i>page 20</i>
1.3.4. Schistosomules	<i>page 21</i>
1.3.5. Adultes	<i>page 22</i>
1.3.6. Œufs	<i>page 24</i>
1.4. PATHOLOGIES	<i>page 25</i>
1.4.1. Granulome	<i>page 25</i>
1.4.2. Fibrose	<i>page 25</i>
1.5. REPONSES IMMUNES DE L'HOTE	<i>page 27</i>
1.5.1. Résistance à l'infection: acquise ou innée?	<i>page 27</i>
1.5.2. Mécanismes de l'immunité concomitante	<i>page 28</i>
1.5.3. Mécanismes cellulaires	<i>page 29</i>
1.6. DIAGNOSTIC, SUIVI MEDICAL ET TRAITEMENT	<i>page 30</i>
1.6.1. Vers un diagnostic plus fin	<i>page 30</i>
1.6.2. Suivi médical de la pathologie	<i>page 31</i>
1.6.3. Traitement: le praziquantel	<i>page 31</i>
1.7. LE BESOIN D'UN VACCIN	<i>page 33</i>

2. Stratégies vaccinales contre les schistosomiases	<i>page 35</i>
2.1. PLUS DE 100 ANS DE VACCINATION	<i>page 35</i>
2.2. OBJECTIFS D'UNE VACCINATION CONTRE LES SCHISTOSOMES	<i>page 36</i>
2.2.1. Reproduction de l'immunité naturellement	<i>page 36</i>
2.2.2. Thérapie vaccinale anti-pathologie	<i>page 36</i>
2.3. APPROCHES CLASSIQUES	<i>page 37</i>
2.3.1. Modèles animaux	<i>page 37</i>
2.3.2. BCG	<i>page 38</i>
2.3.3. Cercaires irradiés	<i>page 38</i>
2.3.4. Extraits parasitaires (vers et oeufs)	<i>page 39</i>
2.3.5. Antigènes recombinants	<i>page 39</i>
2.4. CHOIX DE L'ANTIGENE SM28GST	<i>page 42</i>
2.4.1. Clonage	<i>page 42</i>
2.4.2. Les GST des schistosomes: homologues ou hétérogènes?	<i>page 42</i>
2.4.3. Distinction par rapport aux GST d'autres espèces	<i>page 43</i>
2.4.4. Expression au cours des stades, régulation	<i>page 44</i>
2.4.5. Fonctions	<i>page 45</i>
2.4.6. Immunogénicité de l'antigène Sm28GST	<i>page 46</i>
2.4.7. Réponses anti-GST dans les populations infectées	<i>page 47</i>
2.5. EFFICACITE DE L'ANTIGENE SM28GST	<i>page 48</i>
2.5.1. Réduction de la charge parasitaire	<i>page 48</i>
2.5.2. Inhibition enzymatique et baisse de la fécondité	<i>page 49</i>
2.5.3. Réduction des dommages hépatiques	<i>page 49</i>
2.6. APPROCHES VACCINALES AVEC LES GST	<i>page 50</i>
2.6.1. Approches vaccinales de première génération	<i>page 50</i>
2.6.2. Approches vaccinales de seconde génération	<i>page 51</i>
3. La vaccination ADN	<i>page 55</i>
3.1. PRESENTATION	<i>page 55</i>
3.1.1. Une révolution technologique basée sur un principe simple	<i>page 55</i>
3.1.2. De nombreux avantages et quelques interrogations	<i>page 56</i>
3.2. VACCINATION ADN: MODE D'EMPLOI	<i>page 59</i>
3.2.1. Elaboration d'un plasmide	<i>page 59</i>
3.2.2. Production et conservation	<i>page 60</i>
3.2.3. Voies d'injection	<i>page 62</i>
3.2.4. Modes d'injection	<i>page 63</i>

3.3.	MECANISMES	page 65
3.3.1.	Les mystères de la transfection <i>in vivo</i>	page 65
3.3.2.	Risques liés à l'introduction d'ADN	page 66
3.3.3.	Le paradoxe de la vaccination ADN	page 68
3.3.4.	Cinétique d'expression de l'antigène	page 70
3.3.5.	Synthèse intracellulaire et devenir de l'antigène	page 71
3.3.6.	Initiation de la réponse immune	page 72
3.4.	CARACTERISTIQUES DES REPONSES IMMUNES	page 73
3.4.1.	Une immunogénicité élargie	page 74
3.4.2.	Une réponse CTL puissante	page 74
3.4.3.	Un profil particulier lié à l'effet immuno-stimulant de l'ADN	page 76
3.4.4.	Immunité locale et immunité systémique	page 76
3.4.5.	Longévité et mémoire	page 77
3.5.	ETENDUE DES APPLICATIONS ET EFFICACITE	page 77
3.5.1.	Micro-organismes pathogènes	page 80
3.5.2.	Vaccination des nouveaux-nés	page 80
3.5.3.	Levée de tolérance	page 81
3.5.4.	Allergie	page 81
3.5.5.	Cancer	page 82
3.5.6.	Autoimmunité	page 82
3.6.	VARIANTES TECHNOLOGIQUES	page 82
3.6.1.	Outils de modulation du système immunitaire ou adjuvants génétiques	page 83
3.6.2.	Vaccination multigénique	page 84
3.6.3.	Vaccination génomique	page 84
3.6.4.	Vaccination ADN mosaïque	page 85
3.6.5.	Maîtrise des risques	page 85
3.7.	DE L'ADN NU A L'ADN VECTORISE	page 86
3.7.1.	Mise au point d'un ciblage des voies muqueuses	page 86
3.7.2.	Liposomes cationiques	page 87
3.7.3.	Liposomes multilamellaires	page 87
3.7.4.	Microsphères	page 87
3.7.5.	Cocheates	page 88
3.7.6.	Bactéries libres de plasmides	page 88
3.8.	STRATEGIE DE VACCINATION ADN CONTRE LES SCHISTOSOMIASES	page 88
3.8.1.	Intervention aux sites précoces de l'infection	page 88
3.8.2.	Une réponse à plusieurs composantes	page 89
3.8.3.	Vers un vaccin anti-pathologie	page 90

Objectifs généraux

page 91

Résultats	page 95
1. Construction et préparation des plasmides	page 97
1.1. RESUME	page 97
1.2. CLONAGE	page 98
1.3. METHODES PREPARATIVES	page 99
1.3.1. Rendement et qualité	page 99
1.3.2. Contamination par les endotoxines bactériennes	page 101
1.3.3. Conservation	page 102
1.3.4. Incidence de la conformation sur l'efficacité de la vaccination	page 103
2. Ciblage de l'expression de l'antigène aux sites de l'infection	page 105
2.1. RESUME	page 105
2.2. MISE EN OEUVRE D'OUTILS DE VECTORISATION	page 106
2.2.1. Liposomes multilamellaires neutres	page 106
2.2.2. Liposomes unilamellaires cationiques	page 107
2.2.3. Microsphères	page 110
2.2.4. Peptides	page 112
2.3. PARAMETRES DE LA VACCINATION	page 113
2.3.1. Voies	page 113
2.3.2. Doses	page 114
2.3.3. Nombre d'administrations	page 114
2.4. EXPRESSION DE L'ANTIGENE SM28GST AUX NIVEAU DU TRACTUS RESPIRATOIRE	page 115
<i>Article: DNA immunization to the respiratory tract with S. mansoni antigen-encoding plasmids</i>	page 115
3. Mécanismes d'induction de la réponse immune au niveau de la peau	page 131
3.1. RESUME	page 131
3.2. INDUCTION DE LA MIGRATION DES CELLULES DENDRITIQUES DE LA PEAU PAR LES SEQUENCES CPG	page 132
<i>Article: CpG motifs induce dendritic cell migration</i>	page 132
3.3. ROLE CENTRAL DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'INITIATION DE LA REPONSE IMMUNE APRES VACCINATION ADN INTRADERMIQUE	page 150
<i>Article: Central role of dendritic cells for the initiation of immune responses after intradermal DNA vaccination</i>	page 150

3.4.	IMPLICATION DE L'IMMUNITE LIEE A LA PEAU LORS DE L'ENTREE DES PARASITES	page 167
4.	Nature des réponses immunes induites	page 171
4.1.	RESUME	page 171
4.2.	IMMUNISATION DE RATS AVEC UN PLASMIDE CODANT POUR LA GLUTHATION S-TRANSFERASE DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> <i>Article: Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding Sm28GST</i>	page 172 page 172
4.3.	QUALITE DE LA REPOSE IMMUNE INDUITE PAR VACCINATION ADN Sh28GST: PARTICIPATION DU CORPS PLASMIDIQUE <i>Article: Participation of the plasmid backbone to the nature of the antibody response elicited by a DNA vaccine</i>	page 193 page 182
5.	Etude de l'efficacité de l'association vaccination ADN Sm28GST et chimiothérapie au Praziquantel	page 201
5.1.	RESUME	page 201
5.2.	CONTROLE DE LA PATHOLOGIE INDUITE PAR <i>S. MANSONI</i> PAR L'ASSOCIATION DE LA VACCINATION ADN SM28GST ET DU TRAITEMENT AU PRAZIQUANTEL <i>Article: Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and praziquantel treatment</i>	page 202 page 202
6.	Immunomodulation génique	page 225
6.1.	RESUME	page 225
6.2.	PROTECTION VIS-A-VIS D'UNE INFECTION A <i>S. MANSONI</i> PAR ADMINISTRATION COMBINEE DE PLASMIDES CODANT POUR LA SM28GST ET L'IL-18 <i>Article: Codelivery of Sm28GST- and IL-18-encoding plasmids confers protection against murine Schistosoma mansoni infection</i>	page 226 page 226
Discussion		page 247
1.	Vers une meilleure compréhension des mécanismes de la vaccination ADN	page 249
1.1.	INITIATION AU NIVEAU DE LA PEAU	page 249
1.1.1.	Type de cellules transfectées	page 249
1.1.2.	Séquences immuno-stimulatrices et migration des cellules dendritiques	page 249

1.1.3. Activité des CpG sur les capacités de présentation de l'antigène	page 250
1.1.4. Une seconde vague de cellules présentatrices de l'antigène	page 251
1.2. CARACTERISTIQUES DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE	page 252
1.2.1. Profil de la réponse: Th1 obligatoire?	page 252
1.2.2. Niveau de la réponse immune	page 253
1.2.3. Maintien de la réponse	page 253
1.2.4. Puissance de la mémoire	page 253
2. Faisabilité d'une vaccination ADN contre les schistosomiasés	page 255
2.1. MIMER L'INFECTION	page 255
2.1.1. Mise en place de la réponse immune	page 255
2.1.2. Immunité liée à la peau lors de l'infection	page 255
2.2. PROFIL DE LA REPONSE IMMUNE	page 256
2.2.1. Quel profil pour une protection?	page 256
2.2.2. Vaccination ADN et ADCC	page 257
2.2.3. Maturation de la réponse spécifique vers une production d'IgA spécifiques	page 258
3. Stratégies d'optimisation mises en œuvre	page 259
3.1. IMMUNO-CHIMIOThERAPIE	page 259
3.2. LE PRAZIQUANTEL COMME MODULATEUR DE L'IMMUNITE SPECIFIQUE	page 260
3.3. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE	page 260
4. Immunité anti-GST et mécanismes de protection contre les schistosomes	page 262
4.1. IMMUNITE ANTI-FECONDITE	page 262
4.2. UN DEFICIT NUTRITIONNEL DES VERS FEMELLES	page 262
4.3. IMMUNITE ANTI-VERMINEUSE	page 263
<i>Perspectives</i>	page 265
1. Stratégies de développement de la vaccination ADN contre les schistosomiasés	page 267

1.1.	ACCROISSEMENT DE L'EFFET ANTI-FECONDITE	page 267
1.2.	CROSS-REACTIVITES ENTRE GST	page 267
1.3.	APPROCHES MULTIVALENTES	page 268
	1.3.1. Approches ciblées	page 268
	1.3.2. Approches génomiques	page 269
1.4.	VACCINATION ADN ET GLYCOPROTEINES	page 269
2.	La vaccination ADN dans le contexte de la médecine moderne	page 271
2.1.	VECTORISATIONS ET CIBLAGES	page 271
2.2.	IMMUNOMODULATION	page 272
2.3.	AVENIR: RISQUES MAITRISES OU DERIVE?	page 273

Bibliographie

page 275

Publications et présentations personnelles

Résumés

Abréviations

a.a.	acide aminé
Ac	anticorps
ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	antigène
BALT	tissu lymphoïde associé au tractus bronchique
BCG	bacille de Calmette et Guérin
BET	bromure d'éthidium
CMH I	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CpG	séquence d'acides nucléiques cytosine et guanine
CTL	cytotoxic T-lymphocyte (lymphocyte T cytotoxique)
DMPG	dimyristoyl phosphatidyl glycérol
DPPC	dipalmitoyl phosphatidyl choline
DOPE	dioleoyl phosphatidyl ethanolamine
DOTAP	dioleoyl triméthylammonium propane
DTH	delayed-type hypersensitivity (hypersensibilité retardée)
GALT	tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal
GST	glutathion <i>S</i> -transférase
HIV	virus de l'immunodéficience acquise humaine
i.d.	intradermique
i.m.	intramusculaire
i.n.	intranasal
i.t.	intratrachéal
i.v.	intraveineux
ISS	séquence d'acide nucléique immuno-stimulatrice
LPS	lipopolysaccharide
NALT	tissu lymphoïde associé au tractus nasal
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PLG	poly (DL-lactide-co-glycolide)
PZQ	praziquantel
Sb28GST	glutathion <i>S</i> -transférase de 28kDa de <i>Schistosoma bovis</i>
Sh28GST	glutathion <i>S</i> -transférase de 28kDa de <i>Schistosoma haematobium</i>
Sj26GST	glutathion <i>S</i> -transférase de 26kDa de <i>Schistosoma japonicum</i>
Sj28GST	glutathion <i>S</i> -transférase de 28kDa de <i>Schistosoma japonicum</i>
Sm28GST	glutathion <i>S</i> -transférase de 28kDa de <i>Schistosoma mansoni</i>
SEA	Soluble Egg Antigens (préparation antigénique soluble d'oeuf)
SWAP	Soluble Worm Antigenic Products (préparation antigénique soluble de vers adultes)
Th	(cellule ou réponse) T helper

Cadres du
travail

Laboratoire d'accueil

Mon travail de thèse a été effectué à l'UNITE 167 de l'INSERM, à l'INSTITUT PASTEUR DE LILLE, sous la direction du Pr André CAPRON et sous la tutelle du Dr Gilles RIVEAU.

Les travaux menés par l'équipe du Professeur André Capron sur les interactions cellulaires et moléculaires entre les parasites schistosomes et leurs hôtes ont conduit, entre autres découvertes, à l'identification d'une famille de protéines parasitaires particulièrement prometteuses en termes d'applications vaccinales. Ainsi, la vaccination contre les schistosomiases avec les protéines enzymatiques de la famille des Glutathion *S*-Transférases (GST) des différentes espèces de schistosomes apparaît extrêmement efficace. Non seulement cette vaccination permet de réduire la charge vermineuse par des mécanismes immunitaires cellulaires dépendant d'anticorps spécifiques, mais elle permet également de réduire la fécondité des vers par un mécanisme qui semble être médié par des anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique des GST. Cette dualité fonctionnelle pourrait donc à la fois réduire le niveau d'infection, bloquer le développement de la pathologie liée au dépôt tissulaire des oeufs et affecter la transmission globale de la maladie.

L'expérience considérable acquise par le laboratoire avec ce modèle a conduit récemment à la mise en place d'essais cliniques visant, dans un premier temps, à tester chez l'homme l'inocuité et l'immunogénicité du candidat vaccinal Sh28GST (GST de 28 kDa de *Schistosoma haematobium*), puis à évaluer son efficacité en zones d'endémie. Cet axe de développement auquel j'ai eu le privilège de participer dans sa phase technologique (production des lots cliniques et évaluation de la toxicité chez l'animal), s'est dans une première phase concentré sur l'antigène Sh28GST sous forme de protéine recombinante.

Le choix de cet antigène a été guidé par les raisons suivantes: les vers de l'espèce *S. haematobium* apparaissent plus sensibles que ceux des autres espèces, et pourraient donc se révéler plus sensibles à l'effet d'une vaccination. En outre, l'espèce *S. haematobium* est responsable d'une forme vésicale de la schistosomiase, contrairement aux autres espèces responsables elles d'une forme intestinale de la maladie. Cette caractéristique permet de pouvoir réaliser des examens cliniques non-invasifs et fiables, nécessaires à l'évaluation de l'efficacité de ce vaccin. Le choix de la Sh28GST sous forme de protéine recombinante consiste en une première approche visant à évaluer l'efficacité de l'antigène chez l'homme sous sa pharmacopée la plus simple et la plus facilement évaluable. Mais la stratégie du laboratoire vise à développer une large gamme de vecteurs vaccinaux dans le but de les introduire dans les prochaines évaluations cliniques, avec pour principaux objectifs d'accroître l'efficacité du vaccin et de l'adapter aux contraintes de son terrain d'application. Ce dernier point implique notamment d'améliorer la thermostabilité du vaccin, de réduire le nombre d'administrations et de privilégier des voies d'administrations ne faisant plus appel à l'usage d'aiguilles.

Etat du sujet

Le projet d'initier une stratégie de vaccination ADN contre les schistosomiasés s'est donc inscrit dans cette démarche de développement de nouvelles formes de vecteurs vaccinaux. Les vecteurs en cours de développement au moment où ce projet a vu le jour comprenaient à la fois des vecteurs synthétiques (liposomes et microsphères) et des vecteurs recombinants vivants (BCG, *Bordetella pertussis*, *Lactococcus* et *Salmonella thyphimurium*). A l'époque, l'antigène modèle du laboratoire était la GST de 28 kDa de *S. mansoni* ; ainsi le travail de cette thèse a été entrepris avec cet antigène pour une question de cohérence. Cependant il faut noter qu'un travail complémentaire de vaccination ADN avec le candidat vaccinal Sh28GST a été abordé au cours de ce projet et à fait l'objet de l'encadrement de Maxime Hervé, alors étudiant en DEA.

Lorsque le travail a été initié en 1994 par le clonage du cDNA de la Sm28GST dans le vecteur d'expression eucaryote pRc/CMV (réalisé par Nathalie Ivanoff sous la tutelle du Dr Ray Pierce quelques mois avant mon arrivée au laboratoire), la vaccination ADN en était réellement à ses balbutiements et son efficacité n'avait été démontrée que dans le modèle du virus Influenza. Miser sur son développement vis à vis de parasites extracellulaires tels que les schistosomes relevait donc du défi. Mais à l'époque, on entrevoyait déjà les nombreux avantages liés à cette approche. La relative simplicité de développement, des coûts de production réduits et une grande thermostabilité des plasmides en faisaient une forme vaccinale de prédilection pour une application à des maladies des régions tropicales.

Collaborations

Le cadre de mon travail a par la suite franchi les portes de l'unité 167 de l'INSERM, puisque j'ai été reçu dans le laboratoire du **Dr Nigel PHILLIPS** de l'**UNIVERSITE DE MONTREAL** dans le but d'adapter la vaccination ADN aux voies muqueuses en développant des formulations liposomales. En effet, la vaccination contre les schistosomiasés par les voies muqueuses revêtirait des avantages déterminants: facilité d'administration (prise orale ou application nasale par aérosol), induction de réponses immunes au niveau des sites cruciaux de l'infection (peau, poumons et tractus intestinal ou urinaire) et profils de réponses marqués par les IgA, isotype prépondérant dans la protection vis-à-vis de la réinfection.

Le second axe de collaboration que j'ai eu l'occasion de mettre en place concerne la modulation génétique de réponses immunes dans le cadre d'infections naturelles ou en association avec des protocoles d'immunoprophylaxie. Le principe repose sur l'emploi de plasmides codant pour des molécules immunorégulatrices telles que les interleukines. Ainsi je présente dans ce mémoire une partie des travaux réalisés en collaboration avec le **Dr Laurent KREMER** (INSERM U447, INTITUT PASTEUR DE LILLE) sur les propriétés de l'IL-18 injectée sous forme de plasmide et sur la capacité de cet outil à moduler une immunité vis à vis d'infections à mycobactéries ou à *Schistosoma mansoni*. Ce travail a largement bénéficié des

compétences du **Dr Isabelle WOLOWCZUK** (CNRS URA 1854, INSTITUT PASTEUR DE LILLE), avec qui d'autre part un projet concernant l'implication de l'IL-7 dans la schistosomiase a également été amorcé. Ce projet vise à étudier l'effet de l'expression cutanée d'IL-7 (suite à l'administration d'un plasmide codant pour cette interleukine) dans un contexte d'infection naturelle à *S. mansoni*.

Enfin la phase de mise au point de cette approche vaccinale à laquelle je me suis attelé à permis à d'autres équipes de se lancer dans l'aventure en bénéficiant de ma modeste expérience. Il s'agit des équipes du **Dr Georges BAH**R (INSERM U167, INSTITUT PASTEUR DE LILLE) concernant le développement d'une vaccination multigénique contre HIV, du **Dr Dominique MAZIER** (INSERM U313, LA PITIE SALPETRIERE) concernant la construction de plasmides codant pour des séquences de *Plasmodium* et du groupe du **Dr Anne TSICOPOULOS** (INSERM U416, INSTITUT PASTEUR DE LILLE) concernant la construction de plasmides codant pour des allergènes.

Financements

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le soutien financier de l'INSTITUT PASTEUR DE LILLE, de la COMMUNAUTE EUROPEENNE (contrats IC18CT95-0013 et BIO4CT96-0374) et du FEDER (contrats OBJ2-96.3-01a-N49 et FRT96-1EC1011 Biologie-Santé). Ces recherches ont également été soutenues par l'INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE. Enfin j'ai bénéficié de l'attribution d'une bourse de l'INSTITUT PASTEUR DE LILLE.

Introduction

1. Les schistosomiasés

1.1. UN PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE

Les schistosomiasés (ou bilharziosés) constituent un groupe de maladies parasitaires touchant l'homme et de nombreuses espèces animales. Ces maladies sont contractées au contact d'eau douce hébergeant certains gastéropodes, vecteurs des formes larvaires des parasites. Les schistosomiasés sont causées par des vers du genre *Schistosoma* vivant aux dépens de leurs hôtes définitifs dans leur système sanguin. Il s'agit de maladies endémiques des régions tropicales et sub-tropicales qui touchent 74 pays. Ces maladies concernent 200 à 300 millions d'individus largement affaiblis par des infections chroniques qui peuvent se prolonger sur la vie entière. Il s'avère que les enfants en âge scolaire sont souvent les plus infectés, entraînant notamment des retards de développements intellectuel et physique. Environ 500.000 personnes meurent chaque année, suite à de graves lésions viscérales causées par les oeufs pondus par les parasites qui s'embolisent dans les tissus. Ainsi, les schistosomiasés représentent la deuxième classe de maladies endémiques en terme de décès après les paludismes.

Les moyens de lutte déployés par de nombreux programmes internationaux agissent à plusieurs niveaux complémentaires. Ils comprennent la sensibilisation des personnes accédant aux eaux contaminées pour limiter l'infection, ainsi que le développement d'équipements sanitaires afin que les personnes infectées n'effectuent pas leur déjections à proximité de l'eau, ce qui constitue la voie naturelle de transmission des oeufs. Cependant, ces contrôles et installations sanitaires ne sont pas suffisants pour éliminer l'endémie, notamment parce que l'homme n'est souvent pas le seul hôte vertébré capable de pérenniser ces parasitoses. L'emploi de mollusquicides pour éliminer les hôtes intermédiaires a été tenté, mais pose des problèmes de résistance et de risques écologiques. En outre, un paramètre difficilement maîtrisable concerne le caractère mouvant de ces infections, au gré de l'implantation des mollusques vecteurs et des déplacements de populations.

L'avancée majeure dans la lutte contre les schistosomiasés est venue de l'application massive d'une chimiothérapie efficace depuis 1975. Malgré tout, il apparaît que ce traitement, employé seul, ne permette pas de juguler ces parasitoses, essentiellement parce qu'il n'empêche pas la réinfection, la plupart du temps quotidienne. En complément des nombreuses approches mises en oeuvre, la mise au point d'un vaccin préventif constitue un objectif majeur auquel se sont attelés plusieurs groupes de recherche. Le sujet de cette thèse s'inscrit donc dans cette démarche.

L'objet de ce premier chapitre introductif est de présenter les efforts de recherche concernant la compréhension de l'adaptation des parasites à leur hôte et des mécanismes immunitaires que l'hôte développe naturellement au cours de l'infection. La compréhension de ces phénomènes est en effet essentielle pour concevoir un principe vaccinal efficace et une stratégie vaccinale intégrée à des moyens de lutte complémentaires.

1.2. UNE RELATION DE COHABITATION HOMME/PARASITE

1.2.1. HISTORIQUE

Les schistosomes possèdent une longue histoire de vie commune avec l'homme. En effet une maladie endémique chronique caractérisée par la présence de sang dans les urines et des troubles divers de la vessie était connue en Egypte et en Mésopotamie depuis des temps très anciens. Ainsi l'hématurie avait été décrite sur un papyrus retrouvé dans les ruines de la ville de Kahum (datant d'environ 1900 avant J.C.). D'autre part, le papyrus d'Ebers (environ 1500 avant J.C.) avait établi une relation directe entre le symptôme de l'hématurie et la présence de vers [Ebbel, 1927]. Les interprétations de ces papyrus sont rendues plausibles par l'établissement formel de l'existence du parasite sous forme d'oeufs calcifiés dans les reins de momies égyptiennes datant de 1250-1000 avant J.C. [Ruffer, 1910]. On retrouve les traces de la maladie par la description des troubles urinaires dans des écrits médicaux de l'époque médiévale en Egypte et à Babylone, puis au sein des troupes françaises lors des campagnes napoléoniennes en Egypte. Ce n'est finalement qu'en 1851 que Théodor Bilharz, au cours d'une autopsie réalisée au Caire, identifie au niveau des veines mésentériques l'agent causal de la forme urinaire de la maladie: *Distoma haematobium* [Bilharz, 1852]. Le nom de genre *Schistosoma* sera définitivement adopté en 1954 et le terme schistosomiase, plutôt que bilharziose choisi en 1966 par l'Organisation Mondiale de la Santé pour désigner la maladie.

Bien que l'existence d'oeufs à éperon terminal et d'oeufs à éperon latéral soit connue, on pensait suite à la découverte de Bilharz, que ces oeufs provenaient du même parasite *Schistosoma haematobium*. En 1898 Manson suggéra, sur les bases d'une distribution géographique différente, que la forme vésicale et la forme intestinale de la maladie étaient d'origine différente. En effet il identifia la présence d'oeufs à éperon latéral dans les selles d'un sujet des Caraïbes d'origine africaine [Manson, 1902]. Les années suivantes la forme intestinale de la maladie fût décrite à Porto Rico, au Brésil et au Venezuela. Sambon proposa alors le nom de *Schistosoma mansoni* pour le parasite produisant des oeufs à éperon latéral [Sambon, 1907].

La troisième forme de schistosomiase d'importance majeure chez l'homme est causée par *Schistosoma japonicum*. Les écrits les plus anciens faisant mention de cette forme de la maladie datent de 1847 au Japon [Fujii, 1847]. En 1904 Katsurada identifia l'agent causal de la maladie en isolant le parasite *Schistosoma japonicum* du système portal d'un chat [Katsurada, 1904].

C'est un peu plus tard qu'il est établi que la peau constitue la porte d'entrée des parasites [Fujinami *et al.*, 1909], cela venant confirmer les observations antérieures de Allen [Allen, 1888]. Enfin les travaux de Leiper menés au Japon et en Egypte ont permis d'aboutir à la description du cycle complet des schistosomes montrant clairement l'existence d'espèces distinctes de schistosomes, transmises par des gastéropodes appartenant à des sous-familles distinctes, et pénétrant par la peau sous une forme larvaire [Leiper *et al.*, 1915].

1.2.2. NOTION DE PARASITISME

Par définition, les parasites vivent aux dépens de leurs hôtes. Il ne faut pas y voir une forme de vie dégénérée puisque les parasites ont atteints des niveaux remarquables d'adaptation à leurs hôtes. D'une part les parasites doivent tirer leurs éléments nutritifs de leur hôte et ainsi les schistosomes utilisent pour leur métabolisme du glucose, du cholestérol, des acides gras et des facteurs de croissance dérivés de leur hôtes. D'autre part, une forme d'équilibre, ou vie en bonne entente, est atteinte pour que le parasite ne porte de préjudices trop importants à son hôte, qui pourrait signifier une perte de son habitat ou de sa niche écologique. Ainsi, de nombreuses maladies parasitaires sont tenaces (chroniques) et n'évoluent que lentement vers des formes graves.

En plus de l'utilisation à leurs fins de produits de leur hôte, des parasites tels que les schistosomes ont pu au cours de leur évolution commune avec leur hôte développer des mécanismes de communication extrêmement élaborés. Un véritable langage moléculaire s'établi donc entre le parasite et son hôte pour sentir l'environnement au cours de ses différentes phases de migration, mais également vis-à-vis des défenses immunitaires mises en jeu par l'hôte. A ce titre, beaucoup de parasites dont les schistosomes, semblent avoir mis en place un ensemble de stratégies fines visant à se prémunir des agressions de l'hôte (variation antigénique, camouflage avec des molécules de l'hôte, équipements enzymatiques pour détoxifier des composés oxydants,...) [Capron et al., 1995].

1.2.3. LES SCHISTOSOMES: CLASSIFICATION

Chez les helminthes, l'embranchement des plathelminthes ou vers plats représente sans doute l'un des groupes d'animaux les plus primitifs à présenter une symétrie bilatérale, caractéristique commune de toutes les formes animales évoluées. On se rend donc compte, au niveau de la classification, de la position charnière des schistosomes que l'on peut considérer comme appartenant aux plus évolués des organismes primitifs ou comme appartenant aux plus primitifs des organismes évolués. Ces parasites que l'on présente parfois comme de véritables monstres microscopiques sont en réalité des êtres vivants remarquablement évolués. Les schistosomes font partie des trématodes (du grec "avoir des trous" faisant référence à leurs ventouses bucale et ventrale) et se distinguent dans ce groupe de parasites par leurs sexes séparés (les autres helminthes sont hermaphrodites). Une phase de reproduction sexuée à lieu au sein de l'hôte définitif vertébré et une phase de reproduction asexuée se déroule dans un gastéropode constituant l'hôte intermédiaire. Les espèces du genre *Schistosoma* appartiennent à la famille des *Schistosomatidae* qui sont des parasites résidents du système sanguin des vertébrés et se nourrissant d'hématies. Dans cette famille, les femelles sont plus longues que le mâle et sont portées par celui-ci au sein d'une cavité ventrale appelée canal gynécophore (d'où le nom *Schistosoma* signifiant "corps séparé"). Seize espèces ont été décrites comme étant capables d'infecter les vertébrés en général, mais cinq sont principalement responsables des schistosomiasés humaines. Il s'agit de *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* et à plus faible titre de *Schistosoma mekongi*. Les caractéristiques des quatre espèces essentielles sont rassemblées dans le tableau suivant.

Comparaison des quatre principales espèces de schistosomes infectant l'homme

	<i>S. mansoni</i>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. intercalatum</i>	<i>S. japonicum</i>
VERS ADULTES	veines		veines	veines
localisation	mésentériques	plexus vésical	mésentériques	mésentériques
MALES				
longueur (mm)	6-13	10-15	11-14	10-20
largeur (mm)	1.10	0.90	0.30-0.40	0.55
testicules (nbre)	4-13	4-5	2-7	6-7
tubercules	gros	fins	fins	absents
FEMELLES				
longueur (mm)	10-20	16-26	10-14	20-30
largeur (mm)	0.16	0.25	0.15-0.18	0.30
ovaires (position)	avant	arrière	arrière	médiane
uterus (posit.,long.)	avant, très court	avant, long	avant, long	avant, court
oeufs (nbre/fem)	1-2	10-50	5-60	50-200
OEUFS				
forme	ovale	ovale	ovale	ronde
taille (µm)	61 x 140	62 x 150	61 x 176	60 x 100
éperon	latéral	terminal	terminal	latéral (réduit)
voie d'excretion	selles	urine	selles (et urine)	selles
nbre pondu/jour/fe.	100-300	20-300	150-400	3500
HOTE DEFINITIF (MAJEUR)	Homme, rongeurs	Homme	Homme, rongeurs	Animaux d'éle- vage (et homme)
HOTE INTERMEDIAIRE	<i>Biomphalaria</i>	<i>Bulinus</i>	<i>Bulinus</i>	<i>Oncomelania</i>

adapté d'après [Davis, 1996].

1.2.4. SPECIFICITE D'HOTES

Une caractéristique intrigante du choix d'hôtes des différentes espèces de schistosomes concerne le fait que la spécificité concernant l'hôte intermédiaire gastéropode est très stricte alors que celle concernant l'hôte définitif vertébré l'est beaucoup moins. Cependant, l'infection d'un grand nombre d'hôtes vertébrés doit être tempérée par la notion d'une susceptibilité à l'infection par une espèce de schistosomes très variable d'un vertébré à un autre. Ainsi l'homme et la souris de laboratoire sont des hôtes permissifs à *S. mansoni* alors que le rat de laboratoire est semi-permissif puisque l'infection à lieu sans toutefois aboutir à son terme et à la ponte des oeufs. A l'opposé, l'homme est résistant aux schistosomes aviaires dont l'infection est stoppée avant toute pénétration percutanée.

1.3. BIOLOGIE DES DIFFERENTS STADES PARASITAIRES

1.3.1. CYCLE PARASITAIRE

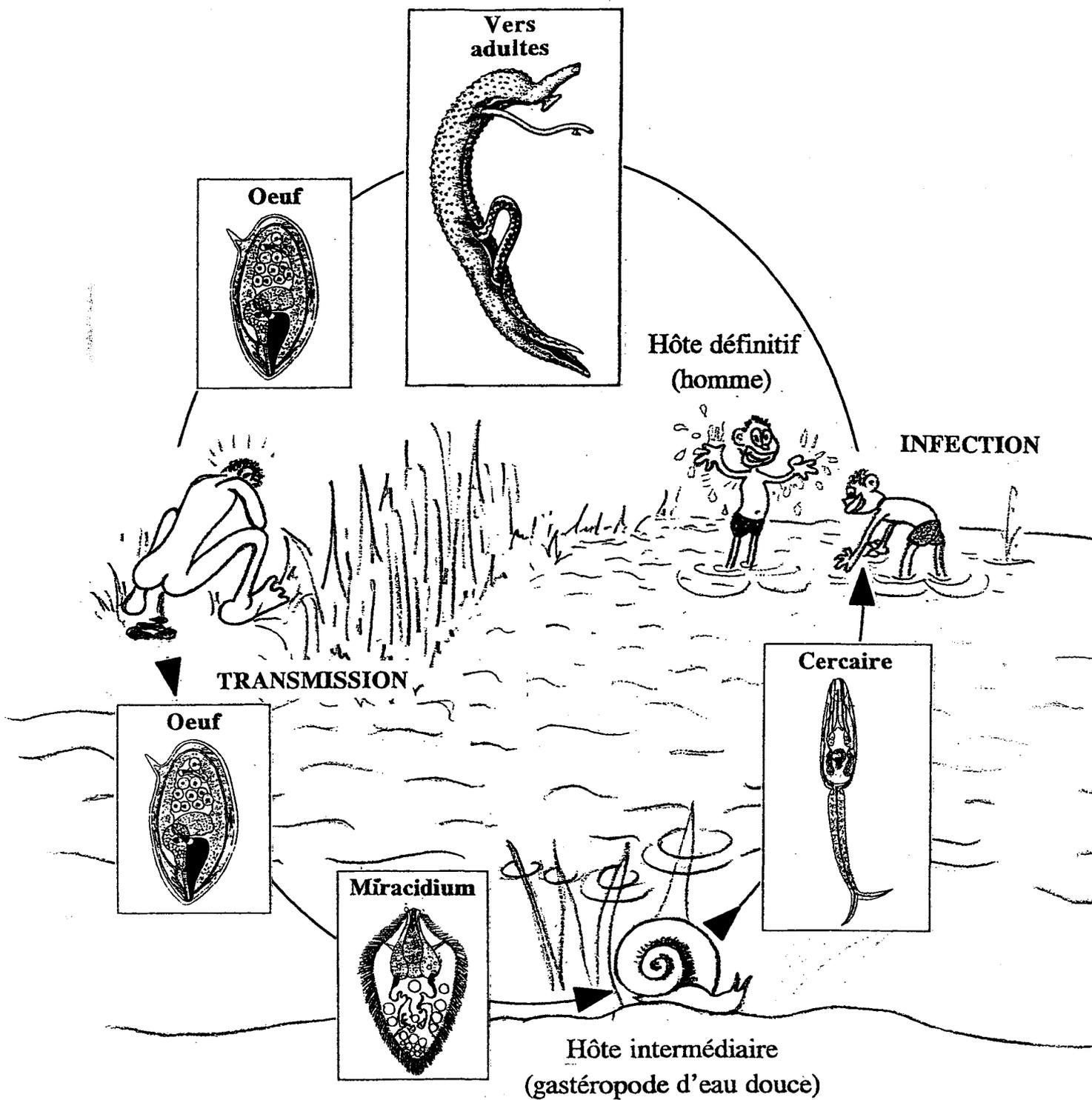
Les différentes espèces de schistosomes se perpétuent en établissant un cycle (schéma ci-contre) comprenant l'infection d'un hôte définitif vertébré de spécificité relative et celle d'un hôte intermédiaire, mollusque d'eau douce, très spécifique de l'espèce. Le milieu aquatique assure donc la transmission de ce cycle. L'hôte intermédiaire sert de support à la phase de reproduction asexuée conduisant en quelques semaines à la production de milliers de cercaires pour un miracidium ayant infecté le mollusque. Les cercaires constituent la forme larvaire infestante de l'hôte définitif. A la faveur d'un contact au niveau de l'eau, elles pénètrent activement par passage percutané. Chaque cercaire va maturer en un adulte sexué sans qu'il n'y ait de phase de multiplication. L'appariement par couples au sein du système sanguin conduit à la ponte de centaines d'oeufs par femelle et par jour et ceci perdurant pendant plusieurs années. Environ la moitié des oeufs s'implante dans les tissus hépatique ou vésical, ce phénomène étant à l'origine des manifestations pathologiques (Cf. schéma, paragraphe 1.4). L'autre partie des oeufs est excrétée via les selles ou l'urine et éclos au contact de l'eau pour libérer un miracidium capable d'infecter à nouveau un mollusque.

1.3.2. MIRACIDIUM ET STADE INTRA-MOLLUSQUE

Lorsque les excréments d'hôtes définitifs infectés se retrouvent au contact d'eau douce, les oeufs éclosent à des conditions bien précises de pH, de salinité, de température et de lumière. Ils libèrent une forme larvaire libre, le miracidium, capable d'infecter un gastéropode d'eau douce bien spécifique de l'espèce de schistosome (Cf. tableau, page 16). Cette spécificité semble être un facteur déterminant, de pair avec le déplacement des populations infectées, pour la distribution géographique des infections par les différentes espèces de schistosomes.

Les miracidiums mesurent environ 300 μm sur 100 μm et peuvent se mouvoir dans l'eau grâce à des cils vibratiles disposés sur l'ensemble de leur surface. En plus des cellules germinales primitives, ils comportent des cellules nerveuses et musculaires, un système d'excrétion et des glandes sécrétoires impliquées lors de la pénétration dans le gastéropode. La reconnaissance semble être guidée par des stimuli d'ordres sensoriel et chimique. Rapidement après la pénétration, les miracidiums se transforment en sporocystes primaires. Leur surface ciliée est remplacée par un tégument devenant l'interface avec l'hémolymphe pour les échanges métaboliques et jouant un rôle de protection contre l'action éventuelle des amébocytes (cellules immunes du gastéropode). La reproduction asexuée des cellules germinales commence. Par divisions cellulaires et différenciation, des sporocystes secondaires constitués de leurs propres cellules germinales ainsi que d'un appareil musculaire et nerveux se forme en l'espace d'une semaine. Ils sont expulsés du sporocyste primaire et rejoignent alors l'hépatopancréas ou les gonades du gastéropode pour y subir un second cycle de reproduction. Cette seconde étape donne finalement naissance à des cercaires qui s'échappent par l'hémolymphe et traversent la surface tégumentaire du gastéropode. On estime à plusieurs dizaines de milliers le nombre de cercaires identiques produits par miracidium, ce nombre semblant limité par le volume de ressources

Représentation schématique du cycle de *Schistosoma mansoni* avec les différents stades parasitaires



nutritives qu'offre l'hôte intermédiaire. En effet il est possible de transférer des sporocystes secondaires à un nouvel hôte permettant ainsi de maintenir un clone génétique particulier.

1.3.3. CERCAIRES

L'infection par les schistosomes a lieu lorsque la larve parasitaire (appelée cercaire ou furcocercaire parce qu'elle porte une queue bifide), sortant de mollusques aquatiques, parvient au contact de la peau de l'hôte définitif. L'émission des cercaires est génétiquement déterminée par le parasite et correspond aux heures de la journée où la probabilité de rencontre avec l'hôte particulier est la plus grande [Théron *et al.*, 1988]. Les cercaires sont déjà sexuées bien qu'on ne puisse pas le distinguer à ce niveau de développement. Des prémices du système digestif sont visibles mais n'entrent en fonction que plus tardivement. Les cercaires possèdent des cellules-flammes constituant un système d'osmorégulation. Les parasites passent en effet brutalement des tissus du gastéropode à un environnement aqueux, puis à l'environnement tissulaire compacte et complexe de l'hôte définitif. Ces cercaires possèdent un corps mesurant environ 125 μm sur 25 μm auquel est relié une queue mesurant 200 μm . Les cercaires se déplacent dans l'eau par des contractions rythmiques rapides de leur corps et de leur queue. Ils peuvent survivre une dizaine d'heures jusqu'à épuisement de leurs réserves en glycogène [Lawson, 80].

La première phase de l'infection consiste en un attachement à la surface de la peau par l'intermédiaire d'épines et de ventouses. Le changement morphologique le plus évident accompagnant cette phase est la perte de la queue. A partir de ce moment les jeunes parasites sont alors appelés schistosomules. Dans l'eau, les larves sont recouvertes d'un glycocalyx dense probablement impliqué dans la protection face au milieu aquatique puisqu'il est perdu au moment de la pénétration cutanée. Il se forme à leur surface une nouvelle membrane bicouche en réaction à l'accroissement de l'osmolarité. Le système nerveux semble être impliqué dans cette adaptation radicale au nouveau milieu que constitue l'hôte définitif. En effet, le sulfate d'ésérine, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, bloque les transformations de surface que subit la cercaire. La réorganisation de la surface des parasites est majeure puisque de nouvelles glycoprotéines y sont présentes, permettant notamment la liaison à la concanavaleine A.

La pénétration dans l'épiderme s'opère par des contractions musculaires et des mécanismes de sécrétion. Les parasites sont munis de glandes unicellulaires contenant notamment des protéases capables de dégrader l'élastine, la gélatine, la laminine, la fibronectine, la kératine, et les collagènes de type I, IV et VII [Wylér, 1990]. En outre, il semble que des prostaglandines et des acides gras provenant de l'hôte soient essentiels au mécanisme de pénétration [Hass *et al.*, 1987 ; Salafsky *et al.*, 1984]. La traversée de l'épiderme se fait dans un intervalle d'une trentaine de minutes, mais la migration est momentanément stoppée au niveau de la membrane basale qui constitue une formidable barrière. Au bout de 2 à 4 jours, les schistosomules parviennent finalement à traverser le derme et entrent dans des veinules post-capillaires ou des vaisseaux lymphatiques afférents [Wilson, 1988], d'où elles sont transportées vers les poumons.

Lorsque des cercaires tentent de pénétrer dans des hôtes non-adaptés, il arrive que l'infection soit totalement stoppée au niveau de la peau. C'est le cas de certains schistosomes

aviaires qui commencent à pénétrer dans la peau humaine, mais dont la migration ne dépasse pas le tissu conjonctif subdermal, au niveau duquel ils provoquent une réaction inflammatoire occasionnant une dermatite. Lorsque l'infection a lieu dans l'hôte définitif naturel, il apparait que 90% des parasites réussissent à traverser la peau pour aller rejoindre les poumons [Kamiya *et al.*, 1987 ; Knopf *et al.*, 1986 ; Mangold *et al.*, 1983]. La peau ne semble donc pas être de manière naturelle un site privilégié d'élimination des parasites. Pourtant des études histologiques montrent que la pénétration des parasites induit une réponse inflammatoire cutanée avec recrutement de neutrophiles et de monocytes [Lichtenberg *et al.*, 1976 ; Ward *et al.*, 1988]. Mais cette réaction semble être davantage liée à l'élimination des queues [Incari *et al.*, 1984] et aux composés répandus le long du trajet du parasite qui pourraient en partie correspondre aux restes du glycocalyx [Incari *et al.*, 1984 ; Pearce *et al.*, 1986].

1.3.4. SCHISTOSOMULES

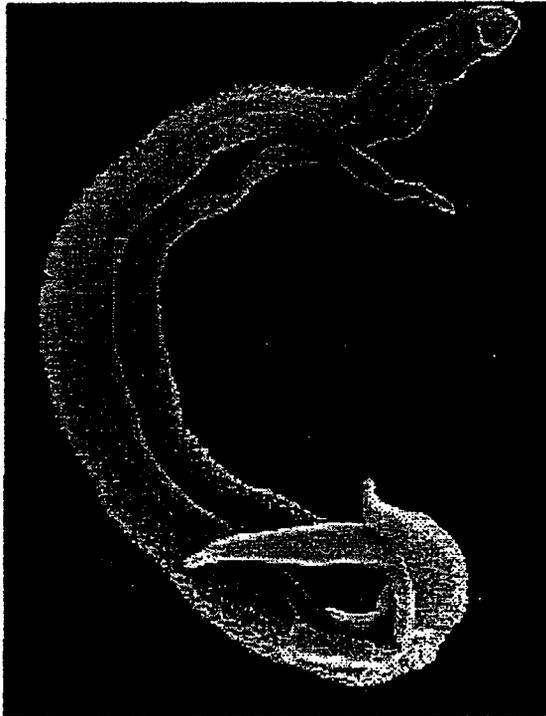
Lorsque les schistosomules se retrouvent dans le flux sanguin à la sortie de la peau, ils sont entraînés vers les poumons en passant par le coeur droit. De part l'importance de leur diamètre, ils sont alors stoppés pour une période d'environ 3 jours au niveau des étroits capillaires pulmonaires. Ils doivent remodeler leur morphologie en s'affinant par élongation pour pouvoir quitter les poumons. A ce niveau, il semble que le changement de morphologie s'accompagne de modifications de la musculature ainsi que de modifications de surface rendant les schistosomules peu sensibles aux attaques du système immunitaire. Une partie non négligeable (environ un tiers chez la souris) des parasites ne poursuit pas la maturation au delà des poumons. En effet, on commence à retrouver, après une dizaine de jours, une délocalisation de certaines schistosomules de l'espace intra-vasculaire vers les alvéolaires pulmonaires, sans qu'un retour à la circulation sanguine ne soit possible [Crabtree *et al.*, 1986]. Cette erreur de parcours pourrait être liée au blocage forcé de parasites possédant une forte musculature au sein d'un tissu très fin (la barrière sang-air ne mesure que de 0.1 à 0.2 μm). Consécutivement à la perturbation tissulaire occasionnée par cette partie des schistosomules, on retrouve une réaction cellulaire non spécifique constituée de polynucléaires et de cellules mononucléées.

Après leur passage obligé par les poumons, il semble que les schistosomules effectuent plusieurs passages par le coeur en passant par le système circulatoire d'organes variés. Pourtant, au bout de quelques jours, c'est au niveau des veines mésentériques et de la veine porte à l'entrée du foie que les parasites vont stopper leur migration pour finalement se sédentariser pour le reste de leurs jours. Cette localisation définitive, déterminée semble-t'il par le mâle, est vraie pour l'ensemble des schistosomes infectant l'espèce humaine à l'exception de *Schistosoma haematobium* qui s'installe lui au niveau du plexus veineux vésico-prostatique ou vésico-urétovaginal.

1.3.5. ADULTES

Les parasites mâles opèrent leur maturation sexuelle terminale en l'espace de quelques jours et ce n'est qu'à la condition de rencontrer et de s'accoupler avec un parasite mâle que la femelle peut atteindre sa pleine maturité sexuelle [Moore *et al.*, 1954]. Les femelles se logent dans le canal gynécophore des mâles et les jeunes couples se déplacent à contre-courant sanguin vers les branches veineuses.

Photographie de microscopie électronique d'un couple de *Schistosoma mansoni* adultes



Au bout d'environ 5 semaines d'infection, la ponte des oeufs commence et peut se poursuivre pendant une dizaine d'années ou plus, durée de vie estimée des parasites. Dans le cas d'infections mixtes à *S. haematobium* et *S. intercalatum* notamment, des couples hybrides peuvent se constituer, la localisation du ver mâle déterminant l'endroit de sécrétion des oeufs, alors que la forme des oeufs est elle déterminée par la femelle. Les organes distinctifs des schistosomes sont d'une part leur tégument, surface d'échanges pratiquement invisible au système immunitaire et spécialisé dans les communications avec l'hôte et dans les communications entre membres du couple, et d'autre part l'appareil de reproduction de la femelle, véritable usine à oeufs.

Tégument des vers adultes

Les parasites adultes vivent donc à l'état d'accouplement permanent dans le milieu sanguin accrochés aux endothéliums par l'intermédiaire de leurs ventouses ventrale et orale. La surface des parasites est constituée d'un tégument consistant en un syncytium avec des

connexions cytoplasmiques et des corps nucléaires sous-jacents un réseau de fibres musculaires. La surface extérieure, faite d'une membrane heptalaminaire, est parsemée de replis reliés à des canaux tubulaires probablement impliqués dans l'absorption des nutriments. En effet, bien que les schistosomes puissent ingérer des hématies par leur orifice oral, une partie importante des nutriments semble être absorbée via le tégument. Le tégument est en relation avec les organes digestifs (oesophage, caecum) par l'intermédiaire direct d'un parenchyme cellulaire dense. La surface des parasites mâles comporte de nombreux tubercules eux-mêmes parsemés de fines épines contrairement à la femelle qui présente un corps d'aspect plus lisse. Un facteur important pour comprendre la survie de plusieurs années des vers dans le milieu sanguin est la régénération perpétuelle de la surface tégumentaire, mécanisme sans doute crucial pour l'échappement à des processus d'attachement de cellules immunes. Ce mécanisme est de plus couplé à une composition moléculaire du tégument mimant de nombreux facteurs de l'hôte.

Mimétisme moléculaire et langage moléculaire

Au cours de sa transformation en adulte, il apparaît que le parasite se mette à exprimer des structures antigéniques et des molécules analogues à celles de son hôte. On ne sait toutefois si ces molécules sont transférées directement ou bien codées par le génôme du parasite. Cette seconde hypothèse pourrait résulter de transferts de gènes au cours de l'évolution notamment par l'intermédiaire de virus navettes entre l'hôte et le parasite. Ainsi, les parasites, avant d'atteindre leur maturité sexuelle, se recouvrent déjà d'un véritable costume moléculaire les rendant en quelque sorte invisibles aux réactions immunes de l'hôte et les dotant également de composés actifs capables d'interagir non seulement avec le système immunitaire, mais également avec le système hormonal de l'hôte [Capron, 1995]. Les schistosomes détournent et se recouvrent de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité [Sher *et al.*, 1978] et d'antigènes de groupe sanguin [Dean, 1974]. En terme de contrôle des réponses immunes de l'hôte, les schistosomes sont capables de produire de la β -endorphine, de l'adrénocorticotropine (ACTH) et de l'hormone de stimulation des mélanocytes (α -MSH). Ces trois neuropeptides conduisent à une immunosuppression des immunocytes de l'hôte intermédiaire et des monocytes de l'hôte définitif [Duvaux-Miret *et al.*, 1992]. En outre, ces parasites sont capables de contrecarrer l'action du complément en utilisant par exemple un inhibiteur du complément (SCIP-1) ou des protéases [Marikovsky *et al.*, 1988]. Des protéases sécrétées par le parasite sont également impliquées dans la lyse d'immunoglobulines pouvant se fixer sur des déterminants épitopiques de sa surface.

Système de reproduction

Les parasites mâles possèdent de 4 à 8 testicules reliés au pore génital par un canal collecteur. En ce qui concerne les femelles, le système de reproduction est très développé. En effet, chaque femelle peut pondre jusqu'à plusieurs centaines d'oeufs par jour. Il n'y a qu'un seul ovaire rempli de cellules à des stades variés de développement. La rencontre avec les spermatozoïdes a lieu à la partie proximale de l'oviducte. Le sexe est dicté par la femelle qui possède une paire de chromosomes hétérogamétiques. L'oeuf est constitué de l'oocyte et de plusieurs dizaines de glandes vitellines. La formation de la coque commence dans l'ootype avec le recouvrement par une sécrétion mucoïde, puis le déversement de granules des glandes vitellines épaissit petit à petit la coque. Le constituant majeur de la coque est la sclérotine, protéine tannée dérivant de composés phénoliques. Le métabolisme de la femelle est donc essentiellement tourné vers l'ovulation et la multiplication de cellules vitellines pour la

production des oeufs dont la masse produite chaque jour avoisine celle de la femelle elle-même. Le rôle du mâle est donc avant tout d'assurer un ancrage solide aux parois veineuses, et probablement, de fournir à la femelle des facteurs nécessaires à sa survie et à la stimulation de ses fonctions de reproduction. En effet, le contact étroit avec le mâle est nécessaire pour la maturation sexuelle ; il doit également l'être pour le maintien de l'union, car on ne retrouve jamais de femelles seules. Ainsi, en ce qui concerne l'acquisition de glucose qui se fait essentiellement par des transporteurs tégumentaires, il apparaît que 75% des besoins en glucose des vers femelles sont fournis par le mâle [Cornfold *et al.*, 1985]. La compréhension plus fine de la biologie de la reproduction chez les schistosomes permettrait sans doute le développement de nouvelles stratégies de lutte.

1.3.6. OEUFS

Le devenir des oeufs pondus est primordial puisqu'une partie est excrétée et pérenise ainsi le cycle parasitaire alors qu'une autre partie est entraînée par le flux sanguin et s'embolise dans le foie (cas de la plupart des espèces de schistosomes) ou la vessie (cas de *S. haematobium*) constituant ainsi l'origine des pathologies bilharziennes. Les oeufs des différentes espèces de schistosomes infectant l'homme sont de forme ovoïde et sont discernables de par la localisation différente de leur éperon typique (Cf. tableau page 16). Les oeufs vivants sécrètent au travers de leur coque de nombreuses molécules encore mal identifiées. Il semble toutefois qu'il s'agisse entre autres de protéases nécessaires à la traversée active de l'intestin ou de la vessie (cas spécifique de *S. haematobium*). Le passage au travers de ces organes s'accompagne d'une importante réaction inflammatoire qui semble être directement causée par les produits de sécrétion des oeufs, fortement inducteurs de cytokines proinflammatoires [Fallon, Communication orale Conférence Jacques Monod, 14-17 septembre 1998, Aussois, France]. Cette réaction inflammatoire de l'hôte apparaît nécessaire à l'excrétion, avec un rôle prépondérant du TNF- α [Amiri *et al.*, 1992]. Les oeufs sont donc finalement expulsés hors de l'organisme par les selles ou par l'urine.

Cependant, environ la moitié des oeufs pondus n'est pas excrétée vraisemblablement faute d'une localisation suffisamment en aval des parasites dans les veines. C'est en quelque sorte l'inefficacité partielle du mécanisme de sécrétion des oeufs qui est à l'origine des manifestations pathologiques graves des schistosomiasés. En effet les oeufs non-excrétés sont entraînés par le courant sanguin et se retrouvent piégés essentiellement dans le système capillaire du tissu hépatique (ou vésical pour *S. haematobium*). Dans ces organes, les oeufs font donc obstruction à la circulation sanguine. En outre, de part leur dépôt dans les tissus et de part les produits de sécrétion qui en émanent, les oeufs vont être à l'origine d'une réaction inflammatoire accompagnée d'une fibrose, aboutissant à des dommages tissulaires irréversibles. Dans une moindre mesure, des oeufs peuvent s'emboliser au niveau du système nerveux central, où ils peuvent alors entraîner des complications neurologiques rares et également au niveau des poumons, au niveau desquels ils peuvent entraîner une hypertension pulmonaire.

1.4. PATHOLOGIES

Bien que des réactions inflammatoires de type allergique (fièvre de Katayama) ou des dermatites réversibles sont parfois associées à des infections par les schistosomes, les principales manifestations pathologiques ne sont pas liées aux vers eux-mêmes, mais à la partie des oeufs non excrétés qui se retrouvent prisonniers dans les tissus de l'hôte (Cf. schéma, page suivante). En réalité la pathologie découle non pas de facteurs de virulence ou de toxines, mais des propres réactions de l'hôte conduisant à la formation de granulômes autour des oeufs et de fibrose pouvant conduire à la mort.

1.4.1. GRANULOME

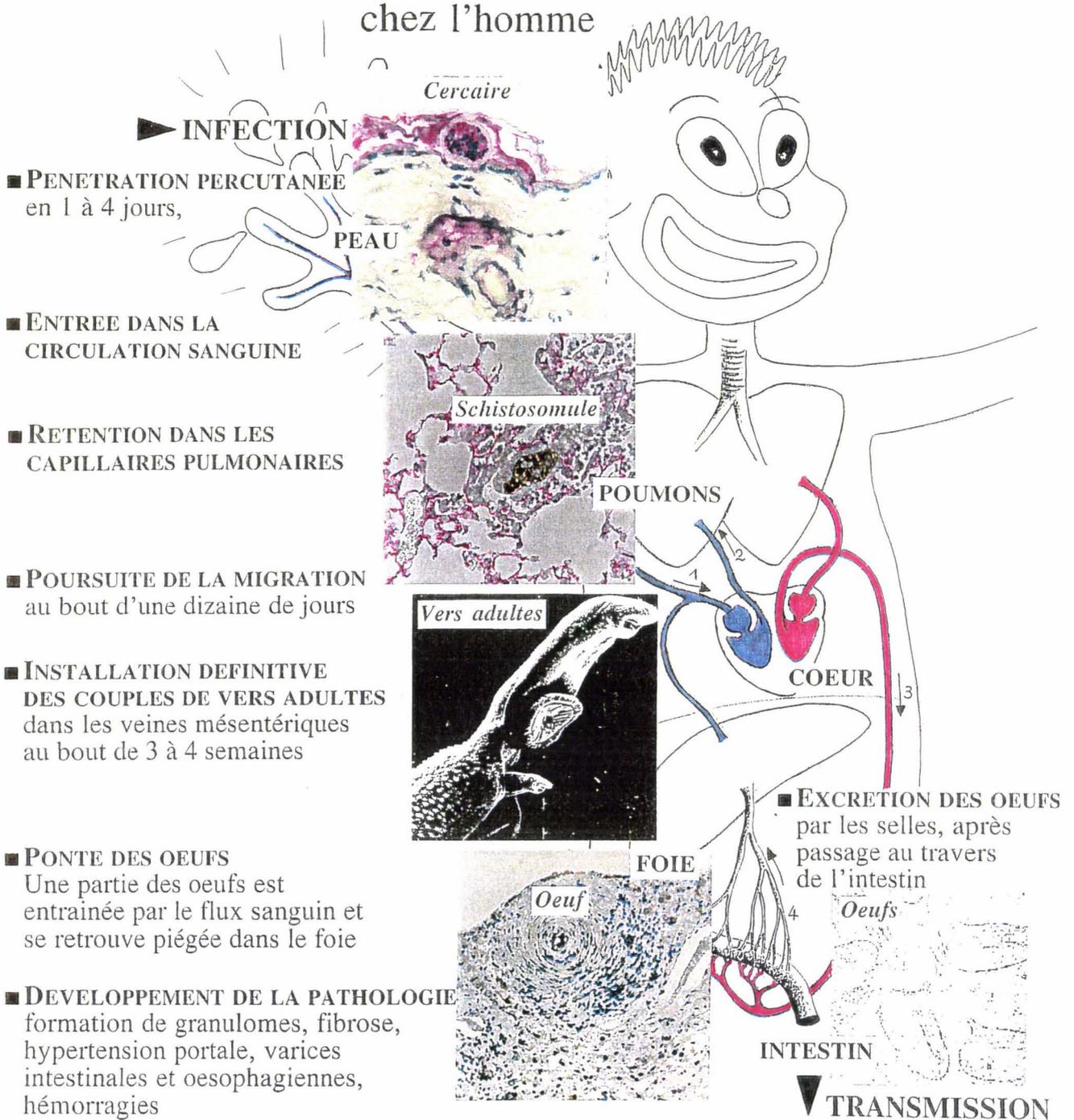
La réaction granulomateuse consiste en un infiltrat cellulaire composés de lymphocytes, de macrophages et d'éosinophiles. Cette réaction inflammatoire est en quelque sorte le parallèle de la réaction inflammatoire mise en oeuvre pour le passage au travers de l'intestin. Avec cette optique, on peut donc penser que la formation du granulôme est initiée par les produits de sécrétion des oeufs embolisés, puisque ces derniers restent vivants pendant quelques semaines. Il apparaît à première vue que la réaction du système immunitaire à l'implantation tissulaire des oeufs n'est que néfaste à l'hôte. Mais cette réaction est sans doute la moins mauvaise que l'hôte infecté puisse mettre en place. En effet, les réactions de l'hôte favorisent au maximum l'excrétion des oeufs au niveau de l'intestin, tout en régulant la formation des granulômes autour des oeufs embolisés. Ainsi, lors d'infections chroniques, il apparaît que la taille des granulômes hépatiques diminue, la réponse lymphoproliférative spécifique des antigènes d'oeufs est réduite et les facteurs de migration des macrophages et éosinophiles est également réduite. Il semblerait s'agir d'une immuno-régulation liée à une réponse cellulaire suppressive [Auriault *et al.*, 1996]. En outre, la formation du granulôme et la fibrose qui l'accompagne peuvent être considérés comme une barrière empêchant la diffusion à l'ensemble du tissu de composés toxiques de l'oeuf libérés lorsqu'il meure et entre en décomposition.

1.4.2. FIBROSE ET TABLEAU PATHOLOGIQUE

Le phénomène de fibrose tissulaire accompagnant la formation des granulômes peut être perçu comme une forme de cicatrisation tissulaire. Il semble que des facteurs chimioattractants des fibroblastes et des facteurs stimulant la synthèse de fibronectine et de collagène soient synthétisés par les cellules du granulôme. Pourtant, ce phénomène est directement impliqué dans les manifestations graves des schistosomiasés.

La fibrose conduit à l'obstruction de nombreuses veinules, générant notamment au niveau hépatique une hypertension portale, une hépto-splénomégalie, la formation d'ascites accompagnées de circulation colatérale, et enfin la formation de de varices oesophagiennes et intestinales pouvant dégénérer en hémorragies mortelles. Dans le cas de l'infection par *S. haematobium*, la fibrose, notamment autour des orifices des urêtres, peut entraîner une obstruction de ces derniers, des dysfonctionnements graves des reins et peut être accompagnée de

Etapes de l'infection par *Schistosoma mansoni* chez l'homme



développement de cancers de la région vésicale. Le contrôle du développement de la fibrose est mal connu, mais il semble qu'il y ait une modulation de l'étendue de cette fibrose au cours de l'histoire d'une infection, allant de pair avec une immunorégulation de la formation des granulômes. En outre, des facteurs indépendants de l'infection elle-même pourraient jouer un rôle important dans le développement de la fibrose puisque toutes les personnes sévèrement infectées ne développent pas toutes de fibrose massive. Ainsi, on suspecte le statut immunitaire de l'hôte, souvent perturbé par de nombreuses infections bactériennes, virales et parasitaires, mais également l'existence d'une prédisposition génétique.

1.5. REPONSES IMMUNES DE L'HÔTE

1.5.1. RESISTANCE A L'INFECTION: ACQUISE OU INNEE?

De l'ensemble des études épidémiologiques, il ressort nettement que le niveau d'infection mesuré par le nombre d'oeufs retrouvés dans les déjections varie nettement en fonction de l'âge ; ainsi, il augmente de manière importante au cours des premiers âges de la vie pour atteindre un maximum chez les individus âgés de 10 à 20 ans. Puis, au cours de l'âge adulte, le niveau d'infection décroît progressivement, alors que la prévalence reste sensiblement la même. En effet, d'après des études mesurant les temps de contact avec l'eau contaminée, il apparaît que ces fluctuations ne sont pas reliées à des comportements différents en fonction de l'âge. Ces différences d'intensité d'infection trouveraient en fait leur origine en grande partie dans une acquisition progressive, par des infections successives, d'une forme de contrôle immunologique du niveau d'infection.

Les arguments en faveur de la mise en place de tels mécanismes chez l'homme sont liés à l'observation des types d'anticorps (isotypes) naturellement développés contre les antigènes parasitaires totaux (SWAP) par les sujets infectés. En effet, les taux des immunoglobulines A (IgA) spécifiques des antigènes parasitaires augmentent avec l'âge et sont majoritaires au-delà de l'âge de 30 ans, c'est-à-dire chez les individus les moins infectés [van Dam *et al.*, 1996]. D'autre part il existe une corrélation nette entre certains profils de réponses immunes et une résistance à une réinfection après traitement. Ainsi, c'est le cas du taux sérique des immunoglobulines E (IgE) spécifiques des antigènes parasitaires, dans des études menées sur des foyers d'infection à *S. haematobium* [Hagan *et al.*, 1991], et à *S. mansoni* [Dunne *et al.*, 1992 ; Rihet *et al.*, 1991]. A l'opposé des IgA et des IgE qui semblent témoigner de l'acquisition naturelle d'une forme de résistance, les IgM [Butterworth *et al.*, 1987 ; Khalife *et al.*, 1986] et les IgG4 [Dunne *et al.*, 1992 ; Hagan *et al.*, 1991] semblent refléter une forme de susceptibilité. On peut donc penser que la classe d'anticorps et sa capacité à fixer des cellules par sa partie constante (Fc) va intervenir positivement ou négativement dans des mécanismes effecteurs. On considère ainsi que l'immunité acquise repose sur une balance entre une classe d'anticorps effecteurs et une classe d'anticorps bloquant les effet des premiers.

Il existe donc une évolution progressive de la sensibilité à l'infection au cours de l'âge corrélant à la maturation de réponses immunes spécifiques. Cependant, différents individus d'une même région endémique (à âge et contact avec l'eau équivalents) ne développent pas tous le même type d'équilibre avec l'infection parasitaire. Il semble qu'une forme de déterminisme génétique puisse au moins en partie expliquer ces différences entre individus. Il existe par exemple une corrélation entre la présence de certains marqueurs leucocytaires (molécules du complexe majeur d'histocompatibilité) et le développement ou non d'hépatosplénomégalias [Abdel-Salam *et al.*, 1979]. Plus récemment, l'équipe d'Alain Dessein a identifié un locus chromosomique relié à une résistance à l'infection à *S. mansoni* en étudiant la ségrégation de marqueurs chromosomiques de familles considérées comme résistantes [Marquet *et al.*, 1996]. La localisation de ce locus nommé Sm1, sur le chromosome 5q31-q33, laisse présager de la participation d'une ou de plusieurs molécules clés de l'orientation et la maturation des réponses immunes. En effet, cette région chromosomique comprend notamment les gènes de l'IL-4 et de l'IL-5, molécules clés dans la maturation de réponses anticorps IgE, et dont le rôle dans la protection contre les schistosomiasés a été établi [Couissinier-Paris *et al.*, 1995]. En outre, cette région 5q31-q33 a été reliée à un locus régulant les niveaux d'IgE [Marsh *et al.*, 1994] et à un locus contrôlant une réponse bronchique exacerbée dans l'asthme [Postma *et al.*, 1995].

L'implication d'un déterminisme génétique a été étendue au cadre du développement des formes graves de la maladie. Dans ce cas également, une région nommée Sm2, comportant notamment le gène du récepteur de l'IFN- γ a été identifiée [Dessein, Conférence Jacques Monod, 14-17 septembre 1998, Aussois, France]. Ce type de déterminisme génétique, contrôlant au moins partiellement les niveaux d'infection et les formes de pathologies développées, pourraient d'ailleurs se généraliser à l'ensemble des maladies infectieuses. L'identification de tels marqueurs génétiques pourraient s'avérer être une aide précieuse au développement d'approches vaccinales fines prenant en compte la modulation des réponses immunes.

En conclusion, des facteurs génétiques sont impliqués dans la capacité à contrôler le niveau d'infection. Ce contrôle fait intervenir une combinaison complexe de nombreux partenaires cellulaires et humoraux. Dans les infections par les schistosomes, il ne semble pas y avoir de sens strict à la notion de résistance ou de susceptibilité, du moins dans les populations non-traitées. Les facteurs génétiques vont donc davantage jouer sur la rapidité d'acquisition de cet équilibre ou sur le niveau de contrôle du niveau d'infection.

1.5.2. MECANISMES DE L'IMMUNITÉ CONCOMITANTE

Les bases mécanistiques qui permettraient d'expliquer la mise en place de l'équilibre visant à limiter le niveau d'infection ne sont pas encore élucidées chez l'homme. Dans ce domaine, les modèles animaux offrent la possibilité d'études très informatives.

Le rat de laboratoire est un hôte semi-permissif, contrairement à des espèces de rats sauvages qui sont des hôtes naturels de schistosomes. Cela signifie que chez le rat de laboratoire, l'infection a lieu sans qu'elle ne puisse parvenir à son terme. Les parasites ne se développent pas en adultes matures ; ils restent atrophiés et la ponte d'œufs n'a pratiquement jamais lieu. Le fait

remarquable est qu'une première infection avortée donne lieu à la mise en place d'une résistance vis-à-vis d'une autre infection. Ce phénomène est nommé immunité concomitante, car la cible des mécanismes immunitaire est exclusivement constituée des nouveaux parasites qui sont rapidement éliminés, alors que la population de parasites précédemment installée reste intacte. Ainsi, lors de leur maturation, les parasites de la première infection mettent en place une immunité, spécifique des stades immatures, qui devient pleinement efficace lors d'une seconde infection. Ces premiers parasites ont ainsi le temps de mettre en place leur mimétisme moléculaire avant que l'immunité qu'ils ont induits ne soit pleinement développée et effectrice. Ce type de protection naturelle observée chez le rat pourrait s'apparenter à l'immunité acquise chez l'homme après de multiples infections, à une échelle de temps bien plus longue. En effet, même dans des régions de forte endémicité, où des infections surviennent chaque jour chez un même individu, il semble que le nombre de parasites au sein d'un même individu ne dépasse pas un certain seuil (il serait de quelques dizaines de couples de vers chez l'homme).

Les mécanismes sous-tendants cette résistance du rat à des infections secondaires ont été étudiés en détails. Ils font appel à l'action combinée d'anticorps spécifiques d'antigènes du parasite et de cellules contenant des granules toxiques. Ces mécanismes sont regroupés sous l'appellation de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Seules certaines classes d'anticorps semblent être capable de médier l'ADCC. Il s'agit chez le rat des anticorps anaphylactiques IgG2a ainsi que des anticorps IgE. La découverte de la participation de ces classes particulières d'anticorps [Capron *et al.*, 1975 ; Capron *et al.*, 1981 ; Capron *et al.*, 1987] a montré, pour la première fois, la participation d'anticorps impliqués dans l'allergie, à des mécanismes bénéfiques pour l'individu. Cette découverte rapproche donc étroitement les pathologies allergiques des infections par les helminthes. A l'opposé, la classe d'anticorps IgG2c semble être capable de bloquer ces mécanismes d'ADCC [Grzych *et al.*, 1984]. Les partenaires cellulaires de ces réactions conduisant à la destruction des parasites immatures, sont les éosinophiles, les macrophages et les plaquettes [Capron, 1992]. Bien que l'on ne puisse vérifier la pertinence de ces mécanismes *in vivo* chez l'homme, il semble bien que des mécanismes analogues soient mis en jeu. En effet, comme rapporté précédemment, chez l'homme aussi, on retrouve la notion d'une dichotomie des classes d'anticorps: certains d'anticorps sont effecteurs (IgE) et d'autres d'anticorps sont bloquants (IgG4).

Un autre type de mécanisme, capable de tuer des larves de schistosomes *in vitro* et impliqué dans la résistance à l'infection d'animaux vaccinés par des cercaires irradiées, est l'action de macrophages activés [James *et al.*, 1987]. Des cytokines de type Th1 (IFN- γ , TNF- α) sont impliquées dans cette activation pour la production de NO, médiateur de la cytotoxicité [James *et al.*, 1989]. D'autre part, des mécanismes de destruction cytotoxique des larves par des anticorps fixant des facteurs du complément ont été proposés.

1.5.3. MECANISMES CELLULAIRES

La souris est plus particulièrement un modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires contrôlant l'infection par les schistosomes. Comme chez l'homme, le parasite effectue un cycle complet et les oeufs se localisent et s'accumulent dans les mêmes organes. Il faut

rapporter que même si des réponses de type ADCC ont été rapportées chez la souris [Ramalho-Pinto *et al.*, 1979], la puissance de ce mécanisme semble être limitée. Ceci pourrait être attribué au fait que contrairement à l'homme et au rat, les souris n'expriment pas de récepteur haute affinité aux IgE, c'est à dire que la reconnaissance de schistosomules par des IgE spécifiques pourrait s'avérer inefficace dans l'adhésion et l'activation d'éosinophiles ou autres cellules.

Dans ce modèle, on a pu mettre en évidence que le profil de la réponse cellulaire T était complètement modifié au moment de la ponte des oeufs. En effet, les cellules T stimulées dans la première phase de l'infection sécrètent majoritairement des cytokines de type Th1 inductrices d'une réponse cellulaire ou inflammatoire. Après la ponte des oeufs, cette réponse cellulaire spécifique se met à sécréter des cytokines opposées aux premières dans leurs activités: il s'agit des cytokines Th2 qui vont favoriser une réaction à médiation humorale [Grzych *et al.*, 1991 ; Pearce *et al.*, 1991]. En outre, la ponte des oeufs s'accompagne d'une production d'IgA à la fois systémique et locale (intestin) [Poulain-Godefroy *et al.*, 1996]. La formation des granulômes et leur régulation sont intimement contrôlées par des mécanismes cellulaires complexes. Le traitement avec des anticorps bloquant la fonction des CD4⁺ réprime la formation des granulômes [Mathew *et al.*, 1986]. La réaction de DTH médiée par les lymphocytes T CD4⁺ semble être maximale 8 semaines après le début de l'infection, puis est modulée par des lymphocytes CD8⁺ [Chensue *et al.*, 1981]. En parallèle, la puissante réponse de type Th2 qui s'installe dès le début de la ponte des oeufs est également graduellement régulée négativement par des cellules CD8⁺ utilisant l'IL-4 (Th2) pour leur stimulation, mais sécrétant des cytokines de type Th1 [Pedras-Vasconcelos *et al.*, 1996].

Chez l'homme, il apparaît que le développement d'une résistance à la réinfection après traitement est associée à des réponses cellulaires de type Th2 vis-à-vis des antigènes SWAP et SEA [Dunne *et al.*, 1995]. Un mécanisme d'anergie a été proposé pour expliquer la baisse de réactivité du système immunitaire (prolifération cellulaire après restimulation) chez les patients infectés de manière chronique. Il passerait par une action de contrôle des réponses cellulaires par l'IL-10 de manière à limiter les atteintes cliniques [King *et al.*, 1996].

1.6. DIAGNOSTIC, SUIVI MEDICAL ET TRAITEMENT

1.6.1. VERS UN DIAGNOSTIC PLUS FIN

Les méthodes de diagnostic reposent essentiellement sur l'examen des selles (Kato) et des urines (filtration urinaire) pour l'identification des oeufs excrétés. Le niveau d'infection est communément accepté comme étant à l'image du nombre d'oeufs par gramme de selle (ou par millilitre d'urine). Cependant, une variabilité importante peut être retrouvée entre des examens effectués à quelques jours d'intervalle. De plus, il s'avère que dans les évolutions graves de la maladie, le nombre d'oeufs retrouvés dans les déjections diminue largement, non pas parcequ'un nombre plus limité est pondé, mais parceque les mécanismes d'excrétion des oeufs semblent être altérés. D'autre part, la présence de certains antigènes, tels le CCA (Circulating Cathodic Antigen) et le CAA (Circulating Anodic Antigen), détectables dans le sang ou l'urine se révèlent

être de bons traceurs antigénique de l'infection [Deelder, 1989]. Enfin le nombre d'éosinophiles, et plus particulièrement le taux d'une de ces protéines nommés l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) corrélient avec l'intensité d'infection.

1.6.2. SUIVI MEDICAL DE LA PATHOLOGIE

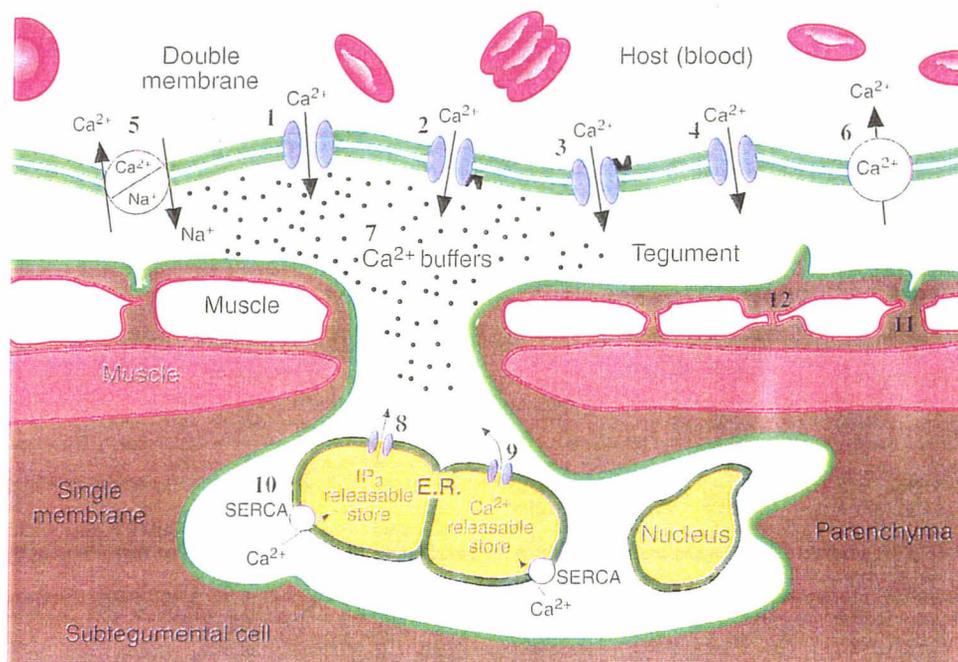
Lorsque la pathologie est installée, la détection d'une infection devient secondaire et des méthodes sont développées pour le suivi de l'évolution de la pathologie. Ce suivi médical repose essentiellement sur l'emploi de l'échographie permettant un suivi non-invasif de nombreux paramètres comme les épaissements des veines porte et splénique, la taille du lobe gauche du foie ou la mesure de lésions vésicale ou reinale. Il existe maintenant des dispositifs portables permettant d'évaluer directement, sur le terrain l'étendue des atteintes tissulaires au niveau du foie ou de la vessie.

1.6.3. TRAITEMENT: LE PRAZIQUANTEL

Mode d'action du praziquantel

Une des avancées les plus déterminantes en matière de lutte contre les schistosomiasés concerne la découverte de l'activité schistosomicide du praziquantel, molécule développée à l'origine comme anxiolytique par la compagnie Bayer [Andrews, 1985]. Son application massive depuis 1975 a permis de juguler en partie l'étendue des dégâts causés par les schistosomes, bien qu'il soit difficile de réaliser des estimations d'impact précises. L'oxamniquine et l'oltipraz ont également été introduites à la même époque, mais leur spectre d'action (diversité des espèces de schistosomes sensibles) est plus restreint. Le praziquantel présente l'avantage majeur d'être efficace le plus souvent en une seule dose par voie orale (40 mg/Kg) et vis-à-vis de toutes les espèces de schistosomes. En outre, ses effets secondaires sont limités. Cette molécule est une pyrazinoisoquinoline et seule la forme lévogyre est active. Le métabolite principal est également actif. La demi-vie dans l'organisme de ces molécules est courte, de l'ordre de 24 heures. En contrepartie, l'action sur les vers est quasiment immédiate. Le praziquantel agit directement sur les vers en provoquant des contractions musculaires et des dommages au niveau du tégument. Le mode d'action précis est mal connu, mais il semble que l'ensemble des atteintes portées aux vers le soit via un influx massif d'ions Ca^{2+} (Cf. figure ci-après). Cette action s'accompagne d'altérations du métabolite des vers comprenant une baisse d'incorporation de glucose, de relargage de lactate et des réserves de glycogène et d'ATP [Harder *et al.*, 1987].

Mode d'action du praziquantel



d'après [Redman *et al.*, 1996].

Action synergique avec les réponses immunes de l'hôte

De manière très intéressante, la pleine efficacité d'un traitement au praziquantel semble être dépendante de l'action conjuguée de réactions immunes de l'hôte. Ainsi, il a été constaté que dans des régions où les endémies à schistosomes ont récemment éclatées et où les individus n'ont pas eu le temps de développer une immunité protectrice naturelle, l'efficacité du praziquantel est réduite [Stelma *et al.*, 1995]. Des évidences directes de cette action combinée sont venues d'expériences chez la souris. Ainsi, chez des souris déprimées en cellules B, l'efficacité de la chimiothérapie est réduite de près de moitié [Brindley *et al.*, 1987]. Il en est de même de souris atymiques, donc sans cellules T [Sabah *et al.*, 1985]. Cette efficacité peut être restaurée par transfert passif à ces animaux de sérum immun ou bien d'immunoglobulines purifiées [Doenhoff *et al.*, 1987]. En outre, l'efficacité du praziquantel peut être augmenté dans des souris normales par transfert de sérum de lapin immunisé avec du SWAP de *S. mansoni* [Fallon *et al.*, 1995a]. Enfin, une action qualifiée de synergique a été décrite avec un nombre restreint d'antigènes comprenant la phosphatase alcaline [Fallon *et al.*, 1994b], l'estérase de 27 kDa [Doenhoff *et al.*, 1988] et une glycoprotéine de tubercule de 200-kDa [Brindley *et al.*, 1989]. Le principal mécanisme effecteur associé à cette synergie semble être dépendant de la présence d'anticorps capables de reconnaître des antigènes cryptiques à la surface des parasites qui ont été exposés suite à l'action du praziquantel.

Limites de la chimiothérapie au praziquantel

L'inconvénient majeur du traitement par le praziquantel est qu'il ne permet pas de prévenir la réinfection. Or en zone d'endémie, la réinfection a lieu pratiquement tous les jours. Ainsi, des oeufs sont retrouvés dans les selles en moyenne environ six mois après un traitement et rejoignent leurs taux initiaux au bout de 8 à 12 mois. Cette observation implique que le contrôle de l'infection par cette chimiothérapie nécessiterait plusieurs traitements par an pour être pleinement efficace. Bien entendu, ce type d'astreinte n'est pas possible à respecter dans beaucoup de pays pour des raisons de coût et de logistique. En outre, un nombre grandissant de rapports font état du risque d'émergence de formes de résistance [Fallon *et al.*, 1995b ; Stelma *et al.*, 1995]. Ainsi par exemple, chez certains patients une dose unique suffit à faire disparaître rapidement toute trace d'oeufs, alors que chez d'autres patients, trois doses successives sont nécessaires. Ces différences s'avèrent être indépendantes d'éventuelles différences de métabolisation du praziquantel [Ismail *et al.*, 1996]. L'isolement des oeufs de parasites présentant le profil résistant et l'établissement de cycles d'infection chez la souris a permis de confirmer l'existence d'isolats plus résistants à l'action vermifuge du praziquantel. En outre, l'emploi répété du praziquantel au cours de cycles d'infection chez la souris, a permis de générer des parasites résistants à partir de parasites sensibles [Fallon *et al.*, 1994a].

Toutefois, les doses et les fréquences d'utilisation du praziquantel chez l'homme sont considérablement réduites et il n'est pas certain que la pression de sélection soit suffisante pour sélectionner massivement les isolats les plus résistants, d'autant plus qu'au niveau de l'étape de multiplication sexuée qui a lieu chez l'hôte intermédiaire, aucune pression de sélection de la drogue ne s'exerce. Malgré tout, à la lumière des problèmes rencontrés dans le traitement des paludismes, il serait sans doute opportun que des compagnies pharmaceutiques concentrent quelques efforts dans la mise en place de programmes de recherche de nouvelles drogues qui pourraient, le cas échéant, venir remplacer le praziquantel.

1.7. LE BESOIN D'UN VACCIN

Les moyens de lutte utilisés jusqu'à maintenant pour tenter de juguler les schistosomiasés présentent tous des limites d'efficacité. Les programmes d'assainissement des eaux ou d'éducation des populations sont des efforts de longue haleine dont il est difficile de mesurer les effets concrets. Les moyens de lutte déployés vis-à-vis des vecteurs ne font que décaler géographiquement les zones d'infection. L'emploi massif du praziquantel depuis une vingtaine d'années a sans doute contribué de manière déterminante à une limitation des niveaux d'infection. Cependant, il apparaît utopique de penser que son utilisation puisse faire reculer significativement la maladie dans les régions de forte endémie. De ces limites de nos moyens d'intervention, il résulte que les schistosomiasés n'ont pas réellement régressé au cours des dernières décennies.

Dans son article d'introduction au numéro spécial de *Parasitology Today* consacré à la lutte contre les schistosomiasés, le Pr André Capron indique judicieusement qu'une victoire définitive dans "la Guerre contre le Ver" ne pourra résulter que de l'emploi de stratégies

multiples et intégrées, s'appuyant notamment sur des outils modernes de l'immuno-intervention prophylactique et/ou thérapeutique [Capron, 1998]. En effet, comme nous l'avons vu au cours des chapitres précédents, les réponses immunes de l'hôte jouent un rôle central dans nos stratégies de contrôle de l'infection et de la pathologie. La production des oeufs, la formation des granulômes, la gravité de la maladie, la résistance à la réinfection et même l'efficacité de la chimiothérapie avec le praziquantel, sont tous des mécanismes dépendant de facteurs immunologiques de l'hôte.

Il apparaît donc clairement que le développement d'une stratégie vaccinale intégrée aux autres moyens de lutte, et notamment à la chimiothérapie, constitue l'espoir principal pour le contrôle des schistosomiasés. L'objectif principal d'un vaccin sera de limiter le développement de la pathologie. Un vaccin pourrait donc agir directement au niveau des vers en les tuant au cours des premières phases de l'infection, en empêchant qu'ils ne puissent se développer jusqu'à l'âge adulte ou bien encore en enrayant le processus de ponte des oeufs. De manière alternative, un vaccin ou immuno-intervention pourrait jouer une fonction thérapeutique en régulant le développement de la pathologie tissulaire liée à la ponte des oeufs.

2. Stratégies vaccinales contre les schistosomiases

2.1 PLUS DE 100 ANS DE VACCINATION

Le principe de la vaccination repose sur l'administration d'une fraction d'un pathogène, ou d'un pathogène sous une forme ne provoquant pas la maladie, induisant des réponses immunes qui seront mises en mémoire et seront mobilisées lors de l'infection naturelle. Ce principe et son application remontent au moins à un millénaire avec l'inhalation d'extraits de pustules de malades atteints de la variole répendue en Chine. La variolisation n'a été introduite que tardivement en occident au XVIII^{ème} siècle. En 1776, Jenner entrepris de réaliser une vaccination plus systématique contre la variole en administrant des extraits de pustules variolaires bovins, tout aussi capables de conférer une résistance contre l'infection par la variole humaine.

Le terme de vaccination a réellement vu le jour il y a un peu plus d'un siècle avec les travaux de Pasteur qui pour la première fois pouvait cultiver les pathogènes au laboratoire et ouvrait ainsi la porte à leur modification et atténuation. Il entrepris d'attenuer des micro-organismes pathogènes par passages successifs dans des conditions particulières: vaccin contre la rage par passage chez le lapin, vaccin contre l'antrax par culture à température élevée, vaccin contre la tuberculose par repiquages successifs sur milieu de culture.

Un autre principe a vu le jour avec les travaux de Behring et Kitasato qui entreprirent d'utiliser la toxine diphtérique inactivée chimiquement ouvrant la voie des anatoxines, vaccins basés sur l'emploi d'un seul constituant du micro-organisme. Ce type de vaccins résulte donc d'une inactivation sélective du pouvoir toxique et pathogène avec une préservation de l'immunogénicité. Les vaccins anti-viraux ont été développés à partir du moment où l'on a su réaliser la culture de cellules dans les années cinquantes permettant ainsi le développement de la vaccination contre la poliomyélite par culture dans des cellules de rein de singe. Aujourd'hui, nous sommes entrés dans l'ère des vaccins recombinants s'appuyant largement sur les progrès de la biologie moléculaire. C'est ainsi le cas du vaccin contre l'hépatite B qui est basé sur l'antigène Hbs, synthétisé par des levures recombinantes.

La vaccination est certainement le meilleur moyen pour prévenir les maladies infectieuses, conduisant dans le meilleur des cas à une éradication complète de l'agent infectieux (variole). Toutefois, de sérieuses limites se posent aux chercheurs chargés de trouver de nouveaux vaccins efficaces contre des maladies anciennes ou émergentes, ou de développer des vaccins présentant moins d'effets secondaires que des vaccins existants. Un défi tout aussi important concerne la distribution de vaccins efficaces aux populations concernées, le plus souvent dans des pays du tiers-monde où des problèmes de logistique et de solvabilité existent. Grâce notamment aux efforts menés par l'OMS avec le programme EPI (Expanded Program for Immunization), la couverture vaccinale des enfants des pays en voie de développement vaccinés est passée de 5% à

plus de 60% en l'espace des dernières 20 années. En outre, les maladies infectieuses sont la plupart du temps associées et entretenues dans leur transmission à des problèmes d'hygiène et de malnutrition. Pour cette raison, les campagnes de vaccination ne peuvent être réellement efficaces que si elles sont accompagnées d'immenses efforts d'éducation et d'amélioration du cadre de vie.

Pour répondre aux difficultés rencontrées sur le terrain, les efforts de développement de vaccins se portent à l'heure actuelle vers l'objectif d'un vaccin multivalent, efficace vis-à-vis de plusieurs infections, délivrable en une seule dose par une voie d'administration non-invasive (orale ou nasale).

2.2. OBJECTIFS D'UNE VACCINATION CONTRE LES SCHISTOSOMIASES

2.2.1. REPRODUCTION DE L'IMMUNITE ACQUISE NATURELLEMENT

Le but de la vaccination serait d'induire, tôt dans la vie, une réponse immune protectrice de même nature que celle que développent certains adultes ayant acquis une forme de résistance après une longue histoire d'infection. Le but complémentaire de cette vaccination serait de favoriser, en terme de rapidité et de niveau, l'apparition de la réponse immune protectrice acquise. En effet, on doit tenir compte du fait que les enfants vaccinés resteront en contact étroit avec le parasite et ne manqueront donc pas de s'infecter et que l'espoir de développer une vaccination détruisant tous les parasites dès les premiers stades de l'infection paraît utopique. Le vaccin doit donc avoir pour partenaire obligé l'infection elle-même. Des simulations basées sur des algorithmes font apparaître qu'une réduction de moitié de la charge parasitaire serait suffisante pour, à la fois limiter le développement de formes graves de la maladie, et réduire grandement la transmission ; à condition toutefois que l'immunité protectrice soit prolongée [Chan *et al.*, 1997].

2.2.2. THERAPIE VACCINALE ANTI-PATHOLOGIE

Au delà de l'objectif de vouloir induire une immunité vis-à-vis de l'infection, le réel défi concerne le contrôle du développement de la pathologie. Cette approche repose sur l'identification de cibles moléculaires des parasites jouant un rôle important dans les processus de fécondation et de formation des oeufs. Ainsi par exemple, le docteur Loverde conduit une approche élégante visant à identifier, au niveau génétique, des gènes ou un pattern d'expression spécifique des vers adultes femelles qui pourraient correspondre à des éléments clés de la reproduction, de la ponte ou de la formation de l'oeuf. De telles molécules constitueraient ainsi des cibles idéales pour la chimiothérapie ou la vaccination [Bobek *et al.*, 1986] permettant d'aboutir à une stérilisation stoppant la transmission, sans toutefois empêcher le développement de l'immunité par rapport à l'infection. Le second axe de recherches, dans le cadre du contrôle de la pathologie, vise à mieux comprendre les relations étroites entre l'oeuf et la pathologie qu'il

engendre, afin de développer des stratégies d'immunorégulation au niveau du site de la pathologie.

2.3. APPROCHES CLASSIQUES

2.3.1. MODELES ANIMAUX

Les animaux de laboratoire classiquement utilisés en immunologie, les rats et les souris, répondent de manière totalement différente à l'infection. Le modèle de la schistosomiasé est certainement l'exemple d'une maladie pour laquelle il n'existe pas de modèle animal parfait. On s'appuie donc sur différents modèles desquels des informations complémentaires peuvent être rassemblées [Capron *et al.*, 1986]. Il s'agit d'une maladie chronique à évolution lente et ces caractéristiques essentielles sont difficilement reproductibles dans les modèles animaux. En outre, la mesure des niveaux d'infection est très lourde puisqu'elle nécessite une perfusion du sang et une digestion des organes des animaux infectés.

Souris

On utilise le modèle souris car le cycle du parasite s'y développe complètement. On pourra donc évaluer une efficacité vaccinale sur le nombre de vers et le nombre d'oeufs. En outre, les outils maintenant à disposition des chercheurs sont considérables. Ainsi, on dispose de souris transgéniques pour l'étude de la fonction de molécules régulatrices et d'outils moléculaires permettant de mesurer des réponses immunes extrêmement fines. Dans ce modèle, les profils de cytokines obéissent à une dichotomie Th1/Th2, qui aide à décrire l'induction des réponses immunitaires et leur évolution. Seulement, les limites du modèle souris sont que justement les réponses que développent les souris semblent relativement différentes de celles de l'homme. Il en est de même concernant les mécanismes effecteurs mis en jeu ; ainsi par exemple, le mécanisme d'ADCC semble être limité chez la souris puisque ces animaux ne possèdent pas de récepteur de haute affinité aux IgE.

Rats

Les rats de laboratoire sont des hôtes semi-permissifs à l'infection par les schistosomes. On ne peut pas les utiliser pour évaluer un effet sur les oeufs. Par contre, il s'agit d'un modèle de choix pour l'évaluation de l'immunité vis à vis des stades précoces de l'infection, faisant notamment intervenir les mécanismes d'immunité concomittante et d'ADCC.

Autres modèles animaux

Les singes se rapprochent davantage de l'homme, concernant notamment le degré de développement de leur système immunitaire ; il semble que le cycle parasitaire s'y développe d'une manière relativement comparable. Ces animaux constituent donc un modèle de choix pour des études d'essais précliniques. Enfin, il est possible d'utiliser d'autres modèles correspondant à des animaux infectés naturellement. Il s'agit par exemple du cas de l'infection par *S. japonicum*, dont le foyer majeur d'infection est constitué par des animaux d'élevage.

2.3.2. BCG

L'utilisation d'immunostimulants puissants tels que le BCG est capable de conduire à une forte protection de souris vis-à-vis de l'infection à *S. mansoni* [Bout *et al.*, 1977]. Même si des spécificités antigéniques semblent réagir de manière croisée, il semble bien que ce mécanisme de protection puisse être, au moins en partie, dépendant de toute spécificité antigénique. En effet une part importante de l'effet immunostimulant de bactéries ou d'extraits bactériens provient de l'ADN comportant des séquences immunostimulatrices [Pisetsky, 1996]. Il est envisageable que l'utilisation de telles séquences puissent, à elles seules, exercer une protection vis-à-vis de l'infection, comme cela a été récemment démontré dans le modèle de l'infection murine par *Leishmania* [Zimmermann *et al.*, 1998].

2.3.3. CERCAIRES IRRADIÉS

La vaccination de souris par des cercaires irradiés fournit un modèle riche d'enseignement même si son application chez l'homme est difficilement envisageable. L'efficacité de ce modèle particulier résiderait dans le fait que les parasites irradiés avec une dose optimale de rayonnements gamma présentent une cinétique de migration ralentie par rapport aux parasites habituels. Ce retard de migration engendrant un séjour prolongé au niveau de la peau et de ses ganglions drainants, ainsi qu'au niveau des poumons, serait à l'origine d'une induction, alors possible, de réponses immunes spécifiques capables d'être mobilisées rapidement lors d'une infection d'épreuve. Dans ce modèle efficace, les poumons constituent le site majeur d'élimination des parasites [Mastin *et al.*, 1983]. En effet, les parasites d'épreuve sont piégés au niveau des poumons par une réaction lymphocytaire inflammatoire (85% de cellules mononucléées comprenant essentiellement des lymphocytes CD4⁺). Ils sont bloqués dans leur migration et finissent leur course au niveau des alvéoles pulmonaires (comme une proportion minoritaire de parasites d'une primo-infection) sans paraître être touchés par des mécanismes cytotoxiques. Une hypothèse est qu'il seraient alors expectoriés. Montford a élégamment démontré que cette immunité protectrice était associée aux événements suivants: induction au niveau des ganglions drainant la peau de lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN- γ et d'IL-3 et recrutement de ces cellules au niveau des poumons lors de l'infection d'épreuve [Montford *et al.*, 1992]. Ces résultats mettent en relief le fait que les schistosomes constituent des cibles mouvantes pour le système immunitaire et qu'un relais entre des sites inducteurs (peau) et des sites effecteurs (poumons) de l'immunité sont primordiaux. Le rôle essentiel dans l'acquisition de cette immunité des organes lymphoïdes rattachés à la peau a été démontré par des expériences d'ablation de ces ganglions conduisant à une perte de l'efficacité protectrice ; de même une infection non-percunaneée ne semble pas être en mesure de rappeler cette réponse immune protectrice.

A la lumière de ces expériences, la peau apparaît donc être un des sites les plus attrayants pour l'induction de réponses immunes vis-à-vis des schistosomes. En effet, même si ce site ne constitue pas un site d'attrition majeur dans les modèles étudiés, il semble être primordial lors d'une infection d'épreuve pour alerter précocement le système immunitaire sensibilisé. Cette notion de rapidité de reconnaissance et d'alerte est en effet essentielle car le parasite est une cible mouvante et changeante. Une question importante reste à élucider et elle dépasse de loin le seul

modèle de l'infection par les schistosomes: la peau dispose t'elle d'un relais immunologique sur l'ensemble de sa surface? Autrement dit la mémoire immunologique associée à ce tissu est t'elle spécifique d'un site restreint ou bien est-elle redistribuée sur l'ensemble de la vaste surface cutanée?

2.3.4. EXTRAITS PARASITAIRES (VERS ET OEUFS)

Il est possible de préparer des extraits antigéniques solubles des différents stades de maturation du parasite: fraction d'antigènes solubles de furcocercaire, de schistosomules (obtenus par passage au travers d'une peau isolée tendue sur du milieu de culture ou par traitement mécaniques conduisant à la perte de la queue et du glycocalyx), d'adultes (SWAP) et d'oeuf (SEA). Des résultats de vaccination assez variables ont été obtenus avec ces différentes préparations. Le meilleur résultat a sans doute été obtenu par injection intradermique de SWAP en présence de BCG qui a permis d'obtenir une réduction de 50% de la charge parasitaire [James *et al.*, 1990].

D'autre part, l'injection directement d'oeufs en présence d'IL-12 permet d'inhiber partiellement la formation des granulômes hépatiques ainsi que la fibrose. Ce protocole n'influence pas le développement des vers, mais semble agir spécifiquement au niveau des oeufs et de la pathologie qu'ils induisent [Wynn *et al.*, 1995].

2.3.5. ANTIGENES RECOMBINANTS

Les extraits antigéniques présentent les désavantages d'être difficilement reproductibles en terme de production et d'être constitués d'une véritable soupe d'antigènes dont les effets conjugués peuvent finalement se contrecarrer les uns les autres. L'administration de ces extraits pourrait également engendrer de sérieux problèmes de cross-réaction avec des protéines du soi, sans qu'aucun contrôle ne soit possible. Une approche plus fine permettant de comprendre les mécanismes immunologiques engendrés consiste à isoler séparément des antigènes. Cette solution offre en outre la possibilité de clonage et de production contrôlée de protéines antigéniques recombinantes. Les stratégies reposent essentiellement sur deux approches principales: la première consiste à purifier des extraits solubles de parasites jusqu'à obtention de produits suffisamment purs et à les administrer à des animaux pour tester leur immunogénicité et leur pouvoir protecteur. Par microséquencage ou à l'aide des anticorps générés, il est alors possible de cloner l'antigène en question à partir d'une banque d'ADN ou d'expression. La seconde approche vise à cloner des antigènes qui génèrent de manière naturelle des réponses anticorps importantes chez des animaux ou individus infectés (on peut par exemple se focaliser sur des patients apparemment résistants). Par exemple, l'équipe du Dr Dunne a récemment cloné une protéine de 22,6 kDa à partir de parasites adultes. Cette protéine avait été préalablement identifiée comme un antigène majoritairement reconnu par des IgE de patients résistants à une réinfection [Webster *et al.*, 1996]. Pour ce faire, on crible une banque d'expression avec les anticorps qui peuvent être purifiés en fonction de leur isotype, mais également avec des anticorps monoclonaux. Mais la vaccination par un tel antigène, fortement immunogène chez des individus

infectés, pourrait potentiellement induire une anergie spécifique de la réponse immune et engendrer une inefficacité complète du vaccin. Une stratégie vaccinale alternative consiste à rechercher des cibles antigéniques naturellement dissimulées par le parasite, et si possible des protéines assurant des fonctions vitales (par exemple des enzymes).

Ces approches ont permis l'identification, le clonage et la caractérisation d'un nombre important d'antigènes potentiellement candidats vaccinaux. Ces antigènes se répartissent en différentes familles fonctionelles ou selon leur localisation (antigènes d'excrétion/sécrétion ou antigènes membranaires). L'objectifs minimal d'obtention de 40 à 50% de protection est tout juste atteint avec ces antigènes lorsqu'ils sont employés séparément dans des protocoles de vaccination chez les rongeurs. L'espoir d'obtenir de meilleurs niveaux de protection chez l'homme est permis puisque les quelques expériences de protection menées chez des animaux plus proches tels les singes ont à chaque fois montré des résultats meilleurs que chez la souris [Boulanger *et al.*, 1991]. De plus, il est également important de noter que l'administration chez les bovins d'un candidat vaccinal a permis d'obtenir des protections de plus de 80 % uniquement après une infection naturelle par *S. bovis* [Bushara *et al.*, 1993] ou *S. mattheei* [De Bont *et al.*, 1997], alors que l'efficacité ne restait que relativement faible après une infection expérimentale.

Tableau des principales protéines antigéniques clonées des schistosomes

Famille	Antigènes	Stade	Protection (%)		Références
			Vers	Oeufs	
enzymes antioxydantes	Glutathion S-Transferases (Sm28GST* , Sh28GST, Sb28GST, Sj26GST,...)	Adulte/ Somule/ Oeufs	30 - 60	30 - 90	[Riveau <i>et al.</i> , 1996] [Liu <i>et al.</i> , 1995b] [Liu <i>et al.</i> , 1995a]
	Glutathion peroxidases	Adulte	ND	ND	[Roche <i>et al.</i> , 1994]
	Superoxydes Dismutases	Adulte	ND	ND	[Mei <i>et al.</i> , 1995]
	Cytochrome c oxydase				
enzymes glycolytiques	Triose Phosphate Isomérase*	Adulte/ Somule/ Oeufs	30 - 60	ND	[Reynolds <i>et al.</i> , 1994]
	Phosphoglycérate kinase	Adulte	ND	ND	[Lee <i>et al.</i> , 1995]
	GAPDH	Adulte	ND	ND	[Waine <i>et al.</i> , 1993b]
	Enolase	Adulte	ND	ND	[Waine <i>et al.</i> , 1993a]
protéines musculaires	Paramyosines (Sm97* , Sj97)	Adulte/ Somule	30	ND	[Pearce <i>et al.</i> , 1988]
	IrV-5*	Adulte/ Somule/ Oeufs	30 - 90	ND	[Soisson <i>et al.</i> , 1992]
protéines de surface	Sm23*	Adulte/ Somule/ Oeufs	40 - 50	ND	[Reynolds <i>et al.</i> , 1992]
	Sm14*	Adulte/ Somule	65	ND	[Tendler <i>et al.</i> , 1996]
	gp38	Adulte/ Somule/ Oeufs	48 - 75	ND	[Grzych <i>et al.</i> , 1987]
Protéines de coque d'oeufs	p14	Oeufs	ND	ND	[Chen <i>et al.</i> , 1992]
	p48	Adulte/ Oeufs	ND	ND	[Chen <i>et al.</i> , 1992]

* Candidats vaccinaux potentiels retenus par l'OMS

Les candidats les plus prometteurs sont donc: la paramyosine (Sm97), également clonée chez l'espèce *S. japonicum*, IrV-5 (Irradiated-associated vaccine antigen), qui est également une protéine musculaire, Sm14 (ou FABP-14, Fatty acid binding protein) à localisation membranaire, la Sm23 également à localisation membranaire, la Triose Phosphate Isomérase, enzyme clef du catabolisme du glucose et enfin la famille des Glutathion *S*-Transférases, enzymes remplissant notamment des fonctions de détoxification chez les schistosomes.

2.4. CHOIX DE L'ANTIGENE SM28GST

2.4.1. CLONAGE

Parmi différentes approches de recherche d'antigènes possibles, l'équipe du professeur Capron a choisi, il y a une dizaine d'année, de se concentrer sur des protéines de vers adultes susceptibles de pouvoir être impliquées dans les mécanismes de l'immunité concomitante. Ainsi différentes fractions protéiques de vers de *S. mansoni* purifiées par électrophorèse sur gel ont été administrées à des rats pour tester leur antigénicité. Une seule fraction correspondant à une protéine d'une masse moléculaire de 28 kDa, associée à la membrane des vers adultes, s'est révélée immunogène [Balloul *et al.*, 1987a]. L'immunisation de rats Fischer et de souris Balb/C avec cette fraction purifiée a permis d'obtenir une protection avec une réduction de la charge parasitaire de 50-70% et 40-43% respectivement. Le criblage d'une banque d'expression de *S. mansoni* a permis ensuite de cloner une séquence de 211 aa. L'expression de la protéine recombinante a été effectuée à la fois dans *E. coli* [Balloul *et al.*, 1987b] et dans *S. cerevisiae* [Loison *et al.*, 1989]. Cette protéine a été identifiée sans équivoque comme appartenant à la classe des Glutathion *S*-Transférases (GST) de part son rapprochement avec des séquences de GST connues (rat et homme notamment) et de part son activité GST qui a pu être confirmée par test enzymatique.

2.4.2. LES GST DES SCHISTOSOMES: HOMOLOGUES OU HETEROGENES?

Par la suite, des GST d'autres espèces de schistosomes ont également été clonées mettant en évidence des homologies très fortes, notamment entre les GST de 28 kDa des espèces *S. haematobium* et *S. bovis*, mais également *S. haematobium* et *S. mansoni* ; par contre l'espèce *S. japonicum* semble moins homologue [Trottein *et al.*, 1992]. Ces homologies (surtout au niveau des régions que l'on a identifié comme étant des épitopes majeurs) ont laissé à penser qu'il serait éventuellement possible de réaliser des protections croisées (Cf. figure, page suivante). Il semble que les schistosomes soient dotés de toute une famille de GST qui appartiennent à deux catégories selon la masse moléculaires: 26 kDa et 28 kDa [Balloul *et al.*, 1987b ; Trottein *et al.*, 1990 ; Trottein *et al.*, 1992]. Il existe également des isoformes ; ainsi, la Sm28GST peut exister sous trois formes selon la combinaison différente pour la dimérisation de deux isoformes se distinguant par deux aa différents aux positions 61 et 136 [Pierce *et al.*, 1994]. Ces molécules sont en effet enzymatiquement actives sous forme dimérisée par formation d'un pont disulfure, le site enzymatique étant formée par une poche à l'interface des deux sous-unités.

Comparaison des séquences en acides aminés des GST de 28 kDa de *S. bovis*, *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum*

				30						70
Sb28GST	MTGDHIKVIY	FNGRGRAESI	RMTLVAAGVN	YEDERISFQD	WPKIKPTIPG	GRLPAVKITD	NHGHVKWMLE			
Sh28GST	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----V-			
Sm28GST	-A-E-----	-D-----	-----D	-----	-----	-----V-	D-----			
Sj28GST	V-L--	-----P-	--I-----	E F-----	E----	-----I----	KR-D--T-S-			
				100						140
Sb28GST	SLAIARYMAK	KHHMGETDE	EYYNVEKLIG	QVEDLEHEYH	KTLMKPEEEK	QKITKEILNG	KVPVLLDIIC			
Sh28GST	-----	-----G-E-	-----	-----A-----	-----Y-----	-----I-----	-----			
Sm28GST	-----	-----	-----S-----	-----A-----	-----V-----	-----Q-----	E-----NM--			
Sj28GST	-----FI-R	--N--D--D	-----II--M--	-----V-S--	-----I--P--	E--S-----	---I--QA--			
				170						211
Sb28GST	ESLKASTGKL	AVGDKVTLAD	LVLIAVIDHV	TDLDKEFLTG	KYPEIHKHRE	NLLASSPRLA	KYLSDRAATP	F		
Sh28GST	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Sm28GST	---G-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----	-----N-P----			
Sj28GST	-T--E--N-	T-----	V---S---I	-----	-----	-----K	H---T--K--	-----E-H--A-		

d'après [Trottein *et al.*, 1992].

2.4.3. DISTINCTION PAR RAPPORT AUX GST D'AUTRES ESPECES

Les GST de 28 kDa des schistosomes présentent des homologies de séquence importantes avec des GST d'autres parasites. Il s'agit notamment des GST de *Ascaris suum* (nématode), *Oncocerca volvulus* (nématode) et *Fasciola hepatica* (plathelminthe trématode). Il a été démontré que la GST de 26 kDa de *F. hepatica* permet d'induire une immunité protectrice vis-à-vis de l'infection [Sexton *et al.*, 1990]. De manière similaire à ce qui est observé dans les schistosomiasés, cet antigène ne semble pas être exposé au système immunitaire lors de l'infection naturelle. Ces données indiquent donc que ces enzymes pourraient se révéler être de bons candidats vaccinaux à la fois contre les plathelminthes, mais également contre les vers intestinaux et les filaires.

En contrepartie de ce fort degré de conservation de cette famille de molécules au sein de différentes espèces de schistosomes (et autres vers parasites), il fallait s'assurer que ces homologies ne soient pas retrouvées avec les GST humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être mise en évidence avec les GST hépatiques et placentaires de mammifères [Taylor *et al.*, 1988] et des études toxicologiques entreprises récemment avec le candidat vaccinal Bilhvax (Sh28GST) montrent l'absence de toute reconnaissance croisée avec des GST de mammifères, dont l'homme. En fait, la comparaison de la séquence de la Sm28GST avec l'ensemble des GST de mammifères laisse apparaître que la région N-terminale est relativement conservée, alors que la région correspondant à l'épitope majeur (région 115-131 pour Sm28GST) ne présente pas de similarité de séquences avec les GST humaines.

Comparaison des séquences en acides aminés de la Sm28GST (ligne du haut) et de la GST humaine la plus similaire : GST A2-2 (classe α) isolée du foie (ligne du bas)

```

7   KVIYFNGRGRAESIRMTLVAAGVNYEDERI-SVQDWPKIKPT--IPGGRLPAVKITDNHG 63
    K+ Y N RGR ESIR L AAGV +E++ I S +D K++ + ++P V+I
6   KLHYSNIRGRMESIRWLLAAAGVEFEKFKSAEDLDKLRNDGYLMFQQVPMVEIDGMK- 64

64  HVKWMVESLAIARYMAKKHHMMGGTEEEYINVEKLIQAEADLEHEYYKTLMXXXXXXXXXX 123
    +V++ AI Y+A K+++ G +E ++ I DL E L
65  ----LVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKEKALIDMYIEGIADL-GEMILLLPFTQPEEQDA 119

124 XXXXLNGKVPVLLDIIICESLKASTGK-LAVGDKVTLADLVLIAVIDHVTDLKDFLTGKY 182
    + K E + S G+ VG+K++ AD+ L+ ++ +V +LD L +
120 KLALIQEKTKNRYFPAFEKVLKSHGQDYLVGNKLSRADIHLVELLYYVEELDSS-LISSF 178

183 PEIHKHRENLLASSPRLAKYL 203
    P + K + +++ P + K+L
179 P-LLKALKTRISNLPVKKFL 198

```

Il apparaît qu'en fait sa séquence soit composée d'une mosaïque de courtes séquences présentant des homologies avec les GST des familles α et μ . Toutefois son activité (spécificités de substrats et d'inhibiteurs) la rapproche davantage des GST de la famille π [Taylor *et al.*, 1988] ou μ [Walker *et al.*, 1993]. Pour étendre cette comparaison parasites-mammifères, l'un des autres candidats vaccinaux, la paramyosine, présente des homologies plus étroites avec l'ensemble des myosines de mammifères. Ainsi il existe des régions d'identité sur une dizaine d'acides aminés consécutifs, soit une taille suffisante pour contenir un épitope.

2.4.4. EXPRESSION AU COURS DES STADES, REGULATION

Les GST sont généralement des enzymes ubiquitaires et cytosoliques. Chez les schistosomes on les retrouve à chacun des stades de développement. En ce qui concerne plus particulièrement la Sm28GST, elle est également présente à tous les stades. Sa localisation fine a été analysée en microscopie optique mais également électronique, montrant chez les vers adultes une forte localisation au niveau du tégument (tubercules) et du parenchyme [Taylor *et al.*, 1988] ainsi que dans les organes génitaux [Liu *et al.*, 1996].

La structure de la région promotrice a été étudiée. NF-YA se fixant à la CAAT box de la Sm28GST, serait impliqué dans sa régulation [Zemzoumi *et al.*, 1996]. En effet, on sait, à partir de modèles de GST de rat, que le niveau d'expression de ce type d'enzymes peut être contrôlé au niveau transcriptionnel et influencé par des xénobiotiques, hormones (10 fois supérieure chez le mâle) et autres substrats endogènes [Sies *et al.*, 1988].

2.4.5. FONCTIONS

Il semble que les GST des schistosomes sont des enzymes multifonctionnelles et exercent des activités catalytiques et de transport différentes en fonction de leur localisation dans les parasites. Le rôle majeur qui leur est généralement attribué est celui de protection contre la peroxydation des lipides induite par les réactions immunes cellulaires.

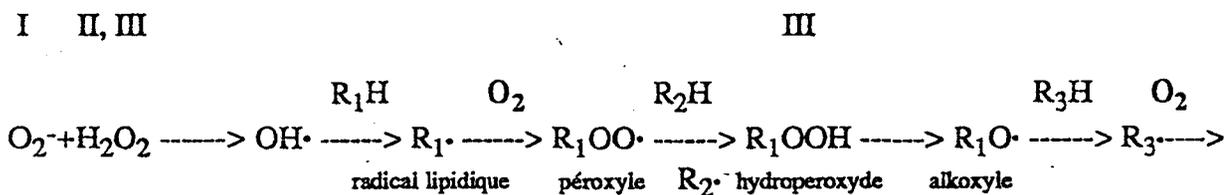
Détoxification

Les radicaux oxydants sont naturellement produits par le métabolisme des cellules qui ont développés des mécanismes de détoxification. Dans le cas d'organismes comme les schistosomes, le défi est double puisqu'ils doivent faire face aux composés toxiques de leur propre métabolisme, mais du fait qu'ils baignent en permanence dans le sang, ils doivent également faire face à de nombreuses agressions cellulaires libératrices du même type de molécules. Les principales cellules toxiques sont les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes [Joseph *et al.*, 1980]. A la suite de leur activation elles sont capables de libérer des stocks de composés oxydants. Les helminthes, dont font partie les schistosomes, ont un système d'oxydo-réduction dépourvu de cytochromes P-450, connu comme étant essentiel pour ce type de fonctions chez les mammifères [Précious *et al.*, 1989]. Ainsi les GST, chez les helminthes, occupent une fonction essentielle dans l'ensemble des processus de détoxification des radicaux oxydants. Cette classe d'enzyme agit de concert avec la catalase, la cytochrome c peroxydase, la superoxyde dismutase [Cordeiro da Silva *et al.*, 1992] et les glutathion peroxydases [Roche *et al.*, 1994]. Les GST n'agissent donc pas en première intention, mais plutôt pour la détoxification des lipides sur lesquels ont été transférés les groupements oxydés.

Mécanismes enzymatiques de détoxification des radicaux oxydants chez les schistosomes

Cycle d'oxydo-réduction des acides gras polyinsaturés

I constitue le lieu d'action de la superoxyde dismutase, II de la catalase et III de la glutathion peroxydase et de la glutathion S-transférase



Les GST catalysent la conjugaison du glutathion (GSH: γ -Glu-Cys-Gly) par attaque nucléophile de divers substrats oxydés, essentiellement des hydroperoxydes de lipides. Les GST des schistosomes semblent également posséder une activité de GSH peroxydases et agiraient donc à la fois en inhibant la peroxydation des lipides et en conjuguant les produits secondaires de la peroxydation des lipides tels les hydroxyalkénaux. La conjugaison opérée par les GST diminue ainsi la réactivité des molécules toxiques et augmente le caractère hydrophile de celles-ci, assurant ainsi leur solubilisation et leur élimination. Cette fonction joue donc un rôle capital dans le maintien de la structure tégumentaire complexe, sans cesse exposée aux attaques du milieu extérieur. En outre, il semble que chez les helminthes ces enzymes soient capables de détoxifier des composés xénobiotiques en plus des attaques cellulaires. Ainsi, il a été montré que *S. mansoni* est capable de détoxifier un métabolite actif du métrifonate, composé anti-helminthique [O'Leary *et al.*, 1991]. Récemment, il a démontré que la Sj26GST était capable de fixer directement le praziquantel, soulevant ainsi la question de l'implication des GST dans des éventuels mécanismes de résistance au praziquantel [Walker *et al.*, 1993].

Autres fonctions

La liaison des GST à divers xénobiotiques, dont le praziquantel, laisse également envisager un rôle potentiel au niveau du tégument pour le transport de ces xénobiotiques. Cependant les interactions des GST avec les xénobiotiques semblent obéir à des types de liaisons différentes, en effet la Sj26GST fixe effectivement le PZQ sans être inhibée, alors que la fixation de l'oltipraz inhibe ses fonctions enzymatiques [Walker *et al.*, 1993].

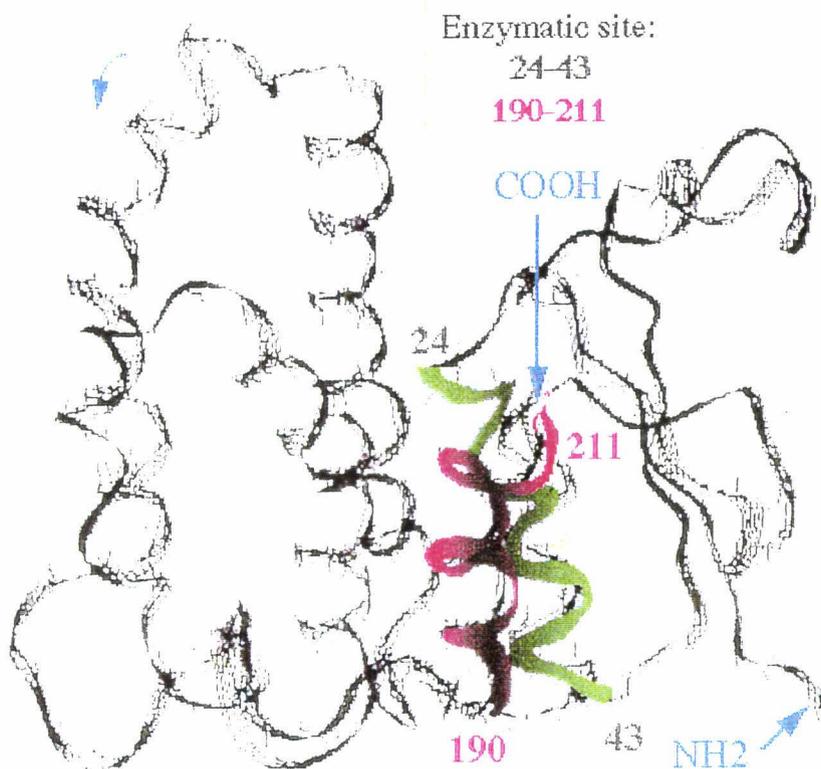
Les GST en général, ont prouvé une pléiade de fonctions. Quelques unes sont citées ici parce qu'elle pourraient être valables chez les schistosomes. Ainsi, les GST peuvent participer à la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes C4. De plus, elles semblent être impliquées dans des mécanismes de transport et de stockage notamment de composés lipophiles [Ketterer *et al.*, 1988]. Enfin, récemment, une fonction cruciale de GST testiculaire de rat a été identifiée dans la fertilité [Aravinda *et al.*, 1995] et pourrait être reliée à un rôle dans la biosynthèse des prostaglandines.

2.4.6. IMMUNOGENICITE DE L'ANTIGENE SM28GST

La Sm28GST a donc été sélectionnée sur base de sa capacité à induire des anticorps chez le rat. Cette protéine est donc immunogène et l'on a caractérisé finement ses propriétés immunologiques. Sur la base d'une prédiction d'épitopes T potentiels (contraintes de longueur et de nature de chaîne latérale pour l'association aux molécules de présentation du CMH), des peptides synthétiques issus de la séquence de la Sm28GST ont été testés pour leur capacité à restimuler des cellules T de souris immunisées par l'antigène ou infestées, ainsi que pour leur capacité à être reconnus par des anticorps de ces mêmes animaux [Auriault *et al.*, 1988 ; Auriault *et al.*, 1991]. Il s'est avéré que l'antigène est composé de 3 épitopes majeurs: le fragment 10-43, épitope T, le fragment 115-131, épitope mixte T et B et la partie C-terminale 190-211, épitope T. La localisation de ces fragments peptidiques sur la protéine indique que le fragment 115-131 forme une boucle au niveau de la partie la plus proéminente de la protéine. Les deux autres fragments épitopiques, malgré leur éloignement sur la séquence primaire, se retrouvent à proximité l'un de

l'autre pour former deux hélices parallèles et inversées situées de manière intéressante dans une région faisant contact pour la dimérisation.

Représentation de la structure tridimensionnelle de la Sm28GST (monomère)



2.4.7. REPONSE ANTI GST DANS LES POPULATIONS INFECTEES

Dans les population infectées, les réponses humorales et cellulaires vis-à-vis des GST sont détectables à des niveaux relativement faibles en comparaison des réponses vis-à-vis d'extraits antigéniques totaux tels que le SWAP et le SEA. Cette information indique que les GST sont immunogènes, mais que, sans doute, leur exposition au système immunitaire est réduite. Ceci représenterait un avantage dans l'optique d'utiliser les GST comme vaccin, notamment auprès de populations déjà infectées. En effet on peut penser que l'effet d'une vaccination avec un antigène déjà fortement présenté par l'infection n'aura pas d'effet déterminant. En outre, certaines hypothèses font mention d'un phénomène d'anergie du système immunitaire vis-à-vis d'antigènes dominants, finissant, dans les infections chroniques, par exacerber le système immunitaire.

Comme mentionné dans la partie "réponses immunes de l'hôte", l'acquisition d'une forme de résistance à l'infection est associée à des profils de réponses particuliers vis-à-vis du SWAP ou du SEA. Il s'avère que le même type de corrélations est vrai pour les réponses spécifiques de l'antigène GST. En effet, il a été démontré que la réponse IgA spécifique à la Sm28GST était

associée à une immunité protectrice à la réinfection après le traitement au praziquantel, chez des individus infectés par *S. mansoni* au Kenya [Grzych *et al.*, 1993]. De manière parallèle, on peut observer l'évolution de la capacité des sérums à inhiber l'activité enzymatique GST et ainsi l'existence d'une forte association entre une réponse IgA spécifique inhibant la Sm28GST et une résistance à la réinfection. A l'opposé, la présence d'IgG4 anti-Sm28GST serait associée à une susceptibilité des patients à la réinfection [Auriault *et al.*, 1990]. Dans une étude réalisée au nord du Sénégal chez des patients infectés par *S. mansoni*, la réponse immune spécifique a été évaluée en fonction de l'intensité d'infection (en dehors de tout traitement). Il a été montré qu'il existe une association entre la réponse IgA anti-Sm28GST et l'inhibition de l'activité enzymatique GST qui est clairement majoritaire chez les patients présentant la plus faible intensité d'infection [Remoué *et al.*, soumis]. De façon surprenante, cette réponse IgA spécifique neutralisante n'a été observée que chez les femmes alors que l'inhibition de l'activité 28GST était associée à une forte réponse IgG3 uniquement chez la population masculine également faiblement infectée. Ces résultats montrent donc l'existence d'une réponse immune acquise spécifique à la Sm28GST qui apparaît différente selon le sexe des individus infectés ; dans tous les cas, l'inhibition de la Sm28GST est reliée à un statut de résistance à l'infection.

Finalement, ces observations font apparaître le développement naturel d'un profil de réponse marqué vis-à-vis des GST, associé à une forme de protection naturelle probablement acquise avec l'âge ou une résistance à la réinfection après traitement. Il est encore trop tôt pour affirmer que ces réponses spécifiques jouent un rôle majeur dans le développement d'une immunité effectrice ; cependant le rapprochement de ces observations avec les essais vaccinaux chez différents modèles animaux, laissent entrevoir une issue positive au développement d'une vaccination GST chez l'homme.

2.5. EFFICACITE DE L'ANTIGENE SM28GST

2.5.1. REDUCTION DE LA CHARGE PARASITAIRE

L'effet protecteur des GST de schistosomes a fait l'objet d'un nombre important de publications. Leur efficacité a été démontrée dans de nombreux modèles animaux, vis-à-vis des principales espèces de schistosomes. Ainsi, les premières expériences menées avec l'antigène Sm28GST purifié en présence d'hydroxyde d'alum ont montré une réduction de moitié environ de la charge en vers chez des rats ou souris [Balloul *et al.*, 1987a]. Des résultats encore plus encourageants sont venus de la vaccination de babouins, dont certains ont montré une réduction de 80% de la charge vermineuse. Toutefois dans ce modèle non-syngénique, les résultats se sont révélés plus disparates d'un animal à un autre [Boulanger *et al.*, 1991]. Les similarités entre les GST de 28 kDa de différentes espèces de schistosomes se révèlent capables de conférer des immunités protectrices croisées. Cela a été montré avec la Sm28GST protégeant vis-à-vis d'une infection à *S. haematobium* [Boulanger *et al.*, 1995] et avec Sb28GST protégeant vis-à-vis d'une infection à *S. matthei* [Grzych *et al.*, 1998]. L'effet de réduction de la charge en vers a pu être reproduit par l'injection d'une construction octamérique du peptide 115-131 [Wolowczuk *et al.*, 1991], montrant la capacité de cet épitope à engendrer des réactions, sans doute à la fois humorales et cellulaires

spécifiques, capables de conduire à la destruction d'une partie des vers (probablement via un mécanisme de type ADCC).

2.5.2. INHIBITION ENZYMATIQUE ET BAISSÉ DE LA FECONDITE

Au cours de ces expériences de vaccination, on avait rapporté de manière surprenante une diminution du volume des granulômes hépatiques, du nombre d'oeufs par femelle et de la capacité des oeufs à éclore. Ces observations illustraient en fait une propriété majeure des antigènes GST, à savoir leur capacité à induire une immunité anti-fécondité. Cette activité protectrice a pu être reproduite par transfert d'anticorps capables de neutraliser l'activité enzymatique de la Sm28GST [Xu *et al.*, 1991], montrant une relation entre la capacité à inhiber l'activité enzymatique GST et l'expression d'un effet anti-fécondité et fragilisateur des oeufs. Il s'est ensuite avéré que ces anticorps neutralisant l'activité enzymatique reconnaissaient dans tous les cas étudiés, soit le peptide 10-43, soit le peptide 190-211, situés tous les deux dans la région du site actif [Xu *et al.*, 1993]. Cette immunité stérilisante a ensuite pu être reproduite par la simple injection du peptide 190-211 [Pancré *et al.*, 1994a]. Cet effet anti-fécondité a également été décrit dans le cadre de vaccinations avec les GST d'autres espèces de schistosomes [Capron *et al.*, 1994]. Enfin, à la vue des résultats de protection obtenus chez des singes avec la Sm28GST contre une infection à *S. haematobium* [Boulanger *et al.*, 1995], des espoirs sont permis pour le concept d'une vaccination anti-fécondité unique fonctionnant vis-à-vis de plusieurs espèces de schistosomes. Une expérience récente chez le singe a également montré que la vaccination par la 28GST pouvait induire une réduction de plus 75 % du nombre d'oeufs tissulaires associées une diminution de la pathologie, évaluée par échographie [Boulanger *et al.*, soumis].

2.5.3. REDUCTION DES DOMAGES HEPATIQUES

L'immunité cellulaire spécifique de la Sm28GST générée par la vaccination semble conduire à une diminution du taux de collagène hépatique et limite les atteintes hépatiques visible sur des coupes histologiques. Cette réponse spécifique contrecarrant le développement de la pathologie apparaît être portée par des cellules T spécifiques productrices de forts taux d'IFN- γ . En effet, l'administration d'anticorps neutralisant cette cytokine ont pour effet d'abolir cette forme de protection [Pancré *et al.*, 1994b]. Il semble en fait que la formation des granulomes est progressivement régulée par des cellules T suppressives majoritairement CD8⁺ [Pancré *et al.*, 1996]. Pour cette raison, il peut être important d'induire des réponses de type cytotoxique vis-à-vis des schistosomes, pas tant pour leur activité de lyse, mais plutôt pour le type de molécules régulatrices qu'elles sécrètent. En effet, même si des cellules CD8⁺ cytotoxiques (CTL) peuvent adhérer aux larves de schistosomes, via une acquisition passive d'alloantigènes de l'hôte, jamais d'activité de lyse n'a pu être observée [Butterworth *et al.*, 1979].

Le couplage d'antigènes à la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) s'est avéré être un moyen puissant pour induire des effets multiples. On compte notamment l'induction de réponses immunes anti-infectieuses [Holmgren *et al.*, 1994], l'induction d'une tolérance orale [Sun *et al.*, 1994], la suppression de réactions d'hypersensibilité retardée (DTH) et la suppression de

maladies autoimmunes [Bergerot *et al.*, 1997]. Récemment, l'administration à des souris de faibles doses de Sm28GST couplée à la CTB par voie nasale a permis de réduire de manière drastique la pathologie hépatique. Cet effet était accompagné d'une suppression des réactions de DTH et des réponses lympho-prolifératives spécifiques de la Sm28GST, et d'une diminution de la production de cytokines de type Th-1 [Sun *et al.*, soumis]. Cette étude montre donc qu'une manipulation fine des réponses immunes vis-à-vis d'un antigène comme la Sm28GST permet éventuellement d'aboutir à une modulation des mécanismes régulant le développement de la pathologie.

2.6. APPROCHES VACCINALES AVEC LES GST

2.6.1. APPROCHES VACCINALES DE PREMIERE GENERATION

La plupart des études visant à tester le pouvoir protecteur des GST de schistosomes, se sont basées sur l'emploi d'antigènes recombinants purifiés à partir de cultures de bactéries *E. coli* recombinantes ou de levures *S. cerevisiae* recombinantes. L'antigène a généralement été testé avec les adjuvants couramment utilisés dans des protocoles expérimentaux: hydroxide d'alumine (Alum), Adjuvant de Freund (complet et incomplet), *Bordetella pertussis* (*B.p.*) et BCG. Des résultats de protection ont été obtenus avec ces différentes formulations, avec toutefois un succès plus limité avec l'emploi de l'alum surtout chez le singe.

Récapitulatif des principaux résultats de protection obtenus avec les GST de schistosomes

Modèle	Dose(s), voie	GST, source	Adjuvant	Protection	Référence
Rats	2 X 50µg s.c.	Sm28 <i>E. coli</i>	CFA	51-68%	[Balloul <i>et al.</i> , 1987a]
			Alum	63-72%	
	1 X 25µg s.c.	Sm28 <i>E. coli</i>	Alum	55%	[Grezel <i>et al.</i> , 1993]
			BCG	60%	
		Sm28 <i>S.cerevisiae</i>	Alum	39-58%	[Grezel <i>et al.</i> , 1993]
			BCG	32%	
Souris			CFA	40-43%	[Balloul <i>et al.</i> , 1987a]

Babouins	2 X 100µg s.c	Sm28 <i>E. coli</i>	Alum + <i>B.p.</i>	38% vers 66% oeufs	[Boulanger <i>et al.</i> , 1991]
	2 X 100µg s.c	Sh28 <i>S.cerevisiae</i>	CFA BCG	77% oeufs 60% oeufs	[Boulanger, soumis]
Bovins	2 X 200µg i.m.	Sm28 <i>E. coli</i>	CFA-IFA	43-86% oeufs	[Bushara <i>et al.</i> , 1993]
	3 X 200-900µg i.m	Sm28 <i>E. coli</i>	CFA	57-81% oeufs	
	2 X 250 µg i.m	Sb28 <i>S. cerevisiae</i>	CFA	50% vers 89% oeufs	[De Bont <i>et al.</i> , 1997]
Porcs	3 X 1gr i.m.	Sj26	Alum	28% vers 53% oeufs	[Liu <i>et al.</i> , 1995b]

Les succès remportés par la vaccination dans divers modèles animaux avec les GST de différentes espèces de schistosomes ont aboutit à la décision de mettre en oeuvre des essais cliniques chez l'homme. Comme mentionné dans la partie tracant les cadres de ce travail (page 4), le choix s'est porté sur la Sh28GST. La protéine recombinante a été produite selon les normes GMP par la société Pharos (Belgique). Les essais précliniques réalisés chez le rat, le chien et le lapin ont montré une absence de toxicité et les tests de mutagénicité se sont révélés négatifs. Les essais cliniques de phase I a ont débuté en Septembre 1998 et sont actuellement réalisés sur 24 volontaires sains au Centre d'Investigation Clinique de Lille. Le protocole adopté consiste en deux injections s.c. à un mois d'intervalle de 100 ou 300 µg de Sh28GST (Bilhvax) complexée à l'Alum. D'ores et déjà, des démarches ont été engagées pour l'organisation d'une Phase I b au Sénégal puis de phases II au Sénégal et au Niger.

2.6.2. APPROCHES VACCINALES DE SECONDE GENERATION

L'amorce d'essais cliniques ne sonne pour autant pas l'heure du glas pour les recherches au laboratoire concernant la mise au point d'un vaccin. En effet, les efforts se sont portés depuis quelques années sur le développement d'une seconde génération de vaccins. Cette génération de vaccins répond à la motivation d'accéder aux voies muqueuses. Les deux raisons majeures de ce choix résultent de l'observation de l'implication des anticorps IgA, isotype majoritaire au niveau de toute muqueuse, dans l'immunité anti-fécondité [Riveau *et al.*, 1996] et la facilité d'utilisation que pourrait constituer des vaccins administrables par les voies orale ou nasale.

Vecteurs synthétiques

Les liposomes encapsulant la Sm28GST sont capables de conférer une protection de 50% (vers et oeufs) après leur administration par voie orale. Ce mode d'administration conduit à l'induction de réponses IgA locales et d'un profil Th2 au niveau systémique [Ivanoff *et al.*, 1996]. Ce mode de vaccination permet également l'induction de réponses immunes suite à une administration par voie nasale [Ivanoff *et al.*, soumis]. L'optimisation portant notamment sur le greffage de déterminants spécifiques pour un ciblage cellulaire à la surface des liposomes sont à l'étude dans notre laboratoire. L'incorporation dans les liposomes de l'hémagglutinine filamenteuse de *B. Pertussis* (FHA) a récemment montré son fort pouvoir immunogénique pour l'induction d'une forte réponse IgA anti-Sm28GST [Poulain-Godefroy *et al.*, 1998].

Les microsphères, composés ne présentant aucune toxicité, dont la nature influence la cinétique de libération de l'antigène permettent d'induire des réponses spécifiques puissantes et prolongées. Une seule administration par voie nasale de ces microparticules ayant incorporées la Sm28GST a permis d'induire une forte réponse IgA spécifique au niveau sérique [Barras *et al.*, soumis].

Vecteurs vivants

Une possibilité attrayante de ciblage des voies muqueuses est l'utilisation de bactéries recombinantes atténuées qui colonisent naturellement les poumons ou le tractus gastro-intestinal. Ainsi, l'antigène Sm28GST a été cloné dans les bactéries suivantes: *Salmonella thyphimurium* atténuée (Aro A), BCG, *Bordetella pertussis* (+/- atténuée) et bactéries lactiques. Grâce à la bonne stabilité du transgène Sm28GST, fusionné avec des protéines immunodominantes des différentes bactéries, et par le mode prolongé de colonisation des vecteurs recombinants, assurant ainsi un relarguage progressif de l'antigène vaccinal, ce type de vaccination permet d'induire une protection importante.

En effet, l'administration par voie orale de *S. thyphimurium* atténuée (Aro A), contenant le gène de la Sm28GST en fusion avec le fragment C de la toxine tétanique permet d'induire de fortes réponses immunes spécifiques et sériques. En outre, de forts taux d'IgA spécifiques sont induits et sont associées à une protection significative vis-à-vis de l'infection [Khan *et al.*, 1994a ; Khan *et al.*, 1994b].

B. pertussis, dans laquelle le gène de la Sm28GST est inséré dans celui de l'hémagglutinine filamenteuse permet une expression de l'antigène parasite à la surface de la bactérie. Suite à une administration par voie nasale, des réponses IgA sériques sont obtenues et sont associées à une protection importante [Mielcarek *et al.*, 1997 ; Renaud-Mongenie *et al.*, 1996]. De plus, l'utilisation d'une souche mutée de la toxine pertussique (PT), donc plus appropriée à un usage clinique, a montré après une seule administration nasale, une immunogénicité accrue vis-à-vis de l'antigène Sm28GST par comparaison avec une souche non mutée [Mielcarek *et al.*, 1998]. De plus, l'administration de cette souche a induite une protection de 60 % après l'infection par *S. mansoni*.

La possibilité d'utiliser des BCG recombinants est également attrayante car ces bactéries naturellement atténuées sont déjà utilisées sans risque et leur utilisation en tant qu'adjuvant dans des protocoles de vaccination contre *S. mansoni* s'est révélé bénéfique [Bout *et al.*, 1977]. Leur faire exprimer et délivrer un antigène à propriétés protectrices devrait donc additionner un effet

spécifique et un effet non-spécifique. Les résultats d'immunogénicité montrent clairement le potentiel de cette approche [Kremer *et al.*, 1996 ; Kremer *et al.*, in press]. Des premiers résultats de protection dans le modèle *S. haematobium* font clairement apparaître une superposition d'un effet lié au vecteur et d'un effet propre à la Sh28GST [Lane *et al.*, soumis].

3. La vaccination ADN

3.1 PRESENTATION

3.1.1. UNE REVOLUTION TECHNOLOGIQUE BASEE SUR UN PRINCIPE SIMPLE

La découverte, en 1992, de la possibilité d'induire une réponse immune, suite à l'injection d'un simple plasmide codant pour un antigène [Tang *et al.*, 1992], a fait l'effet d'une bombe auprès des vaccinologues et cette découverte a rapidement gagné l'intérêt de l'ensemble de la communauté scientifique. En effet, personne n'aurait osé parier sur l'efficacité d'un procédé technologique d'une telle simplicité.

Sans doute, l'effet de surprise engendré par cette nouvelle approche vaccinale est-il lié en partie au contexte technologique et scientifique. En effet, alors que la transfection de cellules en culture nécessite l'emploi de procédés physico-chimiques (précipitation saline, lipofection), électriques (électroporation) ou balistiques (micro-bombardement), on n'imaginait pas que l'injection d'ADN plasmidique nu au sein d'un tissu d'un organisme supérieur puisse conduire à la transfection de cellules *in situ*. En outre, les efforts de transferts de gènes à des organismes supérieurs se sont tout d'abord concentrés autour de la thérapie génique, consistant à remplacer des gènes défectueux par des gènes intacts et ceci dans le plus grand nombre possible de cellules. Le transfert de gènes codant pour des protéines étrangères, donc capables de stimuler le système immunitaire, n'était pas envisagé au cours de ces stratégies de thérapie génique.

Pourtant, les contrôles des expériences de thérapie génique reposant sur le transfert de gènes reporters (par exemple luciférase reconnue comme étrangère par le système immunitaire) étaient déjà inconsciemment des expériences d'immunisation par ADN. De plus, la transfection *in situ* suite à la simple injection de préparations d'ADN avaient déjà pu être mise en évidence de manière indirecte bien plus tôt. Différentes équipes avaient en effet caractérisé les effets de l'expression de gènes viraux *in vivo* suite à la simple injection d'ADN d'origine virale [Stasney *et al.*, 1950 ; Ito, 1961 ; Orth *et al.*, 1964]. Cependant, le véritable point de départ des expériences d'injection d'ADN dans le but d'engendrer une réponse immune repose sur les travaux plus récents de Wolff concernant le transfert de gènes dans le muscle de souris et caractérisant clairement l'expression consécutive à l'administration d'ADN nu [Wolff *et al.*, 1990].

La démonstration de la faisabilité de la vaccination ADN est venue de Tang qui a mis en évidence, pour la première fois, l'induction d'une réponse anticorps vis-à-vis de la protéine codée par le plasmide injecté (hormone de croissance humaine) [Tang *et al.*, 1992]. Puis, en utilisant un plasmide codant pour la nucléoprotéine du virus Influenza, Ulmer et ses collaborateurs ont montré que des réponses à la fois humorales et cellulaires pouvaient être induites et conduisaient à une protection des souris immunisées contre une infection virale [Ulmer *et al.*, 1993]. En l'espace de 5 années, la vaccination par ADN a fait l'objet de plusieurs centaines de publications, un nombre considérable de modèles d'infections ont été testés, divers développements technologiques et conceptuels sont venus enrichir cette approche qui n'est plus seulement

vaccinale mais plutôt immuno-thérapeutique. Enfin les premiers résultats d'essais cliniques chez l'homme commencent déjà à être publiés dans des modèles de paludisme [Wang *et al.*, 1998] et de HIV [Calarota *et al.*, 1998 ; MacGregor *et al.*, 1998] et semblent prometteurs.

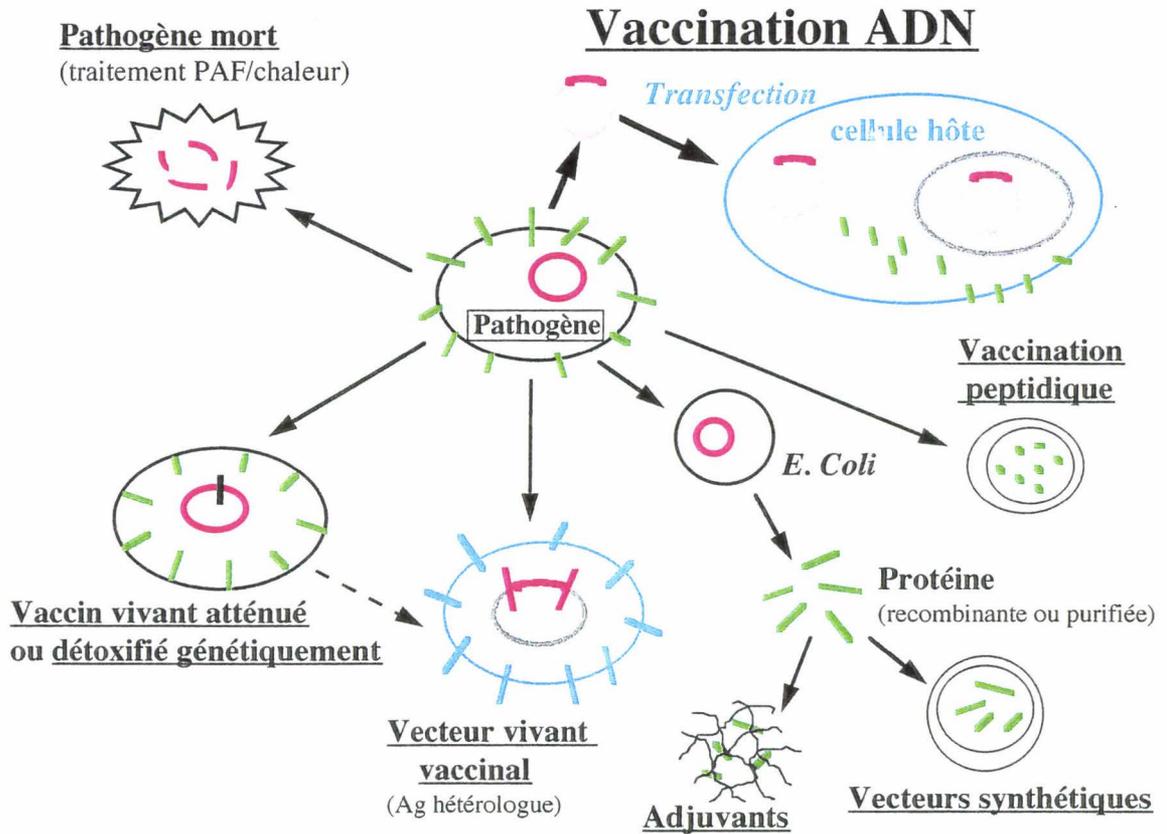
Un des engouements indéniables pour la vaccination ADN repose sur la simplicité de son principe, en faisant ainsi une approche technologique accessible à tout laboratoire équipé des outils rudimentaires de biologie moléculaire. En effet, la vaccination ADN repose sur l'injection (classiquement dans le muscle) d'ADN plasmidique contenant, sous le contrôle d'un promoteur eucaryote puissant, le gène codant pour un antigène. Certaines cellules vont être transfectées et vont synthétiser l'antigène d'intérêt. L'antigène va alors être présenté aux cellules du système immunitaire qui vont mettre en place une réponse immune spécifique.

Ce chapitre introductif s'attache à mettre en relief les avantages en termes d'économie et d'efficacité que procurent la vaccination ADN en comparaison des autres formes de vaccination, puis tente de dresser un bilan des connaissances récentes sur les mécanismes fins régissant cette nouvelle approche vaccinale. Enfin, ce chapitre présente la diversité des applications ouvertes par la vaccination ADN et argumente notre choix de développer cette méthode dans le cadre d'une stratégie immuno-thérapeutique contre les schistosomiasis.

3.1.2. DE NOMBREUX AVANTAGES ET QUELQUES INTERROGATIONS

Lors de la vaccination ADN, les cellules de l'organisme immunisé se comportent comme de véritables micro-usines à vaccin. On peut donc entrevoir, de manière simpliste, une économie de coût de production du vaccin ainsi qu'une efficacité accrue d'un système mimant une situation naturelle. En regard des autres formes de vaccination, la vaccination ADN se situe en quelque sorte entre vecteurs vivants et produits recombinants. Le principe de ce mode de vaccination est représenté sur le schéma ci-contre et les avantages (et inconvénients) sont regroupés dans le tableau suivant.

Principe de la vaccination ADN en regard des autres approches vaccinales



Avantages et limites de la vaccination ADN

AVANTAGES

Production

- facilité de développement et de production
- procédés identiques quelque soit l'antigène
- produit non-infectieux

Conservation

- grande stabilité dans le temps
- possibilité de lyophilisation donc de stabilité à la température ambiante

Administration

- dose unique envisageable
- pas de besoin d'adjuvant
- possibilité de cocktails de plasmides

Comportement dans l'organisme

- absence d'inflammation et de réaction vis-à-vis du plasmide?

Synthèse de l'antigène et réponse immune

- folding et glycosylation optimaux
- expression prolongée de l'antigène
- forte réponse CTL
- levée de la restriction haplotypique
- réponse prolongée (même sans rappel)
- mémoire puissante

Applications et efficacité

- protection supérieure ou égale aux vaccins existants pour les pathogènes intracellulaires
- maladies infectieuses et auto-immunes, cancers, allergies.
- approches prophylactiques et thérapeutiques
- immuno-modulation

LIMITES

Production

- risque de contamination par les LPS

Conservation

Administration

- voie orale (et nasale) à développer

Comportement dans l'organisme

- risques d'intégration dans le génome non exclus
- anticorps anti-ADN?

Synthèse de l'antigène et réponse immune

- réponses anticorps parfois inférieures aux protocoles de vaccination comprenant protéine et adjuvant
- expression prolongée pouvant entraîner tolérisation ou auto-immunité?
- lyse des cellules productrices d'antigène?

Applications et efficacité

- reste à démontrer pour les micro-organismes extracellulaires
-

3.2. VACCINATION ADN: MODE D'EMPLOI

3.2.1. ELABORATION D'UN PLASMIDE

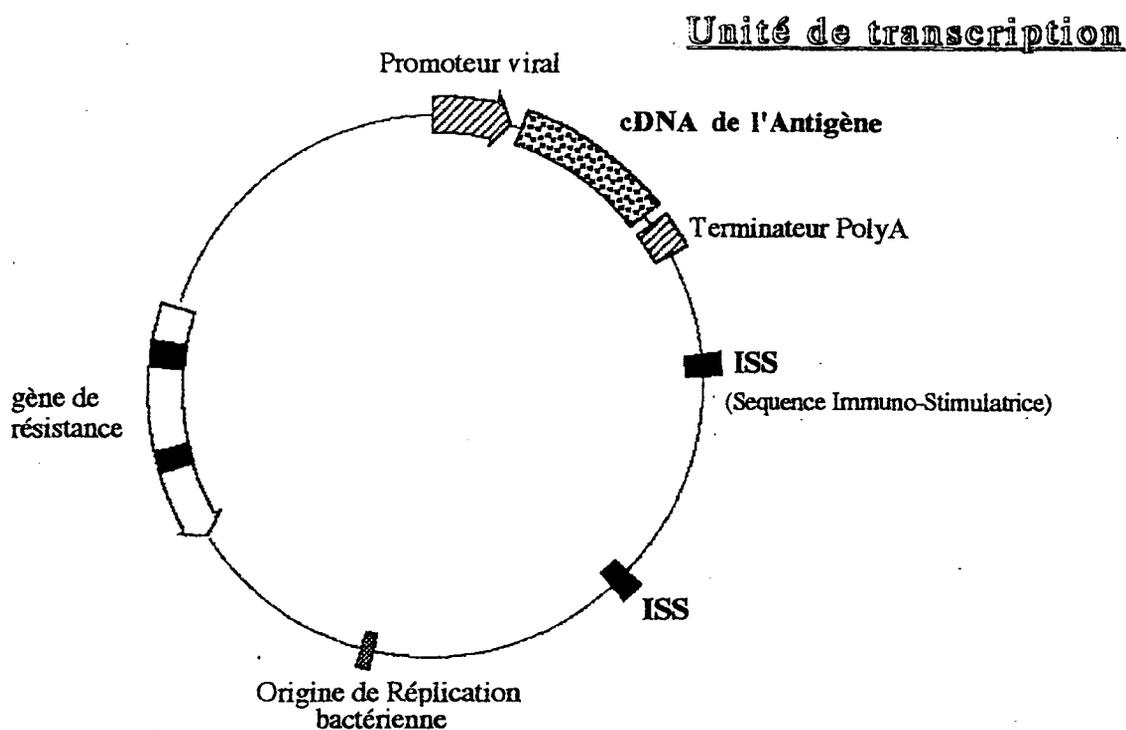
Unité de transcription de l'antigène

Un vaccin ADN consiste dans sa version la plus simple en un gène d'un pathogène porté par un plasmide (ADN double brin circulaire). Pour qu'il puisse être transcrit au sein des cellules de l'organisme, ce gène devra se trouver en aval d'un promoteur fonctionnant dans un environnement nucléaire eucaryote et comporter une séquence de polyadénylation en sa région 3' pour assurer la stabilité de l'ARN messager. Des plasmides, dans lesquels sont aménagés un multi-site de clônage pour faciliter l'insertion du gène d'intérêt, sont disponibles dans le commerce. Il existe également des vecteurs linéarisés et déphosphorylés directement prêts pour l'insertion, après une seule étape de ligation, d'un produit de réaction amplifié par PCR. Le promoteur le plus largement utilisé est le promoteur IE1 du Cytomégalo virus humain. Il est reconnu comme étant l'un des plus puissants promoteurs fonctionnant avec la machinerie transcriptionnelle eucaryote et ne possède apparemment pas de spécificité cellulaire permettant ainsi son utilisation dans tous les tissus ou cellules de l'organisme. Une étude a analysé en détail l'efficacité de différents promoteurs d'origine virale [Montgomery *et al.*, 1993] et a identifié le promoteur CMV comme étant effectivement le plus puissant pour conduire la synthèse d'un antigène *in vivo*. En outre, l'emploi d'un promoteur spécifique des cellules musculaires s'est également révélé efficace dans le cadre d'une immunisation ADN par le muscle [Communication personnelle]. Le signal de polyadénylation le plus fréquemment utilisé est celui de l'activateur de plasminogène. Des auteurs ont montré que l'adjonction à la construction plasmidique d'un intron permettait d'obtenir un niveau de transcription et de synthèse d'antigène plus élevé [Manthorpe *et al.*, 1993].

Le corps du plasmide

Le corps du plasmide (ou squelette plasmidique) comprend les séquences qui sont nécessaires à sa réplication et son maintien dans la cellule bactérienne dont il est originaire et de laquelle le plasmide va être purifié. Ces séquences incluent une origine de réplication assurant un nombre élevé de copies de plasmides (100 à 200) au sein de la bactérie et un gène de résistance à un antibiotique (classiquement Ampicilline ou Kanamycine). C'est d'ailleurs en manipulant et en remplaçant ces gènes de résistance aux antibiotiques que l'on a mis en évidence la présence de séquences immuno-stimulatrices (ISS) sur les plasmides d'origine bactérienne utilisés en vaccination ADN [Sato *et al.*, 1996]. Cette découverte (ou redécouverte puisque l'on connaissait déjà certaines des propriétés immuno-stimulatrices de certains acides nucléiques) a suscité un intérêt grandissant pour étudier le squelette du plasmide plutôt qu'à sa partie directement fonctionnelle. En effet, il est à parier que l'on parviendra plus facilement à moduler des réponses immunes en greffant des ISS plutôt qu'en essayant de développer des promoteurs plus puissants.

Schéma du plasmide-type utilisé en vaccination ADN



Squelette plasmidique

3.2.2. PRODUCTION ET CONSERVATION

Culture bactérienne

La production des plasmides est réalisée à partir de cultures de bactéries *E. Coli* transformées par la construction plasmidique. A l'échelle du laboratoire, les cultures sont entreprises dans des flacons contenant de l'ordre du litre de milieu de culture (permettant de purifier 5 à 10 mg de plasmide), alors qu'à une échelle industrielle, ces cultures peuvent être effectuées en fermenteurs de plusieurs centaines de litres (lots de plusieurs grammes). Le milieu de culture comprend un antibiotique de manière à ne sélectionner que la croissance des bactéries contenant le plasmide, lui-même porteur de la résistance à l'antibiotique. De plus, les souches de bactéries utilisées doivent être dépourvues d'endonucléases (End⁻), de manière à éviter une dégradation enzymatique du plasmide.

Purification

Les bactéries sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance et soumises à une étape de lyse alcaline comme décrite par Sambrook *et al.* [Maniatis *et al.*, 1982]. Les conditions de réalisation de cette lyse des bactéries est importante puisqu'une étape d'agitation trop violente peut être à l'origine de contamination de la préparation de plasmide par des fragments d'ADN génomique de la bactérie. Après une étape de précipitation saline des débris des parois bactériennes, des protéines solubles et de l'ADN génomique, l'ADN plasmidique était

classiquement purifié par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Cette technique fastidieuse et nécessitant l'emploi de fortes concentrations de bromure d'éthidium, dangereux agent intercalant, a été abandonnée au cours des dernières années au profit de kits basés sur l'emploi d'une chromatographie d'échange d'ions.

Contaminations

Les premières versions de ces kits ne présentaient pas toutes les garanties de pureté, puisque l'étape de chromatographie retenait en même temps que l'ADN plasmidique, les endotoxines bactériennes de type LPS, dont la moindre contamination rend impropre l'utilisation d'un produit chez l'homme. Les dernières versions de ces kits introduisent dorénavant une étape de dégradation des endotoxines qui perdent ainsi toute propriété de fixation à la résine échangeuse d'ions. La présence éventuelle de contaminations peut être détectée en utilisant un test colorimétrique basé sur l'activité enzymatique du lysat d'améboocyte de *Limulus*.

Conformation

L'ADN plasmidique se présente sous différentes conformations en fonction de son environnement (concentration saline, température, etc...): linéaire, circulaire relâchée ou super-enroulée. Ces trois formes peuvent être distinguées après migration et coloration sur un gel d'agarose car leur conformation va affecter leur manière de migrer au travers du réseau de mailles du gel. Ainsi la forme super-enroulée migre généralement le plus loin, puis la forme linéaire et enfin la forme circulaire relâchée. Il apparaît que la forme super-enroulée soit la forme efficace pour une transfection *in vivo*. En effet, la forme la plus compacte est simplement la plus résistante à l'action des nucléases. De plus, il faut éviter d'utiliser des plasmides linéarisés car la séquence de la cassette d'expression peut être interrompue et l'on sait qu'un plasmide linéarisé a plus de chances de s'intégrer dans le génome.

Coûts

Si l'on prend comme référence la production d'une protéine recombinante classique, la production d'un plasmide à grande échelle garanti exempt d'endotoxines bactériennes n'apparaît pas être meilleur marché [Communication personnelle]. En réalité, l'économie provient du fait que l'on évite le coût (et le temps) de développement de procédés d'expression, de fermentation et de purification d'une protéine recombinante. Ainsi, dès qu'un nouveau gène est identifié, son ADNc est disponible pour l'insérer dans un vecteur d'expression et l'on peut directement tester son immunogénicité en l'espace de quelques semaines (la réalité se rapproche de la fiction de certains films-catastrophe à épilogues heureux au cours desquels des chercheurs mettent au point en 48 heures un vaccin contre une maladie fulminante et dévastatrice). En outre, dans la perspective d'une application de cette technologie à de nombreuses maladies, on peut entrevoir une importante économie globale du fait que quelque soit le transgène porté par le plasmide, chaque plasmide possède les mêmes propriétés physico-chimiques et peut donc être purifié selon un processus identique.

Sécurité

En comparaison d'approches visant à développer des micro-organismes vivants, vivants-atténués ou même morts, le risque pour le chercheur développant un vaccin ADN est minime puisqu'à aucune étape (s'il dispose d'une banque ADNc ou du ADNc d'intérêt) il n'est amené à

manipuler l'agent infectieux. Ce aspect est particulièrement important pour des pathogènes émergents, tel le virus Ebola, dont on connaît encore mal les modes de transmission [Davis *et al.*, 1996]. De la même manière, en comparaison de l'élaboration d'une protéine recombinante à visée vaccinale, cette méthode évite au chercheur d'être au contact d'une éventuelle protéine toxique (cas des toxines bactériennes, souvent candidats vaccinaux).

Conservation

D'un point de vue logistique, les vaccins ADN pourraient bien s'avérer être très économiques en évitant d'emprunter la chaîne du froid si difficile à maintenir dans les pays des zones tropicales. En effet, la stabilité de l'ADN plasmidique est bien supérieure aux autres supports de vaccins. L'ADN est thermostable et peut se conserver à température ambiante sous forme lyophilisée.

Solutions de resuspension

L'eau physiologique est la solution de resuspension la plus couramment utilisée pour l'injection des plasmides. L'addition de tampons (Tris) ou d'agents complexant les ions divalents (EDTA) n'apparaît pas nécessaire à la conservation sous forme de solution de plasmides purifiés par les techniques décrites ci-dessus.

3.2.3. VOIES D'INJECTION

Voie intramusculaire

La vaccination ADN a eu classiquement pour cible le muscle. Cette voie d'injection a été la première décrite dans les modèles animaux [Tang *et al.*, 1992 ; Ulmer *et al.*, 1993] et à d'ailleurs été utilisée pour les premiers essais cliniques chez l'homme [Calarota *et al.*, 1998 ; MacGregor *et al.*, 1998]. Elle est d'ailleurs toujours largement utilisée dans de nombreux modèles. L'injection est généralement réalisée dans les muscles quadriceps (modèles de rongeurs) en solution physiologique et avec des quantités variant de quelques microgrammes à des centaines de microgrammes. A la lumière de données récentes, il semblerait que les cellules musculaires soient de bonnes cibles pour la transfection. Cette caractéristique est augmentée dans des protocoles où une régénération des fibres musculaires est induite après injection d'agents nécrotiques tels que la cardiotoxine [Davis *et al.*, 1993b], ou la bipuvacaïne [Wang *et al.*, 1993 ; Vitadello *et al.*, 1994]. Cependant, ces cellules musculaires ne joueraient qu'un rôle de synthèse et de stockage de l'antigène. La prise en charge ultérieure de l'antigène par des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes serait en effet nécessaire. En ce qui concerne le développement de cette approche vaccinale chez l'homme, il semblerait que le tissu musculaire des mammifères supérieurs, plus riche en tissu conjonctif, ne soit pas aussi bien adapté à ce type d'immunisation que celui des modèles de rongeurs [Davis *et al.*, 1996]. Ainsi un protocole de vaccination ADN intramusculaire contre la malaria a fonctionné chez la souris, mais pas chez le singe *Aotus*, alors que la voie intradermique a fonctionné dans les deux modèles [Gramzinski, 1996 ; Sedegah *et al.*, 1994]. Cependant il pourrait s'avérer que les muscles de nourrissons (âge cible des campagnes de vaccination) présentent des propriétés de régénération plus importantes que ceux des adultes [Davis *et al.*, 1996].

Voie intradermique

A l'opposé du tissu musculaire, la peau constitue un des sites anatomiques le plus souvent au contact des micro-organismes pathogènes. La peau possède un système immunitaire développé et organisé s'appuyant sur un réseau constitué de cellules chargées de capter les antigènes en relais avec des organes lymphoïdes, lieu de l'induction des réponses immunes spécifiques [Bos *et al.*, 1993]. Cette voie s'avère supérieure en efficacité à la voie musculaire en injection classique par aiguille [Raz *et al.*, 1994]. Le second attrait pour cette voie provient de son accessibilité à une technique de transfection par micro-bombardement (gene gun) qui se révèle d'une efficacité remarquable (Cf. 3.2.4. Modes d'injection). L'observation de tissu cutané transfecté, suite à l'injection d'ADN, semble indiquer que la quantité d'antigène exprimée dans la peau soit moins importante que dans le muscle subissant le même traitement. Cette observation laisse supposer que les cellules de la peau sont moins réceptrices à la transfection, mais qu'en contrepartie, leur efficacité à stimuler le système immunitaire est supérieure.

Voies muqueuses

Les muqueuses des voies respiratoire, gastro-intestinale et vaginale sont, comme la peau, au contact permanent de micro-organismes. Leur organisation immunologique est elle aussi développée et établit des connexions entre chacun des sites muqueux, d'où la notion de système commun des muqueuses [Mc Ghee *et al.*, 1992 ; Mestecky *et al.*, 1994]. Ces sites sont attrayants pour la vaccination à plus d'un titre. En effet, ils représentent des voies d'administration non-invasives, permettent en théorie la mise en place de réponses locales se ramifiant à l'ensemble des sites muqueux, ainsi que des réponses systémiques. En outre, l'établissement d'une immunité locale pourrait permettre de lutter contre des pathogènes dès leur entrée dans l'organisme. La mise au point de vaccins administrables par voie orale en une seule dose est donc l'étalon d'or fixé comme objectif par l'OMS. Pour l'instant, l'administration d'ADN par ces voies n'a pas permis d'induire de réponses immunes suffisamment importantes pour penser qu'elles puissent être protectrices [Fynan *et al.*, 1993]. En effet, les environnements muqueux sont favorables à une dégradation rapide de l'ADN et de plus, les cellules bordant les lumières des muqueuses présentent des structures particulières probablement impropres à une transfection efficace. Les vecteurs vivants, micro-organismes naturels des tissus muqueux, sont pour l'instant beaucoup plus efficaces. De même, le développement de vecteurs synthétiques utilisés pour véhiculer des antigènes protéiques sont au point. Des efforts restent donc à être entrepris concernant l'administration de plasmides par ces voies, notamment en s'inspirant des approches existantes: vecteurs vivants et vecteurs synthétiques. L'application de la vaccination ADN à ces sites dépendra donc du développement de véhicules adaptés.

3.2.4. MODES D'INJECTION

Nombre de doses

L'objectif de la dose unique quant à lui, semble en mesure d'être atteint par l'utilisation de la vaccination ADN. En effet, l'expression de l'antigène au sein des cellules de l'hôte semble être prolongée, à l'opposé de l'expression d'antigènes portés par des vecteurs recombinants dont on limite volontairement la survie dans l'organisme. Ainsi, les cellules transfectées peuvent être considérées comme les usines du vaccin, assurant non pas une livraison unique, mais une

livraison en continu. De manière complémentaire, ces cellules transfectées s'apparentent à des entrepôts de stockage de l'antigène qui se retrouve donc à l'abri de dégradations extra-cellulaires susceptibles, dans certains cas, d'amenuiser son pouvoir immunogène. Cette particularité est donc essentielle pour des antigènes présentant une faible demi-vie et pour lesquels le temps de stimulation du système immunitaire sera court. Ainsi plusieurs études ont pu démontrer l'efficacité d'un protocole basé sur une dose unique de plasmide [Xu *et al.*, 1995 ; Davis *et al.*, 1996].

Adjuvant intégré

Un problème majeur du développement actuel de vaccins basés sur des antigènes recombinants réside dans l'adjonction d'un adjuvant. En effet, seul l'hydroxyde d'aluminium (Alum) a reçu l'aval des administrations réglementaires, mais beaucoup d'antigènes complexés à l'Alum s'avèrent trop peu immunogènes comparativement à d'autres adjuvants puissants mais toxiques (adjuvant de Freund). D'autres adjuvants basés sur des préparations purifiées d'extraits bactériens (mycobactéries) sont à l'étude, mais le problème de la combinaison à l'antigène se posera toujours et devra de toute manière, pour chaque préparation, faire l'objet d'études poussées d'adsorption et de stabilité. Une découverte importante a mis en évidence les propriétés immuno-stimulatrices de l'ADN d'origine bactérienne [Pisetsky, 1996]. Cette activité semble liée à la présence de séquences CpG non-méthylées spécifiques aux génomes des bactéries. Ces séquences pourraient bien constituer un stimulus majeur du système immunitaire, complémentaire des structures liposaccharidiques des membranes, au cours des processus d'infections bactériennes. On retrouve ces séquences au niveau des plasmides utilisés en vaccination ADN, qui sont issus et produits par des bactéries *E. coli*. Les séquences CpG se révèlent être à l'origine de certaines spécificités de la réponse immune induite par la vaccination ADN [Klinman *et al.*, 1997 ; Leclerc *et al.*, 1997] et on les assimile à un adjuvant interne des vaccins ADN.

Vaccins combinés

En terme d'administration, la vaccination ADN offre un avantage déterminant, à savoir la possibilité de mélanger des plasmides différents sans problème de pharmacopée important. En effet, contrairement à des protéines recombinantes, par exemple, la spécificité antigénique n'entraîne pas de spécificité physico-chimique différente des plasmides, qui ne sont en définitive que des porteurs neutres (sauf en terme de langage génétique et de pouvoir adjuvant) de l'information vaccinale. La notion de neutralité est importante car elle entend qu'il n'y aura pas de compétition ou de différences de comportement des différents plasmides, contrairement à ce que l'on pourrait imaginer pour des vecteurs vivants recombinants codant pour différents antigènes. Cette possibilité de mélange étend les possibilités de formulations vaccinales mixtes pour les vaccinations de masse des populations des zones d'endémies, mais la souplesse de ce système devrait également permettre au praticien d'établir des cocktails à la carte pour les voyageurs en fonction des destinations.

Injection classique

Classiquement, les solutions d'ADN sont injectées à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Cette méthode permet de contrôler directement le site d'injection et d'administrer des volumes importants si nécessaire. En règle générale les concentrations sont de l'ordre de 1 mg/ml et les doses de 1 à 100 µg par administration (chez la souris). La répartition d'une dose en

plusieurs points d'injections est généralement conseillée de façon à s'assurer qu'au moins une partie du matériel sera correctement administrée [Spier, 1996].

Utilisation du gene gun

L'adoption d'un protocole de micro-bombardement de la peau par de nombreuses équipes a permis d'induire des réponses immunes importantes avec des quantités d'ADN de l'ordre du nanogramme. Cette technique permet en effet de délivrer les plasmides directement au sein des cellules par passage mécanique au travers du tissu et des cellules. Les plasmides sont en fait adsorbés sur des billes d'or ou de tungstène d'un diamètre voisin de 1 micromètre puis projetés dans le tissu (classiquement la peau) à l'aide d'une force électrique ou pneumatique. L'ajustement de la force de bombardement permet de contrôler la profondeur de pénétration des microparticules dans le tissu (épiderme, derme ou hypoderme pour la peau) [Eisenbraun *et al.*, 1993]. De manière très surprenante, une comparaison des réponses immunes engendrées par injection cutanée d'ADN, soit par aiguille, soit par gene gun, a mis en évidence des réponses totalement opposées en terme de profil de cytokines [Feltquate *et al.*, 1997]. L'explication réside sans doute dans le fait que lors de l'injection par aiguille, la majorité de l'ADN reste localisée à l'extérieur des cellules et exerce alors pleinement son activité immuno-stimulatrice orientant la réponse immune spécifique vers un profil de type Th1. Au contraire, lors de l'administration par gene-gun, une très faible quantité d'ADN se retrouve dans le milieu extra-cellulaire (faible quantité administrée et forte proportion transfectant directement les cellules) et est donc peut être trop faible pour exercer une activité immunostimulatrice promotrice d'un profil Th1. Le développement de versions portables de cette technologie pourrait s'avérer être pratique et efficace pour des campagnes de vaccination massives dans les pays en voie de développement.

3.3. MECANISMES

3.3.1. LES MYSTERES DE LA TRANSFECTION *IN VIVO*

Un récepteur à l'ADN?

Dans le cadre de la vaccination par ADN nu, le mécanisme de transfection est toujours une question en suspens. Comment expliquer en effet que la transfection par ADN nu puisse avoir lieu *in vivo* mais pas *in vitro*? Il peut être envisagé que l'ADN se complexe à des composés de la matrice extracellulaire pour interagir de manière affine avec la membrane cellulaire. Il est également proposé que selon le degré de différenciation des cellules (différent entre *in vivo* et *in vitro*), des fonctions membranaires soient plus ou moins altérées après contact avec l'ADN, déterminant ainsi une qualité particulière de perméabilité pour des molécules telles que les acides nucléiques [Giachetti *et al.*, 1996]. Ces hypothèses n'apportent cependant pas de lumière sur le véritable mécanisme d'entrée dans la cellule: s'agit t'il de pinocytose, d'endocytose ou d'endocytose médiée par un récepteur? Le caractère destructif de la phagocytose est sans doute à écarter de nos hypothèses, preuve en est la grande difficulté à transfecter les macrophages, cellules phagocytaires par excellence. La taille d'un plasmide surtout sous forme condensée (super-enroulée) permet d'envisager une interaction avec un récepteur de type scavenger ou autre. D'ailleurs l'ADN, de par sa structure, est capable d'établir des liaisons très spécifiques avec des

structures conformationnelles de certaines protéines (DNA binding protéines au niveau du noyau). Certaines études ont fait mention de la fixation d'oligonucléotides à des protéines d'extraits membranaires de différentes lignées cellulaires [Bennett *et al.*, 1985 ; Loke *et al.*, 1989 ; Yabukov *et al.*, 1989], sans qu'un consensus concernant la taille d'une telle protéine n'ait été établi. Cependant, ces études, de part les caractéristiques de fixation des oligonucléotides, semblent tabler sur la mise en jeu d'une endocytose médiée par un récepteur. La recherche d'un récepteur à l'ADN est maintenant relancée depuis l'identification des séquences CpG immuno-stimulatrices (ISS). En effet, l'identification d'un récepteur serait la porte ouverte au développement d'agonistes plus puissants et d'antagonistes. Dans le contexte plus large des infections bactériennes, la compréhension du rôle de l'ADN bactérien et les applications pharmacologiques seraient très importantes. A la lumière des travaux entrepris en ce qui concerne les ISS, il est probable que la séquence primaire, le degré de méthylation et la conformation tridimensionnelle de l'ADN puisse être des facteurs déterminants pour la liaison à un récepteur.

Le chemin vers le noyau

La localisation d'un ADN plasmidique au niveau du cytoplasme n'est pas une situation naturelle habituellement rencontrée par la cellule eucaryote. Comment un plasmide parvient donc jusqu'au noyau et comment y pénètre t'il? Il faut en effet rappeler la nécessité pour le plasmide de rencontrer la machinerie transcriptionnelle de la cellule transfectée (RNA polymérase, facteurs de transcription, topoisomérases pour l'adoption d'une conformation relaxée...) pour permettre la synthèse de l'antigène. Des histones ou des peptides d'adressage nucléaire ont été utilisés pour tenter de cibler l'ADN plasmidique vers le noyau permettant cependant d'augmenter la synthèse d'antigène d'une manière relativement limitée [Communication personnelle].

3.3.2. RISQUES LIÉS A L'ADMINISTRATION D'ADN

Evaluation de la possibilité d'intégration chromosomique

A l'opposé de l'utilisation de vecteurs vivants, la vaccination ADN ne présente pas de risque de réversion à une forme pathogène, à moins que l'on imagine d'administrer l'ensemble des gènes d'un micro-organisme pathogène. Cependant, des interrogations pèsent sur l'éventualité de risques plus sournois. En effet, la synthèse d'antigène, suite à l'administration de plasmide, implique que le plasmide chemine jusqu'au noyau de la cellule transfectée pour y rencontrer la machinerie transcriptionnelle. Dans l'espace nucléaire, l'ADN plasmidique se retrouve donc en contact étroit de l'ADN génomique. L'ADN plasmidique résident habituel des bactéries sous forme épisomale se comporte t'il de la même manière au sein du noyau de la cellule eucaryote? Cette question a été abordée par quelques groupes de recherche et aucun événement d'intégration plasmidique dans le génome n'a pu être décelé avec les méthodes de détection les plus sensibles [Danko *et al.*, 1994 ; Robertson, 1994]. Cependant si l'on rapproche notre modèle de la transfection *in vitro*, il est important de noter que l'intégration stable d'un plasmide recherchée *in vitro* est un événement rare (d'une fréquence de l'ordre de 10^{-8}) et est augmentée lorsque le plasmide est linéarisé. Il apparaît donc probable qu'au cours de la vaccination ADN (plasmides circulaires), des événements d'intégration de plasmides dans le génome se produisent à une fréquence très faible située au delà des moyens actuels de détection. En fait, il a été montré que ce type d'évènement est inférieur à la survenue spontanée de tumeurs [Moelling, 1997]. Les

opposants à ce type de vaccination dénoncent en effet des risques d'activation de proto-oncogènes ou de désactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Des études supplémentaires, notamment à long terme, dans des modèles animaux adéquats devront donc faire l'objet d'études minutieuses pour que cette approche ne soit appliquée qu'en pleine connaissance des risques qui l'accompagnent.

Résistance aux antibiotiques

Des améliorations doivent être apportées en ce qui concerne le système de sélection du plasmide lors de sa préparation. En effet, il n'est pas concevable d'administrer des plasmides contenant les gènes de résistance à des antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine. Les transferts horizontaux de gènes de résistances ont été largement démontrés et sont à l'origine de catastrophes thérapeutiques (essentiellement en milieux hospitaliers où la pression de sélection est la plus intense). Les efforts devront donc se concentrer sur l'adoption de techniques de sélection faisant appel à des produits dont on n'envisage pas d'application thérapeutique, tel le mercure [Herrero *et al.*, 1990].

Réponse vis-à-vis du vecteur: anticorps anti-ADN?

En théorie, le fait que le vaccin constitué d'ADN plasmidique soit découplé de l'antigène pour lequel il code, empêche le système immunitaire d'assimiler le vaccin à l'ADN. Ceci entraîne que le support vaccinal constitué d'ADN pourra être utilisé à plusieurs reprises pour des rappels ou des vaccinations contre d'autres pathogènes, sans être reconnu en tant qu'antigène ayant servi au priming. Ceci est important car on doit «laisser le temps et la liberté» au plasmide d'exprimer son information antigénique. Ce problème se pose lors de l'utilisation de vecteurs vivants induisant une puissante réponse immune qui ne manque de les neutraliser lors d'une seconde administration. Cette caractéristique est particulièrement importante dans le cadre de la vaccination des nouveaux nés. En effet ces derniers présentent des anticorps maternels ayant la plupart du temps des spécificités vis-à-vis de l'antigène vaccinal. Un vaccin protéique, ou un vaccin vivant exprimant à sa surface l'antigène sont donc neutralisés avant même d'avoir pu présenter l'antigène de manière appropriée. Il convient également de reconnaître que l'on a depuis longtemps caractérisé des anticorps anti-ADN semblant ainsi indiquer l'existence d'une réponse immune spécifique. Jusqu'à maintenant aucune étude n'a fait mention d'effets adverses qui pourraient avoir pour cause des anticorps dirigés contre l'ADN plasmidique lui-même. En fait, dans le cadre de l'administration directe par l'intermédiaire d'une aiguille, une faible proportion des plasmides transfecte des cellules et est ainsi à l'origine de la synthèse *in situ* de l'antigène (très faible efficacité largement accrue par l'usage du gene gun). La plupart des plasmides restent localisés dans le milieu extra-cellulaire et on peut penser que si des anticorps anti ADN sont induits, ils le soient vis-à-vis de ces plasmides qui ne participent pas à la synthèse d'antigène. Les risques véritables résident plutôt dans le fait que des anticorps anti-ADN ne soient auto-réactifs puisque la spécificité de certaines maladies immune est portée par des séquences d'ADN [Isenberg *et al.*, 1997]. Un des premiers rapports d'essais cliniques chez l'homme de vaccins ADN s'est attaché à évaluer le risque d'induction d'anticorps anti-ADN. D'après ce rapport, aucune réaction de ce type n'a pu être décelée [MacGregor *et al.*, 1998].

3.3.3. LE PARADOXE DE LA VACCINATION ADN

Le paradoxe de la vaccination ADN reside dans le fait que les quantités infimes d'antigène synthétisé après l'injection de plasmides sont capables d'induire des réponses immunes puissantes. L'efficacité de transfection est en effet minimale et l'on estime le nombre de cellules transfectées à quelques centaines et les quantités d'antigène synthétisées à quelques dizaines de nanogrammes [Wolff *et al.*, 1990]. En comparaison, il faut administrer plusieurs microgrammes d'antigène recombinant ou purifié pour induire des réponses comparables. En fait, la faible efficacité de transfection semble être largement compensée par deux mécanismes propres à la vaccination ADN: l'effet adjuvant de l'ADN et la synthèse intracellulaire de l'antigène notamment au niveau de cellules présentatrices comme les cellules dendritiques.

L'ADN procaryote, un langage moléculaire avec le système immunitaire

Jusqu'à une période récente, l'ADN était considéré comme une molécule totalement inerte vis-à-vis du système immunitaire et comme seul support de l'information génétique. Les travaux de Tokunada sur l'activité anti-tumorale de l'ADN des mycobactéries par l'intermédiaire de l'activation des cellules NK ont clairement établi que L'ADN d'origine bactérienne possède des propriétés de stimulation du système immunitaire [Yamamoto *et al.*, 1992]. Des oligonucléotides comportant des séquences CpG (sens 5' vers 3') non-méthylées dans un environnement de bases particulier peuvent reproduire à elles-seules ces propriétés [Klinman *et al.*, 1997]. Ce type de séquences sont sous-représentées dans l'ADN des organismes eucaryotes et sont relativement spécifiques de part leur caractère non-méthylé, propre à l'ADN procaryote. Ces séquences se sont révélées porteuses d'une série d'activités vis-à-vis des cellules du système immunitaire. Ainsi, elles peuvent induire la production des cytokines IFN- γ , IL-6, IL-12 [Chu *et al.*, 1997 ; Roman *et al.*, 1997 ; Yi *et al.*, 1996] activent les cellules B [Krieg *et al.*, 1995] et les cellules NK [Ballas *et al.*, 1996], les monocytes macrophages [Sparwasser *et al.*, 1997a ; Stacey *et al.*, 1996] et les cellules dendritiques [Sparwasser *et al.*, 1998], induire des mécanismes d'inflammation et conduire au choc toxique via activation du TNF- α [Sparwasser *et al.*, 1997b]. Des résultats précurseurs laissent entrevoir que de légères variations dans les séquences des oligonucléotides, mais également des modifications de leur conformation (exemple de la structure quadruplex des poly-G) peuvent entraîner des modulations et même des effets antagonistes [Communication personnelle]. Cette pléiade d'activités laisse pressentir leur rôle *in vivo* au cours d'infections bactériennes. Les séquences CpG pourraient apporter un message secondaire à celui des constituants de la paroi (LPS), en signalant par exemple aux cellules ayant ingérées des bactéries la présence d'une infection.

Les motifs CpG comme nouvelle classe d'adjuvants

Dans le cadre de la vaccination qui nous intéresse, ce type de séquences est pressentie comme une nouvelle classe d'adjuvants et a déjà prouvé son efficacité en combinaison avec des antigènes protéiques [Chu *et al.*, 1997 ; Davis *et al.*, 1998]. L'adjuvant est donc, dans notre modèle, une partie intégrante du vaccin et des études se sont attachées à étudier la contribution de ces séquences dans les réponses immunes induites. Des plasmides dont le gène de résistance pour l'ampicilline riche en séquences CpG a été remplacé par le gène de résistance à la kanamycine dépourvue de ces séquences, ont une activité largement diminuée [Sato *et al.*, 1996]. Lorsque ces séquences sont méthylées on assiste à une suppression presque complète de la capacité de lymphocytes spécifiques de l'antigène à produire les cytokines IL-6, IL-12 et IFN- γ . Un effet

comparable est observé pour la réponse anticorps spécifique [Klinman *et al.*, 1997]. En outre, la co-administration de plasmides non codants contenant ce type de séquences ou bien directement de ces séquences conduit à un accroissement de l'immunogénicité [Klinman *et al.*, 1997]. La prochaine étape consistera donc à greffer sur les plasmides utilisés ces séquences immuno-stimulatrices. Le profil des cytokines qu'elles stimulent de manière non spécifique mais également de manière spécifique en présence d'un antigène indique une claire orientation vers une réponse immune de type Th1. Ce profil a été utilisé à profit pour induire une résistance à l'infection par *Leishmania major* dans une souche de souris habituellement sensible [Zimmermann *et al.*, 1998].

Stimulation au coeur des cellules d'alerte

La seconde explication à la surprenante efficacité de la vaccination ADN par rapport aux quantités d'antigènes synthétisées provient vraisemblablement du fait que cette synthèse au sein des cellules de l'organisme immunisé mime parfaitement une situation naturelle d'infection intracellulaire et plus particulièrement virale. La majorité des cellules constituant un organisme ont mis en place des systèmes d'auto-contrôle de leur état. Ainsi, les cellules dégradent constamment une petite partie des protéines qu'elles ont synthétisées et présentent ces fragments protéiques à leur surface à l'aide de molécules spécialisées, les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH I). De la même manière, lorsqu'une cellule est infectée par un virus par exemple, les protéines virales suivent le même chemin jusqu'à la surface de la cellule. Les cellules T sont chargées de surveiller la nature des peptides qui sont présentés. De part la sélection qui a lieu au niveau du thymus, seules des cellules T possédant des récepteurs en mesure de reconnaître des peptides de nature étrangère se retrouvent en circulation. La reconnaissance peptidique par ces cellules T va induire un message d'activation conduisant à leur pleine activité de cellules T cytotoxiques. L'activation des cellules T ayant reconnu un peptide de nature étrangère nécessite un second message fourni par d'autres molécules appelées molécules costimulatrices (CD80, CD86). Or, ce type de molécules, contrairement à CMH I, n'est pas exprimé par toutes les cellules mais apparaît être restreint au domaine des cellules présentatrices d'antigènes. Dans ce groupe de cellules, des distinctions sont maintenant établies en fonction de leurs capacités de présentation et il apparaît très clairement que les cellules pourvues de la plus grande efficacité de présentation de l'organisme soit les cellules dendritiques. La vaccination ADN, du moins intradermique aussi bien par injection classique que par gene gun, conduit à la transfection d'un certain nombre de cellules dendritiques. Ainsi, l'équipe de B. T. Rouse a montré que la réimplantation dans l'organisme de cellules dendritiques transfectées *ex-vivo* était bien plus efficace que la même expérience réalisée avec des macrophages [Manickan *et al.*, 1997]. Il semble que le nombre de cellules dendritiques transfectées nécessaires à l'induction d'une réponse immune spécifique ne dépasse pas une centaine [Porgador *et al.*, 1998]. Il apparaît donc que c'est principalement la très faible proportion de plasmide qui transfecte des cellules dendritiques qui va être à l'origine de l'initiation de la réponse immune spécifique. Des protocoles visent donc à l'heure actuelle à cibler la transfection de ce type de cellules, notamment à l'aide de liposomes recouverts de peptides spécifiques. Finalement, le paradoxe de la vaccination ADN semble pouvoir s'expliquer par l'efficacité combinée des cellules dendritiques à présenter l'antigène synthétisé en leur sein et des séquences CpG immunostimulatrices qui s'avèrent capables d'activer directement les cellules dendritiques.

3.3.4. CINÉTIQUE D'EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE

Expression prolongée synonyme de réponse immune prolongée?

Si l'on replace la vaccination ADN dans le contexte du transfert de gènes à des organismes supérieurs, elle s'apparente dans son principe à la thérapie génique et on pourrait même la nommer "thérapie génique contre le non-soi", puisque ses domaines d'application dépassent aujourd'hui largement celui de la prophylaxie contre les micro-organismes pathogènes. Cependant la rapidité et l'amplitude du succès de la vaccination ADN tient au fait que, contrairement aux exigences de la thérapie génique réparatrice de défauts, l'expression du transgène peut se limiter à de petites quantités et à un nombre restreint de cellules en raison de la sensibilité du système immunitaire et de la puissante capacité d'expansion du nombre de cellules immunes spécifiques de l'antigène. Contrairement aux contraintes de la thérapie génique, l'expression n'a pas besoin d'être continue tout au long de la vie de l'individu car le système immunitaire va mémoriser le produit antigénique du transgène. Les premières études d'expression de l'antigène suite à l'administration d'ADN dans les muscles de souris avaient fait état d'une prolongation de l'expression du transgène sur l'ensemble de la vie de l'animal (de même en ce qui consiste la persistance du plasmide) [Wolff *et al.*, 1992]. Depuis, on tend à considérer que la persistance des réponses immunes et leur maintien à un niveau élevé, suite à la vaccination ADN, est directement corrélé à cette cinétique d'expression. Cependant, l'ensemble des travaux qui se sont attachés à caractériser cette cinétique d'expression ne s'accordent pas tous à soutenir l'existence d'une expression prolongée. Il semble que le pic d'expression soit situé entre 24 heures et 72 heures après injection, puis qu'il y ait une décroissance progressive de l'expression locale (extinction de 15 jours à quelques mois). La cinétique d'expression du transgène va dépendre de divers facteurs, au nombre desquels, le type de cellule transfectée (différenciée ou non) mais également la stabilité ou demi-vie de l'antigène protéique (ainsi la luciférase et l'antigène Hbs ayant servi de marqueurs aux premières études sont très stables). Comme le maintien de fortes réponses immunes à un niveau constant est une caractéristique commune de beaucoup de modèles de vaccination ADN, il est raisonnable de penser qu'un facteur dépendant de l'antigène puisse en partie être responsable de ce caractère si recherché en vaccination.

Dangers d'une expression à long-terme

Il existe un autre type d'argument en défaveur d'une expression de l'antigène trop prolongée. En effet, ce type de cinétique qui concerne une expression intracellulaire de quantités non-massives, pourrait comporter le risque d'être assimilé à un état d'infection chronique pouvant s'accompagner de phénomènes d'anergie ou de tolérance. Il est également possible que l'antigène ainsi exprimé puisse être assimilé au soi avec le risque de développement de réactions auto-immunes. Cependant, aucun de ces phénomènes n'a jamais pu être mis en évidence, suggérant que, dans ces modèles, le système immunitaire est en mesure de distinguer clairement la nature et la source antigénique du transgène. Finalement, une fois de plus on remarque que cette approche ressemble à une infection naturelle à laquelle notre organisme répond de la manière la mieux adaptée et la plus efficace.

3.3.5. SYNTHÈSE INTRACELLULAIRE ET DEVENIR DE L'ANTIGÈNE

Qualité de l'antigène

Un des avantages indéniables de l'approche ADN est qu'elle est particulièrement adaptée à résoudre des problèmes parfois insolubles de purification ou de transformations post-transcriptionnelles d'une protéine recombinante. Les cellules-usines vont en effet garantir le contrôle qualité de la fabrication de l'antigène. Ainsi, la mise en place de la bonne structure tridimensionnelle mais également l'association de sous-unités entre-elles (structure quaternaire) seront assurées. En outre, l'ensemble des modifications post-transcriptionnelles comprenant par exemple les glycosylations, les acétylations seront assurées par la machinerie cellulaire.

Routage intracellulaire et présentation

Si l'on va plus loin dans le devenir de l'antigène néo-synthétisé, on peut entrevoir que la cellule-usine, pour peu qu'elle soit douée de capacités de présentation d'antigène va également pouvoir assurer le routage intracellulaire, les étapes de processing et enfin la présentation à sa surface de fragments choisis de l'antigène en association avec les molécules du CMH. Des expériences ont été réalisées dans ce sens pour diriger l'antigène néo-synthétisé vers le reticulum endoplasmique pour une présentation membranaire ultérieure. Le greffage de peptides d'adressage spécifiques en amont du cDNA de l'antigène ont ainsi permis d'obtenir une augmentation des réponses immunes [Ciernik *et al.*, 1996].

Libération dans le milieu extracellulaire

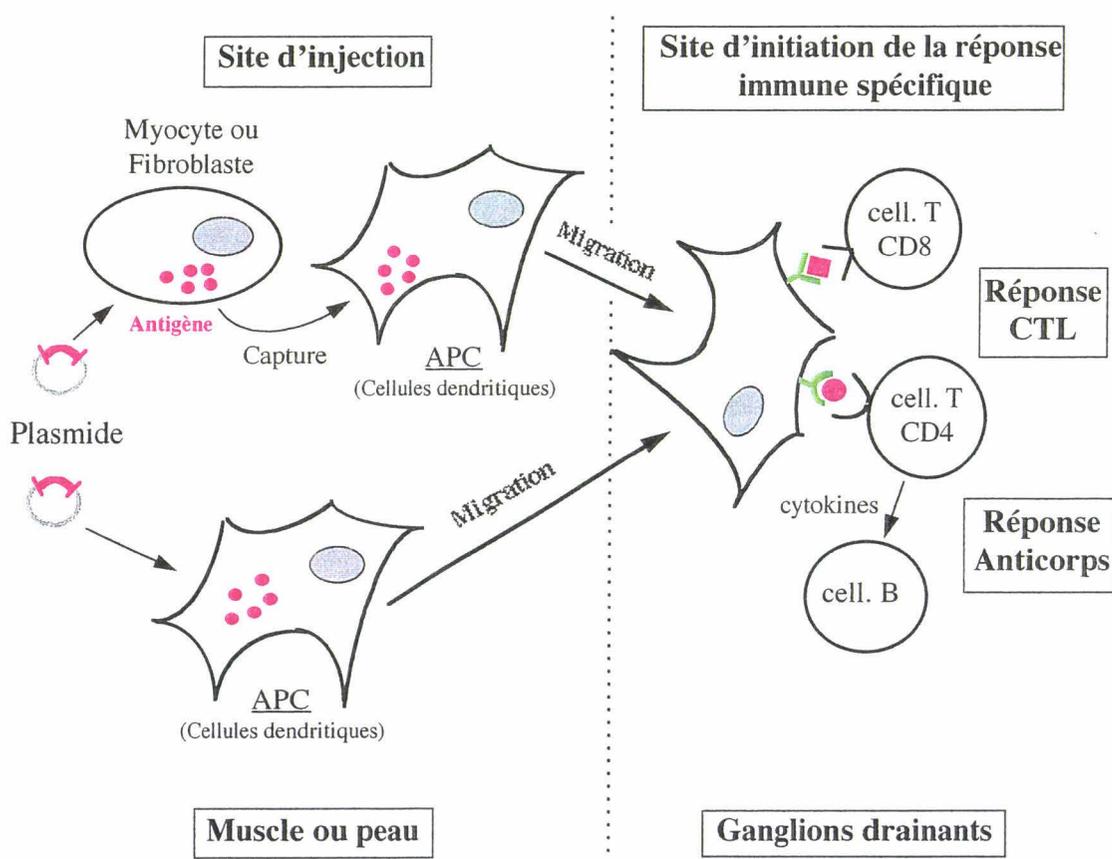
L'induction d'anticorps dans le cadre de la vaccination ADN est une règle générale et implique que l'antigène se retrouve dans le milieu extracellulaire. Dans le cas d'antigènes naturellement sécrétés (gène comportant une séquence signal), le processus de sécrétion va pouvoir s'opérer. Par contre, dans le cas d'antigènes à localisation intracytoplasmique on peut supposer qu'une lyse de la cellule constitue une étape nécessaire à la libération d'antigène. En effet, la vaccination ADN avec des formes matures, non sécrétées d'antigènes a également permis d'obtenir des réponses anticorps [Huygen *et al.*, 1996 ; Inchauspé *et al.*, 1997]. La cellule exprimant l'antigène va présenter des peptides issus de la protéolyse de cet antigène, une réaction cellulaire de type CTL devrait logiquement avoir lieu, conduisant ainsi à la lyse de la cellule. Ainsi donc, un mécanisme de CTL, en libérant massivement l'antigène dans le milieu extra-cellulaire, pourrait être une étape obligée pour l'induction de réponses anticorps.

Confinement tissulaire

Comme le montrent certaines expériences, l'antigène peut se retrouver hors du site d'injection et notamment dans la circulation sanguine [Davis *et al.*, 1993a]. Il semble donc qu'il n'y ait pas de confinement strict de l'antigène. Ceci peut résulter, soit d'une migration des cellules transfectées (ce peut être le cas de cellules présentatrices d'antigènes par exemple), soit d'une distribution dans l'organisme de l'antigène en fonction de ses propriétés physicochimiques et de sa demi-vie, suite à sa libération par la cellule productrice.

3.3.6. INITIATION DE LA REPOSE IMMUNE

Une expérience récente au cours de laquelle le site cutané de l'injection a été excisé à des temps différents après l'injection a prouvé que la réponse primaire était initiée par des cellules dendritiques directement transfectées migrant rapidement hors de la peau et vraisemblablement au niveau des ganglions drainants. Cependant, l'expression prolongée au sein des cellules non-migrantes de la peau n'est pas anodine puisqu'elle apparaît nécessaire à une amplification de la réponse immune initiée par les cellules dendritiques [Klinman *et al.*, 1998]. Ce type d'expérience a permis d'aboutir à l'élaboration d'un schéma global de la mise en place des réponses immunes spécifiques qui est repris ci-dessous.



3.4. CARACTERISTIQUE DES REPOSES IMMUNES

Les réponses induites au cours des protocoles de vaccination ADN comprennent des caractéristiques communes qui distinguent cette approche des autres formes de vaccins. Ce chapitre décrit ces caractéristiques, leur implication dans l'efficacité des vaccins ADN et tente d'expliquer leur origine en distinguant la voie de présentation propre à cette vaccination de l'effet immuno-stimulant des séquences CpG.

En ce qui concerne le type de réponse immune induite le plus généralement par la vaccination ADN, on constate qu'elle est fortement orientée vers des réponses à médiation cellulaire. En cela, la vaccination ADN semble se rapprocher de stratégies vaccinales faisant appel à des vecteurs vivants à localisation intracellulaire (*Salmonella*, BCG). Ce trait de caractère va de pair avec la synthèse intracellulaire de l'antigène. La vaccination ADN apparaît même supérieure aux autres vecteurs vaccinaux et à l'infection elle-même, en ce qui concerne l'induction plus particulière de réponses cellulaires cytotoxiques médiées par les cellules T cytotoxiques (CTL) [Denis *et al.*, 1998]. De plus il semble que le contexte de présentation des épitopes aux cellules T soit plus large que d'autres formes de vaccination garantissant ainsi une possibilité de présentation efficace soit avec un nombre plus important de molécules du CMH différentes soit avec un nombre d'épitopes supérieur (épitopes cryptiques) [Denis *et al.*, 1998 ; Vitiello *et al.*, 1997].

En complément de l'induction de puissantes réponses à médiation cellulaire, la vaccination ADN engendre également des réponses à médiation humorale. Toutefois, les réponses anticorps sont souvent moins puissantes que celles obtenues par exemple avec des antigènes complexés à l'adjuvant complet de Freund. Le niveau des réponses anticorps générées serait en effet plutôt de l'ordre de celui obtenu avec des vecteurs vivants recombinants. Cependant, il existe de plus en plus de possibilités de modulation de la réponse engendrée par une vaccination ADN, laissant penser que l'on pourra parvenir à des réponses anticorps plus puissantes. En outre, la levée au moins partielle de la restriction haplotypique pourrait avoir des répercussions sur la diversité polyclonale de la réponse humorale. En effet, même si les cellules B reconnaissent non pas des épitopes linéaires processés mais des épitopes conformationnels sur l'antigène natif, elles ont besoin, pour leur maturation en plasmocytes, de l'aide fournie par les cellules T helper. Ces dernières, tout comme les CTL, sont stimulées par la présentation de l'antigène processé.

Les réponses humorales et cellulaires présentent la caractéristique d'être d'une stabilité étonnante. Alors que la mise en place des réponses est un peu plus lente que d'autres formes de vaccination, ces réponses se stabilisent sous forme d'un plateau pour des durées souvent supérieures à un an. Il est important de noter que cette caractéristique est indépendante d'un rappel quelconque. En parallèle du maintien prolongé de la réponse immune, il apparaît également clairement que la vaccination ADN est particulièrement efficace pour mettre en place une réponse de type mémoire quelque soit le type de rappel: naturel par l'infection ou bien synthétique (rappel vaccinal).

3.4.1. UNE IMMUNOGENICITE ELARGIE

Réponses cellulaires et humorales

Un des avantages de la vaccination ADN est de permettre l'induction des deux axes de défense du système immunitaire: l'axe cellulaire et l'axe humoral. Dans le cadre du développement de nouveaux vaccins à partir de sous-unités protéiques ou d'antigènes recombinants, on s'aperçoit que l'induction d'un seul de ces deux axes n'est pas suffisant pour induire une protection efficace vis-à-vis d'une infection. Dans le cas de la plupart des infections, l'exigence d'efficacité de la réponse immune générée par le vaccin est très grande puisqu'elle doit conduire à la destruction ou au contrôle de l'ensemble des pathogènes avant qu'ils n'exercent leurs effets délétaires. Il est donc bien compréhensible que de tout vouloir miser sur un mécanisme unique est risqué et que c'est plutôt une action conjuguée de plusieurs mécanismes complémentaires qui risque d'être efficace. Une bonne illustration de ces propos est fourni par l'infection par le virus HIV contre laquelle l'induction d'une forte réponse CTL ne semble pas suffisante, la solution résiderait peut être dans l'induction combinée de CTL et d'anticorps neutralisants.

Proportion de répondeurs

Avec la vaccination ADN, la réponse immune est élargie par rapport aux autres formes de vaccination dans le sens ou une proportion plus importante de sujets répondent. Ainsi, l'administration de l'antigène Hbs sous forme ADN a permis d'induire des réponses immunes dans des souches de souris qui n'avaient pas répondu à une vaccination protéique Hbs ou une vaccination avec le virus de la vaccine recombinant [Davis *et al.*, 1996 ; Schirmbeck *et al.*, 1995]. Ces résultats ont permis de montrer que la vaccination ADN emprunte des voies de processing et de présentation de l'antigène différentes des autres formes de vaccination. Les conséquences en terme d'efficacité de vaccination en sont que des individus (ou souches animales habituellement non répondeuses ou faiblement répondeuses à un antigène) développent, grâce à la vaccination, de bien meilleures réponses à la fois CTL [Schirmbeck *et al.*, 1995] et anticorps [Davis *et al.*, 1996].

3.4.2. UNE REponse CTL PUISSANTE

Mécanismes

La force majeure de la vaccination ADN dans les infections intracellulaires est sa capacité à induire des réponses CTL puissantes, plus puissantes même que les autres types de vaccination [Allsopp *et al.*, 1996 ; Fu *et al.*, 1997 ; Martinez *et al.*, 1997 ; Schirmbeck *et al.*, 1995]. L'activation des CTL est restreinte à une présentation de l'antigène sous forme de peptides associés aux molécules CMH I. Le principe de la vaccination ADN repose sur la synthèse de l'antigène directement à l'intérieur de la cellule. Ainsi, lors de vaccinations ADN par voie intradermique (aiguille ou gene gun), une partie des cellules transfectées sont des cellules dendritiques qui ont la capacité d'associer à une présentation des antigènes via les molécules CMH I, un puissant message de costimulation (molécules B7 entre autres). On comprend donc bien qu'une forte stimulation de réponses CTL puisse avoir lieu. Lorsque l'on considère maintenant les expériences de vaccination ADN réalisées par la voie intramusculaire, la puissance des réponses CTL est du même ordre que par la voie intradermique. On pourrait donc par analogie supposer que des cellules présentatrices,

présentent dans le tissu musculaire, puissent être transfectées et présenter l'antigène. Cependant le seul lieu de production d'antigène décrit est composé des cellules musculaires qui, bien qu'elles expriment des molécules CMH I, sont totalement dépourvues des signaux de costimulation nécessaires à une stimulation efficace des cellules T. Toutefois il existe des voies alternatives à la présentation d'antigènes en association avec les molécules CMH I. Ainsi, des antigènes extracellulaires peuvent également rejoindre cette voie de présentation [Bevan, 1995]. Les mécanismes pouvant être impliqués dans la capture d'antigène extracellulaire pour une présentation CMH I reposent, soit sur l'association directe de peptides extracellulaires (issus d'une fuite du phagosome) aux molécules de CMH I ancrées dans la membrane, soit sur un échappement à la phagocytose (surcharge) conduisant à une association intracellulaire avec les molécules de CMH I (expériences de présentation d'Ag tumoraux par CPA [Huang, Immunity, 1996]. Ces voies alternes pourraient s'avérer jouer un rôle dans la mise en place de réponses CTL suite à la vaccination ADN, notamment par voie intramusculaire.

Des expériences élégantes ont clairement mis en évidence que les réponses CTL générées suite à une vaccination ADN par voie intramusculaire avaient pour origine la présentation par des cellules issues de la moëlle osseuse (macrophages et cellules dendritiques) [Corr *et al.*, 1996 ; Doe *et al.*, 1996 ; Iwasaki *et al.*, 1997], excluant donc la participation active de cellules résidentes du muscle. Ces expériences, de pair avec celle de la transplantation de cellules musculaires transfectées [Ulmer *et al.*, 1996a], indiquent sans équivoque que les cellules musculaires sont bien la source de l'antigène, mais que ce dernier doit être relargué et capté par des CPA professionnelles non résidentes du muscle pour l'initiation de réponses CTL. Pour en revenir aux mécanismes opérant au niveau de la peau, un tel processus de mise en place de réponses CTL, secondaire à celui reposant sur la transfection directe des cellules dendritiques résidentes de la peau, est également tout à fait envisageable.

Puissance

Les facteurs influençant l'amplitude d'une réponse CTL peuvent être les suivants: stabilité de la présentation peptidique, affinité du peptide pour le récepteur T, force de la costimulation, nature et amplitude des signaux environnants. Sur le ou lesquels de ces facteurs la vaccination ADN est-elle susceptible de jouer? Sans doute, de part la synthèse intracellulaire de l'antigène au sein de la cellule présentatrice (dendritique de la peau), l'efficacité de routage vers les voies de processing et d'association aux molécules CMH I est optimale. La puissance de la costimulation de la cellule T risque d'être modulée dans le contexte de la vaccination par ADN. En effet, deux études récentes montrent que les séquences CpG peuvent induire la synthèse des molécules B7 [Sparwasser *et al.*, 1998 ; Jakob *et al.*, 1998]. En outre, la vaccination ADN s'avère capable d'induire des réponses CTL vis-à-vis d'épitopes cryptiques, c'est-à-dire ne stimulant pas, dans un contexte classique d'infection, de réponse cellulaire détectable [Denis *et al.*, 1998 ; Vitiello *et al.*, 1997]. Ceci indique que cette approche permet, en plus d'une stimulation puissante d'épitopes dominants, une stimulation d'un répertoire d'épitopes très larges.

3.4.3. UN PROFIL PARTICULIER LIE A L'EFFET IMMUNO-STIMULANT DE L'ADN

Généralités

La seconde grande famille de cellules T est constituée des cellules T helper (Th). Contrairement aux cellules CTL CD8⁺, les Th, de par l'expression de la molécule CD4, ne vont reconnaître l'antigène que sous forme peptidique associée aux molécules CMH II. Cette voie de présentation est issue de la capture d'antigènes à localisation extracellulaire et passe par une dégradation de l'antigène au niveau des phagosomes. La reconnaissance de l'antigène va stimuler la cellule Th (au départ naive) à produire des cytokines, facteurs solubles constituant les messagers intercellulaires du système immunitaire. Il existe de manière schématique deux familles principales de cellules Th en fonction du panel de cytokines qu'elles produisent. Les cellules Th1 sont celles qui, suite à une stimulation, vont maturer vers des cellules produisant essentiellement des cytokines IL-12, IL-2, IFN- γ . Les cellules Th2 vont quand à elles produire les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 [Mosmann *et al.*, 1989]. Ces profils de cytokines à l'échelle cellulaire se retrouvent également à l'échelle de l'ensemble d'un tissu ou d'un organisme. En effet, ces profils tendent à être mutuellement exclusifs (sur les plans autocrine et paracrine). De plus, il est maintenant bien reconnu que ces deux profils peuvent induire la production d'anticorps d'isotypes différents. Un profil Th1 est associé avec la production majoritaire des IgG2a et IgG2b alors que les cytokines de type Th2 induisent les IgG1 et les IgE (modèle murin).

Profil Th1

La vaccination par injection classique (aiguille), qu'elle soit réalisée par voie intramusculaire ou par voie intradermique, conduit à des profils de réponses de type Th1 avec sécrétion d'INF- γ et stimulation de la production d'anticorps d'isotypes IgG2a chez la souris [Manickan *et al.*, 1995 ; Raz *et al.*, 1996]. Ce type de profils est propre à cette méthode puisque même pour le cas d'antigènes natifs orientant naturellement vers des réponses Th2 (Hbs, gp120 HIV et *Leishmania major* gp63), on obtient des réponses spécifiques de profil Th1 lorsqu'ils sont utilisés sous forme ADN [Whalen *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1995 ; Tighe *et al.*, 1998]. Un mécanisme puissant semble être à l'origine de cette orientation de profil de cytokines et donc de nature de réponse. Cet effet est dominant puisqu'il empêche le retour d'une réponse spécifique à un profil Th2 en administrant par exemple le même antigène sous forme protéique ou en association avec un adjuvant [Raz *et al.*, 1996]. En outre, cette dominance s'exerce après coup vis-à-vis d'une réponse anticorps IgE (dépendante de cytokines Th2) déjà installée [Hsu *et al.*, 1996 ; Raz *et al.*, 1996]. Comme détaillé précédemment, les séquences CpG immuno-stimulatrices présentent sur les plasmides contribuent de manière déterminante à l'immunogénicité des vaccins ADN. Leurs effets sont dominés par l'induction de la sécrétion des cytokines promotrices de réponses de type Th1, IL-12 et IFN- γ . Il est maintenant établi que ce type de séquence gouverne réellement les profils induits lors de vaccination ADN [Leclerc *et al.*, 1997].

3.4.4. IMMUNITE LOCALE ET IMMUNITE SYSTEMIQUE

Les expériences de vaccination ADN ne se sont pas ou très peu concentrées sur les notions de développement de réponses immunes locales ou muqueuses. En effet, la transfection de cellules des muqueuses semble à l'heure actuelle constituer une barrière importante au

développement d'une vaccination ADN par les sites muqueux. Par contre, la peau est un tissu qui semble particulièrement bien adapté à cette approche. Ce tissu, en relation avec les organes lymphoïdes drainants, constitue une entité immunologique inductrice et effectrice à part entière. A notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à décrire finement l'immunité spécifique qui y était mise en place suite à la vaccination ADN. Ce type d'étude serait particulièrement important pour une approche vaccinale contre des pathogènes de la peau ou bien des organismes dont la porte d'entrée dans l'organisme est la peau. Enfin, la vaccination ADN intradermique, de par la nature confinée de l'expression de l'antigène pourrait fournir un bon modèle d'étude sur le relais entre immunité locale et immunité systémique.

3.4.5. LONGEVITE ET MEMOIRE

Dans les modèles murins, où les protocoles de vaccination ADN parviennent à stimuler une bonne réponse initiale, on assiste à un maintien à niveau constant de cette réponse immune, ce maintien étant généralement meilleur que celui obtenu avec d'autres types de vaccination [Davis *et al.*, 1996]. Cette propriété rend donc l'approche ADN très tentante puisque ne nécessitant pas l'emploi de rappels dans les protocoles de vaccination. Comme discuté précédemment, l'expression de l'antigène ne se prolonge sans doute pas au delà de quelques semaines. Y aurait-il une forme de réservoir antigénique pour expliquer le maintien de la réponse immune? Les propriétés immunologiques propres du corps plasmidique (mitogénicité, adjuvantité) pourraient-elles être à l'origine de ce caractère de la réponse immune?

En parallèle de ce maintien de la réponse immune spécifique, se met en place une réponse de type mémoire puissante. Une réponse anamnésique puissante peut être observée après rappel par des plasmides codants, de l'antigène protéique, des virus recombinants ou encore avec l'infection elle-même [Dupré *et al.*, 1997]. Cette caractéristique de la vaccination ADN n'a pas encore à l'heure actuelle trouvé d'explication.

3.5. ETENDUE DES APPLICATIONS ET EFFICACITE

Le tableau qui suit donne un aperçu non-exhaustif de l'étendue de ces modèles en indiquant notamment le type de réponses immunes observée ainsi que la capacité à protéger contre une infection.

Etendue des modèles de vaccination ADN

MODELE	ANTIGENE	ANIMAL	VOIE	REPOUSES				Ref.
				CTL	Ac	Th	prot.	
VIRUS								
Virus Ebola	Nucléoprot., Glycoprot.	Souris, coch d'In	im	+	+		+	Xu, 98
Virus de la grippe	Nucleoprotéine	Souris	im	+	+		+	Ul, 93
	Haemagglutinine	Souris, Poulet	im, id, iv ip, in im		+		+	Fy, 93 Ro, 93
HIV-1	gp160	Souris macaque, chymp	im im	+	+		+	Wa, 93 Bo, 97
	gp160, rev-tax TCA3	Souris	im					Ts, 97
	gp120	Souris	im	+				Ci, 96
		Singe Rhésus	im				Th1	Le, 97
	<i>Nef</i>	Souris	im	+				As, 96
	<i>env</i>	Souris	im		+			Lu, 95
	<i>env + rev</i>		im	+	+			Ok, 95
	<i>env + rev</i>	Homme	im	+	+			Ma, 98
	<i>tat, nef et rev</i>	Homme	im	+				Ca, 98
	<i>env</i>	Singe Rhésus	im					Le, 97
SIV	<i>env + gag</i>	Singe Rhésus	im	+				Ya, 96
		Macaque	im					Lu, 96
FTV	génomé	Chat						Ri, 97
LCMV	Nucléoprot., Glycoprot.	Souris	im	+	+			Yo, 95
HBV	Antigène Hbs	Souris, chimpan.	im					Da, 96
	Régions S et préS2 HBs	Souris	im					Ch, 97
HCV	Glycoprotéine E2	Souris	im		+			Na, 97
	protéines de core	Souris	im		+			Ma, 95
Virus de l'herpes bovin	gIV	Souris, bétail	im	+				Co, 93
HSV-1	Glycoprotéine B	Souris	im			+	+	Ma, 95
		Souris	im, in			+ IgA		Ku, 97
	ICP-27	Souris	im			+	+	Ma, 95
HSV-2	Glycoprotéine B et D	Souris, coch d'In	im	+	+		+	Mc, 96
Virus de la rage	Glycoprotéine	Souris	im	+	+		+	Xi, 94
		Singe		+			+	Lo, 98
Virus de la rougeole	prot. de nucléocapside	Souris	im					Fo, 96
	Haemagglut, nucléoprot	Souris, n.n.	im	+	+	Th1		Ca, 96
Virus Sendai	Nucléoprotéine	Souris, n.n.	im	+	+	Th1		Ma, 97
Papillomavirus	Protéine de capsid L1	Lapin	im	+			+	Do, 96
Rotavirus	Prot. VP4, VP6 et VP7	Souris	id	+			+	He, 96
Cytomegalovirus	Phosphoprotéine 89	Souris	im				+	Ar, 96
Maladie de Newcastle	Protéine F	Poulet	im				+	Sa, 96
BACTERIES								
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Antigène A7-1 et A8-1	Souris	im				+	La, 97
	Banque d'expression	Souris	im	+	+		+	Ba, 95
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Antigène 85	Souris	im			Th1	+	Hu, 96
	Protéine HSP 65	Souris	im			Th1	+	Ta, 96
Tétanos	fragment toxine C	Souris, n.n.	im		+		+/-	An, 96
PARASITES								
<i>Plasmodium yoelii</i>	Prot. CS	Souris	im	+	+		+	Se, 94
		Singe Aotus	im, id	+	+			Gr, 96
	Prot. CS et PyHep17	Souris	im	+	+		+	Do, 96
<i>Plasmodium berghei</i>	Prot. CSP	Souris	im	+				Al, 96
<i>Leishmania major</i>	gp63	Souris	im				+	Xu, 95
<i>Borrelia burgdorferi</i>	OspA	Souris	im				+	Si, 96
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Protéine de surface	Mouton	im	+				Je, 95
<i>Trypanosoma cruzi</i>	trans-sialidase	Souris	im		+		+	Co, 98
<i>Schistosoma japonicum</i>	Paramyosine Sj97	Souris	im		+		-	Ya, 95
<i>Schistosoma mansoni</i>	Sm28GST	Rat	id		+		+/-	Du, 97

ALLERGIES						
Poussière de maison	Allergène Der p5	Souris Rat	im		Th1 + Th1 +	Ra, 96 Hs, 96
CANCERS						
Lymphome non-Hodgkinien	Idiotype d'Immunoglob.	Souris	im	+		Ca, 97
Tumeur B16	MAGE1 et MAGE3	Souris	im		+	Bü, 96
SV-40	Antigène T		im		+	Br, 96
Carcinome	Antigène carcino embry	souris	im		+	Co, 95
AUTOIMMUNITE						
Encéphalomyélite	V β 8.2 récepteur T	souris	im		Th2 +	Wa, 96
MALADIES A PRION						
Kreuzfeld-Jacob	Protéines PrP	souris	im	+		Kr, 96

Prot.: protection

Ref.: 2 premières lettres du nom du premier auteur, année de publication

En quelques années d'existence, la vaccination ADN a prouvé son potentiel à induire des réponses immunes protectrices dans un nombre impressionnant de modèles. Cette efficacité apparaît être très importante pour les organismes intracellulaires, qu'il s'agisse de virus, bactéries ou parasites. Par contre, à ce jour, l'efficacité de cette approche n'a pas encore été clairement établie pour des pathogènes extracellulaires. On manque donc encore de recul pour prédire si la vaccination ADN remplacera prochainement des formulations vaccinales efficaces utilisées actuellement. Par contre, il apparaît d'ores et déjà clair que cette stratégie possède un avenir d'application thérapeutique pour des maladies comme le SIDA et la malaria, contre lesquelles aucune approche prophylactique ne s'est encore révélée efficace.

La vaccination ADN ne se limite pas strictement à une approche prophylactique vis-à-vis de micro-organismes pathogènes. La souplesse de l'outil ADN a contribué à l'élargissement du champ d'application de cette approche. De plus, il s'avère que ses propriétés (profil marqué des réponses, puissantes réponses cellulaires) se révèlent efficaces vis-à-vis de maladies auto-immunes, de cancers et d'allergies. Cette approche s'avère également capable de modifier des états immunologiques établis (allergie, tolérance,...) et peut donc être envisagée pour des traitements thérapeutiques.

Enfin, de part la possibilité d'ajouter aux plasmides codant pour un antigène (ou plusieurs antigènes), des plasmides codant pour des molécules immuno-modulatrices ou immuno-stimulatrices (cytokines, chemokines, molécules impliquées dans la présentation antigénique), cette approche permet à moyen terme d'envisager des protocoles immuno-thérapeutiques permettant des réglages fins et adaptés des réponses immunes.

3.5.1. MICRO-ORGANISMES PATHOGENES

Virus

Les virus de la grippe et de l'hépatite B sont les deux modèles qui sont apparus en premier dans cette nouvelle ère de la vaccination ADN. C'est donc par ces modèles que cette technologie a prouvé sa faisabilité et son efficacité [Davis *et al.*, 1993a ; Ulmer *et al.*, 1993]. Ces deux modèles étant bien établis, ils ont pu servir de base à des études de fond montrant la levée partielle de restriction haplotypique [Davis *et al.*, 1996 ; Schirmbeck *et al.*, 1995] et une protection obtenue malgré la dérive antigénique [Ulmer *et al.*, 1993]. Le modèle du SIDA a bien vite été testé étant données les difficultés rencontrées avec les outils vaccinaux classiques. Seulement les résultats n'ont pas toujours été convaincants, ce qui n'a pas empêché de débiter des essais cliniques chez l'homme, dont les premiers résultats montrent une absence d'effets secondaires et des prémices de réponses humorales et CTL [Calarota *et al.*, 1998 ; MacGregor *et al.*, 1998]. Le résultat le plus impressionnant en terme d'efficacité est venu tout récemment du succès de cette méthode pour induire une immunité protectrice vis-à-vis du virus Ebola, contre lequel aucun remède prophylactique ou thérapeutique n'avait été encore développé [Xu *et al.*, 1998].

Bactéries

On assiste à une recrudescence de la tuberculose liée à l'augmentation des cas de SIDA, à l'acquisition de formes de résistance aux antibiotiques et à l'inefficacité relative de la vaccination BCG. La vaccination ADN contre cette infection bactérienne se révèle être au moins aussi efficace que le BCG dans les modèles animaux testés [Huygen *et al.*, 1996 ; Tascon *et al.*, 1996]. Les études entreprises dans ce domaine s'appuient notamment sur l'emploi de cDNA du complexe Antigène 85 qui représente la fraction majeure des antigènes sécrétés de la bactérie [Huygen *et al.*, 1996].

Parasites

L'un des succès les plus marquants de la vaccination ADN vient de l'emploi de cette approche vaccinale contre les *Plasmodium*, agents de la malaria (première cause de mortalité au monde). L'équipe du Dr Hoffman a montré le potentiel de cette approche en utilisant l'antigène CSP [Sedegah *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1998], puis en s'appuyant sur une combinaison de plasmides codants pour des antigènes de stades d'infection différents permettant ainsi d'induire une protection élargie (levée de la restriction haplotypique combinée à une intervention à différentes étapes clé du cycle de maturation des parasites) [Doolan *et al.*, 1996]. La vaccination ADN contre les leishmanioses (absence de vaccin pour l'instant) semble également prometteuse, puisque les deux antigènes, gp63 [Xu, 95] et LACK [Gurunathan *et al.*, 1997], ont permis séparément d'induire des niveaux de protection remarquables dans des souches de souris sensibles.

3.5.2. VACCINATION DES NOUVEAUX-NÉS

Les vaccins conventionnels se révèlent souvent inefficaces chez les nouveaux-nés, notamment parce que ces derniers ont un système immunitaire relativement immature et parce que les anticorps dérivés de la mère peuvent neutraliser le pouvoir antigénique du vaccin. Il s'avère que la vaccination ADN, sans doute de part des mécanismes propres d'activation du

système immunitaire, est capable d'induire des réponses immunes fortes chez des souris âgées de quelques jours [Martinez *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997]. Ainsi, de fortes réponses CTL protectrices et persistant à l'âge adulte ont été observée même lorsque les souriceaux se nourrissaient du lait de mères immunes [Hassett *et al.*, 1997]. Cependant, dans une autre étude la vaccination ADN avec le gène de la CSP (malaria) chez des nouveaux-nés a, au contraire, induit un phénomène de tolérisation avec absence complète de réponse lors d'un rappel [Mor *et al.*, 1996]. Ces résultats contrastés montrent la limite de nos connaissances des mécanismes fins régissant la vaccination ADN, surtout au sein de la complexité des régulations immunologiques chez les nouveaux-nés.

3.5.3. LEVEE DE TOLERANCE

Des souris transgéniques pour l'antigène Hbs ont été élaborées. De par l'expression ontogénique de Hbs, elles sont tolérisées vis-à-vis de celui-ci [Whalen *et al.*, 1995]. L'expression est concentrée dans les hépatocytes mais les souris ne développent pas de réponse CTL, même après immunisation avec l'antigène sous sa forme protéique. Cependant lorsqu'elles sont immunisées avec un plasmide codant pour Hbs, une réponse anticorps ainsi qu'une réponse CTL spécifique sont induites, conduisant à un arrêt de l'expression du transgène sans destruction apparente des cellules l'exprimant [Schirmbeck *et al.*, 1995 ; Ulmer *et al.*, 1996b]. Ces résultats indiquent donc que la vaccination ADN, contrairement à une autre forme de vaccination, peut lever la tolérance vis-à-vis de l'antigène. Ceci laisse penser que l'antigène, dans le contexte spécifique de la vaccination ADN, emprunte des voies de présentation différentes ou, en tout cas, est capable de stimuler le système immunitaire d'une manière originale.

3.5.4. ALLERGIE

L'application de l'approche ADN aux maladies allergiques s'est révélée être d'une efficacité étonnante. De part la caractéristique de ce mode de vaccination à induire des réponses à profil Th1 marqué, il apparaît logique de vouloir l'utiliser pour contrecarrer des profils de type allergiques (Th2). En effet, les manifestations allergiques résultent d'une forte production d'immunoglobulines de type IgE vis-à-vis d'un allergène. Raz et ses collaborateurs ont ainsi pu montrer que la préimmunisation avec de l'ADN codant pour un allergène pouvait empêcher l'induction d'une réponse de type Th2 (IgE, IL-4 et IL-5) suite à l'administration de la protéine en alum [Raz *et al.*, 1996]. De plus ces auteurs ont montré l'effet dominant du profil induit par l'immunisation ADN, puisque que l'injection d'ADN après l'installation du profil Th2 propre à la vaccination protéique conduisait à une inversion de profil. L'équipe de Hsu a confirmé ce type de modulation par la vaccination ADN de réponses de type allergique et a pu démontrer l'efficacité de cette approche dans un modèle d'allergie chez le rat. En effet, l'administration d'un plasmide codant pour l'allergène majeur de la poussière de maison, Der p 5, a pour effet d'inhiber la synthèse d'IgE, la libération d'histamine ainsi que l'hyperventilation respiratoire [Hsu *et al.*, 1996].

3.5.5. CANCER

Le contrôle immunologique du développement de tumeurs cancéreuses semble essentiellement reposer sur la reconnaissance spécifique d'antigènes tumoraux par des cellules T ($CD4^+$ et $CD8^+$) et cellules NK, qui vont directement agir vis-à-vis des cellules tumorales ou en relais avec des cellules inflammatoires (éosinophiles, macrophages et neutrophiles) par le biais de la sécrétion locale de cytokines [Musiani *et al.*, 1997]. La vaccination a prouvé son efficacité à générer des réponses protectrices dans différents modèles tumoraux. La comparaison du système ADN avec des vaccins cellulaires [Büeler *et al.*, 1996] a pu mettre en évidence sa puissance. En outre, la possibilité de manipuler la réponse immune avec des gènes de cytokines ou autres molécules impliquées dans la costimulation permet d'induire des profils encore plus protecteurs vis-à-vis du développement de tumeurs. Il s'agit de l'emploi de plasmides codant pour le GM-CSF, l'IFN- γ ou pour B7-1 [Büeler *et al.*, 1996]. Des approches basées sur l'injection seule de plasmides codant pour des cytokines telles l'IL-12 [Rakhmilevich *et al.*, 1996], l'IL-6, l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α [Sun *et al.*, 1995] se sont également révélées efficaces.

3.5.6. AUTOIMMUNITE

Les travaux de Waisman concernant l'utilisation de la vaccination ADN dans le contexte d'une maladie auto-immune établissent un nouveau concept: la vaccination ADN suppressive [Waisman *et al.*, 1996]. Le modèle animal de la sclérose en plaques est l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) qui est induite par l'administration d'un fragment de la protéine basique de la myéline (peptide Ac1-20). Les cellules T réactives à l'origine de la pathologie présentent la particularité d'exprimer presque toutes le récepteur T V β 8.2. La vaccination ADN avec le gène codant pour ce récepteur T particulier supprime l'apparition de la maladie lorsque les souris reçoivent le peptide Ac1-20. Il s'agit donc bien d'une vaccination qui supprime une réponse cellulaire spécifique. Les mécanismes de cette suppression ne sont pas complètement élucidés, mais il semble que des cellules T spécifiques du récepteur T soient en mesure de contrôler les cellules T réactives par un phénomène d'anergie ou de délétion conduisant au remplacement de la première population de cellules autoréactives Th1 par des cellules non-réactives Th2.

3.6. VARIANTES TECHNOLOGIQUES

L'avenir du développement de protocoles thérapeutiques contre des maladies impliquant le système immunitaire s'appuiera sans doute sur la technologie de transferts de gènes amorcée par la thérapie génique et la vaccination ADN. Ainsi, les publications les plus récentes montrent que l'on s'oriente vers des protocoles visant à générer des spécificités de réponses immunes bien précises mais également visant à moduler ou manipuler le profil des réponses immunes. Le développement de telles stratégies n'est viable que si l'on comprend bien les mécanismes sous-jacents. Ces outils peuvent également à leur tour aider à appréhender des mécanismes immunologiques fins.

3.6.1. OUTILS DE MODULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE OU ADJUVANTS GENETIQUES

Co-injection de gènes de cytokines

Dès l'apparition de la vaccination ADN, des chercheurs ont eu l'idée d'administrer des plasmides codant pour des cytokines plutôt que les cytokines elles-mêmes dont l'utilisation est limitée par leur coût, leur faible temps de demi-vie et la nécessité de réaliser des injections multiples entraînant souvent des effets indésirables graves. Ainsi, on a pu mettre en évidence les effets systémiques [Raz *et al.*, 1994] et locaux [Hengge *et al.*, 1995] de l'injection de gènes de cytokines. Cette approche semble notamment prometteuse dans le domaine des cancers pour lesquels des cytokines contrôlant des tumeurs ont été identifiées ; il s'agit notamment de l'IL-12 [Irvine *et al.*, 1996]. Cette approche semble également être efficace contre des pathologies inflammatoires [Kuklin *et al.*, 1998].

Dans le cadre de la vaccination vis-à-vis de micro-organismes, ce type de plasmides codant pour des cytokines a été utilisé en association avec des plasmides codant pour des antigènes de manière à évaluer la possibilité d'une immunomodulation de réponses immunes spécifiques. Ainsi, l'emploi de plasmides codant pour le GM-CSF permet de multiplier par 50 le titre des réponses anticorps dirigées contre une glycoprotéine du virus de la rage [Xiang *et al.*, 1995]. Le modèle dans lequel ce type de modulation a été le plus employé est sans doute celui utilisant des antigènes du virus HIV dans le but de palier à des niveaux de réponses trop faibles pour l'induction d'une protection. Les gènes de cytokines employés ont été entre autres l'IL-2, l'IL-7, l'IL-12, l'IFN- γ et le GM-CSF permettant des orientations et potentialisations de réponses immunes [Kim *et al.*, 1997a ; Okada *et al.*, 1997 ; Prayaga *et al.*, 1997 ; Svanholm *et al.*, 1997]. Récemment, la comparaison d'une sélection importante de cytokines a été effectuée dans un même modèle de manière à pouvoir évaluer les candidats les plus intéressants pour une immunomodulation génique [Kim *et al.*, 1998]. A la vue de l'ensemble de ces études, il ressort que la coadministration d'un plasmide codant pour le GM-CSF permet d'accroître considérablement la réponse humorale. Un accroissement de réponses CTL peut être obtenu avec différents gènes de cytokines comprenant ceux de l'IFN- γ et de l'IL-12, cette modulation s'accompagnant généralement d'une diminution des réponses humorales.

Co-injection de gènes de molécules immunorégulatrices (autres que cytokines)

Outre l'utilisation de cytokines pour moduler une réponse immune spécifique, des candidats impliqués notamment dans la présentation d'antigènes sont intéressants. Ainsi les molécules B7 (CD80 et CD86), dont le signal de costimulation est nécessaire à l'activation de cellules T spécifiques ont été utilisées avec succès en tant que potentialisateurs de réponses immunes cellulaires [Büeler *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 1997b]. A l'opposé de l'emploi de gènes codant pour des cytokines pro-Th1, l'administration de plasmides codant pour B7-2 entraîne une augmentation des réponses CTL sans diminution des réponses humorales [Tsuji *et al.*, 1997]. La combinaison de ces gènes avec les gènes codant pour des antigènes, qui peuvent eux mêmes posséder des activités immunorégulatrices intrinsèques (protéine rev de HIV), permettent donc de véritablement jouer avec les systèmes de communication du système immunitaire pour moduler de manière précise et efficace le niveau des réponses immunes.

3.6.2. VACCINATION MULTIGENIQUE

Les niveaux des réponses immunes obtenus suite à une vaccination avec un seul antigène peuvent se révéler insuffisant pour générer une protection. Il apparaît que l'association de plusieurs antigènes permette d'accroître les chances de protection en ajoutant les réponses de différentes spécificités les unes aux autres pour arriver à un seuil suffisant d'immunité générale vis-à-vis de l'agent pathogène. La technologie ADN permet facilement de combiner différents antigènes en intégrant plusieurs gènes sur un même plasmide ou en mélangeant simplement des plasmides différents. Cette approche a été largement développée par le Dr Hoffman dans le domaine de la vaccination contre le paludisme [Doolan *et al.*, 1997]. L'association de plasmides codant pour différents antigènes du parasite permet une vaccination multi-stade (bloquage du développement du parasites à différentes étapes clé de sa maturation: stades pré-érythrocytaire, érythrocytaire et sexué) et pluri-immunitaire (induction de réponses immunes propres à chaque antigène). Ce concept semble très prometteur car il permet de lever en partie la restriction haplotypique. Les résultats chez la souris sont assez fascinants [Doolan *et al.*, 1996], et les essais cliniques chez l'homme sont en cours. Ce type d'approche a également été utilisé pour parer la variation antigénique du virus Influenza en associant l'haemagglutinine à la nucléoprotéine [Donnelly *et al.*, 1997]. Il en est de même du modèle HIV, dans lequel de nombreuses combinaisons ont déjà été testées et sont en cours d'évaluation.

3.6.3. VACCINATION GENOMIQUE

Stephen Johnston ne passe pas inaperçu lors des présentations de son approche de la vaccination. Ce chercheur, se basant sur la possibilité de mélanger des plasmides codant pour différents antigènes, a en fait eu l'idée de pousser cette procédure jusqu'au bout c'est-à-dire de mélanger des plasmides codant pour l'ensemble des protéines d'un micro-organisme. L'opération est simple puisqu'elle revient à cloner une banque de cDNA dans les vecteurs d'expression eucaryote classiquement utilisés. L'immunisation de souris avec une banque d'expression de *Mycoplasma pulmonis* a ainsi permis d'obtenir un fort taux de protection [Barry *et al.*, 1995]. Mais le but de la manœuvre ne s'arrête pas là ; en effet, une telle procédure n'est pas reproductible car chaque banque est légèrement différente dans le tronçonnage de gènes qu'elle opère. L'objectif poursuivi consiste à trier l'ensemble de ces plasmides pour sélectionner les antigènes les plus protecteurs. Ce chercheur et son équipe ont maintenant mis au point un système de tri des plasmides protecteurs et se déclarent capable de sélectionner une dizaine de plasmides protecteurs en moins d'un an pour n'importe quel virus ou bactérie [5th annual congress British Society for Immunology, Brighton, Décembre 1997]. Cette technologie est particulièrement attrayante car elle offre, pour la première fois, l'accès à une sélection méthodique d'antigènes protecteurs utilisables ensuite sous la forme désirée. La vaccination ADN devient donc dans ce modèle un outil technologique incomparable à la méthode classiquement employée de la pêche aux antigènes. Le séquençage systématique des micro-organismes s'avère ici un allié de poids, permettant une identification rapide des gènes sélectionnés. Il convient toutefois de mentionner les limites de cette approche révolutionnaire: le cocktail initial de plasmides contient statistiquement tous les gènes d'un micro-organisme, mais souvent en petits morceaux. En outre, la technique de tri

nécessitant comme lecture finale l'expression d'une protection, elle ne pourra s'effectuer que dans le cas où un modèle animal fiable, simple et rapide existe.

3.6.4. VACCINATION ADN MOSAÏQUE

De part la simplicité des méthodes de clonage, la vaccination ADN apparaît comme une méthode de choix pour tester l'efficacité de protéines de fusion et autres constructions chimères. On peut ainsi mentionner l'étude dans laquelle l'ovalbumine a été couplée à différentes cytokines (ou peptides de cytokines) pour évaluer les modulations de la réponse immune spécifique [Maecker *et al.*, 1997]. Toujours dans le but d'accroître l'immunogénicité, des protéines de fusion entre la protéine de core de HCV et l'antigène Hbs ont été testées pour un effet porteur ou haptène [Major *et al.*, 1995]. Les protéines chimères ainsi exprimées ont été à l'origine de réponses immunes vis-à-vis de déterminants antigéniques des 2 virus. Dans le même ordre d'idée, des épitopes HIV ont également été couplés à Hbs [Fomsgaard *et al.*, 1998].

Minigènes

L'approche de choix pour générer des réponses immunes spécifiques à de fins déterminants épitopiques s'est basée sur l'administration de peptides contenant directement l'épitope protéique. L'intérêt d'une telle approche réside dans le fait d'induire des réponses très fines lorsque l'on connaît bien les différents déterminants épitopique d'un antigène et le type de réponse que chacun d'entre-eux peut induire. De plus, cette approche peut s'avérer essentielle pour induire des réponses vis-à-vis d'épitopes sous-dominants habituellement muets dans un environnement d'épitopes plus puissants. Les limites de cette méthode résident dans la susceptibilité de ces peptides aux différentes protéases, d'où par exemple le greffage d'une queue lipidique permettant à la fois une protection et une meilleure pénétration cellulaire, ou encore l'emploi de vecteurs synthétiques de type liposomes ou microsphères. L'approche ADN permet de synthétiser de telles fractions antigéniques directement au sein des cellules de l'organisme. Ainsi l'expression d'épitopes de gp120 de HIV et de p53 ont permis d'induire des réponses CTL importantes [Ciernik *et al.*, 1996].

Variantes

De nombreuses possibilités de modification du fragment de gène inséré dans le plasmide sont envisagées. Ainsi, des réponses ont pu être augmentées par addition de séquences codant pour un peptide de ciblage du reticulum endoplasmique de manière à diriger l'antigène néo-synthétisé vers une association aux molécules CMH I [Wu *et al.*, 1997]. Il est également possible de potentialiser la réponse immune en couplant un épitope à une molécule porteuse, en construisant des répétitions d'épitopes, ou en couplant l'épitope à une chaîne d'immunoglobuline [Xiong *et al.*, 1997].

3.6.5. MAITRISE DES RISQUES

Le développement de vaccins ADN suicides pourrait être un pas déterminant pour parer aux éventuels risques d'intégration. Un tel système a été présenté récemment [Berglung *et al.*, 1998]

et le principe est basé sur l'emploi d'un plasmide codant pour un réplicon recombinant (dérivé de l'alphavirus *Semliki Forest*). La transfection conduit à la production d'un ARN auto-répliquatif codant pour l'antigène. La quantité d'antigène produite est donc plus importante conduisant à une plus forte induction de réponses anticorps et CTL que les vaccins ADN conventionnels. En outre, le cycle de cette famille de virus est lytique et conduit à une destruction de la cellule infectée, ce qui conduit à une expression transitoire, et à une élimination naturelle du plasmide pouvant représenter un avantage déterminant en terme de sécurité. D'autres types de vecteurs suicides inductibles, donc contrôlables, sont à l'étude dans le domaine de la thérapie génique [Communication personnelle]. Ils sont notamment basés sur l'emploi de gènes codant pour des fragments de protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée ou apoptose dont l'activation nécessite l'apport additionnel d'un composé conduisant au couplage de ces protéines entre-elles. Ainsi, on peut imaginer que l'on pourrait provoquer la mort des cellules transfectées par le plasmide vaccinant par la simple administration d'un composé spécifique.

3.7. DE L'ADN NU A L'ADN VECTORISE

3.7.1. MISE AU POINT D'UN CIBLAGE DES VOIES MUQUEUSES

Un des objectifs majeurs de l'OMS concernant le développement de nouveaux vaccins réside dans la mise au point de vaccins administrables de manière non-invasive par les voies muqueuses. La vaccination ADN ne pourra donc s'imposer par rapport à des vaccins existants qu'à la condition de parvenir à induire une immunité protectrice suite à l'administration de plasmides par les voies intranasale ou intragastrique. Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont concentrées sur le ciblage des voies muqueuses car, assez rapidement, et de manière plus limitée, la peau se sont imposés comme les sites d'injection les plus efficaces et les plus reproductibles pour la vaccination ADN. Le premier paramètre déterminant l'efficacité d'une voie d'injection des plasmides est la perméabilité du site d'injection (ou des sites drainants) à la transfection [Fynan *et al.*, 1993]. L'efficacité de la transfection semble être la meilleure au niveau du muscle [Wolff *et al.*, 1990 ; Acsadi *et al.*, 1991]. Cependant, la plupart des tissus sont, à des degrés variables, perméables à la transfection. Ainsi, l'expression de transgènes a pu être mise en évidence après administrations de plasmides par la peau [Raz *et al.*, 1994], en utilisant la voie intraveineuse [Acsadi *et al.*, 1991], par aérosolisation [Stribling *et al.*, 1992] par voie intrapéritonéale [Philip *et al.*, 1993], ou encore par administration directement dans les patchs de Peyer [Livingston *et al.*, 1998]. Le second paramètre concerne la qualité de l'immunosurveillance au site d'expression de l'antigène. La peau, le tractus respiratoire et le tractus intestinal ont la particularité de posséder des types cellulaires spécialisés dans le captage d'antigènes et des tissus lymphoïdes associés garantissant un haut niveau d'immunosurveillance [Bos *et al.*, 1993 ; Mc Ghee *et al.*, 1992]. Ainsi, une expression, même minime, d'antigène au niveau de ces tissus peut s'avérer suffisante à l'induction de fortes réponses immunes.

L'obtention des réponses immunes les plus fortes par vaccination ADN devraient donc s'obtenir en parvenant à transfecter massivement des cellules d'un site muqueux. Cet objectif passe nécessairement par le développement de vecteurs capables de protéger les plasmides des

dégradations des lumières des voies muqueuses. Nous faisons ici le point sur les approches à l'étude.

3.7.2. LIPOSOMES CATIONIQUES

L'utilisation de liposomes cationiques formant en réalité de petites vésicules unilamellaires a concentré l'engouement de beaucoup de chercheurs du domaine de la thérapie génique recherchant des alternatives aux vecteurs rétroviraux. Ces liposomes présentent une forte efficacité pour la transfection de cellules eucaryotes *in vitro* (lipofection) [Felgner *et al.*, 1987]. Il semble que les charges positives résiduelles (portées par le lipide cationique) permettent un attachement aux membranes des cellules chargées négativement puis une endocytose. La présence d'un lipide neutre Cholestérol ou DOPE (dioleyle phosphatidylethanolamine) à propriétés fusogènes semble primordiale pour l'échappement du plasmide à la vésicule d'endocytose de manière à ce qu'il se retrouve rapidement dans le cytoplasme de la cellule. Cependant, les résultats obtenus *in vivo* aussi bien pour la thérapie génique que pour la vaccination ADN présentent des limites d'efficacité [Caplen *et al.*, 1995 ; Ishii *et al.*, 1997 ; Okada *et al.*, 1997 ; Xin *et al.*, 1998]. Il semble en effet que les charges résiduelles des structures ADN/lipides interagissent avec les protéines environnantes déstabilisant ainsi les complexes. Une des solutions consisterait à neutraliser les charges de surface de ces complexes et à accroître l'adhésion aux cellules à transférer, en greffant par exemple des ligands spécifiques.

3.7.3. LIPOSOMES MULTILAMELLAIRES

Des liposomes multilamellaires non chargés ont également été utilisés et se sont révélés plus efficaces, en terme d'intensité de réponse immune, que l'utilisation de plasmides nu ou encore de plasmides complexés à des liposomes unilamellaires cationiques et ceci à la fois après une administration par voies intramusculaire, sous-cutanée, intraveineuse ou intrapéritonéale [Gregoriadis, 1998]. Ces liposomes ne présentant pas de charge de surface, source de déstabilisation, pourraient donc constituer une alternative à l'emploi des liposomes cationiques. Une de leurs limites réside dans leur plus faible capacité d'incorporation et c'est la raison pour laquelle a été envisagé l'utilisation de liposomes contenant une part de lipide cationique au coeur celui-ci, ceci revenant à faire des liposomes multilamellaires à coeur cationique pour lier l'ADN et à surface neutre pour éviter toute déstabilisation [Gregoriadis, 1998].

3.7.4. MICROSPHERES

L'utilisation de microsphères composées d'un polymère biodégradable (polylactide-glycolide) a dernièrement permis de réaliser des injections d'ADN plasmidique efficaces par les voies intrapéritonéale et sous-cutanée (habituellement inefficaces avec des plasmides nus). En outre, les réponses CTL obtenues se sont révélées plus importantes qu'une vaccination ADN intramusculaire classique [Hedley *et al.*, 1998]. De manière encore plus révolutionnaire, une immunité antivirale protectrice a été obtenue suite à une administration par voie orale d'ADN

encapsulé dans ce type de microsphères [Chen *et al.*, 1998]. Les microsphères présentent l'avantage d'être très résistantes aux dégradations acides et le contrôle de leur taille permet de cibler les cellules M ou la prise en charge par les macrophages. De plus, le choix de la nature des polymères entrant dans la composition des microparticules peut permettre en théorie de contrôler la cinétique de relargage du produit encapsulé. L'utilisation de ce type de vecteur synthétique dans le domaine de la vaccination ADN s'avère donc très prometteur pour le ciblage de la voie orale en particulier.

3.7.5. COCHLEATES

Enfin, à la liste des vecteurs synthétiques, s'ajoute le nom des cochleates, structures en forme de spirale constituées d'une bicouche de phospholipides anioniques stabilisés par le calcium. Ils se révéleraient être efficaces pour protéger l'ADN et le délivrer aux cellules en induisant des réponses CTL de longue durée suite à une administration par voie orale [Gould-Forgerite, IBC conference on genetic vaccines, Février 1995].

3.7.6. BACTERIES LIVREUSES DE PLASMIDES

Le meilleur moyen de pénétrer au coeur des cellules tapissant les voies muqueuses est probablement bien d'utiliser des organismes vivants ayant développé pour leur survie des mécanismes ingénieux de pénétration et d'échappement aux environnements acides et protéolytiques des phagosomes. Ainsi, les Shigelles envahissent la muqueuse orale via les cellules M, puis se répandent dans les cellules muqueuses. Elle survivent dans les cellules par un mécanisme d'échappement des phagosomes et se retrouvent donc dans le cytoplasme. Des Shigelles atténuées ont été transformées avec un plasmide d'expression eucaryote de la β -galactosidase et ainsi ont pu délivrer ce plasmide une fois installées dans le cytoplasme des cellules de la muqueuse orale, conduisant à l'induction d'une réponse immune spécifique de la β -galactosidase [Sizemore *et al.*, 1995]. Cette variante de la vaccination ADN a permis d'induire à la fois des réponses immunes locale et systémique et pourrait s'étendre à d'autres souches de bactéries notamment pour un ciblage de la muqueuse respiratoire.

3.8. STRATEGIE DE VACCINATION ADN CONTRE LES SCHISTOSOMIASES

3.8.1. INTERVENTION AUX SITES PRECOCES DE L'INFECTION

L'approche de vaccination par ADN permet en théorie de contrôler le site d'expression de l'antigène. Ainsi, ce type d'approche pourrait se révéler efficace pour la mise en place de réponses immunes à composantes locales et systémiques. L'analyse de la bibliographie fait nettement ressortir la peau comme site le plus efficace en vaccination ADN. Or dans le modèle de l'infection par les schistosomes, ce site est primordial pour l'induction de réponses précoces

influencant ainsi la mise en place des réponses immunes systémiques. La mise en place d'une immunité spécifique au niveau de la peau permettrait ainsi de détecter une intrusion par le parasite dès son entrée. On peut entrevoir que le site cutané joue alors un rôle directement effecteur dans l'élimination des parasites ou bien qu'il agisse en relais avec des sites effecteurs ultérieurs dans le cheminement du parasite au travers de l'organisme.

Un site important pour une élimination efficace des schistosomes semble être les poumons, du moins dans le modèle de la vaccination de souris par des cercaires irradiées [Wilson, 1993]. Le ciblage de ce tissu par la vaccination ADN pour l'induction de réponses immunes locales n'a pas encore permis d'aboutir à des résultats déterminants. Cependant il est fort à parier que les efforts considérables consacrés au développement de vecteurs synthétiques dans ce domaine permettent rapidement de disposer d'outils efficaces pour le ciblage par l'ADN de ce tissu.

3.8.2. UNE REPONSE A PLUSIEURS COMPOSANTES

Réponses anticorps et cellulaires

Même si, à première vue, on peut rétorquer que la vaccination ADN semble être davantage adaptée au contrôle d'infections intracellulaires, de nombreux arguments peuvent être avancés en faveur de son développement vis-à-vis de parasites extracellulaires comme les schistosomes. En effet, comme nous venons de le détailler, cette nouvelle approche de la vaccination permet d'induire des réponses immunitaires élargies et peut s'accompagner de nombreuses possibilités d'immuno-modulation. En outre, les avantages économique, de stabilité et de conservation de ce type de vaccin suffisent à motiver un investissement pour une adaptation à des maladies parasitaires des régions pauvres du globe.

Il apparaît clairement que le contrôle d'organismes extracellulaires aussi complexes que les schistosomes passe par la conjonction de mécanismes de défense variés et puissants. L'illustration type d'un mécanisme immunologique à plusieurs composantes, vraisemblablement efficace vis-à-vis des schistosomes, est l'ADCC, présenté dans la première partie de cette introduction. Aucune étude ne s'est penchée sur la possibilité d'induire un tel mécanisme par une stratégie de vaccination par ADN. Pourtant, le fait que cette stratégie induise à la fois des réponses anticorps et des réponses cellulaires semble être en faveur de la mise en place d'un mécanisme d'ADCC.

Profil Th1 ou Th2?

Il apparaît que le contrôle à long terme des niveaux d'infection par les schistosomes et que le contrôle du développement de la pathologie reposent sur un fin équilibre faisant intervenir des composantes immunologiques rattachées à la fois à des cytokines de type Th1 et des cytokines de type Th2. Certainement, l'approche ADN tend fortement à orienter vers des réponses de type Th1, mais il devrait être possible de moduler cette réponse par exemple avec des gènes de cytokines.

Les effets particuliers de l'ADN et plus particulièrement des séquences immunostimulatrices pourraient induire des réponses assez différentes des autres types de

vaccins. Par exemple on peut envisager que la vaccination ADN conduise à une levée du profil proche de l'allergie, propre aux infections chroniques. On peut imaginer, dans le même ordre d'idée, que cette approche vaccinale puisse lever des mécanismes d'endormissement du système immunitaire qu'utilise le parasite. Enfin, le spectre large d'activation cellulaire des séquences immunostimulatrices pourrait induire une immunité innée capable de participer à une élimination du parasite.

CTL

Une approche de vaccination ADN ne devrait pas manquer d'induire des réponses CTL. Ce type de réponse, même s'il paraît secondaire pour une immunité effectrice vis-à-vis des schistosomes, a tout de même été montré avec l'antigène Sm28GST [Pancré *et al.*, 1996]. Ce type de réponse pourrait se révéler important comme source cellulaire de facteurs de maturation et d'orientation de la réponse notamment au niveau de la régulation de la pathologie hépatique liée à la formation des granulômes. En effet les CTL peuvent être considérés comme une source importante de cytokines Th1 ou Th2 jouant ainsi un rôle majeur dans l'orientation de la réponse dans le cadre de l'infection par les schistosomes [Pedras-Vasconcelos *et al.*, 1996].

3.8.3. VERS UN VACCIN ANTI-PATHOLOGIE

L'effet vaccinant des antigènes GST repose en partie sur leur capacité à induire une immunité antifécondité. Bien que l'on ne connaisse pas encore précisément les mécanismes impliqués, cette propriété commune de l'ensemble des GST de différentes espèces de schistosomes est intimement liée à une capacité des anticorps générés par la vaccination à inhiber l'activité enzymatique GST. Or la vaccination ADN se présente comme le meilleur moyen de présenter au système immunitaire un antigène parfaitement foldé donc possédant une conformation qui pourrait permettre l'induction d'anticorps neutralisants l'activité enzymatique avec une affinité optimale. Sur le modèle de la vaccination GST, la facilité de combinaison de plasmides codants pour différents antigènes permet d'envisager de pouvoir attaquer le parasite sous plusieurs angles avec l'induction d'anticorps neutralisants en ciblant des fonctions vitales, dont le système de reproduction. Enfin, la vaccination ADN permet d'enrichir la présentation d'antigène de la synthèse *in situ* de molécules immunorégulatrices. On peut ainsi entrevoir de délivrer des plasmides codant pour des cytokines régulant la formation granulomateuse suite au dépôt des oeufs dans le foie.

Objectifs
généraux

Les objectifs de ce travail se déclinent suivant un axe appliqué et un axe plus fondamental:

Evaluation de la faisabilité et de l'efficacité d'une vaccination ADN contre *Schistosoma mansoni*,

- Etapes:
- construction génétique
 - mise au point de protocoles de vaccination
 - développement d'outils d'immunomodulation
 - association à la chimiothérapie.

Etude des mécanismes immunitaires impliqués dans une immunisation ADN vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*,

- Etapes:
- ciblage de la vaccination au niveau des sites de l'infection
 - mécanismes d'initiation de la réponse immune (locale et systémique)
 - effet immunostimulant de l'ADN
 - rappel de la réponse immune spécifique lors de l'infection.

Résultats

1. Construction et préparation des plasmides

1.1. RESUME

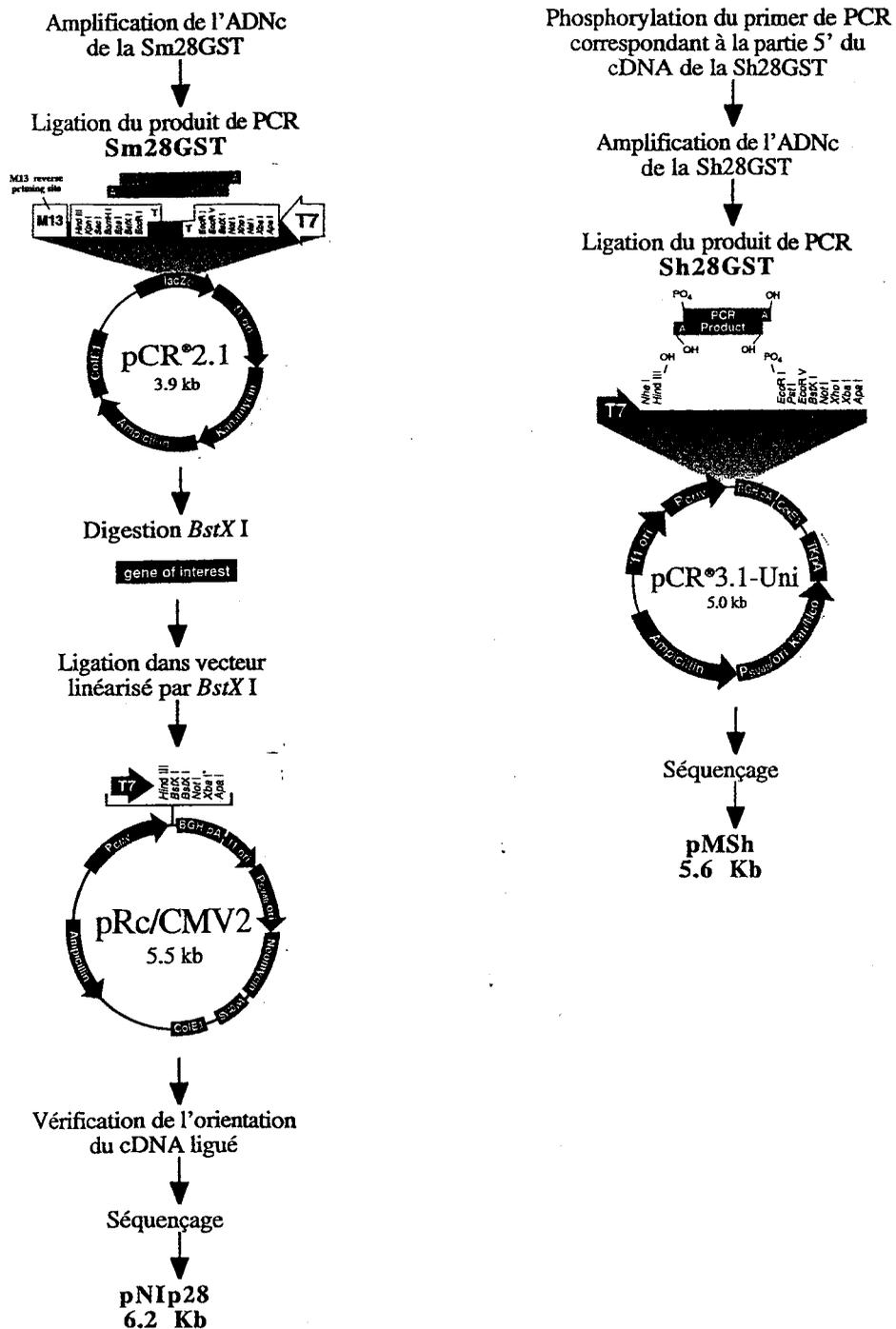
Nous présentons dans cette première partie les techniques utilisées pour la construction des plasmides codant pour les Sm28GST et Sh28GST. La méthode la plus simple et la plus rapide consiste en un clonage unidirectionnel directement à partir de produits de PCR.

L'usage des plasmides pour des applications *in vivo* implique l'emploi de méthodes préparatives adaptées et un contrôle de leur qualité en aval. Les méthodes préparatives que nous avons comparées sont: 1°) lyse alcaline des bactéries et purification des plasmides sur gradient de chlorure de césium (CsCl) ; 2°) lyse alcaline des bactéries et purification par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Nos résultats montrent que les rendements sont comparables, de même que la qualité des plasmides. La purification par chromatographie permet un gain de temps et évite d'employer le bromure d'éthyldium (BET). Par contre, la contamination par les endotoxines bactériennes (LPS) est nettement supérieure à la purification sur gradient de CsCl. L'ajout d'une étape de clivage des endotoxines en amont de la chromatographie permet d'obtenir de l'ADN exempt de contaminations.

Notre étude montre que les préparations d'ADN dans de l'eau physiologique pour injections doivent être conservées à -20°C et met en évidence l'importance d'utiliser le plasmide sous forme super-enroulée pour une efficacité optimale *in vivo*.

1.2. CLONAGE

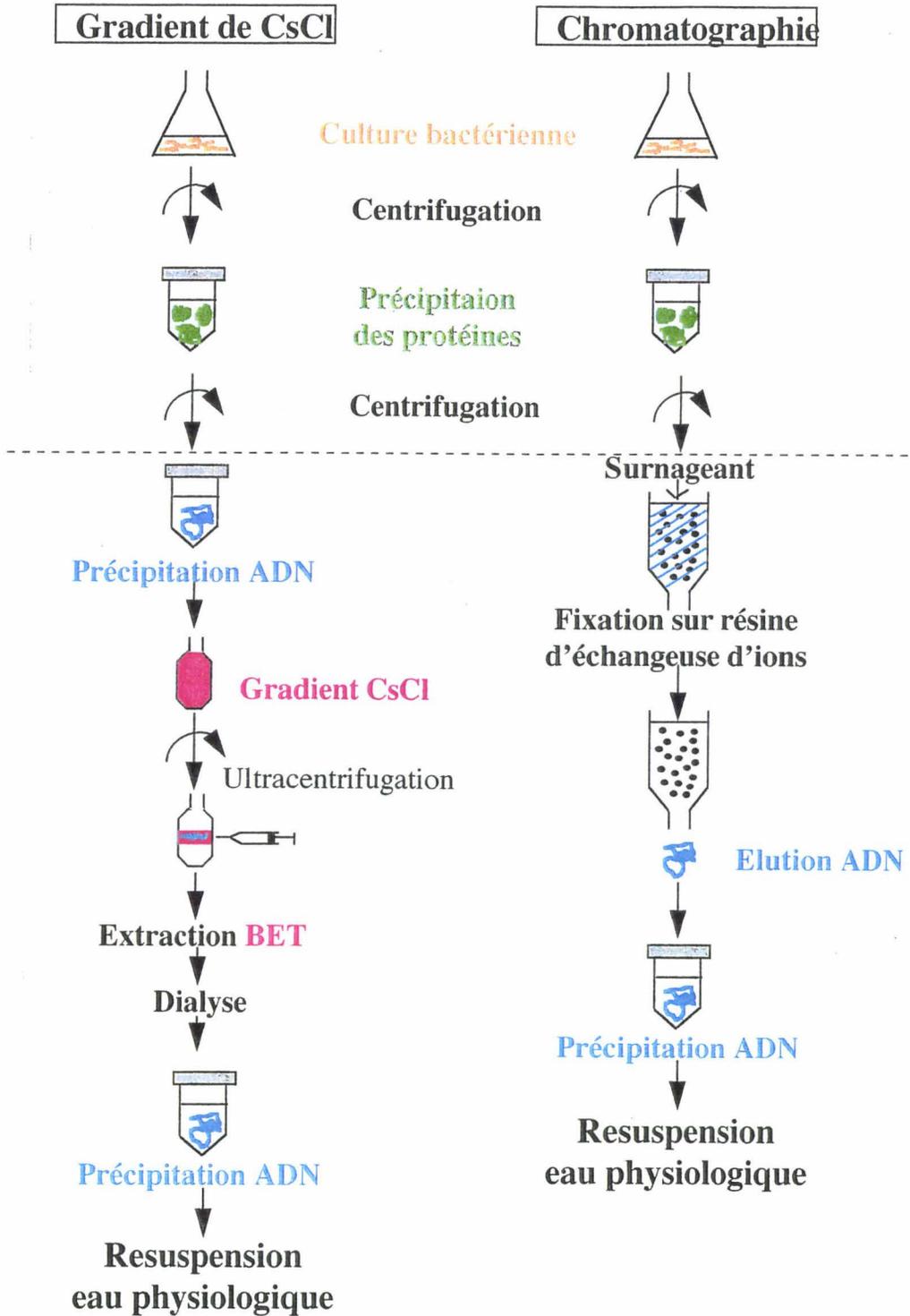
Schéma des stratégies de clonage utilisées pour la construction des plasmides codant pour Sm28GST (pNIp28) et des plasmides codant pour Sh28GST (pMSh)



L'approche de clonage utilisée pour la construction du plasmide pMSh nous a permis d'économiser une étape de digestion - ligation, tout en garantissant la bonne orientation du cDNA de GST inséré. Dans les deux cas, un séquençage de la région insérée a été réalisé pour vérifier l'intégrité de la séquence.

1.3. METHODES PREPARATIVES

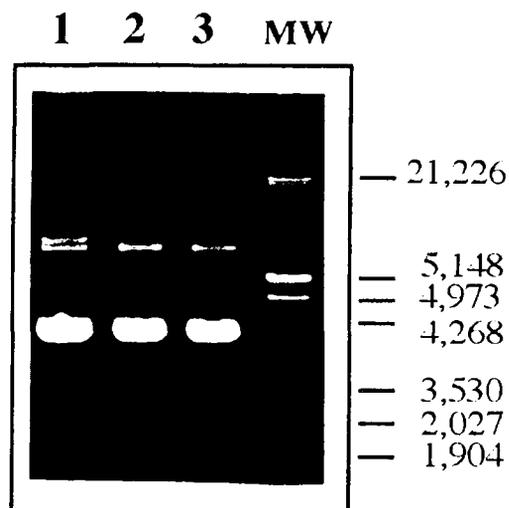
Schéma des protocoles utilisés pour la préparation des plasmides



1.3.1. RENDEMENT ET QUALITE

Technique de purification	Rendement (mg/L culture)	Pureté (DO 260nm / DO 280nm)
Gradient discontinu CsCl	3,46	1,81
Nucleobond (AX 500)	2,80	1,46
Qiagen (tip 500)	2,92	1,48

Analyse sur gel des plasmides pNip28
préparés selon différentes techniques de purification



Dépôts de 1 µg d'ADN par puits.

1. ADN purifié sur gradient discontinu de CsCl
2. ADN purifié par chromatographie d'échange d'ions (kit Nucleobond AX500)
3. ADN purifié par chromatographie d'échange d'ions (kit Qiagen tip500)

L'analyse sur gel des plasmides préparés selon différentes méthodes indique que la conformation des plasmides est identique (forme super-enroulée majoritaire). En ce qui concerne la pureté, le rapport de lecture de densités optiques à 260 et 280nm montre que seule la purification sur gradient de CsCl permet de garantir une préparation quasiment exempte de contaminations de type protéique. Il convient toutefois de noter que l'emploi de kits de purification sur colonnes capable de fixer de 10 à 30 mg d'ADN (soit des capacités plus grandes que celles des kits AX500 et Tip500 limitées à 1 mg) nous a permis d'obtenir des qualités de plasmides comparables à celles obtenues avec le gradient de CsCl. En effet un dépassement des capacités des colonnes entraîne une baisse de la qualité de la purification. Les rendements des deux techniques de purifications utilisées ne se sont pas révélés différer de manière significative.

1.3.2. CONTAMINATION PAR LES ENDOTOXINES BACTERIENNES

Nous avons réalisé le dosage des endotoxines dans différentes préparations de plasmides par un test basé sur l'emploi de lysat d'améboocyte de *Limulus* (test LAL QCL-1000, BioWhittaker).

Plasmides préparés par purification sur **gradient de Chlorure de Césium**:

pRc/CMV: 140 U (14 ng) endotoxines / 100 µg plasmide (dose classiquement injectée)

pNIp28: 34 U (3,4 ng) endotoxines / 100 µg plasmide

Plasmides préparés par **chromatographie** (kit Qiagen Plasmid Giga)

pRc/CMV: 950 U (95 ng) endotoxines / 100 µg plasmide

pNIp28: >1000 U (100 ng) endotoxines / 100 µg plasmide

Plasmides préparés par **chromatographie + lyse des endotoxines** (kit Qiagen Endofree Plasmid Giga)

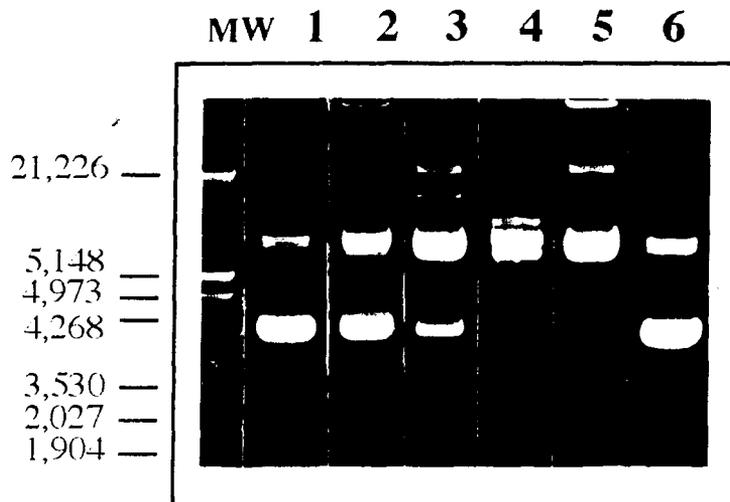
pRc/CMV: 0,7 U (0,07 ng) endotoxines / 100 µg plasmide

pNIp28: 0,2 U (0,02 ng) endotoxines / 100 µg plasmide

Finalement, seule la technique incluant une étape de lyse des endotoxines permet d'obtenir des solutions de plasmides suffisamment propres pour garantir l'absence d'effets non-spécifiques lors de la vaccination ADN (inflammation au site d'injection, modulation de la réponse ou choc endotoxinique). Cette technique de préparation des plasmides a donc finalement été retenue pour l'ensemble de nos expériences.

1.3.3. CONSERVATION

Analyse sur gel des plasmides pNip28
conservés à des durées variables à 4 ou -20°C,
en solution saline injectable à la concentration de 1 mg/ml:



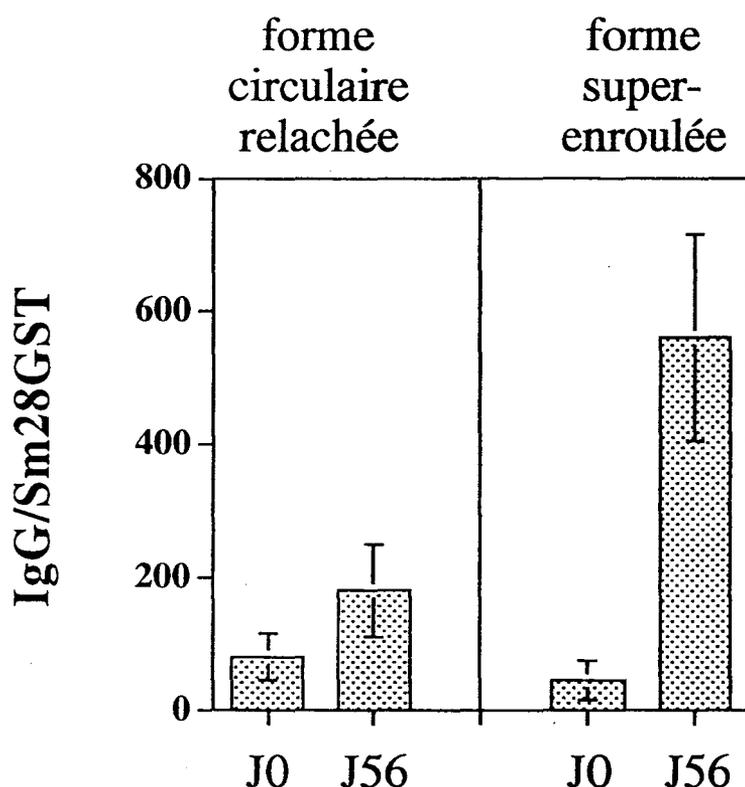
Dépôts de 1 µg d'ADN par puits.

Puits	Durée de conservation	Température de conservation
1	1 jour	4°C
2	5 mois	4°C
3	9 mois	4°C
4	11 mois	4°C
5	21 mois	4°C
6	21 mois	-20°C

Cette analyse fait clairement apparaître que les plasmides changent lentement de conformation lorsqu'ils sont conservés en solution saline à 4 °C. En effet, ils passent progressivement d'une forme majoritairement super-enroulée à une forme circulaire relâchée en l'espace d'une dizaine de mois. La conservation à -20°C garantit par contre une stabilité de la préparation plasmidique sous sa forme super-enroulée.

1.3.4. INCIDENCE DE LA CONFORMATION DES PLASMIDES SUR L'EFFICACITE DE LA VACCINATION ADN

Dosage par ELISA des IgG spécifiques de la Sm28GST chez des rats immunisés par voie intradermique avec des préparations de plasmides pNip28 présentant des conformations différentes



Nous constatés que les plasmides sous forme super-enroulée (puits 1 du gel, page précédente) sont largement supérieurs aux plasmides sous forme circulaire relachée (puits 5 du gel, page précédente) pour induire une réponse immune spécifique. En effet, la conformation des plasmides risque d'être un paramètre déterminant de la stabilité dans les espaces intercellulaires et de la capacité à transfecter les cellules *in vivo*. Il en découle que la conservation de solutions de plasmides à 4°C n'apparaît pas idéale pour une conservation au delà de quelques mois. La lyophilisation des plasmides apparaîtrait donc comme étant un moyen de conservation plus adapté, à condition toutefois que cette procédure n'affecte pas la conformation des plasmides (non-testé dans nos expériences).

2. Ciblage de l'expression de l'antigène aux sites de l'infection

2.1. RESUME

Les stratégies de vaccination ADN se sont le plus souvent portées sur le muscle comme site d'injection des solutions de plasmides. Cependant, dans la mise au point d'une stratégie de vaccination vis-à-vis d'un organisme établissant des contacts privilégiés avec des tissus bien distincts de l'hôte, il nous a semblé judicieux de cibler ces tissus par la vaccination ADN. Au regard du cycle des schistosomes dans l'organisme de leurs hôtes mammifères, trois sites principaux apparaissent primordiaux dans les interactions parasite/hôte: la peau, les poumons et l'interconnexion intestin-foie (ou l'arbre visico-urétal dans le cas particulier de l'infection par *S. haematobium*). Le problème majeur est que les plasmides s'avèrent être très sensibles aux dégradations enzymatiques dès qu'ils se retrouvent dans les milieux extracellulaires de l'organisme. Notre stratégie a consisté à adapter des vecteurs synthétiques en fonction des voies ciblées.

L'emploi de liposomes neutres multilamellaires ne s'est pas révélée être bien adaptée puisque les taux d'encapsulation des plasmides sont quasiment nuls. Par contre, l'emploi de liposomes unilamellaires cationiques composés de DOPE et de DOTAP permettent une bonne encapsulation. L'emploi de ce type de liposomes nous a ainsi permis d'améliorer l'efficacité de l'immunisation ADN par voie nasale. De manière originale, l'emploi de ces vecteurs par voie intraveineuse a permis de générer des réponses immunes locales du tractus respiratoire suite à une expression de l'antigène au niveau des poumons. Cependant, dans l'ensemble, ces réponses restent faibles. Nos résultats montrent que les complexes plasmides/liposomes présentent une charge résiduelle de surface fortement positive. Leur incubation en présence de sérum conduit à une déstabilisation rapide qui pourrait être à l'origine des limites de leur efficacité.

Nous avons donc entrepris d'ajouter des résidus de polyéthylène glycol (PEG) à la structure des liposomes, de manière à neutraliser leur charge de surface. Nous montrons que cela est réalisable, sans que le taux d'encapsulation des plasmides soit diminué. Ce type de complexes est alors beaucoup plus stable en présence de sérum et laisse envisager un comportement meilleur une fois administré dans l'organisme.

D'autre part, nous avons développés l'association de l'ADN à des microsphères (polylactide glycolide) pour une administration par voie orale. Les premiers résultats *in vivo* sont prometteurs puisque nous avons pu mesurer l'apparition d'une réponse immune spécifique.

Nous avons également abordé l'étude de l'association de plasmides à des peptides bifonctionnels possédant une partie pour la liaison à l'ADN (polylysine) et une partie dite "cibleuse" (peptide RGD se liant au récepteur CD11/CD18 des macrophages). Nous montrons que ce type de peptide peut se lier à l'ADN, les rapports de quantités peptide-ADN étant essentiels pour la taille des complexes obtenus.

2.2. MISE EN OEUVRE D'OUTILS DE VECTORISATION

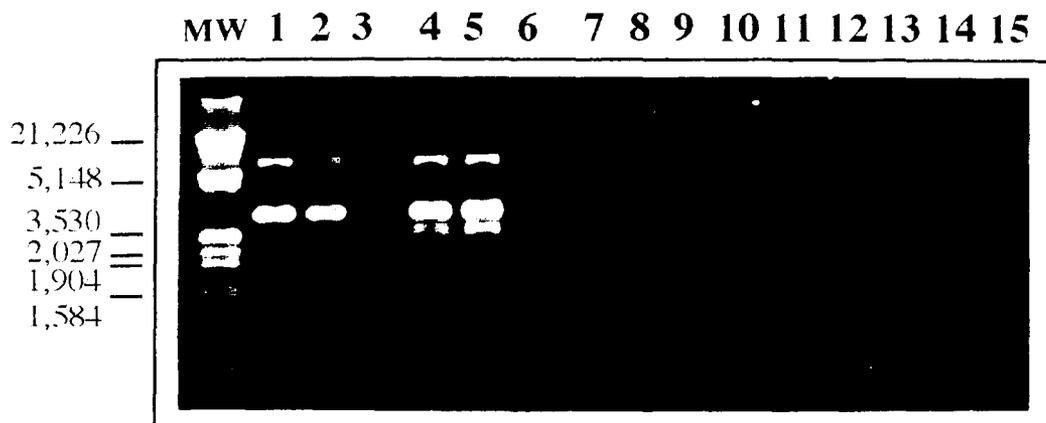
2.2.1. LIPOSOMES MULTILAMELLAIRES NEUTRES

Les liposomes composés de phospholipides neutres possédant comme pôle hydrophobe un groupement choline (tel le dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC) forment des vésicules à plusieurs couches permettant ainsi d'y encapsuler de nombreuses molécules. En outre, ce type de liposomes et plus précisément des liposomes composés de DPPC et de DMPG (dimiristoyl phosphatidyl glycérol) à un rapport molaire 9:1 ont fait l'objet d'évaluations cliniques chez l'homme, démontrant une absence de toxicité [Phillips *et al.*, 1990]. Nous avons tenté d'associer des préparations d'ADN plasmidique à ce type de liposomes multilamellaires neutres. Nous avons également choisi d'évaluer la possibilité d'incorporer des plasmides à des liposomes dans lesquels est greffée l'hémagglutinine filamenteuse de *Bordetella pertussis* (FHA). Les résultats de notre laboratoire ont en effet mis en évidence l'effet adjuvant pour une immunisation par voie nasale de la FHA lorsqu'elle est greffée à des liposomes renfermant l'antigène Sm28GST sous forme protéique [Poulain-Godefroy *et al.*, 1998].

Les liposomes multilamellaires DPPC:DMPG ont été fabriqués comme décrit précédemment [Poulain-Godefroy *et al.*, 1998]. En bref, les phospholipides sont dissouts dans du chloroforme, puis séchés par évaporation rotative sur les parois d'un ballon en verre. Les liposomes sont alors formés par addition d'une phase aqueuse ; il s'agit dans notre cas de solutions de plasmides additionnée le cas échéant de FHA. De manière à évaluer l'incorporation des plasmides aux liposomes, les préparations ont subi 3 lavages successifs par centrifugation.

Analyse sur gel d'agarose des différentes fractions de lavage des liposomes après réhydratation avec les préparations de plasmide

	ADN ajouté au départ	Lavage1	Lavage2	Lavage3	Lipo
Lipo/FHA/ADN	1	4	7	10	13
Lipo/ADN	2	5	8	11	14
Lipo	3	6	9	12	15



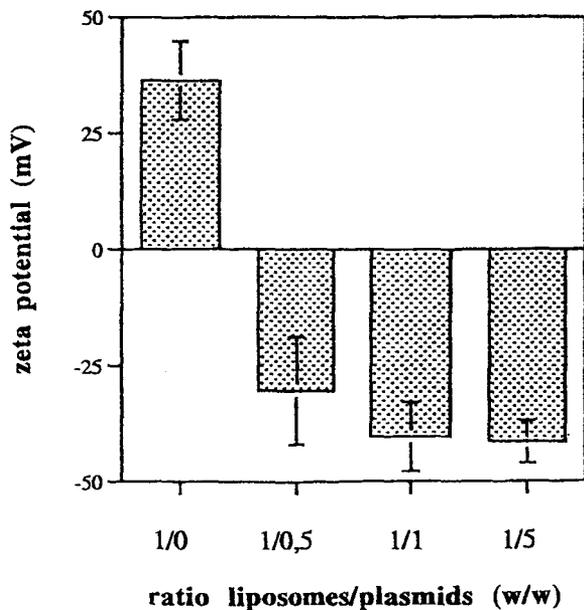
Nous observons donc sur ce gel qu'il y a absence d'incorporation des plasmides aux liposomes (en présence ou en absence de FHA). Ce résultat a été confirmé par mesure des concentration d'ADN dans les solutions de lavage. Ce type de liposomes multilamellaires ne semble donc pas se prêter à l'incorporation d'ADN, sans doute de part son absence de charges. Récemment, il a en effet été démontré que l'interaction de plasmides avec des liposomes multilamellaires était largement accrue par l'ajout de phospholipides cationiques, essentiellement via une interaction de type électrostatique [Gregoriadis, 1998]. Pour cette raison, nous avons choisi de réorienter notre choix de liposomes vers des liposomes cationiques.

2.2.2. LIPOSOMES UNILAMELLAIRES CATIONIQUES

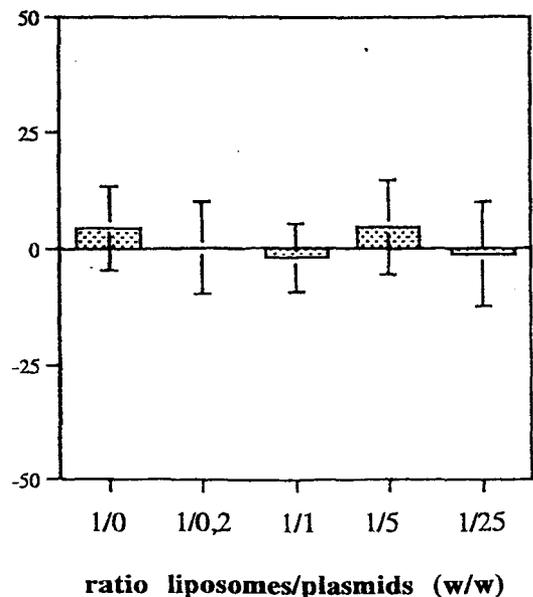
Les liposomes cationiques permettent une interaction électrostatique forte avec les molécules d'ADN. Cependant l'existence de charges résiduelles à la surface de tels liposomes risque de les rendre instables suite à une administration dans l'organisme. Nous avons réalisés des liposomes composés de DOTAP (dioleoyl trimethylammonium propane, phospholipide cationique comportant un groupement amine quaternaire) et de DOPE (dioleoyl glycéro-phosphoethanolamine, phospholipide neutre à propriétés fusogènes) par une technique d'évaporation de solvant similaire à celle utilisée pour les liposomes DPPC:DMPG. Les liposomes sont réhydratés, puis une solution de plasmide est rajoutée. De façon à essayer de neutraliser la charge de surface, nous avons également réalisés des liposomes cationiques DOTAP:DOPE contenant une fraction de polyethylene glycol (PEG) de masse molaire variant de 400 à 5000 g/mole. Les molécules de PEG sont couplées au phospholipide distearyl glycerophosphoethanolamine (DSPE) de manière à pouvoir se greffer aux liposomes.

La charge de surface des liposomes complexés à l'ADN a été évaluée par mesure du potentiel zeta (mesure de diffraction de rayons X d'une solution de particules soumises à une électrophorèse alternative) sur un appareillage DELSA 440SX de marque Coulter.

Zeta potential as a function of DOTAP/DOPE liposomes to pNip28 plasmids ratio

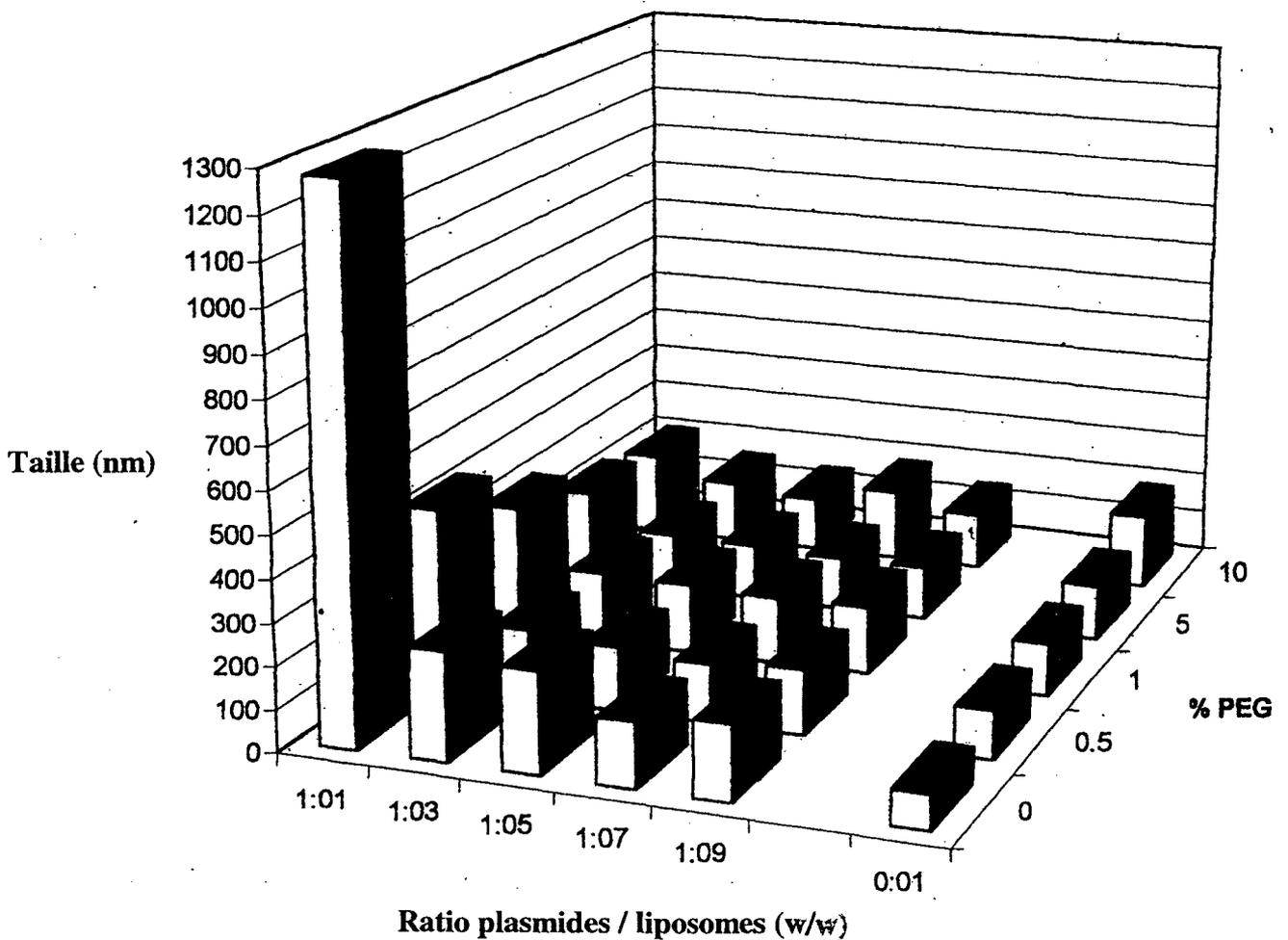


Zeta potential as a function of DOTAP/DOPE/DSPE-PEG2000 liposomes to pNip28 plasmids ratio



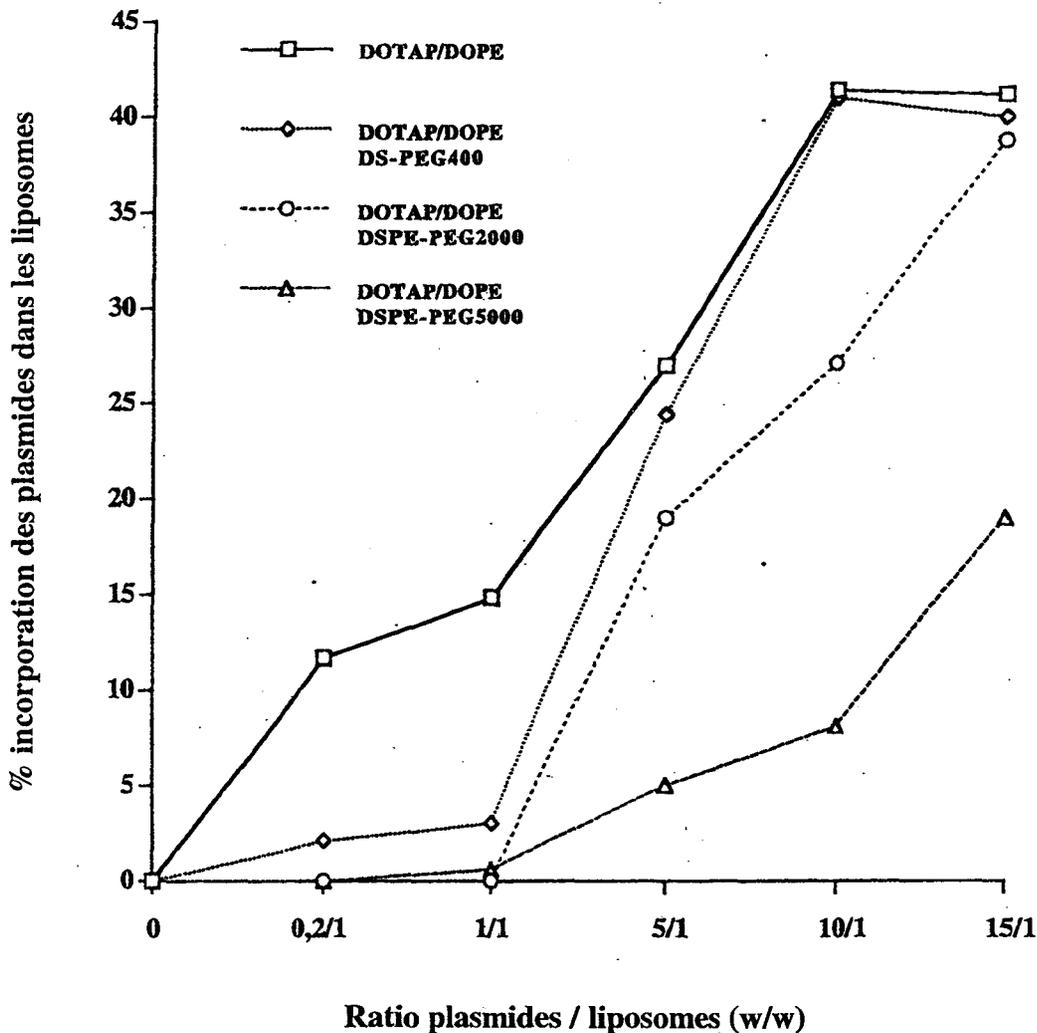
Les liposomes DOTAP:DOPE vides présentent un potentiel zeta de -37mV . Dès que l'on y ajoute des plasmides, le potentiel zeta chute à des valeurs négatives comprises entre -30mV et -40mV . En effet, une partie des plasmides est associée au coeur des liposomes unilamellaires tandis qu'une autre partie des plasmides reste associée à la surface. Dans le cas de liposomes comprenant du DSPE-PEG2000, la charge de surface est totalement neutralisée, même lorsqu'une quantité massive de plasmides est ajoutée. Schématiquement, on suppose que les molécules de PEG forment des extensions à la surface des liposomes entre lesquelles les plasmides peuvent se glisser pour rejoindre le coeur cationique des liposomes.

Mesure de la taille de complexes plasmides / liposomes cationiques DOTAP:DOPE +/- DSPE-PEG



Par mesure de la liaison de bromure d'éthidium aux plasmides non-incorporés dans les liposomes (mesure de fluorescence à 585 nm), nous avons analysé si le greffage de PEG provoquait ou non une exclusion des plasmides.

Incorporation de plasmides dans des liposomes cationiques DOTAP:DOPE +/- DSPE-PEG



Il s'avère qu'à des concentrations de plasmides importantes (rapport plasmides/liposomes égal ou supérieur à 1/5), les liposomes incluant du PEG de faible longueur (PEG400) ou de longueur intermédiaire (PEG2000) présentent des capacités de complexation aux plasmides comparables à celles des liposomes sans PEG. Seuls les liposomes comportant de longs bras de PEG5000 se révèlent réfractaires à la complexation avec les molécules de plasmides.

Puisque le greffage de molécules de PEG à la surface des liposomes cationiques est capable de neutraliser la charge de surface sans empêcher l'incorporation des plasmides, nous avons voulu évaluer l'avantage de ces liposomes en terme de stabilité au contact d'un milieu se rapprochant de conditions physiologiques

Etude de la stabilité des liposomes en présence de sérum de veau (SVF)

Type de liposome	% Plasmides relargués
DOTAP/DOPE	30,7
DOTAP/DOPE/DSPE-PEG5000 1%	3,8
DOTAP/DOPE/DSPE-PEG5000 10%	8,6

Incubation des complexes liposomes / plasmides (ratio 1/5) 30 min à 37 °C en présence de 10% SVF.

De manière très claire, la présence de PEG prévient le relarguage des plasmides. Des résultats comparables ont été obtenus avec des liposomes contenant le DSPE-PEG2000.

Nous présentons dans la partie 2.4. des résultats obtenus avec l'utilisation *in vivo* de liposomes cationiques DOTAP:DOPE complexés au plasmide codant pour la Sm28GST. Ces liposomes permettent de réaliser une immunisation ADN par les voies intraveineuse et intranasale. Cependant, les résultats d'immunogénicité restent relativement marginaux et nous envisageons donc prochainement d'utiliser en vaccination ADN les liposomes DOTAP:DOPE:DSPE-PEG que nous avons développés.

2.2.3. MICROSPHERES

Nous avons réalisés des microsphères composées d'un polymère biodégradable et biocompatible: le poly(lactide-co-glycolide) (PLG ou RG 505), c'est-à-dire un polymère racémique contenant 50% d'acide lactique et 50% d'acide glycolique et ayant un poids moléculaire de 65 kDa.

La technique de préparation des microparticules fait appel à une "double émulsion/évaporation de solvant" (w/o/w). Succinctement, 1 ml d'une solution aqueuse (eau mQ) contenant les plasmides est ajouté à 10 ml d'une solution organique (6%) contenant le polymère (RG 505) dans du dichlorométhane. Le mélange est émulsionné avec un ultraturrax 5 minutes à 8000 rpm. 2,5 ml de cette première émulsion sont ajoutés à 50 ml d'une solution aqueuse (mQ) contenant 5% d'émulsifiant (alcool polyvinylique). La seconde émulsion est réalisée avec un ultraturrax pendant 5 minutes à 8000 rpm. Le solvant est mis à évaporer o/n à température ambiante et sous agitation (\pm 700 rpm). Les microgouttes se solidifient suite à l'évaporation du solvant pour donner finalement des microparticules solides chargées en plasmides. Les microparticules sont centrifugées 10 minutes à 3.500 rpm afin d'éliminer l'alcool polyvinylique excédentaire. Le culot de microparticules est alors lavé 3 fois avec 10 ml d'eau mQ et centrifugé 10 minutes à 3.500 rpm. Ce dernier culot est resuspendu dans 2 ml d'eau mQ, puis est liophilysé.

Mesure des rendements d'incorporation:

Les microparticules sont détruites avec du NaOH 0,1 M, puis chauffées 20 minutes à 100°C. Après centrifugation 10 minutes à 3.500 rpm l'ADN est dosé dans les surnageants.

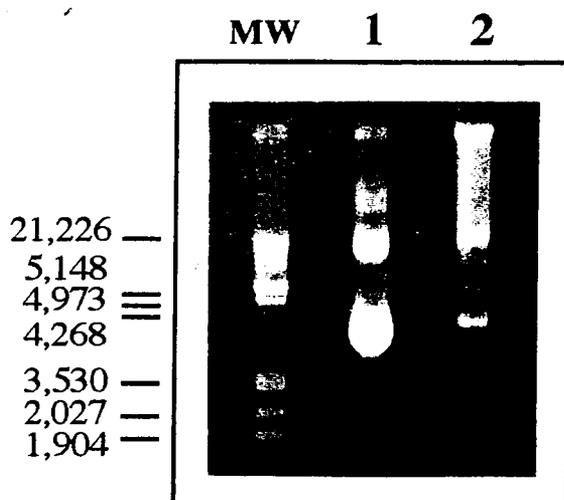
2,56 mg de pCR3.1/mg de microparticules RG 505

5,77 mg plasmide pMSh/mg de microparticules de RG 505

4,77 mg plasmide pGFP/mg de microparticules de RG 505

Analyse sur gel de la qualité des plasmides incorporés:

1 µg de plasmide (pGFP) est déposé par puits (gel d'agarose 1%)



On remarque que la forme superenroulée initiale du plasmide non encapsulé est convertie en partie en une forme circulaire relâchée après encapsulation et libération.

Immunsation orale de souris avec des microparticules chargées en plasmide codant pour la Sh28GST (résultats préliminaires):

Des souris Balb/c sont immunisées une fois par dose orale de 80 µg de plasmide. Aucune réponse immune humorale spécifique n'est détectée chez les souris ayant reçu les microparticules vides ou les microparticules chargées en plasmide contrôle (pCR3.1). Par contre dans le groupe de souris ayant reçu des microparticules chargées en pMSh, une réponse en anticorps IgG1 est détectée par ELISA:

J0: titre <20 pour toutes les souris

J12: idem

J19 souris n°7 (titre 360), 6 autres souris (titre <20)

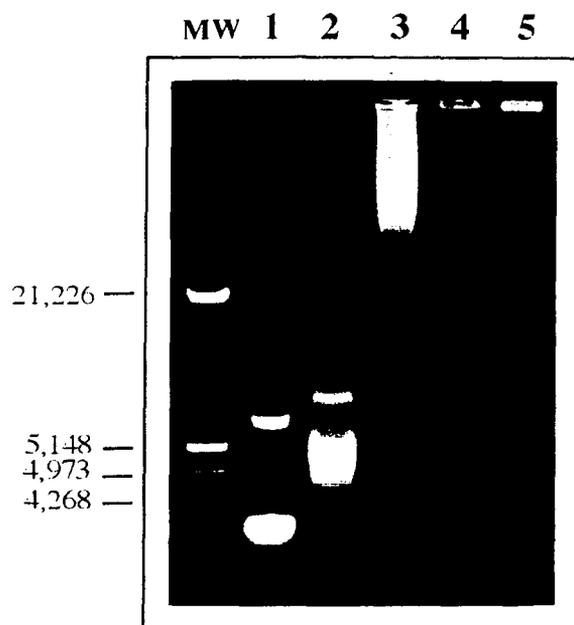
J33 souris n°1 (titre 250), souris n°7 (titre 910), 5 autres souris (titre <20)

J47 souris n°1 (titre 520), souris n°7 (titre 850), 5 autres souris (titre <20)

2.2.4. PEPTIDES

Nous avons évalué la liaison d'un peptide (polyK)₉GGGRGD à des plasmides par incubation à différents rapports molaires et analyse sur gel d'agarose (0,6%). Il s'agit d'un peptide de type bifonctionnel, capable en théorie de se lier à l'ADN par liaisons électrostatiques (partie poly-lysine) et également capable de se lier au récepteur CD11/CD18 présent à la surface des macrophages par l'intermédiaire du motif RGD, retrouvé par exemple dans la séquence de la FHA.

Puits	Rapport molaire plasmide/peptide
1	1/0
2	1/0,5
3	1/1
4	1/5
5	1/10



De manière très nette, un shift du plasmide est observé au rapport 1/1, démontrant l'interaction du peptide avec le plasmide. Aux rapports supérieurs, l'association provoque une aggrégation, puisque l'on retrouve majoritairement le plasmide au niveau du puits de dépôt. Ce type de complexes sera dans un premier temps testé sur des lignées cellulaires de type macrophagiques (J774) en utilisant des plasmides codant pour le gène reporter Luciférase de manière à évaluer la qualité de la transfection. Si un effet de ciblage facilitant la transfection des études d'application *in vivo* seront alors entreprises.

2.3. PARAMETRES DE LA VACCINATION

2.3.1. VOIES

Au cours de ce travail, nous avons donc testés de multiples voies d'administration des solutions de plasmides: intradermique, intranasale, intratrachéale, intraveineuse, orale et intramusculaire. Pour chacune des voies nous avons tenté d'étudier à la fois la localisation des cellules transfectées et exprimant l'antigène ainsi que l'induction éventuelle de réponses immunes à composante locale. Cette approche a notamment été abordée en détails pour le ciblage de la peau (se rapporter au chapitre 3. de la partie *Résultats*) et du tractus respiratoire (2.2. pages suivantes).

Voies d'administrations, sites d'expression de l'antigène et composantes locale/systémique de la réponse immune

Voie d'administration	Site d'expression de la Sm28GST		Réponse immune spécifique	
	<i>localisé au site d'injection</i>	<i>disséminé dans l'organisme</i>	<i>locale</i>	<i>systémique</i>
i.d.	+	-	+	+
i.n.	+	n.d.	+/-	+/-
i.n. (+ lipo DOTAP:DOPE)	+	n.d.	+/-	+/-
i.t.	+	n.d.	n.d.	n.d.
i.v.	-	-	-	-
i.v. (+ lipo DOTAP:DOPE)	-	+	+/-	+/-
orale (+ microsph. PLG)	n.d.	n.d.	n.d.	+/-
i.m.	n.d.	n.d.	n.d.	+

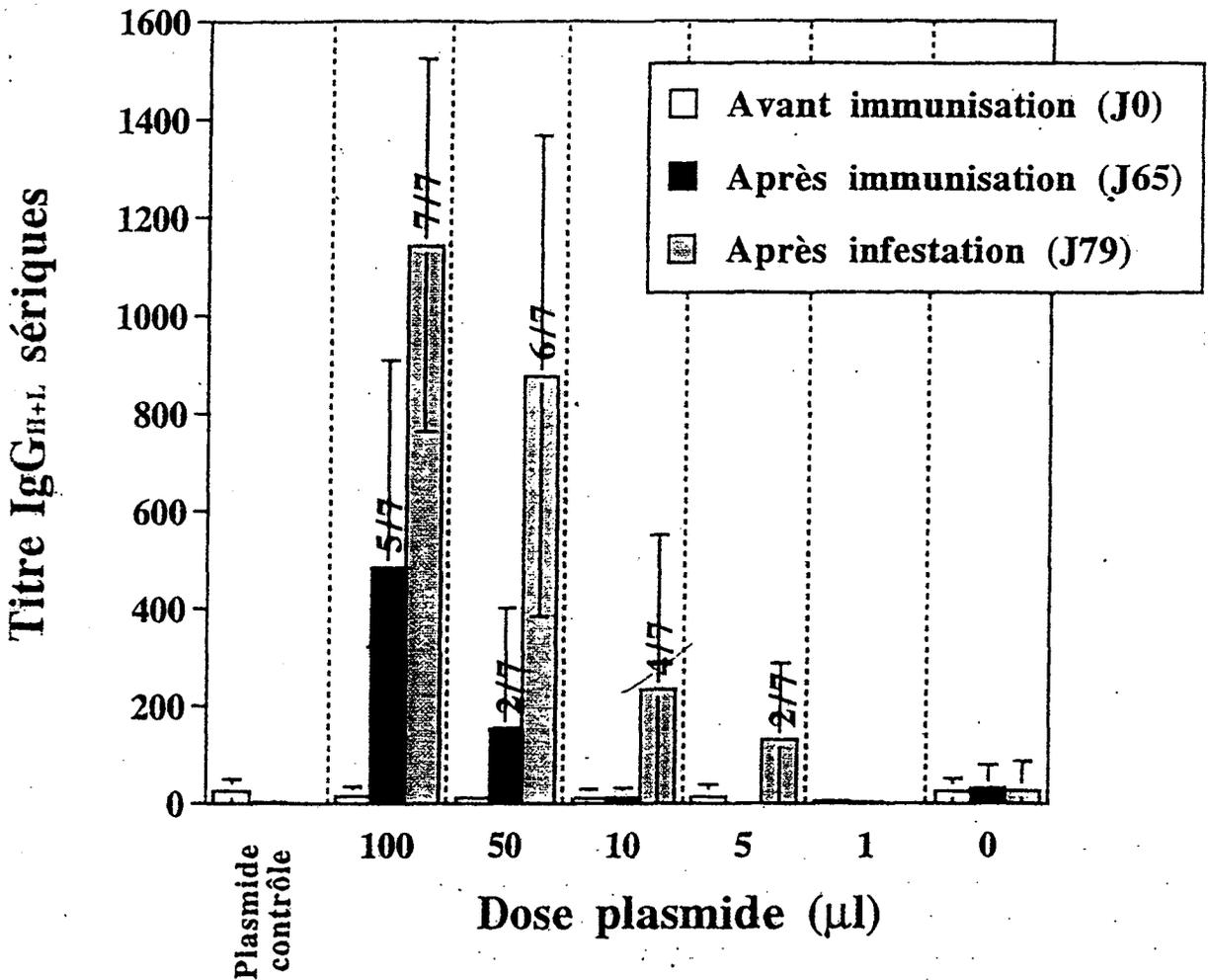
n.d. non déterminé

+/- réponse immune faible avec de fortes variations individuelles

Les voies intradermique et intramusculaires se révèlent être les plus efficaces pour l'immunisation ADN dans notre modèle. Notre étude souligne toutefois que la vaccination ADN par les voies muqueuses est tout à fait envisageable et notamment par l'emploi de vecteurs synthétiques adaptés, tels que les liposomes cationiques pour la voie nasale et les microsphères pour la voie orale.

2.3.2. DOSES

Nous avons choisi une gamme de doses couramment utilisée pour ce mode de vaccination dans les modèles murins, à savoir de 1 à 100 μg par injection. Nous avons réalisé une étude dose/réponse après administrations i.d. de trois doses égales à 2 semaines d'intervalle. En voici les résultats en terme de niveau de réponse humorale et proportion d'animaux répondeurs.



Ce type d'étude n'a pas été réalisé avec les administrations par les autres voies, notamment parce que les réponses se sont révélées être moins reproductibles et pour des raisons de limite de volume d'injection.

2.3.3. NOMBRE D'ADMINISTRATIONS

Nous avons testé dans notre modèle 1 dose ou 3 doses par les voies id et im. Après une administration, même aucune réponse primaire n'a pu être détectée. Par contre une réponse spécifique est malgré tout initiée et mémorisée car l'infection parasitaire provoque une réponse de certains de ces animaux (les animaux naïfs ne développent pas de réponse spécifique de l'antigène suite à l'infection).

2.4. EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE SM28GST AU NIVEAU DU TRACTUS RESPIRATOIRE

DNA IMMUNIZATION TO THE RESPIRATORY TRACT WITH *SCHISTOSOMA MANSONI* ANTIGEN-ENCODING PLASMIDS

**Loïc Dupré, Mohammed Mekranfar, Anne-Marie Schacht,
Odile Poulain-Godefroy, André Capron and Gilles Riveau*.**

*Relations Hôtes-Parasites et Stratégies vaccinales, INSERM U 167,
Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245,
59019 LILLE CEDEX, FRANCE.*

*Corresponding author : Tel. : (33) 03.20.87.77.81
FAX : (33) 03.20.87.78.88

Keywords : DNA, Immunization, Lungs, Mouse, *Schistosoma mansoni*, Sm28GST.

Running title : DNA immunization at the respiratory tract.

ABSTRACT

We have investigated the targeting of DNA immunization to the respiratory tract against in mice using plasmid DNA encoding the model antigen *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase (Sm28GST). The aim of this study was to characterize the relationship between the route of plasmid DNA injection, the distribution of the expressed antigen and the possibility to induce both systemic and mucosal antibody responses. Expression of Sm28GST in cells of the respiratory tract was achieved by intratracheal and intratracheal plasmid delivery routes. We were able to detect both local IgA antibody responses and systemic IgG antibody responses following intranasal administration with a clear potentialization when using Lipofectin complexed to the plasmid DNA. Intravenous administration of plasmid DNA with Lipofectin led to a largely distributed expression of Sm28GST including expression in cells of the respiratory tract. We demonstrated here that intravenous route induced systemic responses and was as efficient as intranasal route to induce mucosal antibody response. Thus this study clearly shows that the choice of the route of injection for DNA immunization can be particularly determinant for inducing specific immune responses at immunocompetent sites encountered during the course of the infection considered.

INTRODUCTION

The recently developed DNA-based approach to vaccination is regarded as a very promising alternative to live and subunit vaccination approaches because of the simplicity of its development and its proven efficacy against a growing number of pathogens¹⁻⁴ Another potential advantage of DNA vaccination that would merit further investigation relies on the possibility to control the sites of antigen expression *in situ* by the choice of adequate delivery routes and delivery tools. Thus the control of the targeting of antigen expression would be determinant for adding a local mucosal component to the systemic immune response induced. It is well-accepted that the mucosal surfaces are the first line of the host defense against many pathogens and that the induction of mucosal immunity through vaccination can be crucial for the control of an infection. However, concerning DNA vaccines, most strategies have relied on the administration of plasmid DNA into the muscles and the skin either by needle injection or by microbombardment (gene gun). Strategies aimed at stimulating immunity at mucosal surfaces were only poorly

investigated. The first report in this field clearly indicated the potential for inducing protective immunity against influenza virus of intranasal administration of a plasmid encoding haemagglutinin antigen ⁵. However, neither the site of antigen expression nor the mucosal immunity induced were characterized. More recently, it has been shown that intramuscular or intranasal administration of plasmid encoding a glycoprotein of herpes simplex type 1 virus could result in the induction of a local immune response at the level of the female genital tract ^{6, 7}. The only study that was directly aimed at controlling the site of antigen expression following DNA delivery for inducing mucosal immunity focused on the immunization of the female genital tract ⁸. It demonstrated that human growth hormone was expressed in cells of the vaginal mucosa following gene gun immunization directly to this site, thus leading to the induction of a local immunity in the female genital tract.

The aim of the present study was to target antigen expression at the level of the respiratory tract and to study the induction of a mucosal immunity at this site. Targeting of the expression of heterologous protein to the lungs was already demonstrated in previous studies using either aerosol or intranasal delivery. Expression at the lung level was also determined to be important after intravenous delivery. For these reasons we decided to chose the intranasal and intratracheal routes as well as the intravenous route. In addition, we used cationic liposomes aimed at preventing DNA degradation and at facilitating delivery to the cells ⁹.

Our model antigen was a 28-kDa Glutathione *S*-Transferase of *Schistosoma mansoni*(Sm28GST). Indeed, the respiratory tract may represent the main site of elimination of *Schistosoma mansoni* ¹⁰, since the young parasites are thought to be particularly vulnerable at this level, where they undergo important maturation. Furthermore, it has been shown that protection in humans against massive output of eggs responsible for the pathology was correlated with the presence of IgA antibodies specific to Sm28GST ¹¹. We have already developed a Sm28GST DNA vaccination approach in the rat model and we showed that specific antibodies able to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) could be induced following delivery to the skin of plasmid DNA encoding Sm28GST ¹². We investigated here the distribution of antigen expression by immunohistology and evaluated the potential of the different immunization routes to induce specific antibody responses both systemically and locally in the lungs.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid preparation. The Sm28GST expression plasmid, pNip28, has already been described¹². Plasmids (pNip28 and control plasmid pRc/CMV) were purified by centrifugation in a discontinuous caesium chloride gradient and redissolved in filter-sterilized apyrogenic normal saline at a final concentration of 1 mg/ml. Plasmid preparations were controlled for endotoxin contamination (<0.2 U/mg DNA) using a Limulus Amebocyte Lysate assay (Biowhittaker, Walkersville, MD).

Expression of Sm28GST. COS-1 cells (ATCC, Rockvile, MD) were cultured on cover glass in 60 mm dishes. They were approximately 80% confluency for transfections which were performed using plasmid-PEI (Euromedex, Souffelweyersheim, France) complexes at 1:3 ratios according to the manufacturer's instructions. 1 µg plasmid was used for approximately 150,000 cells which were harvested 48 hours after transfection. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde solution for 30 minutes and permeabilized with 0.1% Triton X100 for 4 minutes. Sm28GST labelling was performed for 2 hours using a rabbit immune serum diluted 1/1000 in 0.2% gelatin and revealed 1 hour using a fluorescein iso-thiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit antibody diluted 1/500. Countercoloration with Ewans blue was performed prior to examination.

DNA immunization. Female Balb/C mice were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) and were 6 weeks of age at the initiation of the experiments. Groups of 10 mice received 3 administrations (2 week-intervals) each corresponding to 10 µg plasmid solution. Intravenous and intranasal delivery were performed either with naked plasmid or with plasmid-Lipofectin (Life Science Technologies, Gibco BRL) complexes at 1 : 4 ratios following manufacturer's recommendations. In order to ensure that intranasal administrations correctly drained the respiratory tract, intratracheal administrations of plasmid were performed under anaesthesia as a control. A boost consisting of an intranasal injection of 20 µg recombinant Sm28GST (rSm28GST purchased from Transgène S.A., France) was performed for all animals 56 days after the first plasmid administration. Blood samples and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were collected at different time points after immunizations and boost with rSm28GST.

Immunohistochemistry. Tissue samples including lungs, liver, spleen, trachea and nasal epithelium were collected 3 days after one administration of 10 µg plasmid either naked or complexed to Lipofectin. They were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, Saint Louis, MO) in PBS, dehydrated in ethanol baths and embedded in paraffin. 4 µm-thick sections were deparaffinated in toluene, rehydrated, washed in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 154 mM NaCl) and saturated for 30 minutes in TBS, 0.5% ovalbumin (Sigma), 5% normal goat serum (Sigma). Hyperimmune anti-Sm28GST rabbit serum was incubated overnight at 4°C (1/1000 in TBS, 0.5% ovalbumin). A pre-immune rabbit serum was used as control. After three washes in TBS, slides were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/200, in TBS, 0.5% ovalbumin ; Sigma) for 4 hours and extensively washed in TBS. The alkaline phosphatase reaction was developed for 10 minutes with New Fuchsin substrate (Dako, Carpinteria, CA). Counterstaining was performed with Harris' haematoxylin.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. To detect specific antibodies, ELISA assays were performed on Immulon 3 plates (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VI) coated 2.5 hours at 37°C with 100 µl/well of a 10 µg/ml solution of rSm28GST diluted in PBS (10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 154 mM NaCl). After 3 washes with washing buffer (PBS, 0.1% Tween-20 (Prolabo, France)), sera or BALF were diluted serially in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween-20, 0.5% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany)) and incubated on plates overnight at 4°C. Plates were washed 5 times with washing buffer and then incubated with IgG_{H+L} or IgA peroxidase-conjugated specific antisera (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) diluted in blocking buffer for 1.5 hour at 37°C. After 4 washes with washing buffer, plates were developed using 1mg/ml 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium substrate (Sigma) and 0.03% H₂O₂. One hour later, absorbance at 492 nm was determined with an automated microplate reader (Titertek Multiscan, Labsystems, Finland). Titers were calculated as the reciprocal of dilution yielding 3 times the value obtained for the background (no serum or no bronchoalveolar fluid added).

RESULTS

***In vitro* expression of Sm28GST.** Sm28GST was expressed in COS-1 cells transfected with the pNip28 plasmid as visualized by the fluorescent labelling seen on Fig.1a. No labelling could be detected for cells transfected with control plasmid (Fig. 1b). Approximately 30% of the pNip28-transfected cells expressed the protein which was

mainly localized into the cytoplasm. We also observed specific labelling when transfected cells were not permeabilized (data not shown) indicating possible association of the protein to the membrane. However, no Sm28GST protein could be detected in the supernatants of transfected cells (data not shown).

***In situ* expression of Sm28GST following systemic and mucosal administrations of pNIp28.** Intranasal and intratracheal plasmid administrations gave comparable results with Sm28GST labelled cells being spread over the whole respiratory tract including the nasal mucosa, the trachea and the lungs (Table 1). The number of labelled cells was found to be relatively small (0 to 5 positive cells per field corresponding to a 50 fold magnification), but equally distributed over the whole respiratory tract tissues. The localization of Sm28GST-containing cells was found to be predominantly within the first line of cells underlying the epithelium (Fig. 2C, 2D). We were not able to notice any influence of the adjonction of Lipofectin on the number and distribution of Sm28GST-labelled cells. Concerning intravenous route of administration, the presence of Lipofectin was found to be determinant since Sm28GST labelling was detected only when pNIp28 was complexed to the cationic liposomes (Table 1). Sm28GST *in situ* expression had a large distribution mainly in cells of the liver (Fig. 2B) and the lungs (Fig. 2A) with a predominant perivascular localization. Labelling intensity of positive cells appeared to be weaker than after intranasal or intratracheal administrations but number of expressing cells was found to be higher (5 to 15 positive cells per field corresponding to a 50 fold magnification).

Systemic and mucosal antibody response. Since intratracheal and intranasal routes gave similar results concerning *in situ* expression of the antigen, only intranasal route was chosen for immunization studies. For injections by the intravenous route complexation of plasmids with Lipofectin was used systematically. Specific IgG antibody responses were elicited at the systemic level with the two routes tested (Table 2). Following intranasal delivery primary Sm28GST-specific IgG antibody response could be detected only when pNIp28 was complexed to Lipofectin. The secondary response after the protein boost was not strong concerning the intensity of the response but increased the number of responding individuals. Intravenous administration of pNIp28 complexed to Lipofectin led to an antibody response comparable to that obtained after intranasal priming. The intranasal administration of the recombinant protein had also only a minor effect on the intensity of the response. No systemic IgA response could be detected for any of the immunization protocols used. In contrast, specific IgA antibody response was detected in the BALF of both intranasally- and intravenously-immunized mice (whereas IgG antibody response was under detection limites).

However, this mucosal response appeared only after boost with rSm28GST. Thus, the boost induced a clear recall of a local response initiated by the DNA administrations. Indeed, we detected specific IgA antibodies in approximately one third of the mice immunized either by intranasal or intravenous routes. For intranasal route presence of Lipofectin was beneficial. Animals showing mucosal antibodies corresponded to the animals with the highest systemic responses. Measurement of total IgG and total IgA in BALF indicated absence of serum transudate in BALF.

DISCUSSION

This study demonstrates the potential of DNA-based vaccination to induce mucosal immune response at the respiratory tract level using either intranasal or intravenous delivery route. We demonstrated here that the control and analysis of the site of antigen expression following DNA immunization can be determinant for the induction of local immune responses in addition to systemic immune responses.

We have investigated the distribution of expression of the vaccine candidate Sm28GST following administration of antigen-expression plasmid (pNip28) by intranasal and intravenous routes and using two forms of delivery e.g. naked plasmid and plasmid complexed to Lipofectin. Our study was based on the histological analysis of Sm28GST expression. We showed here that direct administration of plasmid DNA in saline by the nares or the trachea of the mice led to the subsequent expression of the encoded antigen. Although intranasal delivery is thought to lead to important loss of the delivered solution in the digestive tract, this delivery route was found to drain lungs in a satisfying manner since intranasal and intratracheal administrations gave comparable results. Expression was detected 3 days after pNip28 administration and was restricted to cells scattered over the whole respiratory tract including nasal tissue, trachea and lungs. Thus this study shows for the first time that nasal mucosa can also be transfected and thus could be the site of immune induction since lymphoid organs have been characterized at this level ^{13, 14}. Furthermore, we visualized the precise localization of the cells containing expressed Sm28GST antigen. *In vitro* transfection studies indicated that our model antigen had an intracellular (and membrane-associated) localization. Thus, we believe that labelled cells visualized on tissue sections corresponded to transfected and antigen-expressing cells. We found that antigen was predominantly localized in cells lying directly under the

epithelia. Most expressing cells had oval shape and round nucleus and could correspond to pneumocytes. This observation indicated that transfection and expression of Sm28GST was selective to certain cell type(s) and that epithelial cells although being the first line of cells that should be in contact with the plasmid did not expressed antigen at detectable levels at least at the time considered. This observation is in contrast with the results of Stribling *et al.* ¹⁵ who reported transgene expression in lung epithelial cells following aerosol plasmid delivery. Aerosol plasmid delivery also appeared more potent at draining the lung alveoli which were rarely the site of antigen expression in our model. Cationic liposomes are thought to protect DNA from rapid degradation and to enhance transfection efficiency . Most studies have shown the requirement for cationic liposomes to achieve antigen expression at the lung level ^{15, 16}. In opposite, our data indicate that there was no apparent effect of the adjonction of lipofectin in our model. Indeed, number, localization and morphology of labelled cells were similar to naked plasmid administration. Our result can be compared to the studies of Tsan ¹⁷ showing comparable transfection efficacy with naked plasmid and plasmid-cationic liposomes complexes. However, our detection method, which was based on the observation of histological sections, is not accurate for measuring a quantitative expression level in a whole tissue.

A number of studies have demonstrated that intravenous injection of plasmid-cationic liposomes complexes also resulted in transfection of the lung tissue ¹⁸⁻²⁰, presumably because of the large endothelial surface of this tissue. For this reason we thought that intravenous injection could lead to a stimulation of mucosal immunity at the level of the respiratory tract. We first assessed if cells at this level could be transfected following intravenous delivery of pNIp28 plasmid. In contrast to the results obtained for the delivery by the nasal route, the complexation of plasmids to Lipofectin was found to be stricly required for expressing Sm28GST *in vivo* following intravenous delivery. This is in accordance with all studies of gene expression after intravenous plasmid DNA delivery ^{19, 21, 22}. Immunohistochemical labelling of tissue sections confirmed previous reports with other antigens since they showed a large tissular distribution of Sm28GST expression including the liver, the lungs and the spleen. In addition they clearly show that this expression was perivascular in the liver and both perivascular and sub-epithelial in the lungs, whereas expression in the spleen was limited to a very restricted number of cells.

After having characterized the expression of Sm28GST antigen, we studied the relationship between this expression and the induction of specific systemic and mucosal antibody responses. Intranasal delivery of naked plasmid (3 times 10 µg) was not sufficient to induce a primary antibody response neither at the systemic level nor at the mucosal compartment. However, administration of a protein boost by the same route allowed to induce a small response in one of the mice, showing that at least in one of the animals a immune response was primed after plasmid delivery. Complexation of plasmids to Lipofectin did not seem to affect transgene expression in the respiratory tract. However concerning the induction of antibody response a clear potentialization of the cationic liposomes was observed. Indeed, 2 individuals displayed a specific systemic IgG response before protein boost which increased to 4 individuals after boost. A mucosal IgA response was also detected after boost in 2 individuals. In comparison administration of protein alone was not able to induce any systemic or mucosal response. This potentialization effect of Lipofectin could either be due to a different pattern of transfection that we were not able to observe (quantitative difference, different cell type) or to an adjuvant or surfactant activity of one of the constituent of Lipofectin (DOPE and DOTAP). Concerning the delivery by the intravenous route, we observed a primary systemic IgG response comparable to the one observed after intranasal delivery. After boost with rSm28GST administered intranasally, systemic response was enhanced and 3 animals out of 10 had specific IgA in their BALF. This is thus the first demonstration that intravenous delivery of a plasmid DNA encoding an antigen can induce a mucosal response in the BALF.

Although this study demonstrates the feasibility of inducing mucosal immune responses at the lung level following intranasal or intravenous delivery, the efficacy of the method appears to be limited and should benefit from improvements. Indeed this response could be visualized only after a boost with the recombinant protein and only a few individuals responded. In comparison, a single administration of recombinant *Bordetella pertussis* expressing Sm28GST antigen led to massive production of specific IgA in BALF²³. The limits of our approach probably rely on the small amount of expressed antigen and on the cell type in contact with expressed antigen. Transfection efficiency could be improved for local delivery either using aerosol delivery¹⁵ or gene gun which has recently been applied to mucosal surface⁸. Although precise mechanisms concerning initiation of immune responses following antigen *in situ* expression are still not completely elucidated, the type of cell being transfected appears to be determinant. After intradermal delivery transfected dendritic cells rapidly leave the skin and initiate immune response

in the draining lymph nodes^{24, 25}. Thus it is possible that in our model, expression at the lung level was very limited in dendritic cell types which could explain poor primary antibody responses. We can hypothesize that expression occurred mostly in non-professional antigen presenting cells resulting in poor primary response but in stimulation of a memory response. Many approaches are possible for improving efficacy of DNA-based vaccination. One of them would be to target plasmid delivery to immunocompetent cells like dendritic cells. The complexation of plasmids to liposomes could allow to place specific ligands on the outside of the liposomes. Alternatively, the capacity of cells to present the antigen could be enhanced by codelivering plasmids coding for cytokines or costimulatory molecules²⁶. In addition, it has been described that plasmid DNA from bacterial origin bears unmethylated CpG sequences which exhibit a large range of immunostimulatory activities^{27, 28}. Thus the addition of these sequences in the backbone of plasmids would stimulate specific immune responses generated.

This study pointed out the importance of studying antigen expression following plasmid DNA delivery aimed at inducing immune responses. It highlighted the possibility to stimulate mucosal immune response at the respiratory tract level using either intranasal or intravenous plasmid delivery. In the particular context of *S. mansoni* infection, this study demonstrated that specific antibodies can be elicited towards the protective antigen Sm28GST antigen both locally and systemically. In addition transfection of liver cells following intravenous delivery constitutes a promising approach for immunotherapeutic intervention against the liver-specific development of schistosomiasis pathology.

ACKNOWLEDGMENTS

Loïc Dupré holds a fellowship from the Institut Pasteur de Lille. This work received financial support from European Economic Community contracts IC18CT95-0013 and BIO4CT96-0374. This study was also supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

REFERENCES

- 1 J. B. Ulmer, J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, L. A. Hawe, K. R. Leander, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, and M. A. Liu. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.*, 1993, **259**, 1745-1749.
- 2 K. Huygen, J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. DeWitt, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Sousa, A. Drowart, E. Lozes, P. Vandenbussche, J.-P. V. Vooren, M. A. Liu, and J. B. Ulmer. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine*, 1996, **2**, 893-898.
- 3 D. Xu and F. Y. Liew. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology.*, 1995, **84**, 173-176.
- 4 W. C. Lai, M. Bennett, S. A. Johnston, M. A. Barry, and S. P. Pakes. Protection against *Mycoplasma pulmonaris* infection by genetic vaccination. *DNA and Cell Biology*, 1995, **14**, 643-651.
- 5 E. F. Fynan, H. L. Robinson, and R. G. Webster. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA and Cell Biology*, 1993, **12**, 785-789.
- 6 N. Bourne, G. N. Milligan, M. R. Schleiss, D. I. Bernstein, and L. R. Stanberry. DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. *Vaccine*, 1996, **14**, 1230-1234.
- 7 N. Kuklin, M. Daheshia, K. Karem, E. Manickan, and B. T. Rouse. Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.*, 1997, **71**, 3138-3145.
- 8 J. B. Livingston, S. Lu, H. Robinson, and D. J. Anderson. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Inf. Immun.*, 1998, **66**, 322-329.
- 9 M. J. Stewart, G. E. Plautz, L. D. Buono, Z. Y. Yang, L. Xu, X. Gao, L. Huang, E. G. Nabel, and G. J. Nabel. Gene transfer in vivo with DNA-liposomes complexes : safety and acute toxicity in mice. *Human Gene Therapy*, 1992, **3**, 267-275.
- 10 R. A. Wilson and P. Coulson. *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. *Parasitol.*, 1986, **92**, 83-100.

- 7 N. Kuklin, M. Daheshia, K. Karem, E. Manickan, and B. T. Rouse. Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.*, 1997, **71**, 3138-3145.
- 8 J. B. Livingston, S. Lu, H. Robinson, and D. J. Anderson. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Inf. Immun.*, 1998, **66**, 322-329.
- 9 M. J. Stewart, G. E. Plautz, L. D. Buono, Z. Y. Yang, L. Xu, X. Gao, L. Huang, E. G. Nabel, and G. J. Nabel. Gene transfer in vivo with DNA-liposomes complexes : safety and acute toxicity in mice. *Human Gene Therapy*, 1992, **3**, 267-275.
- 10 R. A. Wilson and P. Coulson. *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. *Parasitol.*, 1986, **92**, 83-100.
- 11 J. M. Grzych, D. Grezel, C. B. Xu, J. L. Neyrinck, M. Capron, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and A. Capron. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, 1993, **150**, 527-635.
- 12 L. Dupré, O. Poulain-Godefroy, E. Ban, N. Ivanoff, M. Mekranfar, A.-M. Schacht, A. Capron, and G. Riveau. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.*, 1997, **19**, 503-513.
- 13 H. Y. Wu and M. W. Russel. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol. Res.*, 1997, **16**, 187-201.
- 14 I. van der Ven and T. Sminia. The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Reg. Immunol.*, 1993, **5**, 69-75.
- 15 R. Stribling, E. Brunette, D. Liggitt, K. Gaensler, and R. Debs. Aerosol gene delivery *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 11277-11281.
- 16 T. Hazinski, P. Ladd, and C. DeMatteo. Localization and induced expression of fusion genes in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991, **4**, 206-209.
- 17 M. Tsan, J. White, and B. Shepard. Lung-specific direct in vivo gene transfer with recombinant plasmid DNA. *Am J Physiol*, 1995, **268**, L1052-L1056.
- 18 K. L. Brigham, B. Meyrick, B. Christman, M. Magnuson, G. King, and L. C. Berry. In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokariotic gene using a liposome vehicle. *The American Journal of the Medical Science*, 1989, **198**, 178-281.
- 19 N. Zhu, D. Liggitt, Y. Liu, and R. Debs. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science.*, 1993, **261**, 209-211.
- 20 A. E. Canonico, J. D. Plitman, J. T. Conary, B. O. Meyrick, and K. L. Brigham. No lung toxicity after repeated aerosol or intravenous delivery of plasmid-cationic liposomes complexes. *Journal of Applied Physiology*, 1994, **77**, 415-419.
- 21 Y. Liu, D. Liggitt, G. Tu, W. Zhong, K. Gaensler, and R. Debs. Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery in mice. *J. Biol. Chem.*, 1995, **27**, 24964-24870.
- 22 Y. Liu, L. C. Mounkes, H. D. Liggitt, C. S. Brown, I. Solodin, T. D. Heath, and R. J. Debs. Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nature Biotech.*, 1997, **15**, 167-173.

- 23 G. Renauld-Mongenie, N. Mielcarek, J. Cornette, A. M. Schacht, A. Capron, G. Riveau, and C. Locht. 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.
- 24 C. Condon, S. C. Watkins, C. M. Celluzi, K. Thompson, and J. L. D. Falo. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Medicine*, 1996, **2**, 1122-1128.
- 25 D. M. Klinman, J. M. Sechler, J. Conover, M. GU, and A. S. Rosenberg. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.*, 1998, **160**, 2388-2392.
- 26 E. Manickan, M. Daheshia, N. Kuklin, S. Chun, and B. T. Rouse. Modulation of virus-induced delayed-type hypersensitivity by plasmid DNA encoding the cytokine interleukin-10. *Immunology*, 1998, **94**, 129-134.
- 27 J. N. Kline, T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, and A. M. Krieg. Cutting edge: modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.*, 1998, **160**, 2555-2559.
- 28 D. A. Schwartz, T. J. Quinn, P. S. Thorne, S. Sayeed, A. K. Yi, and A. M. Krieg. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.*, 1997, **100**, 68-73.

Table 1. Tissue localization of Sm28GST 3 days after administration of naked pNip28 or pNip28 complexed to Lipofectin

Route of inoculation ^a	Plasmid dose μg	Lipo- fectin	Organs staining positive for Sm28GST	Type of tissues	Frequency of staining in tissues
i.n./i.t.	1x10	+/- ^b	upper respiratory tract	nasal / tracheal epithelium	+^c
			lungs	bronchioles	++
i.v.	1x10	-	none		-
	1x10	+	liver	endothelium hepatocytes	++
			lungs	alveolar walls bronchioles	++
			spleen	endothelium	+

^a i.v., intravenous ; i.n., intranasal ; i.t., intratracheal

^b similar results observed with or without Lipofectin

^c -, absence of staining ; +, 1 to 5 positive cells per observation field (x50 magnification) ; ++, > 5 positive cells per observation field.

Table 2. Systemic and mucosal antibody responses in mice immunized with naked pNIp28 or pNIp28 complexed to Lipofectin

Route of inoculation ^a	Plasmid	Dose μ g	Lipo-fectin	Day	Serum		BALF	
					mean IgG titer ^b	No resp./no tested ^c	mean IgA titer ^b	No resp./no tested ^c
i. n.	pNIp28	3x10	-	0	6	0/9	n.d. ^d	n.d.
				56	16	0/9	0.01	0/9
				72	23	1/9	0.18	1/9
	pNIp28	3x10	+	0	7	0/9	n.d.	n.d.
				56	57	2/9	0.04	0/9
				72	57	4/9	0.40	2/9
pRcCMV	3x10	+	0	15	0/9	n.d.	n.d.	
			56	3	0/9	0.05	0/9	
			72	0	0/9	0.03	0/9	
i. v.	pNIp28	3x10	+	0	8	0/10	n.d.	n.d.
				56	34	2/10	0.06	0/10
				72	47	3/10	0.55	3/10
	pRcCMV	3x10	+	0	15	0/7	n.d.	n.d.
				65	3	0/7	n.d.	n.d.
				79	0	0/7	n.d.	n.d.

^a i. v., intravenous ; i. n., intranasal

^b results are expressed as geometrical means of individual titers

^c responder animals : exhibit titers higher than 50 for serum and higher than 0.5 for BALF

^d not determined.

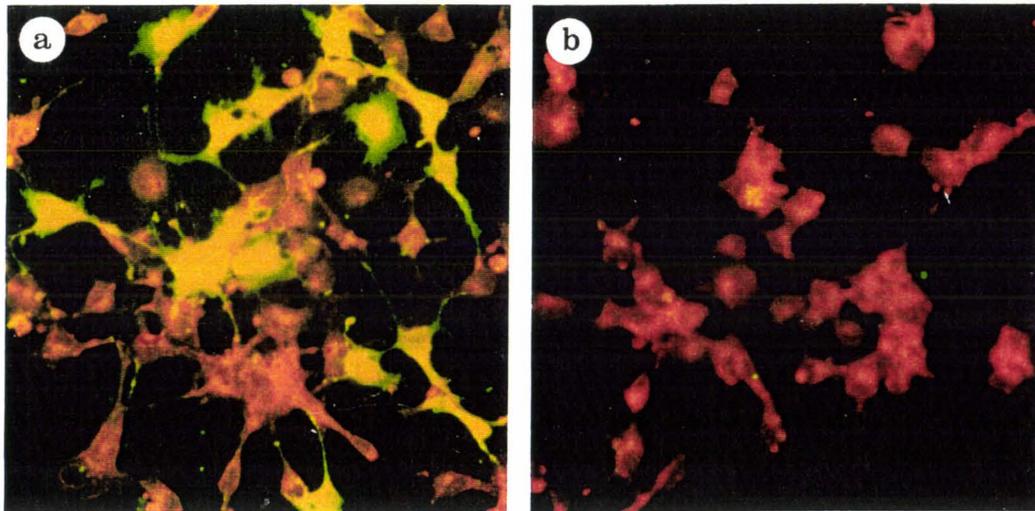


Fig. 1 : *In vitro* expression of Sm28GST.

Immunofluorescence detection of Sm28GST antigen in COS-1 cells. **a** pNip28-transfected cells, **b** pRc/CMV-transfected cells. Blue Evans countercoloration allows visualization of untransfected cells which appear in red.

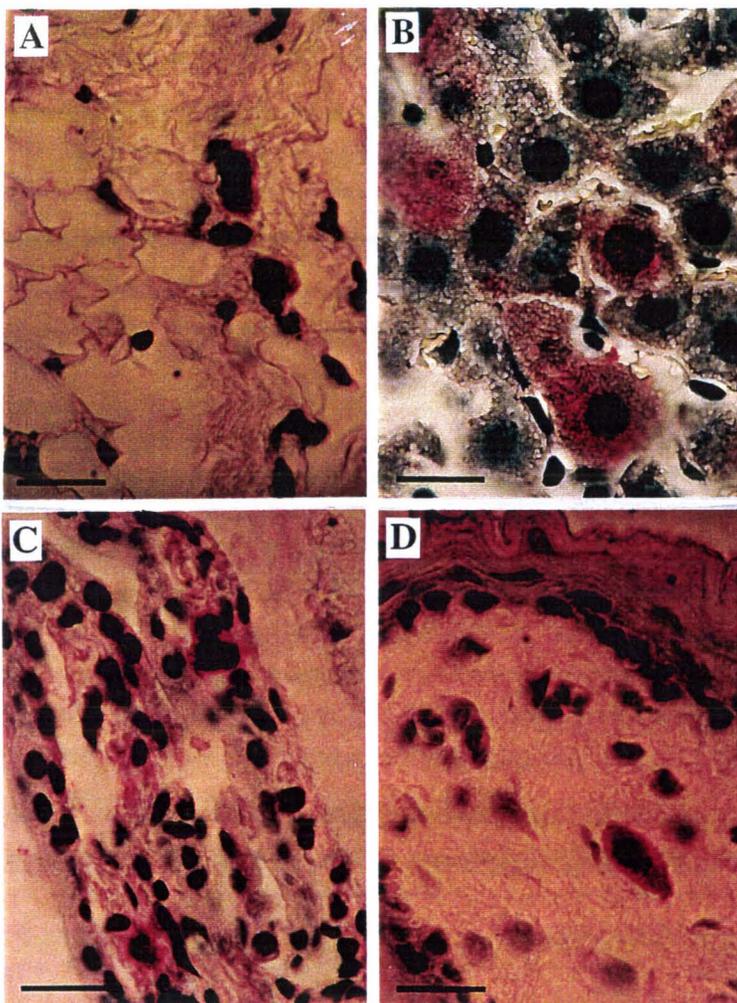


Fig. 2 : Immunohistocalization of Sm28GST following administration of pNip28 by different routes.

Localization of *in situ* expressed Sm28GST after i.v. administration of pNip28 (**A**, lungs and **B**, liver) or after i.n. administration of pNip28 (**C**, lungs **D**, trachea). Bar = 10 μ m for B and D, bar = 20 μ m for A and C.

3. Mécanismes d'induction de la réponse immune au niveau de la peau

3.1. RESUME

Notre choix de ciblage s'est finalement porté plus particulièrement sur la peau, puisque ce tissu allie efficacité de l'immunisation par ADN nu et site de pénétration des parasites. Les deux questions principales auxquelles nous avons voulu répondre sont:

- la vaccination ADN par la peau permet elle la mise en place d'une réponse à composante locale (mécanismes)?
- Le cas échéant, ce type de réponse peut il avoir une incidence sur l'infection par *S. mansoni*?

L'efficacité de la vaccination ADN est remarquable puisque l'on obtient les mêmes niveaux de réponse pour des quantités d'antigène infimes en comparaison d'une vaccination protéique classique. Nos résultats montrent que l'efficacité de l'initiation de la réponse immune repose sur une interaction particulière entre l'ADN et les cellules dendritiques. En effet, des cellules dendritiques sont directement transfectées *in vivo* et leur migration de la peau vers les ganglions est largement induite par les séquences immunostimulatrices CpG présentes sur les plasmides. Cette maturation est induite par une régulation de molécules de surface induites dans l'adhésion : E-cadherin, α -6 integrin et ICAM-1.

Le cheminement de la peau vers les ganglions drainants assure une initiation strictement locale de la réponse immune spécifique. Nous montrons que cette composante locale est rappelée lors de la pénétration percutanée des parasites. A la vue de nos premiers résultats, la peau ne semble pas être un site d'élimination majeur des parasites. Cependant, le tissu cutané semble jouer un rôle de système d'alerte lors de l'infection, agissant en relais avec les poumons.

3.2. INDUCTION DE LA MIGRATION DES CELLULES DENDRITIQUES DE LA PEAU PAR LES SEQUENCES CPG

CpG MOTIFS INDUCE DENDRITIC CELL MIGRATION

**Elisabeth Ban, Loïc Dupré, Emmanuel Hermann, Catherine Vendeville,
Brigitte Quatannens[§], Paola Ricciardi-Castagnoli^{*}, André Capron and
Gilles Riveau.**

From the INSERM unité 167, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France.

[§] From UMER 319, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France.

^{} From CNR Centre of Cellular Pharmacology Milan 20129, Italy.*

SUMMARY

Cytosine-guanosine (CpG) sequences present in bacterial DNA were recently shown to possess immunostimulatory properties. Their presence within plasmids used as DNA vaccines may contribute to the onset of the immune response. Since Langerhans (LC) were identified as key cells in intradermal DNA vaccine induced immune response, we investigated the ability of CpG sequences to directly act on skin LC migration. Inoculation of 10 μ g of CpG containing oligonucleotides (CpG-oligo) in the epidermis induced a local depletion of LCs as shown in whole mounted epidermal sheets after LC staining with antibodies to CD11c and Ia. In contrast, injection of an oligonucleotide containing the inverted sequence GpC had no effect on LC tissue density. The results of *ex vivo* experiments showed that LC depletion is due to CD11c+ dendritic cells (DC) migrating out of the cultured epidermal sheets. To further assess the direct effect of CpG-oligo on the maturation processes involved in DC migration we used an immortalized cell line (FSDC) previously shown to have the characteristics of early DC precursors. CpG-oligo (1 mM) stimulation during 8h initiated FSDC phenotypic maturation characterized by a reduction of the E-Cadherin and α 6-Integrin (CD49f) expression and an increase of ICAM-1 expression. In addition, morphological changes were observed after histochemical staining of F-actin that included cell depolarization, appearance of filopods, and loss of adherence. These results identify an important role for CpG sequences in initiating the maturation and migration of DC during plasmid DNA immunization.

INTRODUCTION

Bacterial DNA possesses immunostimulatory properties that are not shared with eukaryotic DNA. This was recently shown to be due to the presence of unmethylated CpG motifs [1, 2] that are expressed in high frequency in non-vertebrate DNA and are rare in vertebrate DNA [3-5]. Selected synthetic oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs (CpG-oligo) were shown to induce the synthesis and the release of variety of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF α and IL-12 both *in vitro* and *in vivo* [6-10]. The cells

responding to CpG-oligo were shown to be professional antigen presenting cells such as the monocytes, the B-cells and the dendritic cells [7, 8, 11-14].

The presence of CpG motifs in plasmid bacterial DNA may significantly contribute to the immune response generated by DNA vaccination [15]. In addition, the CpG-oligo were shown to potentate the immune response to a co-injected protein antigen [16-20] and thereby act as an adjuvant. Despite the progress in our understanding of the mechanisms involved in priming the DNA vaccine-mediated acquired immune response [18, 21-23], the cells involved in this innate component of the immune response have yet to be characterized. We therefore analyzed the effect of CpG motifs on the key antigen-presenting cells of the skin, the Langerhans cells (LC). More specifically, the present report focus on the effect of CpG motifs on LC migration from the skin because it is the most early event of LC activation [24]. Our study reveals that CpG-oligo induce the rapid migration of LC from the epidermis and regulate the adhesion molecules involved in this process.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Six-8 wk-old BALB/c mice were purchased from Iffa Credo (L'Arbresle, France) and kept in specific pathogen free units.

Antibodies and reagents. All antibodies used for immunostaining and FACS analysis were biotinylated and purchased from Pharmingen (San Diego, Ca, USA) except for the antibody for E-Cadherin (Tebu, Le Perray en Yvelines, France) that was not biotinylated and was detected by a FITC labelled rabbit anti-goat IgG antibody (Southern, Biotech, Birmingham, AL, USA). FITC-Labelled Phalloïne was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and FITC-Streptavidin was from Zymed (Sna-Francisco, Ca, USA). Phosphothioate oligonucleotides: (TGCTAGTTCCATAACCGTTCTGATGCTTAC and TGCTAGTTCCATAAGCTTTCTGATGCTTAC were from Genset (Paris, France).

Histochemical staining of Langhehans cells in epidermal sheets. Mice were anaesthetized with pentobarbital and inoculated with oligonucleotides (10 µg) using lancets for prick test (Bayer, Leverkusen, Germany). After 2 hours, ears were cut and separated into dorsal and ventral leaflets with forceps. Dorsal leaflets were fixed to slides with dermatome tape (3M, St. Paul, Mn, USA) and incubated with 3,8% ammonium thiocyanate for 20 min at 37 °C. Dermis was removed with forceps and the slides were washed with PBS and fixed in ice-cold acetone for 10 min. Staining was performed overnight at 4°C with anti-Ia^{b+b} or anti-CD11c (1/50) in PBS/0,5 % ovalbumin after saturation with 5% normal goat serum for 30min. Slides were mounted with Immuno fluore mounting medium (ICN, Orsay, France) and observed immediately.

Skin Explant Assay. Epidermal sheets were prepared from naive mice, and dorsal ear halves were put into six well plates and inoculated with oligonucleotides. After 30 min the culture wells were carefully filled with 2 ml of ISCOVE medium containing 10% of bovine serum and explants were cultured for 4h while floating on the medium. Cells migrating in the medium were recovered, counted and analyzed by FACS analysis for CD11c.

Flow Cytometric Analysis. Epidermal LC and FSDC were analyzed for the expression of various cell surface molecules by dual color immunofluorescent staining with antibodies for CD11c, ICAM-1, E-Cadherin and α6 integrin (clone GoH3) and propidium iodide. Both adherent and suspended FSDC were harvested and analyzed after adherent cells have been detached with 3 mM EDTA (10 min at 20 °C). Staining was performed for 30 min on ice with 1 or 2 µg of the various antibodies for $5 \cdot 10^6$ cells in PBS containing 10 % heat inactivated rat serum. Cells were washed with 3ml PBS and incubated with streptavidin-FITC (1/1000) for 20 min on ice. When GoH3 was used as first step reagent, binding was detected by FITC-labelled rabbit antibody anti-goat Ig (1µg for $5 \cdot 10^6$ cells). Cells were washed and resuspended in PBS containing 10% serum and 10 µg/ml propidium iodide. Flow cytometry was performed with a FACScalibur (Becton Dickinson). Cells were gated for size and scatter to exclude debris and dead cells were excluded by gating on FL3-H negative cells.

Phalloidin-FITC staining. FSDC were seeded on glass coverslip and cultured overnight to 50% confluency. Cells were treated with the oligonucleotides for 2-8h and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde on ice. Fixed cells were washed three times with PBS containing 10mM glycine, 0,1 mM MgCl₂ and 0,1 mM CaCl₂, and permeabilized for 30 min with 0,5% saponin in PBS 0.2% BSA. Cells were stained with FITC-labeled Phalloidin (10 µg/ml) in PBS for 30 min, washed three times for 10 min in PBS and mounted with Immuno fluore mounting medium for observation.

RESULTS

CpG Oligonucleotides induce LC migration out of the skin. The effect of CpG motifs on LC migration was studied *in vivo* after intradermal inoculation of CpG-oligo in the mouse ear. Epidermal sheets were prepared after inoculation of 10mg of a CpG containing oligo (CpG-oligo) or an inverted GpC control oligonucleotide (GpC-oligo) and the number of LC still present in the epidermal sheets was determined after immunostaining of whole mounted tissues with an antibody against Ia molecules. In control tissue the Ia⁺ cells were organized in a regular network (Fig 1A) of interdigitated cells typical of Langerhans cells (Fig 1B). One hour after a single injection of CpG-oligo, the number of Ia⁺ cells in the epidermal tissue was profoundly reduced (Fig 1C) when compared to control tissues inoculated with PBS (Fig 1A) or untreated skin from the other ear (data not shown). No depletion was observed in tissues from mice receiving the inverted control GpC-oligo (Fig 1D) confirming that the response was strictly sequence-specific. Quantification of Ia⁺ cells still present in different microscopic fields showed that CpG-oligo treatment was as potent as TNF α in inducing Ia⁺ cell depletion in the epidermis layer (Table I). Similar results were observed when cells were stained for CD11c expression (data not shown). The depletion of Ia⁺ cell is not likely to be due to cytotoxic effect of CpG on LC since CpG action was extremely rapid and no significant change was observed in the number of apoptotic cells detected *in situ* 1h after CpG injection. This was demonstrated by TUNEL staining of epidermal sheet preparations. No apoptotic cells were detected in epidermal sheets (Fig 2A) except for the hair bundle dermal cells (Fig 2B) that are known to continuously undergo spontaneous apoptosis [25]. Topical

LC depletion was due to LC migrating out of the skin as shown in *ex vivo* experiments. To do this, ear skin sheets were prepared from mouse ear and inoculated *in vitro* with 10mg of CpG-oligo. The sheets were then incubated while floating on the cultured media, and the cells migrating into the culture dish were recovered for FACS analysis. In this model the number of LC recovered by mere sedimentation from untreated epidermal sheets steadily increased between 3 to 12h and reached a plateau between 12 to 18h [26]. In accordance, the differential migration of LC between saline versus oligonucleotide-treated tissues was assessed at the 6 hour time-point. Cells migrating from the skin *in vitro* were counted and stained with an antibody to CD11c and analyzed by FACS. The results of these experiments showed that the percentage of CD11c+ cells migrating from the tissue was markedly increased after CpG-oligo treatment (Fig 3A) and not after GpC-oligo treatment (Fig 3B). The total number of CD11c⁺ cells migrating out of the skin was $3,8 \pm 0,35$ time fold higher in CpG-treated cultures than in control cultures. Altogether these observations are consistent with the hypothesis that CpG motifs promote the migration of DC from skin epidermis.

CpG oligonucleotides induces DC migratory phenotype in vitro. Dendritic cell migration requires a coordinated series of events that include a sequential rearrangement of both surface adhesion molecules and the actin-based cytoskeleton. Because of experimental limitations in obtaining migratory DC cells, CpG effects on these molecular changes was assessed *in vitro* on immortalized immature DC cultures [27]. First, DC morphology and cytoskeleton modification was assessed in CpG treated cultures after F-actin histological staining with FITC-phalloidin. Most of the cells in unstimulated cultures were polarized with one or two pseudopod-like membrane expansions and displayed discrete actin aggregates (Fig 4A). When cells were treated with 1 mM of CpG for 2h, they underwent profound change in shape characterized by loss of polarized organization, development of numerous filipod-like dendrites and subcortical actin aggregates (Fig 4B). In contrast, cells treated with the inverted GpC-oligo did not undergo morphological changes (Fig 4C). CpG-oligo stimulated DC lost adherence upon 6-8h of treatment leaving filopods on the coverslips (Fig 4D) whereas unstimulated cultures required incubation with EDTA to induce their detachment. Altogether these observations suggest that CpG motifs induce the early cytoskeleton rearrangements involved in the acquisition of migratory properties. Concomitant to morphological changes, dramatic

changes in surface molecules phenotype occur during the initiation of LC migration out of the epidermis . LC dissociate from keratinocytes, cross the underlying basement membrane into the dermis and enter the afferent lymphatics. Each of these steps is regulated by various adhesions molecules that include, E-cadherin [28] $\alpha 6$ integrin (VLA-6 CD49f) [29] and ICAM-1 (CD54) [30]. Unstimulated cells expressed an intermediate level of CD49f and E-cadherin and a high level of CD54 (Fig 5). Cells stimulated for 8h with 1 mM of CpG-oligo expressed low level of CD49f and E-Cadherin and an increased level of CD54 (Fig 5 and Table II). Enhancement of cell surface expression of ICAM-1 was first visible at 3h of treatment with CpG-oligo was optimum at 8h and declined after 18h. Dose-response studies revealed that half-maximal regulation of ICAM-1 was obtained with 0,3 mM of oligo-CpG with the maximal response occurring at 1 mM. These results suggest that CpG motifs act directly on DC to regulate the requisite adhesion molecules involved in DC migration.

DISCUSSION

The function of DC is intimately connected to their capacity to migrate. In the skin, LC are induced to migrate to the draining lymph node after topical application of an allergens, inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1, or bacterial product such as LPS. LC migration is a crucial event of the initiation of cutaneous immune response and prevention of LC migration was shown to alter the immune response to allergens [31]. In the present study we have shown that oligonucleotides containing the CpG motifs are able to directly act on skin DC to promote their emigration from the epidermis. This report provides direct *in situ* evidences that CpG motif adjuvancy may be mediated by the potent ability of these sequences to mobilize the LC.

We assume that *in situ* LC depletion observed after CpG-oligo inoculation was reflecting LC migration out of the epidermis layer. But, it must be considered that the disappearance of Ia staining in the skin after CpG inoculation could be the result of cell migration, loss of Ia expression or cytotoxicity. For several reasons we think that loss of Ia⁺ cells is not likely to result from the putative cytotoxic effect of CpG-oligo nor the regulation of Ia

expression. First, the disappearance of Ia⁺ cells was extremely rapid and no apoptotic cells were detected *in situ* at the site of injection. Second, the effects observed were not attributable to the trauma resulting from CpG-oligo as treatment with the inverted control GpC-oligo failed to cause similar changes. Third, MHC class II molecules are not down-regulated but rather up-regulated by CpG-oligo *in vitro* [32]. In addition, similar results were observed when tissues were stained with an anti-CD11c antibody and CD11c level is not regulated by CpG-oligo treatment *in vitro* (our unpublished observations). Despite all these points, it is difficult to demonstrate migration of DC directly in this model. Therefore, we confirmed that CpG-oligo induced a pool of emigrating CD11c⁺ cells from the epidermis in skin organ cultures. The combined results of these two approaches demonstrate that CpG motifs induce LC migration.

Our results show that LC is a cell target of CpG activity in the skin. The results of our *in vitro* experiments on the FSDC line showed that CpG directly trigger maturational changes of these cells. The changes observed *in vitro* after CpG treatment well explain the change in migratory behavior that follow DC activation. Indeed, CpG-oligo induced the early mature phenotype characterized by an increase of ICAM-1 level and a decrease in E-cadherin and α6 integrin levels. E-cadherin is regulated upon LC activation when they leave the epidermis and loosen their adhesive contact with surrounding keratinocytes [33]. The α6 integrins are also involved in regulating the initial stages of LC migration from the epidermis across the underlying basement membrane and were shown to be down-regulated on emigrating LC [29]. On the opposite, ICAM-1 is up-regulated on DC in the lymph node when compared to the LC in the skin suggesting that, during migration from the skin, LC are induced to express increased level of ICAM-1[30]. Therefore, the finding that CpG-oligo up-regulates ICAM-1 suggest that they are inducing DC maturation and are in accordance with previous results showing that CpG oligonucleotides triggered up-regulation of MHC class II, CD40 and CD86 on DC *in vitro* [13] (and our unpublished results).

We considered that CpG-oligo may not act directly on DC, but that, as in other experimental models, its effects are mediated via cytokines [8, 34-36]. TNFα was considered as a mediator involved in oligo-CpG induced regulation of ICAM-1 because (i) CpG motifs were shown to be a strong inducer of TNFα synthesis[7, 8] and (ii)

TNF α is a major activator of LC *in vitro* [37] and induces DC migration to draining lymph nodes *in vivo* [38] and (iii) TNF α is known to up-regulate ICAM-1 [39] and down-regulate E-Cadherin [40]. The result of *in vitro* experiments showed that blocking antibodies against TNF α , which were effective in blocking TNF α mediated L929 cell death, did not block CpG-induced ICAM-1 regulation (our unpublished data). This result suggest that CpG effect on DC is not TNF α mediated. Experiences are on their way to define whether CpG-oligo activity on DC is mediated by autocrine cytokine synthesis such as IL-1 α or IL-12. However, given the pleiotropic and apparently degenerate nature of cytokine activity, it may prove very difficult to define the individual cytokines that mediate DC activation by CpG-oligo.

Our study confirm the central role play by DC in initiating an immune response during DNA immunization. CpG motifs contained in the plasmid backbone would be to act as an internal adjuvant by inducing DC migration to the lymph node. An important issue in DNA vaccine is whether the transfected immunogen is expressed at the site of immunization and captured by local DC or if the plasmid directly transfects DC. In the first model, depletion of LC by the CpG-motifs would negatively influence the immune response since the LC density determines that outcome of an immune response toward an antigen introduced via the skin [41, 42]. Experimental data showed that this is not the case since increasing the number of CpG motifs in the plasmid backbone from 4 to 6 motifs significantly improved to amplitude of the immune response generated to the transfected antigen [15]. Therefore, the immune response generated by DNA vaccine is likely to be at least partially mediated by direct transfection of the DC. This model is supported by data showing that DC present in the draining lymph node are carrying the plasmid and express the transfected antigen DNA [21, 22] (and Dupré et al., in preparation). In addition, grafting experiments showed that the immune response generated by DNA immunization is primed by cells that migrate rapidly from the site of immunization [43]. These data together with our results showing a direct effect of CpG motifs on skin DC suggest that DC are a key cells in mediating both the acquired and the innate immune response generated by plasmid DNA immunization

One of the most important goals of DC research is the development of DC-based strategies for enhancing immune responses against tumors and infectious agents [44]. Our findings suggest that CpG-oligo interact with LC at the site of injection and promote their rapid migration to secondary lymphoid organs. This contributes to the pool of data showing that CpG-oligo constitute a new class of adjuvant with the highly interesting characteristics for human use [16]. Indeed, they may serve as powerful adjuvants in cellular and humoral response to both protein and peptide antigen. They elicit rapid, potent, and long-lasting immune responses with a Th1-like profile which is beneficial against most pathogens. In addition they are inexpensive, stable and by nature potentially safe. However, the lack of understanding of the immunological mechanism of adjuvant generally limits their application for human use. Therefore, this report provides a insights of how CpG motifs may enhance a specific immune response which are relevant for use in humans not only in the development of DNA vaccines but also in the development of novel adjuvants.

REFERENCES

1. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment INF-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* **1992**; 148: 4072-4076.
2. Sonehara K, Saito H, Kuramoto E, Yamamoto S, Yamamoto T, Tonukaga T. Hexamer palindromic oligonucleotides with 5'-CG-3' motif(s) induce production of Interferon. *J. Interferon and Cytokine Res.* **1996**; 16: 799-803.
3. Bird AP. CpG islands as gene a markers in vertebrate nucleus. *Trends Genet.* **1987**; 3: 342.
4. Doerfler W. Patterns of de novo DNA methylation - evolutionary vestiges of foreingn DNA inactivation as host defense mechanism. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **1991**; 372: 557-564.
5. Burge C, Campbell AM, Karlin S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**; 89: 1358-1362.

6. Yi A-K, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. *J. Immunol.* **1996**; 157: 5394-5402.
7. Stacey KJ, Matthew JS, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* **1996**; 157: 2116-2122.
8. Sparwasser T, Miethke T, Lipfrod G, et al. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature.* **1997**; 386: 336-337.
9. Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, et al. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* **1997**; 27: 3420-25.
10. Segal BM, Klinman DM, Shevach EM. Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependant pathway. *J. Immunol.* **1997**; 158: 5089-5090.
11. Krieg AM, Yi A-K, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* **1995**; 374: 546-549.
12. Sun S, Beard C, Jaenisch R, Jones P, Sprent J. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J. Immunol.* **1997**; 159: 3119-3125.
13. Sparwasser T, Koch ES, Valulas RM, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **1998**; 28: 2045-54.
14. Jakobsen P, Morris Lanes S, Ronn A. Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P.vivax* malaria and association with disease severity. *Immunology.* **1994**; 83: 665-669.
15. Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* **1996**; 273: 352-354.
16. Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvant. *Eur. J. Immunol.* **1997**; 27: 2340-2344.

17. Weiner GJ, Liu H-M, Wooldridge JE, Dahle CE, A.M. K. Immunostimulatory oligonucleotides containing CpG motif are effective as immune adjuvant in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94: 10833-10837.
18. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* **1997**; 158: 3635-3639.
19. Leclerc C, Dériaud E, Rojas M, Whalen RG. The preferential induction of Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunoregulatory effect of plasmid DNA. *Cellular Immunology.* **1997**; 179: 97-106.
20. Hervé M, Dupré L, Schacht A-M, Capron A, Riveau G. Participation of the plasmid backbone in the nature of the antibody response elicited by a DNA vaccine. Submitted. **1998**;
21. Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinmann RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* **1997**; 186: 1481-1486.
22. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barder BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* **1998**; 188: 1075-1082.
23. Condon C, Watkins SC, Celluzi CM, Thompson K, Louis D, Falo J. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Medicine.* **1996**; 2: 1122-1128.
24. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **1998**; 392: 245-392.
25. Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (Catagen). *Am. J. Pathol.* **1997**; 151: 1601-1617.
26. Belkaid Y, Jouin H, Milon G. A method to recover, enumerate and identify lymphomyemoid cells present in an inflammatory dermal site: a study in laboratory mice. *J. Immunol. Meth.* **1996**; 199: 5-25.

27. Girolomoni G, Lutz MB, Pastore S, ABmann CU, Cavani A, Ricciardi-Castagnoli P. Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur. J. Immunol.* **1995**; 25: 2163-2169.
28. Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes is mediated by E-cadherin. *Nature.* **1993**; 361: 82.
29. Price AA, Cumberbatch M, Kimber I. Alpha-6 Integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J. Exp. Med.* **1997**; 186: 1725-1735.
30. Cumberbatch M, Peters SW, Gould SJ, Kimber I. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by lymph node dendritic cells: comparison with epidermal Langerhans cells. *Immunol. Lett.* **1992**; 32: 105-10.
31. Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology.* **1997**; 84: 31-35.
32. Jacob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immuno.* **1998**; 161: 3042-9.
33. Schwarzenberger K, Udey MC. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression *in situ*. *J. Invest. Dermatol.* **1996**; 106: 553.
34. Segal BM, Klinman DM, Shevach EM. Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *J. Immunol.* **1997**; 158: 5087-5090.
35. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* **1996**; 157: 1840-1845.
36. Cowdery JS, Chace JH, Yi A-K, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-g in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **1996**; 156: 4570-4575.
37. Koch F, Heufler C, Kampegen E, Schneidweiss D, Bock P, Schuler G. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans' cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating, without influencing their functional maturation. *J. Exp. Med.* **1990**; 171: 159.

38. Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology*. 1992; 75: 257-263.
39. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 317-328.
40. Jacob T, Udey M. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J. Immunol.* 1998; 160: 4067-4073.
41. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW, Sullivan S. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* 1980; 127: 445.
42. Elmetts CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Woods PJ, Streilein W. Analysis of the mechanisms of unresponsiveness produced by hapten painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 1983; 158: 781.
43. Klinman DM, Sechler JM, Conover J, GU M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.* 1998; 160: 2388-2392.
44. Girolomi G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol. Today*. 1997; 18: 102-104.

Table I: Depletion of Ia⁺ cells from epidermis after inoculation of CpG-oligo in mice ears.

	n ¹	Ia+ cells ²	Range
Control	8	42 ± 15	18 - 75
CpC-oligo	11	18 ± 9	5 - 26
GpC-oligo	9	38 ± 8	27 - 43
TNFα	9	17 ± 5	11 - 28

1: Number of fields observed

2: Mean number of Ia+ cells per field

Table II: Quantitative analysis of CpG-induced regulation of adhesion molecules

	Control*	CpG-oligo*	GpC-oligo*	D**
ICAM-1	21 ± 0,63	41,16 ± 5	21,2 ± 2,1	+ 94 %
E-Cadherin	11 ± 1,1	5,63 ± 1,65	8 ± 0,6	- 23%
CD49f	14 ± 0,8	10,5 ± 1,25	13,72 ± 0,25	- 29 %

*Average of the mean intensity of fluorescence of 6 separate experiments.

** (MIF CpG / MIF GpC) X 100

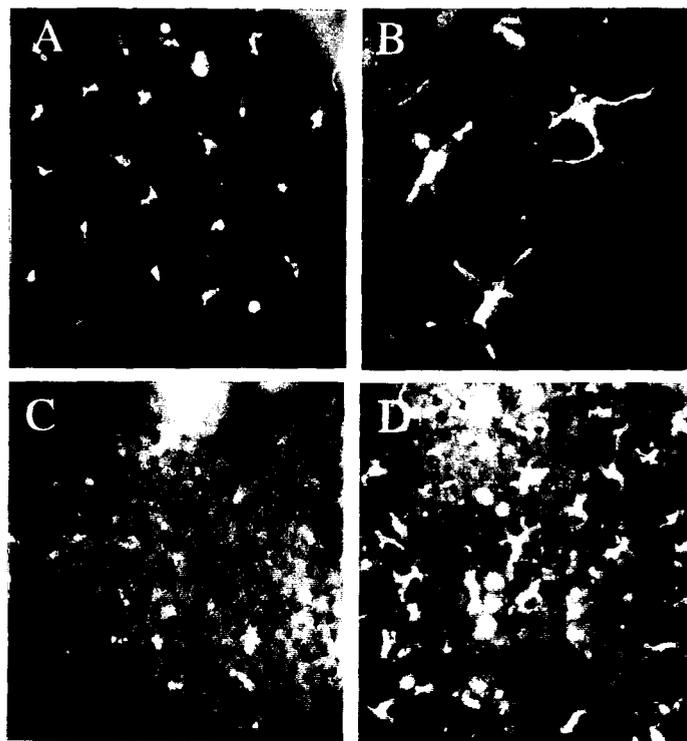


Fig. 1 : *In situ* immunostaining of LC after *in vivo* treatment with CpG-oligo.

Mice ears were inoculated with saline buffer (A, B), 10 μ g CpG-oligonucleotides (C) or control nucleotides with a reverse GpC sequence (D). One hour after inoculation, epidermal sheets were prepared, fixed and LC were stained in whole mounted tissues for Ia expression using indirect FITC-fluorescent staining. Magnification is x 400 for A, C and D and x 1000 for B.

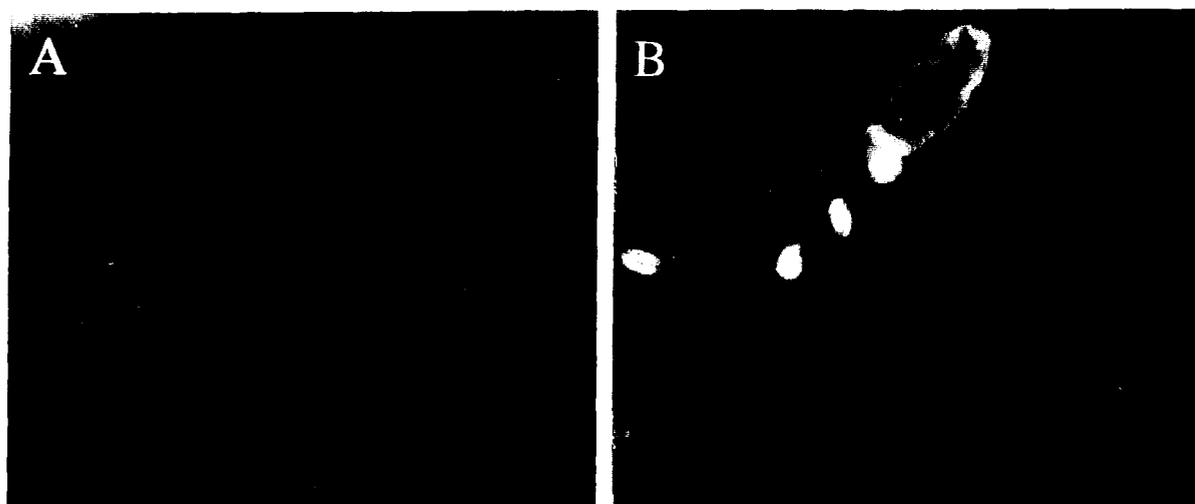


Fig. 2 : Detection of apoptotic cells in CpG-treated epidermal sheets.

Mice ears were inoculated with CpG-oligo (10 μ g), epidermal sheets were prepared one hour after treatment, fixed, and stained with the TUNEL method. No apoptotic cells were detected in epidermal sheets (A), except for the hair bundle dermal cells (B).

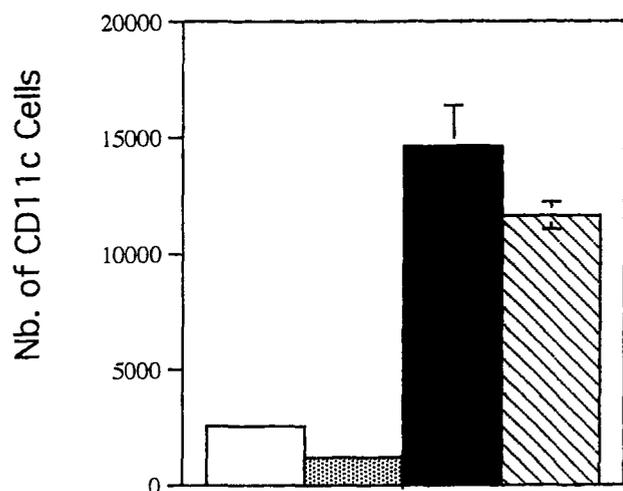


Fig. 3 : Effect of CpG-oligo on the migration of epidermal LC *in vitro*.

Skin epidermal sheets were prepared from the ears of naive mice and inoculated *in vitro* with 10 μ g of CpG-oligo (solid bar) or 100 U of TNF- α (hatched bar) and incubated onto cell culture medium. Controls included explants incubated with LPS-free PBS (open bar) or with the reverse sequence GpC-oligo (dotted bar). Migrating cells were harvested in the medium after 18h of incubation, counted and stained with an antibody against CD11c to determine the percentage of DC by FACS analysis

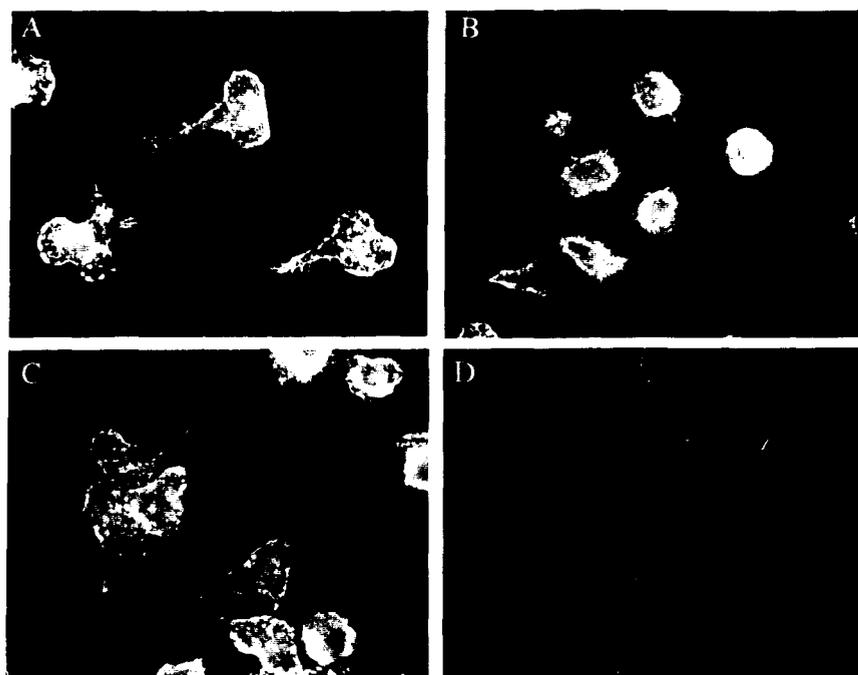


Fig. 4 : Effect of CpG-oligo treatment on the morphology of DC *in vitro*.

FSDC were grown onto coverslips and treated for 2h with 1 mM of the inverted GpC-oligo (A) or the CpC-oligo (B, C). Cells were fixed and cytoskeleton modifications were visualized by phalloidin-FITC staining of F-actin. After 12h of treatment, cells lost adherence leaving only filopods on the coverslips (D).

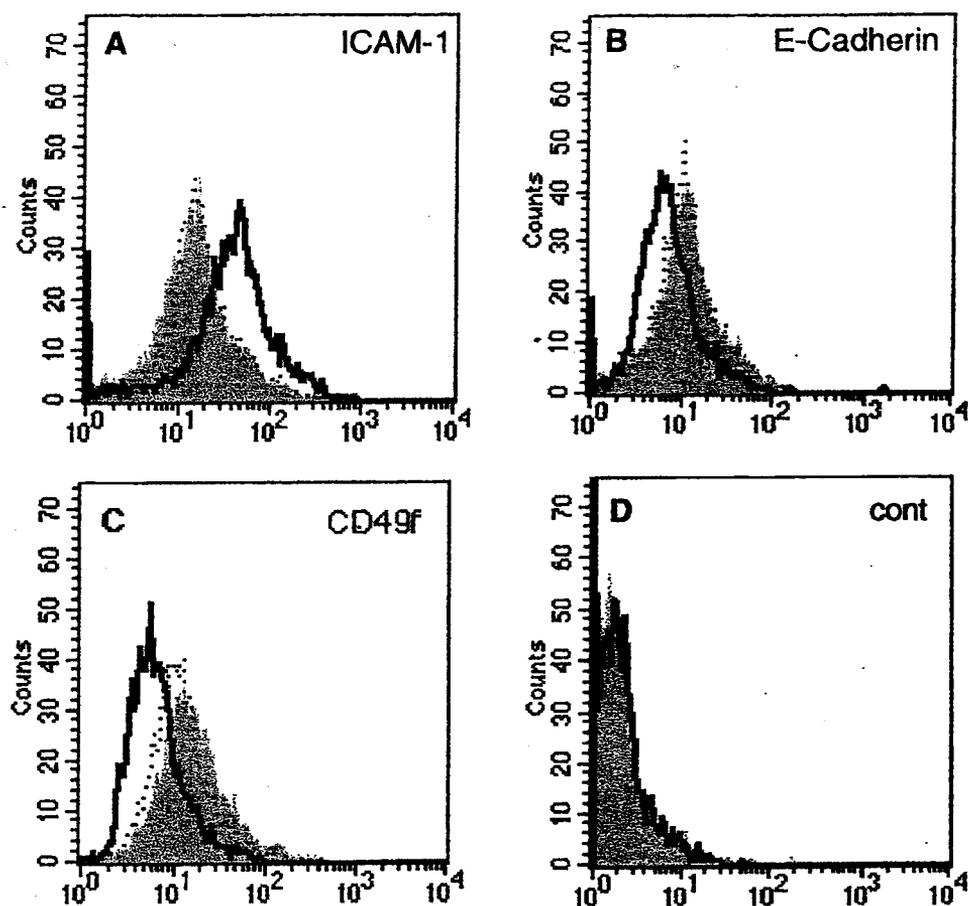


Fig. 5 : Regulation of adhesion molecules after exposure of FSDC to CpG-oligo.

FSDC were incubated with 1 mM of CpG-oligo (solid lines) or with the control GpC-oligo (dotted lines) for 8h. Cells were stained with anti-ICAM-1 antibody (panel A), anti-E-Cadherin antibody (panel B), anti-CD49f antibody (panel C) or an IgG2a isotype matched control antibody (panel D) and compared to untreated cultures (shaded areas) (n=3).

3.3. ROLE CENTRAL DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'INITIATION DE LA REPOSE IMMUNE APRES VACCINATION ADN INTRADERMIQUE

CENTRAL ROLE OF DENDRITIC CELLS FOR THE INITIATION OF IMMUNE RESPONSES AFTER INTRADERMAL DNA VACCINATION

Loïc Dupré, Elisabeth Ban, Florence Rivenet, Odile Poulain-Godefroy, Catherine Vendeville, André Capron and Gilles Riveau*.

Relations Hôtes-Parasites et Stratégies vaccinales, INSERM U 167,

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245,

59019 LILLE CEDEX, FRANCE.

*Corresponding author : Tel. : (33) 03.20.87.77.81

FAX : (33) 03.20.87.78.88

Keywords : DNA, Immunization, Skin, Dendritic cells

Running title : DNA immunization at the skin level.

ABSTRACT

Vaccination that would induce a local immune responses at the skin level in addition to a systemic immunity would be of a strong relevance for controlling pathogens that infect this tissue. The use of antigen-encoding plasmids delivered directly into the skin has proven to be highly efficient for inducing protective immunity. However, the participation of the skin immune system to the immunity induced has not been investigated in details. The aim of this study was to characterize the initiation of immune responses at the skin level following intradermal DNA immunization in mice using plasmid DNA encoding the model antigen *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase (Sm28GST). Expression of Sm28GST was characterized in the skin as early as one day after plasmid injection. Presence of antigen was also detected in the draining lymph nodes after 3 days. In these organs, increased levels of MHC II mRNA were measured at the same time point. Surprisingly ICAM-1 mRNA expression in the same organs was sharply increased after skin injection of both antigen-encoding plasmid and control plasmid. This suggested a non-specific activity of the plasmid backbone. Control plasmids or antigen-encoding plasmids were equally efficient in inducing depletion of dendritic cells from the epidermis. Study of cell populations emigrating from the skin showed that one hour after plasmids injection, number of emigrating dendritic cells was comparable for both plasmid types whereas 24 hours after plasmids injection, emigration of inflammatory cells including neutrophils, eosinophiles, macrophages and T lymphocytes was observed only in the case of the antigen-encoding plasmid. Finally, measurement of cellular lympho-proliferative responses clearly indicated that the specific immune response was initiate in the skin-draining lymph nodes before being spread to the systemic level. Thus, this study clearly shows that the driving force of intradermal DNA immunization relies both on direct transfection of dendritic cells and on a strong activity of the plasmid backbone to induce migration of dendritic cells to the skin-draining lymph nodes, at the level of which the specific immune response is initiated.

INTRODUCTION

Many pathogens, including viruses, bacteria and parasites enter the body via the skin either by active penetration or as a consequence of mechanical injury or vector bite. To face this almost continuous antigenic

challenge, the skin makes use of a highly organized immune system endowed with immunosurvey functions [Bos and Kapsenberg, 1993]. The skin immune system is composed of unique cell populations in the skin itself in connection with lymphoid tissue situated outside the dermal stroma. Keratinocytes nonetheless establish the structural architecture of the epidermis, but also are producers of a wide range of cytokines for the activation of other cell subsets. Langerhans cells are immature dendritic cells covering the whole surface of the epithelium by dendrites expanding inbetween the keratinocytes. T cells present in the skin are divided into memory perivascular T cells and epidermal T cells expressing the $\gamma\delta$ TCR in mice. The induction of specific immune responses mainly results from the capture of antigens by Langerhans cells that emigrate to the skin-draining lymph nodes after passage through the dermis and via the afferent lymphatics, mature into antigen-presenting cells and sensitize naive T cells at this level.

The skin constitutes an attractive site for vaccination because its direct access opens the possibility for non-invasive delivery methods. It is particularly adapted for inducing protective immune responses against pathogens that naturally establish a contact with this tissue during the process of infection. Recently, the development of intradermal DNA vaccination has highlighted the potential of this tissue for inducing strong and protective systemic immune responses [Raz, et al., 1994]. The intradermal route of plasmid delivery either by direct injection or using a gene gun device has proven to be the most efficient route for DNA vaccination. Gene gun DNA vaccination has been shown to result in the direct transfection of skin dendritic cells, which migrate to the draining lymph nodes [Condon, et al., 1996, Casares, et al., 1997]. In addition, primary systemic immune response is probably induced by these migratory cells since removal of the vaccinated skin within a few hours after plasmid injection does not prevent induction of a systemic antibody and cellular responses [Klinman, et al., 1998]. However these studies have not established if DNA vaccination through the skin could induce local immune responses. In addition, the mechanisms responsible for dendritic cell migration has not been explored.

An increasing number of studies have reported the immunostimulatory properties of short oligonucleotides from bacterial origin bearing unmethylated CpG motifs on *in vitro* cultured cell lines [Krieg, et al., 1995, Ballas, et al., 1996, Sparwasser, et al., 1997]. These sequences are present on most plasmid constructions used for DNA vaccination and their activities appear to contribute both to the level and the profile of the immune responses elicited [Sato, et al., 1996, Klinman, et al., 1997, Leclerc, et al., 1997, Chu, et al., 1997]. Recently, a study reported the activity of CpG oligonucleotides on the upregulation of MHC class II, CD40 and CD86 molecules and on the

activation for antigen presentation [Sparwasser, et al., 1998]. For this reason, we thought of assessing the participation of the DNA immunostimulatory activity in the initiation of immune response at the skin level and particularly their properties on dendritic cells *in vivo*.

To address this question, we used a Sm28GST-encoding plasmid in which we already demonstrated the potential of DNA immunization through the skin for inducing systemic immune responses with *in vitro* parasiticide activity [Dupré, et al., 1997]. A strong recall of the specific response was induced by the natural parasite infection through the skin (expresses the antigen at this stage). We thus have some evidence that a skin-stage immunity is induced by the intradermal DNA vaccination and that it alerts the whole immune system as soon as the parasite enters the skin. Such an early recognition of *S. mansoni* parasite intrusion is of major importance for the development of vaccination strategies because it could increase the chances to destroy it before it can reach full-maturity and ability to lay deleterious eggs. Indeed the parasite is a moving and changing target. Necessary to develop immunity with connection between local and systemic immunity.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid preparation. The Sm28GST expression plasmid, pNIp28, has already been described [Dupré, et al., 1997]. Plasmids pNIp28 and control plasmid pRc/CMV (Invitogen, San Diego, CA) were purified from bacterial cultures using Qiagen endotoxin-free preparative system (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) and redissolved in filter-sterilized apyrogenic normal saline at a final concentration of 1 mg/ml. Plasmid preparations were controlled for endotoxin contamination (<0.01 IU/mg DNA) using a *Limulus* Amebocyte Lysate assay (Biowhittaker, Walkersville, MD).

Intradermal DNA immunization. Female Balb/C mice were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) and were 6 weeks of age at the initiation of the experiments. Volumes of 20 μ l (migration) to 50 μ l (immunization, 3 times) were either injected with a 26-gauge needle into the dermis of shaved abdominal skin (for immunizations) or into the ears (for migration).

Detection of Sm28GST in vivo by immunohistochemistry. Skin samples were collected 1 or 3 days after a single administration of 10 to 50 µg plasmid. They were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, Saint Louis, MO) in PBS, dehydrated in ethanol baths and embedded in paraffin. 4 µm-thick sections were deparaffinated in toluene, rehydrated, washed in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 154 mM NaCl) and saturated for 30 minutes in TBS, 0.5% ovalbumin (Sigma), 5% normal goat serum (Sigma). Hyperimmune anti-Sm28GST rabbit serum was incubated overnight at 4°C (1/1000 in TBS, 0.5% ovalbumin). A pre-immune rabbit serum was used as control. After three washes in TBS, slides were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/200, in TBS, 0.5% ovalbumin ; Sigma) for 4 hours and extensively washed in TBS. The alkaline phosphatase reaction was developed for 10 minutes with New Fuchsin substrate (Dako, Carpinteria, CA). Counterstaining was performed with Harris' haematoxylin.

Lympho-proliferative response. Inguinal lymph nodes draining the abdominal site of plasmid injection and spleen were recovered 30 days and 60 days after the beginning of the immunization protocol (4 mice per group and per recovery). Cells were isolated and resuspended in RPMI 1640 (Gibco BRL, Courbevoie, France) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Boehringer Mannheim, Germany). Cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells per well of 96-well culture plates with or without indicated concentrations of recombinant Sm28GST antigen (Transgène S.A., Strasbourg, France). Positive control for T cell proliferation was with 1 mg/ml Concanavalin A (Sigma). After 4-day culture, cells were pulsed with [³H]-thymidine for 14 hours, then harvested onto fiber filter strips and finally radioactivity was measured by liquid scintillation counting (LBK, Wallac, Finland). Results are expressed as stimulation index determined as the ratio between antigen-stimulated cells and non-stimulated cells. Each condition was performed in triplicates.

Labeling of Langerhans cells in epidermal sheets. Ears from plasmid-injected or control mice were separated into dorsal and ventral leaflets with forceps. Dorsal leaflets were fixed to slides with dermatome tape (3M, St Paul, Minn.) and epidermal sheets were prepared by incubation in 3,8% ammonium thiocyanate for 20 min at 37°C and removal of dermis with forceps. Epidermal sheets were washed in PBS and then fixed in ice-cold acetone for 10 min. Saturation was performed in PBS, 0.5% ovalbumin, 5% normal goat serum for 30 minutes. Anti-Ia^{b+d} conjugated to FITC (Pharmingen, San Diego, CA) was incubated overnight at 4°C (1/50 in PBS, 0.5% ovalbumin). After three washes in PBS, slides were mounted with Fluoroprep (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Analysis of cell populations emigrating from the skin. Skin samples of 1 cm² corresponding to the injection sites were recovered aseptically either 30 min or 24 hours after plasmid injection. They were transferred, dermal side down onto RPMI 1640 in 6-well plates with hydrophobic plastic. Skin cells were allowed to emigrate and sediment at the bottom of the plates for 16 hours in a humidified incubator. Cells were recovered from the medium and after washing of the skin sample and the bottom of the wells. An aliquot of the cells was taken for counting under a light microscope and assessment of cell viability with trypan blue (>90%). Another aliquot was used for cytopsin on poly-L-lysine-treated slides and labeling with RAL 555 staining kit (Vasse industries, Templemars, France). Staining for flow cytometry was performed on 96-well round-bottom plates on ice. Incubation with primary antibody was incubated for 30 min and diluted 1/100 in PBS containing 5% FCS. Antibodies used (Pharmingen) were: anti-CD11c (biotinylated), anti-Ia^{b+d} (FITC-conjugated) anti-CD4 (Rat Ig), anti-CD8 (Rat Ig) and anti-MAC-1 (Rat Ig). Cells were washed and centrifuged twice and incubated for 15 min in either PE-conjugated anti-rat Ig or Streptavidin-FITC. A minimum of 5,000 cells were analysed on a BD flow cytometer. Results are expressed as the absolute number of cells positive for the indicated surface molecule. Similar results were reproduced in 3 independent experiments.

RT-PCR. For RNA extraction, skin-draining lymph nodes and spleens were snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using RNazol (Bioprobe, Montreuil, France), according to the manufacturer's recommendations. Equal amounts of RNA (1 µg) were reverse-transcribed with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Gibco BRL). PCR amplification primers were the following: HPRT, MHC class II, CD86, CD40 and ICAM-1 5'-CCC AGG AAC CAT GGC TGC CAT GTC-3' and 5'-AAG GTA CCA CCT AAC TTT GAT GTA AG-3'. Samples of cDNA were amplified for 30 cycles (HPRT) or 35 cycles (others) at an annealing temperature of 55°C using a Perkin Elmer DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Saint-Quentin, France).

RESULTS

Sm28GST is expressed in the skin and present in the skin-draining lymph nodes. To follow the fate of antigen expressed after plasmid injection into the skin, we prepared skin and draining lymph nodes sections on which we performed immunochemistry. Sm28GST was detected in skin cells 24 hours after intradermal injection of pNIp28.

Localization of cells containing Sm28GST antigen was restricted to the injection area and Sm28GST positive cells were only found in the dermal layers (Fig. 1A). No inflammatory reaction could be observed in the skin sections. Inguinal lymph nodes draining the plasmid injection sites were collected 3 days after injection. Distinct foci of a few cells (2 to 5) containing Sm28GST antigen could be identified in lymph nodes from mice receiving Sm28GST-encoding plasmids (Fig. 1C).

Plasmid DNA induces early migration of skin dendritic cells. Skin samples were isolated and epidermal sheets were prepared 30 min after intradermal injection of plasmids in order to assess the potency of plasmids to induce Langerhans cells migration. MHC class II labeling of Langerhans cells on the epidermal sheet from NaCl-injected skin revealed presence of Langerhans cells distributed over the surface of the epidermis (Fig. 2A). In contrast, mice pretreated with either pNip28 (Fig. 2B) or pRc/CMV (Fig. 2C) plasmids showed only few MHC class II labeled cells. In addition, remaining Langerhans cells adopted a morphology with shorter dendrites. Langerhans cell depletion observed after plasmids administration was even more important than after administration of 50 ng TNF- α (Fig2D).

Cellular composition of the cells emigrating from the skin. Emigrating cells were collected by sedimentation from skin biopsies harvested either immediately or 24 hours after plasmid injection. Cellular composition was analysed on a morphological basis (Fig. 3) and by flow cytometry (Fig.4). We found that the total number of emigrating cells just after injection was much higher when either Sm28GST-encoding plasmid (380,000 cells/cm²) or control plasmid (330,000 cells/cm²) had been injected in comparison to saline injection (60,000 cells/cm²). Forty to 50% of emigrating cells were found to be positive for CD11c and we found approximately the same proportion of dendritic cells by microscopic examination (Fig. 3A and 3C). Other cell types included eosinophils, neutrophils and mononuclear phagocytes. When we started the harvest of emigrating cells only 24 hours after plasmid injection, we found a basal level of emigrating cells when skin had been pretreated with either control plasmid (81,000 cells/cm²) or saline (56,000 cells/cm²). The number of emigrating cells was found to be significantly higher when skin was pretreated with Sm28GST-encoding plasmid (345,000 cells/cm²). These cells included neutrophils, mononuclear phagocytes, lymphocytes and a few dendritic cells. FACS analysis shows that 30% of those cells were MAC-1 positive, 19% were CD4 positive and 11% were CD8 positive.

Plasmid DNA activates ICAM-1 mRNA expression. We hypothesized that the presence of antigen in the skin-draining lymph nodes was associated to antigen-presenting cells that had migrated from the skin. Thus we examined at the mRNA level if molecules involved in antigen presentation were upregulated in the case of plasmid administration. RT-PCR analysis shows that mRNA levels for MHC class II were upregulated (approximately two fold) in the lymph nodes 3 days after injection of Sm28GST-encoding plasmids (Fig. 5). Very clearly, ICAM-1 mRNA levels were strongly increased after injection of either plasmids, indicating an antigen-independent activation. In contrast, mRNA levels for CD40 and CD86 were comparable for each experimental condition (data not shown).

Sm28GST-specific cellular response is initiated in the skin-draining lymph nodes. Cellular proliferation upon *in vitro* restimulation with Sm28GST was measured in inguinal nodes and spleen of mice primed *in vivo* by Sm28GST-encoding plasmids or control plasmids. Clearly, when organs were collected 30 days (fig. 6A) after the first of 3 intradermal injections (performed at day 0, 14 and 28), a specific proliferation was detected in the inguinal nodes but not in the spleen. When organs were collected on day 60, a comparable specific proliferative response could be measured (Fig. 6B). These results indicate that Sm28GST-specific cellular response was initiated in the lymph nodes draining the skin plasmid injection site before being generalized to the systemic level.

DISCUSSION

We demonstrated that initiation of immune response in intradermal DNA immunization is due to rapid migration of DC that is induced by the plasmid backbone. These DC are thought to be responsible for the initiation of the specific immune response [Bos and Kapsenberg, 1993], which is in our model restricted to the SLN. Our previous work on intradermal DNA immunization of rats clearly suggested that dendritic cells transfected in the skin rapidly leave this tissue since cells coexpressing the antigen and MHC class II molecules could not be detected when skin samples were harvested 2 weeks after antigen-encoding plasmid injection [Dupré, et al., 1997]. This was confirmed and further characterized by other groups demonstrating presence of transfected, antigen expressing dendritic cells from skin origin in the SLN [Condon, et al., 1996, Casares, et al., 1997, Porgador, et al., 1998]. However it is still not known what are the events that induce DC migration.

Evidence for the implication of CpG oligonucleotides in the maturation of DC *in vitro* has recently been demonstrated [Sparwasser, et al., 1998, Jacob, et al., 1998]. It has been shown that sequences present on plasmid backbones induce the up-regulation of molecules involved in antigen presentation: Ia and B7-2. We have also developed an *in vitro* system with skin-derived DC and were able to confirm these observations. However, the molecular mechanisms we observed concerned a maturation for migration rather than for presentation. Indeed, CpG oligonucleotides induced down modulation of E-cadherin and $\alpha 6$ -integrin and up-regulation of ICAM-1 (submitted for publication).

We demonstrate here that plasmids induce migration of DC independently from the process of antigen expression, thus migration of non-transfected DC also occurs during the early steps after DNA injection. It has been recently suggested that DC that are not carrying the antigen provide help to antigen-loaded DC for antigen presentation to naive T lymphocytes [Knight, et al., 1988]. Indeed, optimal lymphocyte stimulation can only occur when transfer of antigen from antigen-loaded DC to empty DC takes place. Thus, immunization via DNA may be particularly potent at stimulating this kind of cooperation between DC at the level of the lymph nodes.

The rapidity at which DC migrate out of the skin indicates that transfected DC probably start to express antigen only after they have left the skin. Our results clearly show that the migration of these cells is specifically targeted to the draining lymph nodes since the specific cellular immune response is first detected at this level before it can also be detected at the systemic level, in the spleen. Initiation of the specific immune response at the level of the skin immune compartment is important since it could result in the establishment of a specific memory-type response via homing of T cells with memory phenotype to the skin. This issue might be particularly relevant to the development of vaccination approaches against pathogens that infect this tissue or penetrate through it to enter the systemic circulation. In our model of schistosome infection, we are currently exploring the effects of intradermal DNA vaccination on the parasite larvae as they progress through the skin.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Brigitte Quatannens for FACS analysis and Laurent Kremer and Isabelle Wolowczuk for helpful discussions. Loïc Dupré holds a fellowship from the Institut Pasteur de Lille. This work received financial support from European Economic Community contracts IC18CT95-0013 and BIO4CT96-0374. This study was also supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

REFERENCES

1. Bos, J.D. & Kapsenberg, M.L. (1993) The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Tod.* 14: 75-78.
2. Raz, E. *et al.* (1994) Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519-9523.
3. Condon, C. *et al.* (1996) DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells *Nature Medicine* 2: 1122-1128.
4. Casares, S. *et al.* (1997) Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope *J. Exp. Med* 186: 1481-1486.
5. Klinman, D.M. *et al.* (1998) Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.* 160: 2388-2392.
6. Krieg, A.M. *et al.* (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
7. Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L. & Krieg, A.M. (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157: 1840-1845.
8. Sparwasser, T. *et al.* (1997) Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α mediated shock. *Eur. J. Immunol.* 27: 1671-1679.
9. Sato, Y. *et al.* (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273: 352-354.
10. Klinman, D.M., Yamshchikov, G. & Ishigatsubo, Y. (1997) Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 158: 3635-3639.

11. Leclerc, C., Dériaud, E., Rojas, M. & Whalen, R.G. (1997) The preferential induction of a Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunostimulatory effect of the plasmid DNA *Cell. Immunol.* 179: 97-106.
12. Chu, R.S. *et al.* (1997) CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity *J. Exp. Med.* 186: 1623-1631.
13. Sparwasser, T. *et al.* (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 2045-2054.
14. Dupré, L. *et al.* (1997) Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase *Parasite Immunol.* 19: 503-513.
15. Porgador, A. *et al.* (1998) Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188: 1075-1082.
16. Jacob, T. *et al.* (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immuno.* 161: 3042-3049.
17. Knight, S. *et al.* (1988) Transfer of antigen between dendritic cells in the stimulation of primary T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 28: 1636-1644.

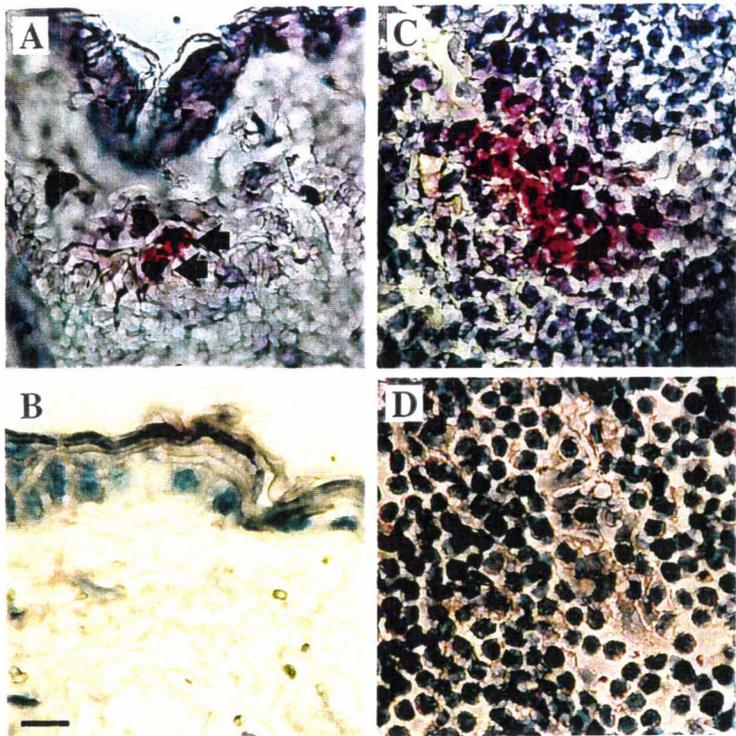


Fig. 1 : Detection of Sm28GST in skin and lymph nodes.

Sm28GST specific immunostaining was performed following intradermal plasmid DNA injection. Skin biopsies were harvested 1 day after injection of 50 µg Sm28GST-encoding plasmid (A) or 50 µg pRc/CMV control plasmid (B). Inguinal draining lymph nodes were harvested 3 days after injection of 50 µg Sm28GST-encoding plasmid (C) or 50 µg control plasmid (D). Bar = 10 µm.

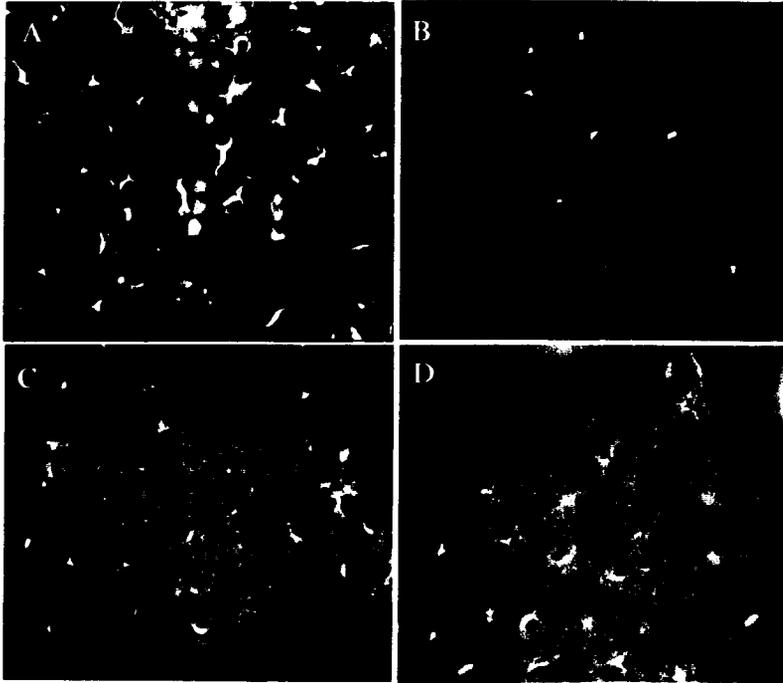


Fig. 2 : Labeling of Langerhans cells epidermal sheets following injection of plasmid DNA.

Epidermal sheets from ear skin were prepared and labeled with FITC-conjugated anti-Ia, 1 h after skin treatment. **A** intradermal injection of 20 μ l saline. **B** intradermal injection of 20 μ g pNIP28. **C** intradermal injection of 20 μ g pRc/CMV. **D** intradermal injection of 50 ng TNF- α .

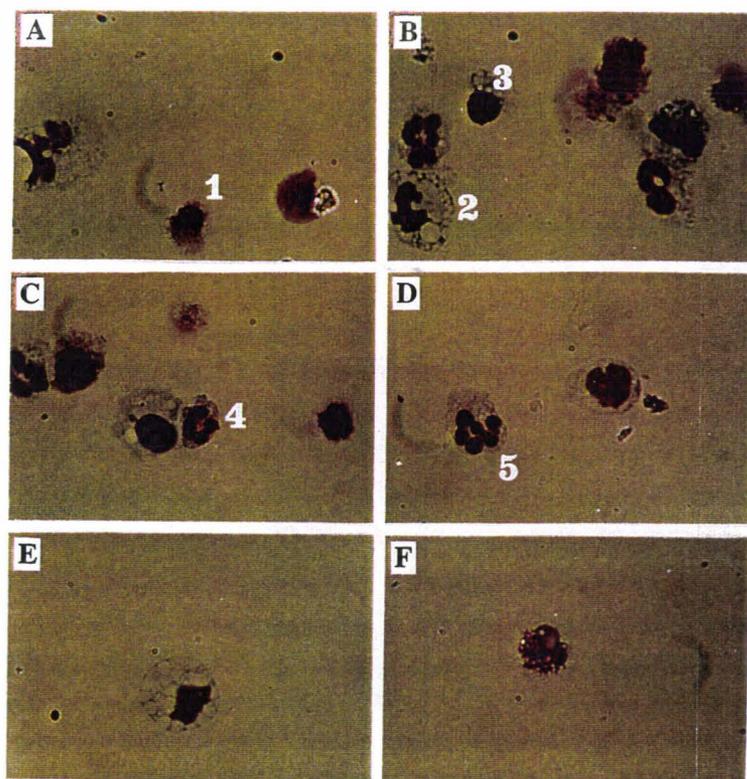


Fig. 3 : Morphological analysis of skin-emigrating cells immediately and 24h after plasmid injection.

Emigrating cells were recovered after 15 h sedimentation. 100 μ l aliquots were cytopined and stained with RAL 500 kit (eosin and methylen blue). **A** cells emigrating from skin immediately after injection of pNIp28. **B** cells emigrating from skin 24 h after injection of pNIp28. **C** cells emigrating from skin immediately after injection of pRc/CMV. **D** cells emigrating from skin 24 h after injection of pRc/CMV. **E** cells emigrating from skin immediately after injection of saline. **F** cells emigrating from skin 24 h after injection of saline. Dendritic cells (1), monoclear monocytes (2), lymphocytes (3), eosinophils (4) and neutrophils (5) can be easily identified.

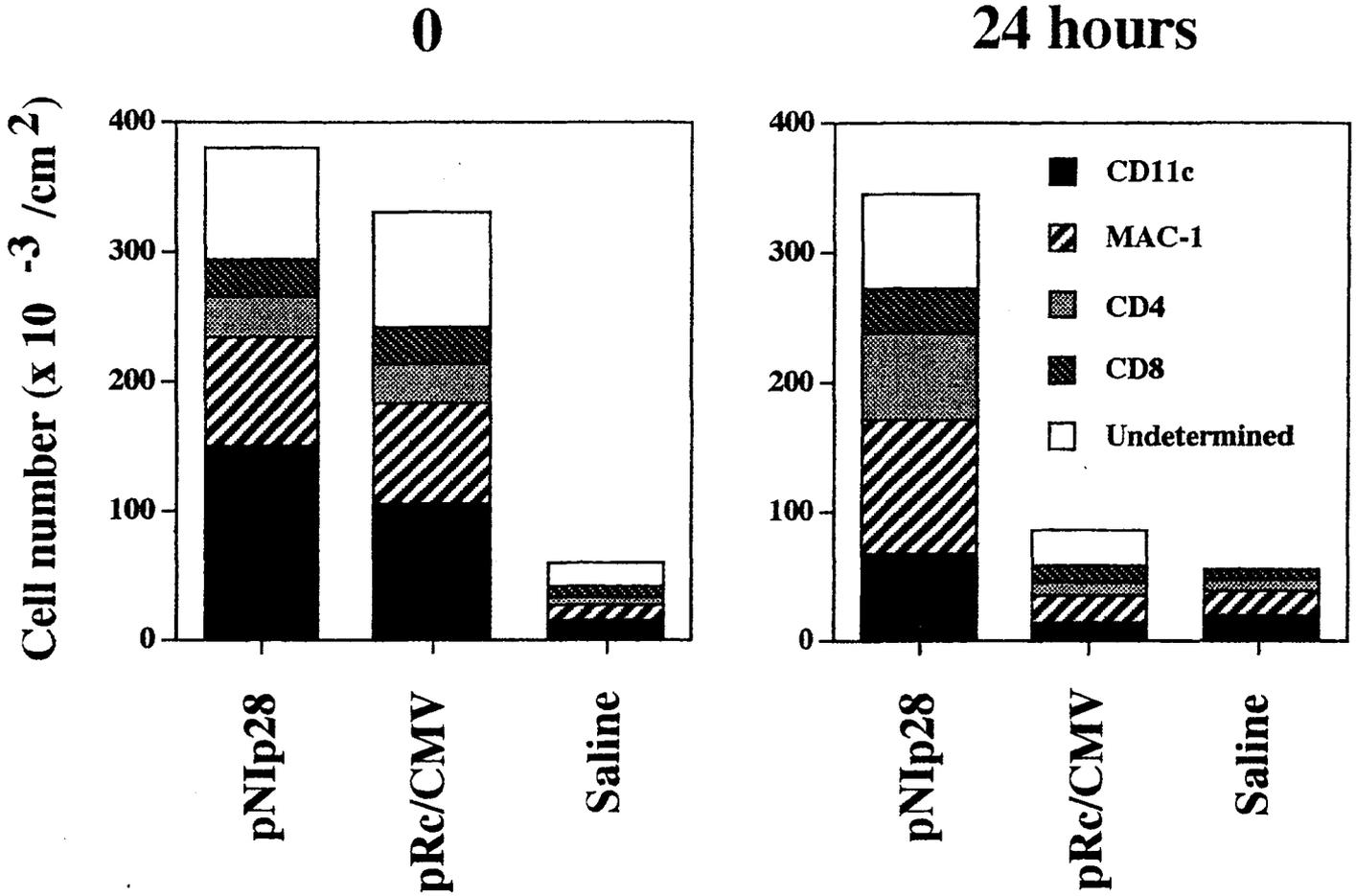


Fig. 4 : Expression of surface markers on skin-emigrating cells immediately and 24h after plasmid injection.

Emigrating cells (same samples as for morphological analysis) from 1 cm² skin biopsies were collected in 10 ml culture medium. Cells were centrifuged and distributed for labeling with antibodies specific for CD11c, MAC-1, CD4 and CD8. Percentage of cells staining positive for each surface molecule was measured by FACS analysis. Cell numbers represent the absolute numbers of positive cells emigrating from a 1 cm² skin biopsy.

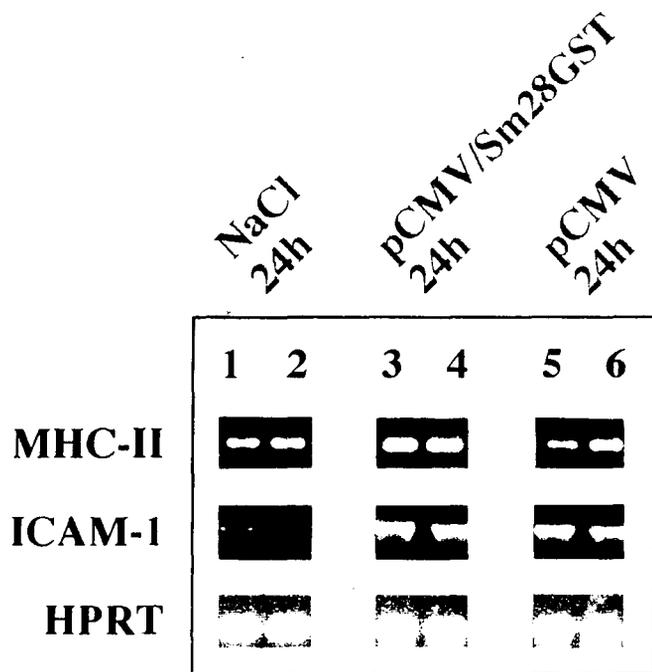


Fig. 5 : RT-PCR of MHC class II and ICAM-1 in skin-draining lymph nodes 1 day after injection of plasmids

One μg of reverse-transcribed mRNA from lymph nodes were amplified by PCR with primer pairs specific for HPRT, MHC-II and ICAM-1. Samples from two individual animals were studied for each condition.

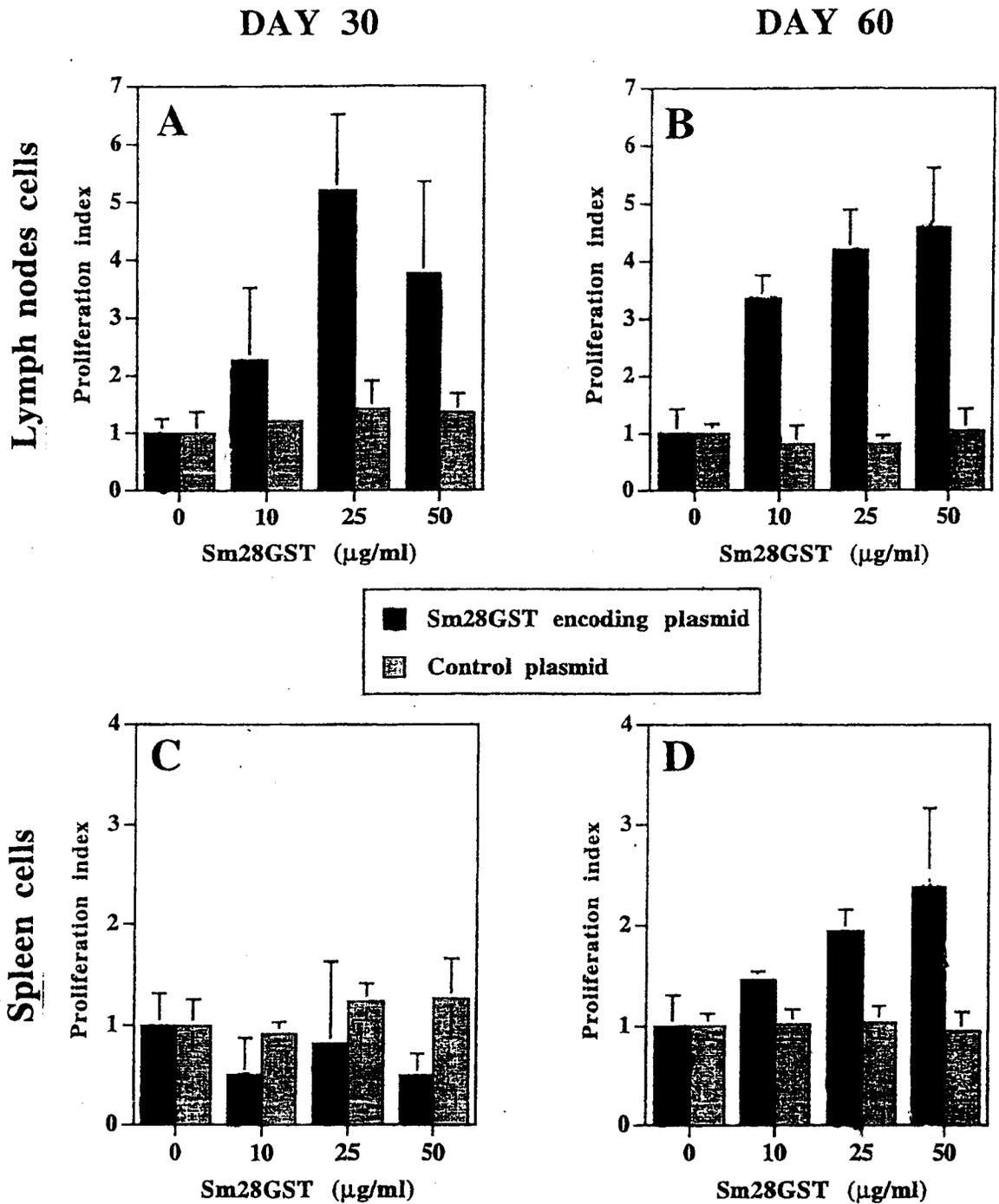
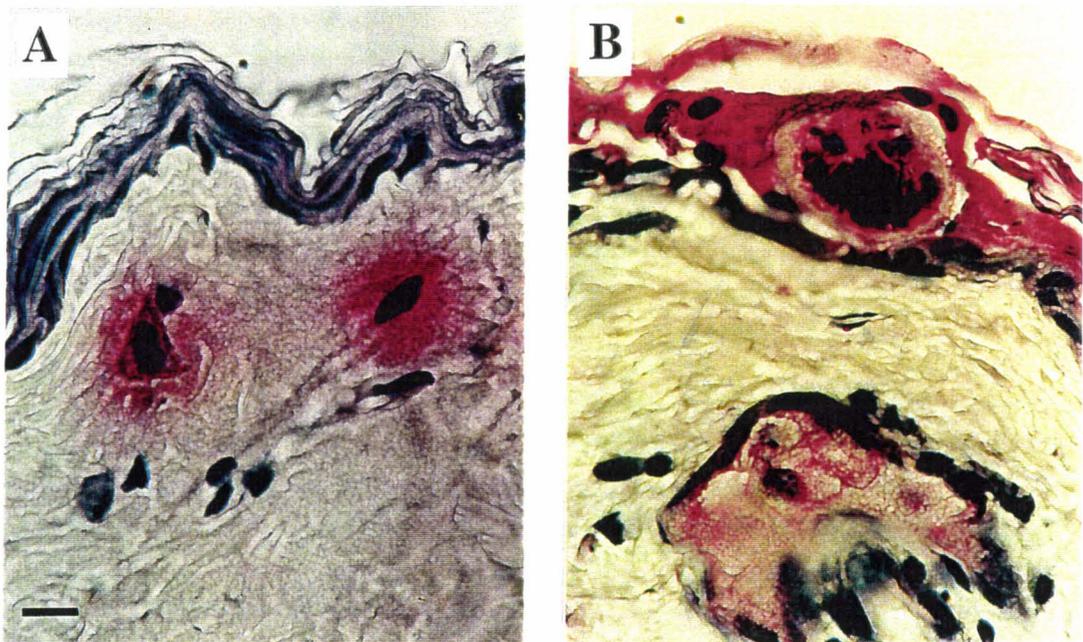


Fig. 6 : Initiation of specific cellular immune response

Cellular proliferation upon Sm28GST *in vitro* stimulation at day 30 and day 60 after DNA immunization both in skin-draining lymph nodes (A, B) and in spleen (C, D).

3.4. IMPLICATION DE L'IMMUNITÉ LIÉE À LA PEAU LORS DE L'ENTRÉE DES PARASITES

S. mansoni exprime et semble excréter l'antigène Sm28GST dès qu'il entre en contact avec la peau. (voir marquage immunohistochimique ci-dessous). On peut donc penser que si une réponse spécifique a été mise en place au niveau de la peau, les constituants de cette immunité vont pouvoir reconnaître le parasite, et jouer le rôle d'un système d'alerte ou directement un rôle effecteur vis-à-vis du parasite.

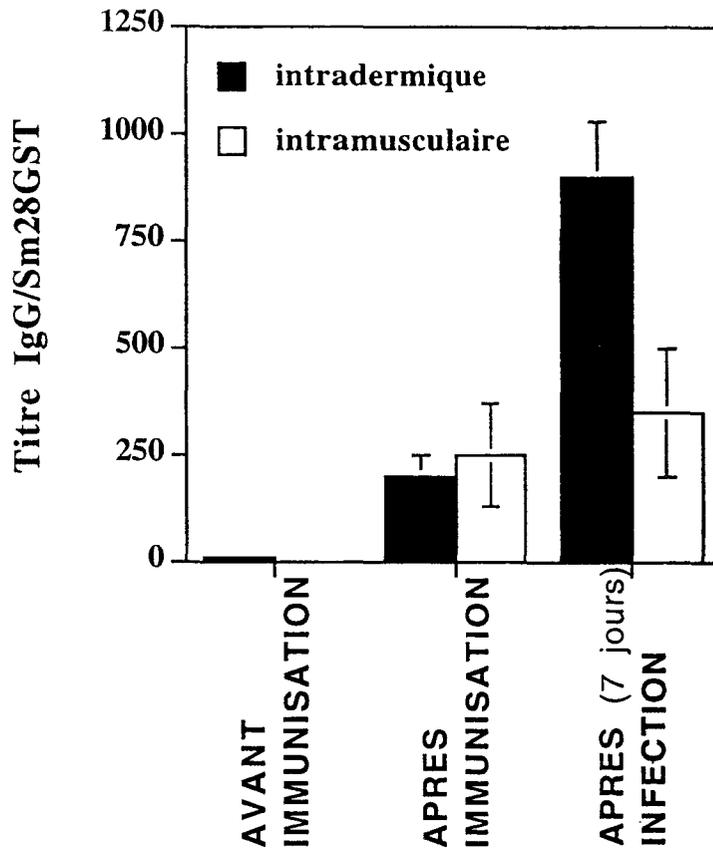


A Expression de la Sm28GST dans des cellules du derme suite à la vaccination ADN

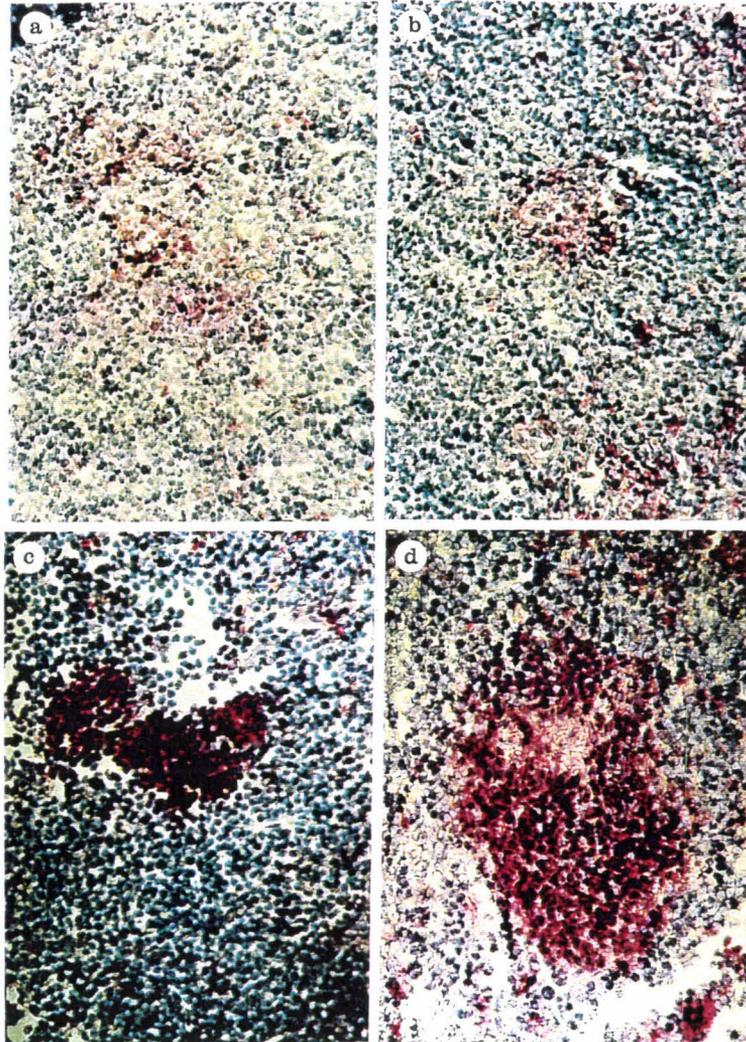
B Expression de la Sm28GST par le parasite *S. mansoni* lorsqu'il s'apprête à pénétrer dans la peau

La réponse anticorps spécifique est puissamment rappelée par l'infection (peau de l'abdomen) dans le cas d'une vaccination ADN par la peau (Cf. article page 171, pour les détails du protocole expérimental), et ceci quelque soit le site d'injection des plasmides: peau de l'abdomen, du thorax, de l'oreille ou du coussinet plantaire (résultats non montrés). Dans le cas d'une vaccination au niveau du muscle, l'effet rappel est limité et décalé dans le temps (Cf. graphique, page suivante). Ceci montre bien qu'il doit s'opérer une recirculation de cellules mémoires sur l'ensemble du tissu cutané et non pas seulement au niveau du site d'injection des plasmides. Il en découle que l'immunité associée au tissu peau dans son ensemble est capable de "sentir" le passage transcutané du parasite et d'alerter ainsi très rapidement le système immunitaire à un niveau systémique.

Effet de l'infection percutanée sur la réponse anticorps/Sm28GST en fonction de la voie d'administration des plasmides



La réponse immune mise en place suite à la vaccination ADN par la peau présente donc un avantage important. En effet la reconnaissance précoce de l'infection permet au système immunitaire de "gagner du temps" par rapport au parasite en mouvement. Au niveau cellulaire, nous avons pu vérifier et expliquer cet effet rappel par l'étude des cellules B au niveau des ganglions drainants de la peau. En effet, après infection d'animaux immunisés (et dans ce cas uniquement) nous pouvons observer des centres germinatifs massifs, correspondant à une forte expansion de cellules B qui sont vraisemblablement spécifiques de l'antigène Sm28GST (à vérifier).



Marquage des lymphocytes B (B220, en rouge) sur des coupes de ganglions drainant la peau (inguinaux) de souris, prélevé 14 jours après les traitements suivant: **a.** contrôle non traité, **b.** immunisation ADN Sm28GST intradermique, **c.** infection percutanée par *S. mansoni* d'une souris naïve et **d.** infection percutanée par *S. mansoni* d'une souris préalablement immunisée.

Il semble que les réponses immunes à l'infection mises en place au niveau de la peau ne suffisent pas à générer des mécanismes effecteurs pouvant conduire à la destruction des parasites ou pouvant les freiner dans leur migration. Ce qui manque encore à notre étude est notamment l'analyse des réactions cellulaires locales au niveau de la peau (histologie, FACS sur cellules émigrantes et RT-PCR).

4. Nature des réponses immunes induites

4.1. RESUME

Le mode de présentation et la nature du vecteur (ou adjuvant) sont des facteurs importants d'une vaccination qui vont largement contribuer à la nature et au profil de la réponse immune induite vis-à-vis de l'antigène. Nous nous sommes essentiellement concentrés sur la nature de la réponse humorale dans deux modèles animaux: le rat et la souris et avons étudiés le profil de la réponse immune et avons testés la capacité des anticorps à participer à des mécanismes reliés à une protection. Nous avons également comparé l'immunogénicité de GST de deux espèces: *S. haematobium* et *S. mansoni*. Finalement, nous avons étudié la contribution du corps du plasmide dans la nature des réponses induites au cours de la vaccination ADN.

Chez le rat, aussi bien que chez la souris nous obtenons un profil de réponse mixte avec un mélange de sous classes d'anticorps dépendants de réponses Th1 et d'anticorps dépendants de réponses Th2. Ce résultat est original par rapport aux résultats obtenu avec d'autres antigènes utilisés en vaccination ADN. Chez le rat ces anticorps (IgG2a et IgG2b) sont capables de participer à un mécanisme d'ADCC *in vitro* conduisant à la mort de schistosomules. Chez la souris, nous mesurons une majorité d'IgG1, la présence d'IgG2a et d'IgG2b, ces anticorps étant capables d'inhiber l'activité enzymatique GST, activité reliée à un effet anti-fécondité. En ce qui concerne la réponse cellulaire, nous avons observé une réponse lymphoproliférative accompagnée de la sécrétion d'IFN- γ et l'absence d'IL-4. Nous n'avons pas pu détecter de réponse CTL.

La comparaison entre Sm28GST et Sh28GST montre clairement une immunogénicité supérieure pour Sh28GST bien que les plasmides soient de même origine (même promoteur et niveaux d'expression *in vitro* comparables). Enfin, la comparaison entre protéine et ADN montre clairement la puissance de la vaccination ADN (les quantités de protéines synthétisées sont minimales lors de la vaccination ADN). Les caractéristiques de la réponse immune engendrée par la vaccination ADN sont: maintien de la réponse à un niveau constant (courbe en cloche pour la protéine) due au corps du plasmide, puissance de la mémoire (boost protéine à 8 mois) due à la vaccination ADN (le corps du plasmide joue un rôle prépondérant dans l'initiation, mais plus par la suite). Le profil isotypique de la réponse (mixte en ADN) est due au corps du plasmide (Th2 avec la protéine).

4.2. IMMUNISATION DE RATS AVEC UN PLASMIDE CODANT POUR LA GLUTATHION S-TRANSFERASE DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Parasite Immunology, 1997: 19: 505–513

Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase

LOÏC DUPRÉ, ODILE POULAIN-GODEFROY, ELISABETH BAN, NATHALIE IVANOFF, MOHAMED MEKRANFAR, ANNE-MARIE SCHACHT, ANDRÉ CAPRON & GILLES RIVEAU

Relations Hôte-Parasite et Stratégies Vaccinales, Inserm U 167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France

Parasite Immunology, 1997, 19: 505–513

Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase

LOÏC DUPRÉ, ODILE POULAIN-GODEFROY, ELISABETH BAN, NATHALIE IVANOFF, MOHAMED MEKRANFAR, ANNE-MARIE SCHACHT, ANDRÉ CAPRON & GILLES RIVEAU

Relations Hôte-Parasite et Stratégies Vaccinales, Inserm U 167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France

SUMMARY

Direct administration of plasmid DNA encoding an antigen represents an attractive approach to vaccination against infectious diseases, particularly in developing countries where easy-to-handle and cost-effective vaccines are needed. We have investigated the potential of DNA immunization to induce a specific antibody response against *Schistosoma mansoni*, using plasmid-DNA encoding the protective antigen, *S. mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase (Sm28GST). Since *S. mansoni* parasite penetrates into its host through the skin, this tissue was chosen for plasmid DNA delivery. Following plasmid DNA administration into the skin of rats, the parasite antigen was detected in skin cells by immunohistochemistry. Three administrations of 200 µg plasmid at 14 day intervals led to the induction of a long-lasting specific IgG antibody response in the sera of immunized rats, with a predominance of IgG2a and IgG2b subclasses. Sera of immunized animals were able to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro, leading to the specific killing of parasite larvae. A parasite challenge performed on plasmid DNA-immunized animals induced a strong and rapid boosting effect on the specific IgG antibody response. These results demonstrate the potential of genetic immunization via the skin with plasmid DNA encoding Sm28GST for inducing immune responses with protective patterns against an *S. mansoni* infection.

Keywords DNA, immunization, skin, rats, *S. mansoni*, Sm28GST

INTRODUCTION

Schistosomiasis is the second endemic parasitic disease in importance after malaria. This chronic and debilitating disease affects more than 200 million people essentially in developing countries and is responsible for approximately 500 000 deaths per year. Development of an efficient vaccine against this helminth infection is a major priority since existing chemotherapy fails to prevent reinfection in young children and the development of pathology (Capron *et al.* 1995).

One of the most promising vaccine candidates against *Schistosoma mansoni* infection is a 28 kDa glutathione S-transferase (Sm28GST) molecule, which has proven its efficiency against parasite challenges in rodents (Balloul *et al.* 1987a, Grezel *et al.* 1993) and non-human primates (Boulanger *et al.* 1991). In rats, the main mechanism involved in the development of protective immunity following vaccination with Sm28GST antigen appears to be antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In this animal model, specific antibodies of IgG2a or IgE isotypes mediate the killing of parasites by macrophages, eosinophils or platelets (Capron & Capron 1986).

Genetic vaccination against schistosomiasis could represent a promising alternative to recombinant antigen vaccination since antigen-encoding plasmid DNA is very stable when compared to a protein antigen and can be used without any adjuvant. This new approach to vaccination has proven to elicit both humoral and cellular responses specific to the plasmid encoded antigen and to be efficient in conferring protective immunity in a large number of viral and bacterial infectious disease models (Fynan *et al.* 1993, Ulmer *et al.* 1993, Lai *et al.* 1995, Wang *et al.* 1995, Huygen *et al.* 1996).

The potential of genetic immunization against parasitic infections has also been demonstrated in different disease models (Sedegah *et al.* 1994, Jenkins *et al.* 1995, Xu & Liew 1995, Yang, Waine & McManus 1995, Doolan *et al.* 1996). Immunization against schistosomiasis using plasmid DNA

Correspondence: G. Riveau

Received: 24 April 1997

Accepted for publication: 29 August 1997

encoding *Schistosoma japonicum* 97 kDa paramyosin antigen was able to induce a strong antibody response in mice *via* intramuscular injection, although this immunity was not protective. In contrast, no antibody response could be detected when using plasmid DNA encoding *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione S-transferase (Yang *et al.* 1995).

Our approach consisted in the injection of plasmid DNA containing the full-length Sm28GST cDNA sequence (Balloul *et al.* 1987b) intradermally in rats. The skin is the penetration site of the parasite and the invading schistosomula express the Sm28GST molecule (Porchet *et al.* 1994). Furthermore the skin presents a developed lymphoid system able to induce both local and systemic immunity and its participation in protection against *S. mansoni* infection has been reported (Mountford *et al.* 1992).

The aim of this study was to assess potential of genetic immunization *via* the skin for inducing specific immunity against *S. mansoni*. Our results demonstrate that Sm28GST expression in rat skin cells led to a long-lasting specific antibody response which was boosted by a parasite challenge. Furthermore, induced antibodies were able to mediate ADCC. The profile of the immune response induced by Sm28GST expressing-plasmid DNA and the relevance of genetic immunization *via* the skin against schistosomiasis are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Animals and parasites

Female Fischer/ICO F344 rats were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) and were aged 10 weeks at the beginning of the experiments.

The *S. mansoni* cycle was maintained with *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts (bred in mineral water: Société des eaux de Volvic, France) and golden hamsters as definitive hosts. Infestation was performed by application of 1200 cercariae in 200 μ l mineral water to the shaved back skin of anaesthetized rats for 30 min.

Plasmid construction and preparation

The Sm28GST expression plasmid, pNip28, was constructed by PCR amplification of the full-length Sm28GST cDNA sequence and cloning into pCR II plasmid (TA cloning System, Invitrogen, San Diego, CA, USA). The Sm28GST sequence was then restriction digested with *Bst*X I (Boehringer Mannheim Corp., Mannheim, Germany) and ligated into *Bst*X I linearized pRc/CMV plasmid (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The integrity of the construct was confirmed by DNA sequencing. Plasmid DNA

was purified by centrifugation in a discontinuous caesium chloride gradient and redissolved in filter-sterilized apyrogenic normal saline at a final concentration of 2 mg/ml.

DNA immunization of rats

Intradermal injections of 100 μ l plasmid solution (200 μ g) were performed with a 1 ml syringe and a 26-gauge needle at six separate points into the shaved back skin of animals. Groups of five rats received three inoculations at 14 day intervals. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus and sera were stored at -20°C until further use.

Immunohistochemistry

Skin samples were harvested either at the site of plasmid injection or at distant sites on killed animals. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, Saint Louis, MO, USA) in PBS (10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 154 mM NaCl), dehydrated in ethanol baths and embedded in paraffin. 4 μ m-thick sections were deparaffinated in toluene, rehydrated, washed in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 154 mM NaCl) and saturated for 30 min in TBS, 0.5% ovalbumin (Sigma), 5% normal goat serum (Sigma). Hyperimmune anti-Sm28GST rabbit serum was incubated overnight at 4°C (1/1000 in TBS, 0.5% ovalbumin); a pre-immune rabbit serum was used as control. After three washes in TBS, slides were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/200, in TBS, 0.5% ovalbumin; Sigma) for four h and extensively washed in TBS. The alkaline phosphatase reaction was developed for ten min with the New Fuchsin substrate system (Dako, Carpinteria, CA, USA). Counterstaining was performed with Harris' haematoxylin.

Detection of MHC class II molecules was performed using a biotin anti-rat RT1B antibody (Fukumoto, McMaster & Williams, 1982) (1/50; Pharmingen, San Diego, CA, USA), followed by streptavidin-horseradish peroxidase (1/500; Amersham Life Science, GB) incubation for four h and revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) and H₂O₂.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

To detect specific antibodies, ELISA assays were performed on Immulon 3 plates (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VI) coated 2.5 h at 37°C with 100 μ l/well of a 10 μ g/ml solution of recombinant Sm28GST diluted in PBS. After three washes with washing buffer (PBS, 0.1% Tween-20 (Prolabo, France)), sera were diluted serially (1/20 to 1/640) in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween-20, 0.5% gelatin

(Merck, Darmstadt, Germany)) and incubated on plates (100 μ l/well) overnight at 4°C. Plates were washed five times with washing buffer and then incubated with IgG_{H+L} or IgG subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c) peroxidase-conjugated specific antisera (Sigma) for 1.5 h at 37°C. Dilutions for antisera were respectively 1/12 000, 1/8000, 1/8000, 1/5000 and 1/4000 in blocking buffer (100 μ l/well). After four washes with washing buffer, plates were developed using 1 mg/ml O-phenylene diamine dihydrochloride substrate (Sigma) and 0.03% H₂O₂. Thirty min later, 100 μ l 2N HCl were added to each well and the absorbance at 492 nm was determined with an automated microplate reader (Titertek Multiskan, Labsystems, Finland). Titres were calculated as the reciprocal of dilution yielding three times the value obtained for the background (no serum added). On each plate, anti-Sm28GST rat serum

containing detectable levels of each IgG subclasses tested was used as a positive control.

Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)

Effector macrophages were obtained from Fischer rats by a peritoneal wash with 20 ml Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 4 mM glutamine and 50 IU/ml calciparine (50 IU/ml). Cells were centrifuged, resuspended in 5 ml 20% normal rat serum MEM and allowed to adhere to plastic Petri dishes with flat bottom wells (200 μ l per well). After two h incubation, non-adherent cells were discarded by washing with the same medium and macrophages were incubated overnight at 37°C, in the presence of 5% CO₂. The cytotoxic assay was performed by incubating the cells with a 10% dilution of the

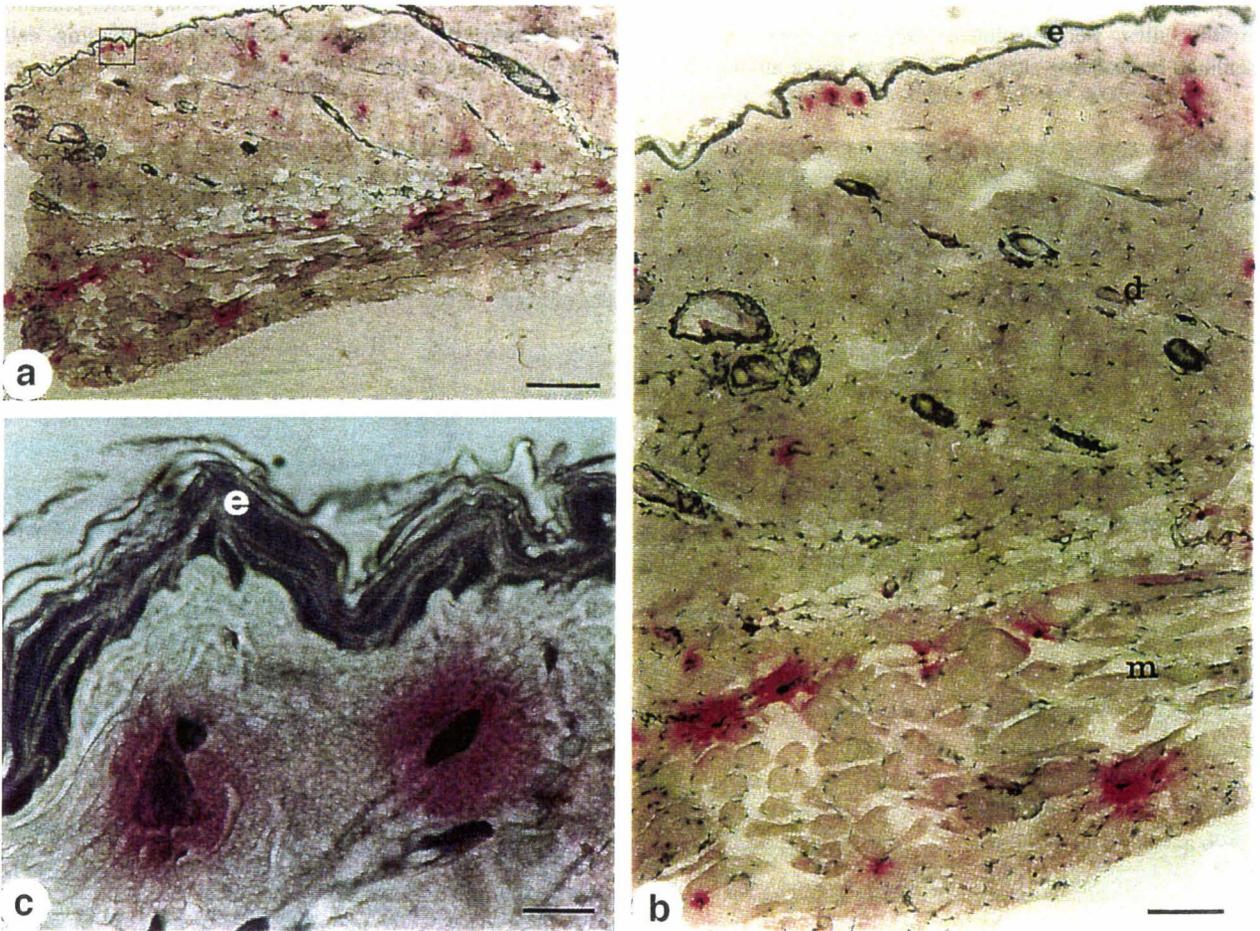


Figure 1 Sm28GST expression in rat skin 14 days after intradermal injection of 200 μ g pNip28. Skin samples were taken at the site of pNip28 administration. The same skin cross-section area is shown at different magnifications (a: bar = 250 μ m; b: bar = 100 μ m; c: bar = 10 μ m). Sm28GST labelling (red) is detectable in cells present under the epidermis (e), in the dermis (d) or in the muscular layer (m). Nuclei were counterstained in blue with haematoxylin.

tested serum before the addition of 80 schistosomula per well, which were prepared by passage of cercariae through isolated skin (Grezel *et al.* 1993). Cytotoxicity was measured after 24 h by microscopic examination and was determined as the percentage of killed schistosomula surrounded by macrophages. Assays were performed in duplicate and results were expressed as the mean value plus standard deviation.

RESULTS

Immunohistochemical detection of Sm28GST in rat skin following intradermal administration of plasmid DNA encoding Sm28GST

Skin samples were collected either two days or 14 days after pNip28 plasmid intradermal injection. Tissue samples corresponding to both the plasmid injection sites and distant sites were isolated. Negative controls were obtained by isolating skin samples from naive animals.

Immunohistochemical analyses with anti-Sm28GST antibodies revealed the presence of Sm28GST only in sections corresponding to the plasmid injection sites. Specificity of the labelling was confirmed by the absence of labelling in adjacent sections using normal rabbit serum as a control. The localization of Sm28GST protein in the skin was similar two days or 14 days after pNip28 injection and was concentrated in a confined area where plasmids had been delivered (Figure 1a). Antigen was localized throughout the dermis and in the muscle layer underlying the dermis (Figure 1b). At higher magnification (Figure 1c), staining appeared to be localized both intracellularly and in association with the membrane of labelled cells. Diffusion of the specific staining was also observed around the labelled cells.

In order to better characterize the nature of Sm28GST-expressing cells, a double staining was performed on skin sections to label both Sm28GST expressed by skin cells and MHC class II molecules. Two days after plasmids inoculation, the majority of Sm28GST-expressing cells were not stained for MHC class II molecules. However,

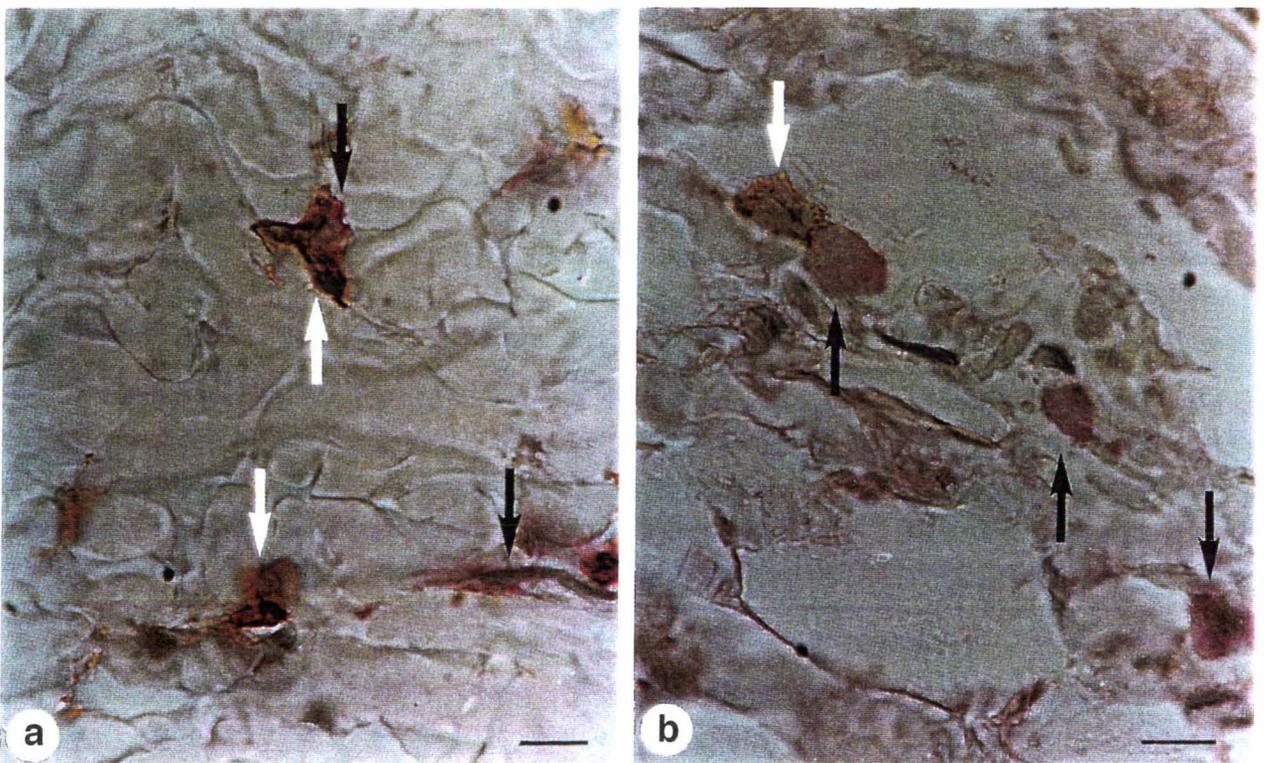


Figure 2 Localization of Sm28GST and MHC class II molecules in rat skin 2 days and 14 days after intradermal injection of 200 μ g pNip28. Double immunostaining of immunized rat skin was performed at two time points after pNip28 injection. (a) At two days a few skin cells display both Sm28GST labelling (red staining; black arrow) and MHC class II labelling (brown staining; white arrow). (b) At 14 days no colocalization was detected, but direct contact of Sm28GST labelled cells with MHC class II-bearing cell can be observed. Nuclei were counterstained in blue with haematoxylin. (bar = 10 μ m).

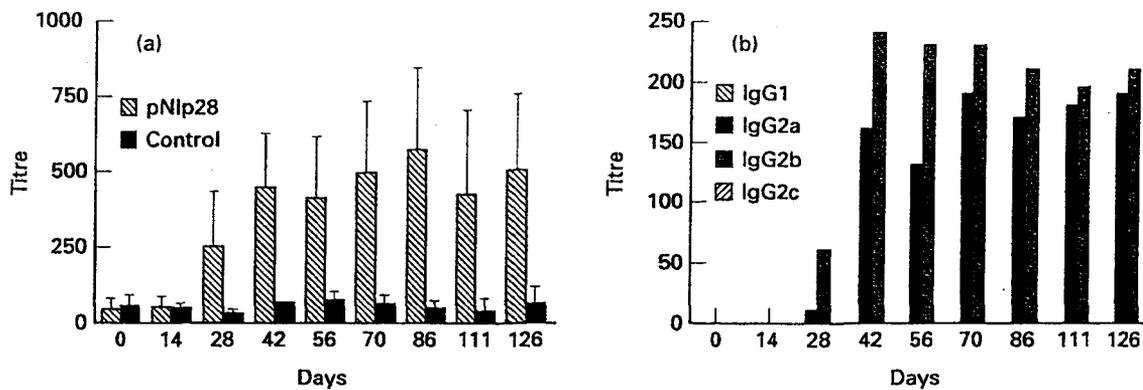


Figure 3 IgG antibody response against Sm28GST in the serum of rats intradermally immunized with pNip28. 200 µg plasmid injections were performed at days 0, 14 and 28. (a) Specific anti Sm28GST IgG_{H+L} antibody titres for control or pNip28-immunized rats expressed as mean and SD of individual responses of 5 rats per group. (b) Specific anti Sm28GST IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c antibody titres in pooled sera of 5 rats.

colocalization of Sm28GST and MHC class II molecules was clearly identified in a few cells throughout the dermis (Figure 2a). In contrast no cell with double labelling for MHC class II and Sm28GST could be observed in skin sections collected 14 days after plasmid inoculation (sections corresponding to five separate injection sites were analysed). At both time courses MHC class II-bearing cells were found in close proximity or even in direct contact to Sm28GST-expressing cells as it can be observed in Figure 2b.

Intradermal gene immunization induced a long-lasting specific antibody response able to mediate ADCC

Fischer rats were immunized by three intradermal injections of 200 µg pNip28 at 14 day intervals. Levels of Sm28GST specific IgG antibodies were evaluated by ELISA on sera from pNip28-immunized and non-immunized animals. Results shown in Figure 3a indicate that the specific IgG response was induced in all intradermally immunized rats, whereas no specific IgG were detected in control animals. Antibodies were detected in the sera of intradermally immunized animals as soon as 28 days after the first administration. The antibody response increased rapidly to a peak at day 42 and persisted at a constant level for at least 126 days. ELISAs performed on pooled sera to quantify IgG subclasses (Figure 3b) indicated that plasmid DNA immunization induced a selected profile of IgG subclasses. Indeed, the IgG antibody response against Sm28GST was exclusively constituted of IgG2a and IgG2b subclasses which both followed the kinetic profile observed for total IgG. IgG1 and IgG2c subclasses were not present at detectable levels.

To evaluate the functionality of the anti-Sm28GST

induced antibodies, *in vitro* ADCC assays were performed in the presence of immune sera using macrophages as effector cells and schistosomula as targets. When compared to the background killing in the presence of day 0 sera and sera from control animals (respectively 20.4% ± 1.0 and 16.5% ± 7.3), pooled sera from DNA-immunized rats (day 42 to day 126) were able to mediate the killing of schistosomula at significant ($P < 0.05$) levels (Figure 4). ADCC activity was concomitant with the presence of specific antibodies and increased gradually but not significantly with sera collected from day 42 (37.4% ± 8.1) to day 126 (53.8% ± 4.3) after the first immunization.

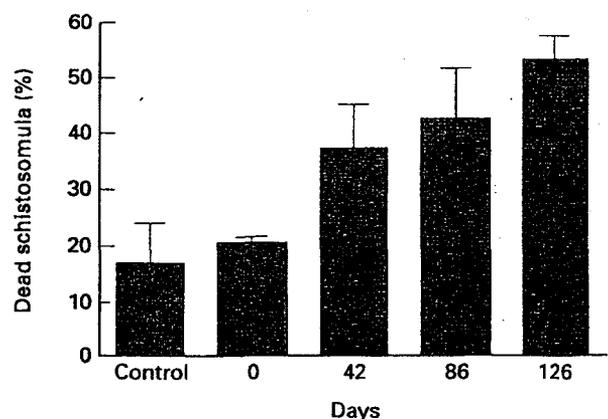


Figure 4 Percentage of antibody-dependent cellular cytotoxicity toward schistosomula (ADCC). Immunized or control pooled sera (five rats per group) from different time points after administration were tested with naive macrophages as effector cells. Results are expressed as the percentage of killed schistosomula (mean and SD of duplicate experiments). Plasmid injections were performed at days 0, 14 and 28.

Increase in the specific antibody response after parasite challenge

Percutaneous infection with cercariae induced a rapid boosting effect on the antibody response elicited by genetic immunization. Seven days after infection a several fold increase in specific IgG titres was observed in all immunized animals (Figure 5). The profile of specific IgG subclasses after challenge was still dominated by IgG2a and IgG2b (no IgG1 and IgG2c were detected). Titres remained at a constant level for at least 21 days. In the mean time there was no detectable Sm28GST specific antibody response following the infestation in the animals that were not immunized with pNip28.

DISCUSSION

In this report we have demonstrated the feasibility of the DNA immunization approach to induce immune responses with protective patterns against a multicellular parasite. Our study has focused on the intradermal delivery to rats of plasmid DNA encoding Sm28GST, a *Schistosoma mansoni* antigen. Sm28GST expression has been observed in the skin and was limited to a confined area around the injection site. This was probably the result of a short half-life of plasmid DNA outside the cells (Manthorpe *et al.* 1993), limiting its diffusion and the transfection of cells distant from the injection site. In contrast to other studies (Raz *et al.* 1994, Hengge *et al.* 1995) in which antigen was detected in the epidermis and in the upper layer of the dermis, Sm28GST neoantigen was mainly found in cells scattered in the dermis

and in the muscle layer located under the dermis. This difference may be due to the nature of the skin and to the injection technique.

The observation of immunostained skin sections collected two days after plasmid DNA injection showed that a small proportion of cells containing detectable levels of Sm28GST were MHC class II positive cells. This is not surprising since MHC class II expressing cells represent a minority of cells in the skin (based on our labelling experiments). This lack of specificity for cell transfection indicates the crucial relationships that should take place between antigen-presenting cells (APC) and antigen-producing cells to engage the specific immune process. Interestingly, 14 days after plasmid DNA injection we did not find any Sm28GST and MHC class II colocalization in the skin. This observation is in accordance with the demonstration of the rapid migration of transfected and consequently activated dendritic cells from the skin to the skin-draining lymph nodes (SLNs) in the context of gene gun immunization (Condon *et al.* 1996). Therefore, we are currently investigating the presence of Sm28GST-expressing APCs in the SLNs.

DNA immunization efficiency may be due to the expression of high quantities of antigen within transfected APCs that directly present processed antigens in association with their MHC class I molecules leading to the induction of strong CTL responses. However, in our model DNA immunization was characterized by the induction of a specific antibody response that would theoretically require an extracellular localization of the antigen. A diffused labelling was observed around Sm28GST containing cells (Figure 1c) suggesting that the antigen was released from the expressing cells. The majority of these cells were MHC

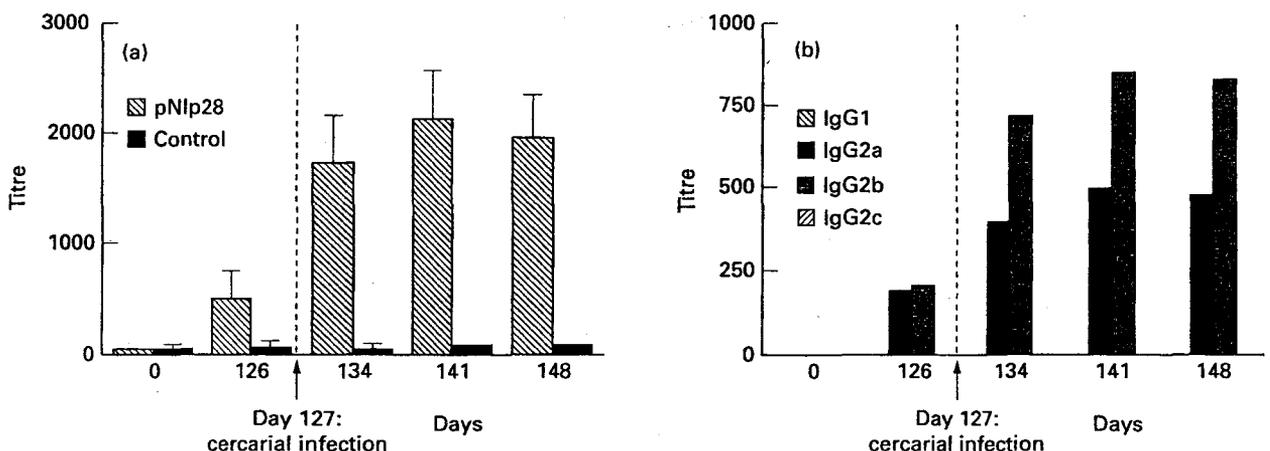


Figure 5 IgG antibody response against Sm28GST after infestation of rats intradermally immunized with pNip28. Plasmid injections were performed at days 0, 14 and 28. Infestation with cercariae was performed at day 127. (a) Specific anti Sm28GST IgG_{H+L} antibody titres for control or pNip28-immunized rats ($n = 5$, mean and SD of individual responses). (b) Specific anti Sm28GST IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c antibody titres in pooled sera.

class II negative cells and they may act as a reservoir for the antigen, as already demonstrated by others for myocytes in DNA inoculated muscles (Whalen *et al.* 1995, Corr *et al.* 1996). Prolonged expression of the antigen by non-professional APCs may lead to a slow release of the antigen in their microenvironment which may contribute to the induction of specific antibody responses. However, the cloned Sm28GST gene does not contain any typical signal peptide (McNair *et al.* 1993) and Sm28GST has been shown to be refractory to secretion in different expression systems (Kremer *et al.* 1996, Renaud-Mongenie *et al.* 1996). Nevertheless, our observation can be compared to recent results (Huygen *et al.* 1996) showing comparable immunogenicity with plasmids containing mycobacterial antigen sequences with or without a leader sequence suggesting that the antigen may be released as a consequence of cell lysis. Since MHC class II-expressing cells were present in the proximity of and even in direct contact with antigen-containing cells the antigen may have been captured, processed and presented by APCs leading to specific antibody production by B cells. The kinetic of the antibody response was characterized by a 14 to 28 day delay between DNA injection and detection of specific antibodies. This may be related to the requirement of a certain level of antigen expression and accumulation to induce a significant antibody production. We also observed that a third administration did not seem to further increase the specific antibody response and we are currently considering immunization protocols with reduced number of injections and lower doses of plasmid DNA.

In the mouse model, other authors failed to elicit detectable level of antibodies against *S. japonicum* 26 kDa glutathione S-transferase using intramuscular DNA immunization (Yang *et al.* 1995). Similarly, in the rat model we were not able to detect any specific antibody response after intramuscular injection following a similar protocol as the one used for the intradermal route (data not shown). The higher efficiency of intradermal immunizations with plasmid DNA over intramuscular immunizations has already been reported with other antigens (Raz *et al.* 1994, Pertner *et al.* 1995). Thus the efficiency of DNA immunization may vary according to the site of injection. Furthermore, the plasmid construction and the nature of the plasmid backbone itself may contribute to immunostimulatory effects since short DNA sequences have been shown to facilitate a Th1 immune response in the context of intradermal gene immunization (Sato *et al.* 1996). The pNip28 plasmid we used contains eight characterized immunostimulatory DNA sequences localized in the *AmpR* gene and in the CMV promoter region. This could partly explain the fact that DNA immunization with our plasmid was efficient and induced a selected profile of antibody subclasses.

This study clearly shows that genetic immunization in rats induced a selected panel of IgG subclasses, including IgG2a and IgG2b, in absence of detectable IgG1 and IgG2c. Thus the profile of the immune response induced in our model is probably of a Th1-like type, which is recognized as a general feature of DNA immunization (Whalen *et al.* 1995). In the rat model, there is some evidence that antibodies of the IgG2a subclass are related to protection. Indeed a monoclonal IgG2a antibody directed against a *S. mansoni* 38 kDa antigen has been shown to mediate ADCC and to protect against a challenge infection after passive transfer (Grzych *et al.* 1982). In contrast IgG2c monoclonal antibodies directed against the same molecule have been shown to block both ADCC and protection (Grzych *et al.* 1984). The possible role of specific IgG2b antibodies in rodent schistosomiasis is unknown and their production seems to be specifically induced by DNA immunization since they have never been shown to be predominant in any other protocol of immunization with the Sm28GST antigen in rats (Balloul *et al.* 1987a, Grezel *et al.* 1993).

Consistent ADCC activity was clearly induced following DNA immunization. ADCC activity appeared to build up during the time after immunization with pNip28 plasmid, following a slight increase in IgG2a titres and a progressive decrease in IgG2b titres which indicates that specific IgG2a antibodies would be directly involved in this activity. As ADCC is considered as a major defence mechanism against schistosome larvae, the DNA immunization approach we used might promote protective effect. Indeed preliminary results suggest that consistent reduction of worm burden could be obtained (>40%).

The strong and rapid boost effect observed after the infestation of the rats with cercariae indicates that native Sm28GST reactivated the specific antibody response induced by intradermal DNA immunization. When considering the duration of parasite migration through the skin (up to three to four days) it is conceivable that the secondary immune response was elicited at the skin level. This is supported by the fact that schistosomula express Sm28GST antigen during migration through the skin (Porchet *et al.* 1994). In addition protection against *S. mansoni* have been demonstrated in mice vaccinated with irradiated cercariae (Mountford *et al.* 1988). In this model irradiated parasites exhibit a truncated migration with persistence of the larvae in the skin and in the SLNs. In some respects these experiments can be compared to ours since both protocols induce a prolonged antigen release at the skin level. Induction of immunity towards Sm28GST antigen in the skin may induce systemic immunity with homing of antigen specific memory cells back to the skin. This may contribute to an early interaction of the immune system with parasites as soon as they penetrate into the organism. This early recognition and/

or interaction with the parasites as they migrate through the skin could result in strong and early induction of protective mechanisms.

In conclusion, we have shown that intradermal DNA immunization with plasmid DNA encoding Sm28GST was able to induce a long-lasting specific antibody response at the systemic level against *S. mansoni* infection. Induced antibodies were able to mediate ADCC which is considered as a major protective mechanism involved in the reduction of worm burden. Moreover, the induction of protective immunity in the skin would be particularly attractive for the control of *S. mansoni* infection since the skin is the first tissue encountered by the parasite which is thought to be more susceptible to the immune defenses at this early stage than at later maturation stages. More generally, DNA immunization via the skin seems to be very relevant for obtaining a local and early control of infection by pathogens that penetrate or invade this tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Josette Fontaine, Monique Leroux and Suzanne Van Wingène for preparation of parasites. We are grateful to Raymond Pierce for supplying Sm28GST cDNA and help with plasmid construction and Transgène for production and purification of recombinant Sm28GST. Loïc Dupré holds a fellowship from the Institut Pasteur de Lille. This work received financial support from European Economic Community contracts IC18CT95-0013 and BIO4CT96-0374. This study was also supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Balloul J.M., Grzych J.M., Pierce R.J. *et al.* (1987a) A purified 28 000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* **138**, 3448–3453
- Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D. *et al.* (1987b) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**, 149–153
- Boulanger D., Reid G.D.F., Sturrock R.F. *et al.* (1991) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **13**, 473–490
- Capron M. & Capron A. (1986) Rats, mice and men. Models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitology Today* **2**, 69–75
- Capron A., Riveau G., Grzych J.M. *et al.* (1995) Development of vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 235–240
- Condon C., Watkins S.C., Celluzi C.M. *et al.* (1996) DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* **2**, 1122–1128
- Corr M., Lee D.J., Carson D.A. *et al.* (1996) Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 1555–1560
- Doolan D.L., Sedegah M., Hedstrom R.C. *et al.* (1996) Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8⁺, T cell-, interferon γ -, and nitric oxide-dependent immunity. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1739–1746
- Fukumoto T., McMaster W.R. & Williams A.F. (1982) Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus. *European Journal of Immunology* **12**, 237–243
- Fynan E.F., Webster R.G., Fuller D.H. *et al.* (1993) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 11478–11482
- Grezel D., Capron M., Grzych J.M. *et al.* (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *European Journal of Immunology* **23**, 454–460
- Grzych J.M., Capron M., Bazin H. *et al.* (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *Journal of Immunology* **129**, 2739–2743
- Grzych J.M., Capron M., Dissous C. *et al.* (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* **133**, 998–1004
- Hengge U.R., Chan E.F., Foster R.A. *et al.* (1995) Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nature Genetics* **10**, 161–166
- Huygen K., Content J., Denis O. *et al.* (1996) Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine* **2**, 893–898
- Jenkins M., Kerr D., Fayer R. *et al.* (1995) Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine* **13**, 1658–1664
- Kremer L., Riveau G., Baulard A. *et al.* (1996) Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guérin producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Journal of Immunology* **156**, 4309–4317
- Lai W.C., Bennett M., Johnston S.A. *et al.* (1995) Protection against *Mycoplasma pulmonaris* infection by genetic vaccination. *DNA and Cell Biology* **14**, 643–651
- Manthorpe M., Cornefert-Jensen F., Hartikka J. *et al.* (1993) Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Human Gene Therapy* **4**, 419–431
- McNaire A., Dissous C., Duvaux-Miret O. *et al.* (1993) Cloning and characterization of the gene encoding the 28 kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* **124**, 245–249
- Mountford A.P., Coulson P.S., Pemberton R.M. *et al.* (1992) The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology* **75**, 250–256
- Mountford A.P., Coulson P.S. & Wilson R.A. (1988) Antigen localisation and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **97**, 11–25
- Pertmer T.M., Eisenbraun M.D., McCabe D. *et al.* (1995) Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* **13**, 1427–1430
- Porchet E., McNair A., Caron A. *et al.* (1994) Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasitology* **109**, 565–572
- Raz E., Carson D.A., Parker S.E. *et al.* (1994) Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction

- of cellular immunity to viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 9519–9523
- Renauld-Mongenie G., Mielcarek N., Cornette J. *et al.* (1996) Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**, 7944–7949
- Sato Y., Roman M., Tighe H. *et al.* (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352–354
- Sedegah M., Hedstrom R., Hobart P. *et al.* (1994) Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 9866–9870
- Smithers S.R. & Terry R.J. (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* **55**, 695–700
- Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E. *et al.* (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745–1749
- Wang B., Boyer J., Srikantan V. *et al.* (1995) Induction of humoral and cellular immune response to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by *in vivo* DNA inoculation. *Virology* **211**, 102–112
- Whalen R.G., Leclerc C., Deriaud E. *et al.* (1995) DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen. Activation and entrainment of the immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences, USA* **772**, 64–76
- Xu D. & Liew F.Y. (1995) Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* **84**, 173–176
- Yang W., Waine G.J. & McManus D.P. (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**, 1029–1039

4.3. QUALITE DE LA REPONSE HUMORALE INDUITE PAR LA VACCINATION ADN SH28GST: PARTICIPATION DU CORPS PLASMIDIQUE

PARTICIPATION OF THE PLASMID BACKBONE TO THE NATURE OF THE ANTIBODY RESPONSE ELICITED BY A DNA VACCINE

Maxime Hervé, Loïc Dupré, Anne-Marie Schacht,

André Capron and Gilles Riveau*.

*Relations Hôte-Parasite et Stratégies Vaccinales, INSERM U 167,
Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du professeur Calmette, BP 245,
59019 LILLE CEDEX, FRANCE.*

*Corresponding author : Tel. : (33) 03.20.87.77.81

FAX : (33) 03.20.87.78.88

Keywords : DNA immunization, plasmid backbone, Sh28GST, Antibodies.

Running title : Characteristics of DNA-raised antibody responses.

ABSTRACT

One of the advantages of DNA-based vaccines relies on the induction of strong cellular and antibody responses without the requirement for any adjuvant. Indeed, DNA of bacterial origin appears to act as a strong immunostimulatory molecule. In order to better understand the contribution of plasmid DNA adjuvanticity in the development of antibody responses following DNA immunization, we compared 3 immunization protocols in mice by the intradermal route using either plasmid encoding the model antigen *Schistosoma haematobium* 28kDa Glutathione S-Transferase (Sh28GST) or recombinant Sh28GST (rSh28GST) supplemented with non-coding plasmid or rSh28GST alone. Our results indicate that DNA immunization induced a more sustained long-lasting antibody response than protein vaccination, which was attributed to the presence of the plasmid DNA. The antibody isotype profile was dominated by IgG1 antibodies for rSh28GST immunization. The adjonction of plasmid DNA to the protein induced a mixed IgG1/IgG2 isotype profile identical to the profile obtained after DNA immunization. Intradermal rSh28GST administration performed 8 months after immunization elicited a much greater anamnestic antibody response in animals that had been primed by DNA immunization. The strength of this memory response was not related to the adjuvanticity of the plasmid backbone, since rSh28GST and rSh28GST supplemented with non-coding plasmid gave similar results. After the boost, antibodies from the DNA-primed mice were the most efficient in the neutralization of Sh28GST enzymatic activity. Thus, this study clearly distinguishes between characteristics of antibody response due to plasmid DNA adjuvanticity and highlights the efficiency of DNA vaccination for inducing sustained long-lasting antibody responses and strong memory.

INTRODUCTION

DNA vaccines are a particularly promising approach for preventing a large range of infectious diseases caused by viruses, bacteria and unicellular protozoan parasites [Donnelly *et al.*, 1997 ; Huygen *et al.*, 1996 ; Sedegah *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, ; Xu *et al.*, 1998]. DNA vaccines can be used without any adjuvant since DNA of bacterial origin contains non methylated CpG motifs which stimulate the innate immune system to produce Th1 cytokines [Sato *et al.*, 1996 ; Tighe *et al.*, 1998]. In the context of DNA vaccination, intracellular expression of the antigen

coupled to the production of Th1 cytokine facilitates CTL development that is a major effector mechanism against intracellular pathogens [Kuhröber *et al.*, 1997 ; Schirmbeck *et al.*, 1995].

This novel vaccine strategy has also proven to be a strong inducer of specific antibody responses. In contrast to soluble protein immunization, which generally leads to a Th2-type response with IgG1 predominance in mice, DNA immunization directs antibody responses towards a specific IgG2 isotypic profile [Raz *et al.*, 1996]. Furthermore, a previous report indicated that DNA immunization induced greater avidity antibody than protein immunization even though the amount of antigen used was 1,000-fold smaller [Boyle *et al.*, 1997b]. Thus DNA vaccination could also be an appropriate method for inducing protective immunity against pathogens which elimination depends on antibody-mediated mechanisms.

In the model of infection by schistosome parasites, glutathione *S*-transferase molecules are one of the most promising vaccine candidates [Balloul *et al.*, 1987 ; Boulanger *et al.*, 1995 ; Wolowczuk *et al.*, 1989]. Antibodies neutralizing the enzymatic activity of Sm28GST have been associated to the acquisition of protective immunity against schistosomiasis [Grzych *et al.*, 1993]. We have shown recently the feasibility of using DNA vaccination in the model of schistosomes infection. Indeed, intradermal DNA immunization of rats with plasmid encoding Sm28GST generated the production of specific antibodies that were able to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [Dupré *et al.*, 1997].

In the present paper, we have investigated the characteristics of the humoral response elicited by intradermal Sh28GST DNA immunization. The critical parameters we studied include level of antibodies, isotype profile, duration and sustainment of the response, memory and ability to neutralize the Sh28GST enzymatic activity. By using recombinant protein immunization by the same route and recombinant protein plus antigen-plasmid DNA admixtures, we determined precisely the participation of the adjuvant effect of bacterial DNA on the different characteristics of the specific humoral response.

Our results indicate that the sustainment of the antibody response observed after DNA vaccination was due to the plasmid backbone. Similarly the isotypic mixed IgG1/IgG2a profile obtained was due to the immunostimulatory activity of the plasmid DNA. In contrast, the strong memory response induced selectively by the

DNA vaccination was unrelated to such an immunostimulatory effect. Finally, Sh28GST DNA-raised antibodies had a strong neutralizing ability towards Sh28GST enzymatic activity. Together, this study provides evidence that intradermal DNA immunization elicits a high-quality humoral response that could prove to be adapted for the control of infection by extracellular pathogens such as schistosomes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction. The Sh28GST expression vector pMSh was constructed by PCR amplification of the full-length Sh28GST cDNA sequence, and ligation of the PCR product into pCR3.1-Uni plasmid (Invitrogen, San Diego, CA). The integrity of the construct was confirmed by sequence analysis. Plasmid was purified by centrifugation in a discontinuous caesium chloride gradient and redissolved in filter-sterilized apyrogenic normal saline at a final concentration of 1 mg/ml. Plasmid preparations contained only trace amounts of endotoxin (<0,02 U/ μ g of plasmid DNA) as determined by a limulus amoebocyte lysate assay (BioWhittaker, Walkersville, MD).

In vitro transfection and expression of Sh28GST. COS-1 cells were maintained in DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10 % fetal calf serum, 2 mM Glutamine, 100 mM β -pyruvate, 25 mg/ml gentalline. Twenty-four hours before transfection, 1.5×10^4 cells per well were seeded in 6-well tissue culture plates. Cells were washed with OPTI MEM-1 (Life Technologies) and transfected with pMSh complexed to PEI (*Exgen 500*, Euromedex, Souffelmeyersheim, France) at a 1:3 ratio. Sh28GST expression was analysed 48 h after transfection. Cells were washed with PBS and fixed in 4% PAF (Sigma, St Louis, MO) for 30 min at room temperature (RT), and then were permeabilized with Triton X-100 (0.1 % in PBS) for 30 min at RT. Sh28GST was detected by incubating the cells overnight incubation at 4°C with purified rabbit anti-Sh28GST IgG diluted 1/500 in PBS-Gelatin 0.2 % (Merck, Darmstadt, Germany). Cells were washed three times in PBS and incubated with FITC conjugated goat anti-rabbit IgG (PharMingen, San Diego, CA) diluted 1/250 in PBS-Gelatin 0.2% for 1h at RT. After 2 washes, cells were treated with Ewans Blue diluted 1/10,000 in PBS and Sh28GST expression was observed under a microscope equipped with a 490 nm U.V. light.

Enzymatic activity of in vitro-expressed Sh28GST and inhibition by immune sera. Transfected COS-1 cells were trypsinized, centrifugated and resuspended in 1 mM PMSF. Cell lysis was achieved by 4 successive incubations at -70°C and 37°C. Enzymatic activity of the expressed Sh28GST was assayed on 25 µl of cellular lysate incubated with 200 µl of KPO₄ buffer (50 mM, pH 6,5) containing 5 mM GSH and 0,36 mM 1,-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma), according to Habig et al. [Habig *et al.*, 1974]. Enzymatic reaction was performed in Immulon 3 Plates (Dynatech., Chantilly, France) and absorbance at 340 nm was measured every 15 sec for up to 2 min with a spectrophotometer (Labsystems Multiskan, MS). Positive control corresponded to the enzymatic activity of 25 µl of a 10 µg/ml rSh28GST solution. Negative control corresponded to the enzymatic activity of 25 µl of reaction buffer with pCR3.1-transfected COS-1 cells lysate. For the assessment of the inhibitory ability of immune sera, two hundred nanogramms of rSh28GST diluted in KPO₄ buffer (50 mM, pH 6,5) were incubated with 10 µl of sera of immunized mice for 1h30 at 37°C prior to enzymatic activity measurement. The percentage of enzymatic activity inhibition (%EAI) was calculated according to the formula: $\%EAI = 100 - [(X - Y) \times 100] / Z$, where X corresponds to enzymatic activity with serum, Y corresponds to background (no enzyme) and Z corresponds to enzymatic activity in the absence of serum.

DNA and protein immunization protocols. Female Balb/c mice were purchased from Iffa Credo (L'arbresle, France) and were aged 6 to 8-week-old at the beginning of the experiments. Mice were primed with 100 µg of plasmid DNA, 100 µg of soluble rSh28GST or 100 µg of soluble rSh28GST coadministered with 100 µg of pCR3.1. Intradermal injections were performed with a 1 ml syringe and a 26-gauge needle at 3 separate points into the shaved abdomen skin of animals and were repeated three times at 2 week-intervals. All animals were boosted intradermally with 20 µg of Sh28GST eight months later. Sera were collected from the retroorbital sinus and were stored at -20°C until further use.

Detection of specific antibodies by ELISA. To detect anti-Sh28GST immunoglobulins, ELISAs were performed on Maxisorp plates (NUNC, Denmark) coated 2.5 hours at 37°C with 50 µl/well of a 5 µg/ml solution of recombinant Sh28GST diluted in PBS. After three washes (PBS, 0.1 % Tween-20 (Prolabo, France)), sera (50 µl/well) were diluted serially in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween-20, 0.5% gelatin (Merck)) and incubated overnight at 4°C. Plates were washed 4 times with washing buffer and incubated with horseradish peroxydase-conjugated goat anti-mouse Ig (H+L) (Cliniscience, Montrouge, France) for 1.5 hour at 37°C. Dilution for antisera was 1/1,200 in

blocking buffer (50 μ l/well). For specific immunoglobulin isotypes, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (Cliniscience) were diluted respectively 1/1,000, 1/500, 1/500, 1/300 in blocking buffer (50 μ g/ml). After four washes, plates were developed using 1 mg/ml 2,2'-azino-bis (3 ethylbenzen-thiazolin-6 sulfonic acid) diammonium substrate (Boehringer Mannheim, Germany) and 0.01 % H_2O_2 . One hour later, absorbance at 405 nm was determined with an automated microplate reader. Titers were calculated as the reciprocal of dilution yielding 3 times the value obtained for the background (no serum added).

RESULTS

Expression and enzymatic activity of plasmid-encoded Sh28GST. Immunofluorescence staining of permeabilized COS-1 cells showed the expression of Sh28GST in pMSh transfected cells (figure 1a), whereas no fluorescence signal was observed in cells transfected with pCR3.1 plasmid (figure 1b). Transfection with pMSh plasmid led to the expression of Sh28GST that was enzymatically active (figure 1c). GST activity was associated to the cellular lysate and could not be detected in the supernatants indicating an intracellular localization for Sh28GST. No enzymatic activity was observed with cellular lysate of COS-1 cells transfected with pCR3.1 plasmid.

Antibody response after DNA and protein priming. Every mice immunized intradermally with either 3 administrations of Sh28GST-encoding plasmid (pMSh), rSh28GST or rSh28GST plus control plasmid (pCR3.1) produced specific antibodies that were still present in the sera 8 month after immunizations (figure 2). In contrast, mice immunized with pCR3.1 did not produce any specific antibodies. The administration of rSh28GST alone induced antibody production that peaked 2 weeks after the last injection and decreased thereafter in a progressive manner. Coadministration of pCR3.1 with rSh28GST did not enhance early Sh28GST antibody production, but induced a sustained antibody response, staying at a plateau level over the time (figure 2). Antibody response after DNA immunization with pMSh was two times weaker and was slightly delayed in comparison to protein vaccination since it peaked 4 weeks after the last injection. This last discrepancy might be due to the time necessary for expression of the plasmid-encoded Sh28GST. Similarly to the coadministration of rSh28GST and pCR3.1, DNA immunization induced anti-Sh28GST antibodies that remained at a constant level rapidly after the initial peak.

Secondary humoral response. Very clearly, priming with Sh28GST-encoding plasmid induced a much stronger memory than priming with the recombinant antigen. Indeed, intradermal booster injection of 20 µg rSh28GST 8 months after DNA immunization induced a 13-fold increase in anti-Sh28GST antibody production within 2 weeks, with anamnestic effect observed for every individual mice. In contrast, only a very moderate anamnestic antibody response (3-fold increase) was observed in mice primed with the recombinant protein either with or without adjonction of control plasmid (figure 3). As a result, mice immunized with pMSh had antibody titers superior to the mice immunized with rSh28GST after the boost (figure 3). In the control animals injected with pCR3.1 an booster dose, no anti-Sh28GST antibody could be detected (data not shown).

IgG sub-classes produced before and after boosting. Before the boost, relative distribution of IgG sub-classes within each experimental group of mice was stable over the time (figure 4 represents isotype profile just before the boost). Anti-Sh28GST antibodies induced after protein priming were predominantly of the IgG1 isotype, with relatively low levels of IgG2b and minimal IgG2a and IgG3 antibodies (figure 4a). The addition of non-coding pCR3.1 plasmid to the protein shifted the isotypic profile towards the production of IgG2 isotypes, with IgG1 being still predominant. The profile of IgG isotypes induced after DNA immunization was mixed and comparable to the one observed after immunization with rSh28GST plus non-coding plasmid DNA. Intradermal boost with 20 µg of rSh28GST of rSh28GST-primed mice resulted in a predominant increase of IgG2a and IgG2b isotypes (figure 4b). Since profiles of IgG isotypes were not significantly modified in the two other groups, the boosting had a leveling effect on the profiles of the different groups. No IgA nor IgE isotypes could be detected before and after the boost in any of the groups (data not shown).

Neutralizing activity of anti-Sh28GST antibody generated. Inhibition assays of the rSh28GST enzymatic activity were performed with sera of immunized mice just before boost and two weeks after the boost (Table I). Anti-Sh28GST antibodies generated by DNA or protein priming were able to neutralize the Sh28GST enzymatic activity 8 month after intradermal immunization. Enzymatic inhibition was more important with sera of mice immunized with the recombinant protein. This could be attributed to the fact that levels of anti-Sh28GST antibodies were higher than the mice primed with DNA. Sera from animals coadministered with rSh28GST and pCR3.1 plasmid were the most efficient at inhibiting the Sh28GST enzymatic activity (86%). Intradermal boost with 20 µg of rSh28GST resulted in an increased ability to inhibit Sh28GST enzymatic activity in all immunized groups and 10 µl of sera of each

immunized group were able to strongly neutralize (90%) the Sh28GST enzymatic activity. Thus, the enzymatic inhibition seemed to be directly related to IgG titer.

DISCUSSION

DNA vaccination relies on the administration of antigen-encoding plasmids which direct antigen expression once they have transfected cells of the recipient organism. Immune responses induced are not solely dependent on the *in situ* synthesized antigen since plasmids harbour specific nucleotide sequences with strong immunostimulatory activity [Tighe *et al.*, 1998]. Only few attention has been devoted to the study of the precise nature of antibody responses elicited by DNA vaccination. In this study, we analysed the level, the profile, the memory and the neutralizing ability of antibody response after a DNA immunization with a Sh28GST-encoding plasmid and evaluated participation of the plasmid backbone in these characteristics.

Our results demonstrate the strength of DNA immunization in inducing high-level antibody responses. Indeed, in agreement with a previous report [Wolff *et al.*, 1990], we have estimated that antigen expression *in vivo* after DNA immunization reached amounts of a few nonograms (unpublished observation). In comparison, immunization with 100 µg of the recombinant protein by the same route gave antibody levels in the same level of magnitude. The use of DNA from bacterial origin or DNA sequences containing unmethylated CpG motifs as an adjuvant to protein antigens has been shown to increase both cellular and humoral responses [Davis *et al.*, 1998 ; Lipford *et al.*, 1997]. For this reason, immunostimulatory sequences present on the plasmid backbone are thought to contribute to the amplitude of DNA-raised immune responses. However, we found here that the adjonction of non-coding pCR3.1 plasmids, which contain 8 CpG motifs, to rSh28GST antigen did not modify the level of the antibody response elicited. This lack of adjuvanticity could be related to the relatively high levels of protein used that could saturate the immune system stimulation.

The longevity of the primary response and its sustainment at a plateau level observed here during a 8-month period has been suspected to be a characteristic of DNA immunization [Davis *et al.*, 1996 ; Deck *et al.*, 1997]. This characteristic could be explained by the persistence of antigen-expressing plasmids in skin cells and especially in

antigen presenting cells which would then represent an antigenic reservoir protecting antigens against antibody-mediated clearance [Raz *et al.*, 1994]. These transfected antigen presenting cells are known to migrate to the skin-associated lymph nodes. At these sites, they could stimulate T and B cells for a prolonged period of time by expressing and presenting the plasmid-encoded antigen [Condon *et al.*, 1996]. Nevertheless, in our model, intradermal immunization with rSh28GST was also able to induce a long-lasting specific IgG response. This finding demonstrates the efficacy of the intradermal route in inducing long-lasting primary immune response even with soluble antigens without any adjuvant. Coadministration of pCR3.1 plasmid with rSh28GST protein had a clear adjuvant effect on the sustainment of the specific IgG response over the time in comparison to the protein immunization. Interactions between plasmid DNA and dendritic cells, which are in contact with DNA after intradermal immunization, could influence their maturation and antigen presentation for an efficient antibody production by B-cells. We have recently observed an immunostimulatory effect of CpG motifs on dendritic cells by up-regulating molecules implicated in their migration (Ban *et al.*, submitted). Others have demonstrated that the effects of these motifs on dendritic cells can up-regulate surface expression of molecules involved in antigen presentation [Sparwasser *et al.*, 1998]. Together, these observations could explain the adjuvant effect of plasmid DNA on the maintenance of high antibody production.

Even though primary response after DNA priming was two-fold weaker than the one observed after protein priming, a booster injection of soluble rSh28GST into the skin, 8 months after immunization, induced a strong anamnestic boost of antibody production in DNA immunized mice only. This indicates that DNA priming was more powerful than protein priming at inducing a long-lived memory immune response. It has been reported that a boost with DNA is superior to a boost with protein, although a smaller amount of plasmid-encoded antigen is expressed [Davis *et al.*, 1996]. Reactivation of B-cells or memory cells seems to be associated with a particular antigenic presentation which compensates the low amount of plasmid-encoded antigen. In the case of DNA priming, expression of the antigen could persist until the time of the boost. Indeed, expression for at least 19 months has already been described [Wolff *et al.*, 1992]. Dendritic cells, which are thought to play an essential role in the initiation of DNA-raised immune responses [Casares *et al.*, 1997], could also prove to play a critical role in the reactivation of B-cells. Indeed, dendritic cells directly modulate B-cell growth and differentiation [Dubois *et al.*, 1997]. Thus, antigen-expressing dendritic cells could be particularly efficient at inducing cells with a particularly strong memory pattern.

DNA immunization mimics viral infection since antigen synthesis occurs directly in the host cells. Both DNA immunization and viral infections are associated with a Th1 response typically including IFN- γ production and IgG2 isotype predominance [Anderson *et al.*, 1996]. In contrast, protein immunization leads to a specific Th2 response with predominance of IgG1 isotype and IL4 production, because of an extracellular localization of the antigen. We found here a clear predominance of the IgG1 isotype after immunization with rSh28GST. More surprisingly, IgG1 predominance was also conserved after intradermal Sh28GST DNA immunization. However IgG2a and IgG2b isotypes were also produced, thus indicated a stimulation of T-cells with a mixed Th1/Th2 profile. Recent reports mentioned that secreted antigens after DNA immunization are much efficient in inducing strong IgG1 and wider antibody responses than cytoplasmic or membrane-bound antigens, showing that release of the plasmid-encoded antigen could have an important role to play in the balance of Th1/Th2-profile [Boyle *et al.*, 1997a]. We did not detect any secretion of plasmid-encoded Sh28GST *in vitro* and the DNA of Sh28GST does not contain any signal peptide (data not shown). Nevertheless, we demonstrated, that plasmid-encoding a GST from the *Schistosoma mansoni* parasite appeared to be released from the *in vivo* transfected cells after intradermal immunization [Dupré *et al.*, 1997]. This suggests the participation of an active mechanism for the release of the antigen, which could be a CTL-induced lysis as observed for intramuscular immunization [Corr *et al.*, 1996]. When we coadministered pCR3.1 plasmid with Sh28GST, we observed a very similar profile than the one obtained after DNA immunization, thus indicating the role of the plasmid backbone in the maturation of the specific anti-Sh28GST antibody response. Bacterial DNA and CpG motifs act as Th1-adjuvant [Chu *et al.*, 1997 ; Pisetsky, 1996] and previous studies reported an important role of CpG motifs in the efficacy of DNA vaccines, where plasmid backbone stimulates innate immune system to produce Th1 cytokine [Klinman *et al.*, 1997 ; Leclerc *et al.*, 1997]. This cytokine production induced specifically antibody class switching to IgG2 isotype production. Moreover, bacterial DNA and CpG oligonucleotides are capable of interacting directly with B-cells [Krieg *et al.*, 1995 ; Sun *et al.*, 1997] and thus could represent some costimulatory signals for switching the isotypic profile of antibody responses. The originality of our results lies in that the presence of plasmid DNA (either in combination with the protein or in the DNA vaccine itself) did not completely switch the Th2-type response towards a pure Th1 response. Since our model antigen is an active GST enzyme with broad substrate range, it could function in the transfected cells and thus influence the balance of the oxydo-reduction system. It has been shown recently that intracellular signaling after CpG activation uses the redox cascade. Our hypothesis is that expression of the GST enzyme would partially impede the activation by CpG motifs, thus resulting in a mixed profile for the specific antibody response.

Only a few enzymes were used as antigens in DNA immunization experiments. Indeed β -galactosidase or luciferase were used as reporter molecules for studying gene expression in genetic immunization [Wolff *et al.*, 1990]. An under-estimated advantage of the DNA vaccination approach is that, through antigen synthesis in the eucaryotic host cells, it guarantees optimal folding of the plasmid-encoded antigen. This parameter is crucial for strategies in which the delivery of bioactive antigens such as enzymes is necessary. Recently, immunization with a plasmid DNA encoding the catalytic domain of a *trans*-sialidase reduced parasitemia and mortality after *Trypanosoma cruzi* infection in mice, associated with antibody production that neutralized the enzymatic activity of this antigen which is a virulent factor of infection [Costa *et al.*, 1998]. In our model, neutralization of GST enzymatic activity is also associated to protective mechanisms acting preferentially on parasite fecundity [Xu *et al.*, 1991]. This is of major importance since layed eggs that become trapped in the tissues of the host are responsible for the pathology [Riveau *et al.*, 1996]. Here we observed that DNA immunization was able to generate neutralizing antibody. Furthermore following the boost, DNA-primed mice had the highest inhibitory ability.

In conclusion, our results strongly suggest that DNA vaccination represents a particularly promising vaccine strategy against extracellular organisms, which elimination depends on antibody-mediated immune mechanisms. The immunostimulatory role of DNA on the nature of humoral response that was characterized here should open new areas of research not only for improving genetic vaccines but also for the rational development of a novel class of immunomodulatory molecules.

REFERENCES

- Anderson, R., Gao, X.M., Papakonstantinou, A., Roberts, M. & Dougan, G. 1996. Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of Tetanus toxin. *Infect. Immun.* **64**: 3168-3173.
- Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. & Capron, A. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**: 3448-3453.
- Boulanger, D., Warter, A., Trottein, F., Mauny, F., Bremond, P., Audibert, F., Couret, D., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Pierce, R.J., Lecocq, J.P., Sellin, B. & Capron, A. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally

- infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione *S*-transferase clones from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* **17**: 361-369.
- Boyle, J.S., Koniaras, C. & Lew, A.M. 1997a. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int. Immunol.* **9**: 1897-1906.
- Boyle, J.S., Silva, A., Brady, J.S. & Lew, A.M. 1997b. DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14626-14631.
- Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T.D., Steinmann, R.M. & Bona, C.A. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med* **186**: 1481-1486.
- Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V. & Harding, C.V. 1997. CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med* **186**: 1623-1631.
- Condon, C., Watkins, S.C., Celluzi, C.M., Thompson, K. & Louis D. Falo, J. 1996. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Medicine* **2**: 1122-1128.
- Corr, M., Lee, J.L., Carson, D.A. & Tighe, H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* **184**: 1555-1560.
- Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., Ribeiro, M., Schenkman, S. & Rodrigues, M.M. 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of *trans*-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* **16**: 768-774.
- Davis, H.L., Mancini, M., Michel, M.L. & Whalen, R.G. 1996. DNA-mediated immunization to Hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14**: 910-915.
- Davis, H.L., Weeranta, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J. & Krieg, A.M. 1998. CpG is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant Hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* **160**: 870-876.
- Deck, R.R., DeWitt, C.M., Donnelly, J.J., Liu, M.A. & Ulmer, J.B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* **15**: 71-78.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W. & Liu, M.A. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 617-648.
- Dubois, B., Vanbervliet, B., Fayette, J., Massacrier, C., Kooten, C.V., Brière, F., Banchereau, J. & Caux, C. 1997. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **185**: 941-951.

- Dupré, L., Poulain-Godefroy, O., Ban, E., Ivanoff, N., Mckranfar, M., Schacht, A.-M., Capron, A. & Riveau, G. 1997. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* **19**: 503-513.
- Grzych, J.M., Grezel, D., Xu, C.B., Neyrinck, J.L., Capron, M., Ouma, J.H., Butterworth, A.E. & Capron, A. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **150**: 527-635.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jacoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 73.
- Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Orme, I.M., Baldwin, S., D'Sousa, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandenbussche, P., Vooren, J.-P.V., Liu, M.A. & Ulmer, J.B. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine* **2**: 893-898.
- Klinman, D.M., Yamshchikov, G. & Ishigatsubo, Y. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* **158**: 3635-3639.
- Krieg, A.M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. & Klinman, D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* **374**: 546-549.
- Kuhröber, A., Wild, J., Pudollek, H.-P., Chisari, F.V. & Reinmann, J. 1997. DNA vaccination with plasmids encoding the intracellular (HBcAg) or secreted (HBeAg) form of the core protein of hepatitis B virus primes T cell responses to two overlapping K^b- and K^d-restricted epitopes. *Int. Immunol* **9**: 1203-1212.
- Leclerc, C., Dériaud, E., Rojas, M. & Whalen, R.G. 1997. The preferential induction of a Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunostimulatory effect of the plasmid DNA. *Cell. Immunol.* **179**: 97-106.
- Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. & Heeg, K. 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvant. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2340-2344.
- Pisetsky, D.S. 1996. Immune activation by bacterial DNA: A new genetic code. *Immunity* **5**: 303-310.
- Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M. & Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9519-9523.

- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J.A., Roman, M., Swain, S.L., Spiegelberg, H.L. & Carson, D.A. 1996. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **93**: 5141.
- Riveau, G.J. & Capron, A. 1996. Vaccination against schistosomiasis: concepts and strategies. In *Concepts in Vaccine Design*. S.H.E. Kaufmann (ed.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York. p. 509-532.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.-D., Silvermann, G.J., Lotz, M., Carson, D.A. & Raz, E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*. **273**: 352-354.
- Schirmbeck, R., Böhm, W., Ando, K., Chisari, F.V. & Reinmann, J. 1995. Nucleic acid vaccination primes Hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol.* **69**: 5929-5934.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S.L. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9866-9870.
- Sparwasser, T., Koch, E.S., Valulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W. & Wagner, H. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2045-54.
- Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P. & Sprent, J. 1997. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J. Immunol.* **159**: 3119-3125.
- Tighe, H., Corr, M., Roman, M. & Raz, E. 1998. Gene vaccination: plasmid DNA is more than a blueprint. *Immunol. today* **90**: 89-97.
- Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. & Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1**: 363-369.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. **247**: 1465-1468.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J.M., Tartar, A. & Capron, A. 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* p-28-1 antigen. *J. Immunol.* **142**: 1342-1350.
- Xu, C.-B., Verwaerde, C., Grzych, J.-M., Fontaine, J. & Capron, A. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1801-1807.

Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z.Y., Zaki, S.R., Nabel, E.G., Nichol, S.T. & Nabel, G.J. 1998. Immunization for Ebola virus infection. *Nat. Med.* **4**: 37-42.

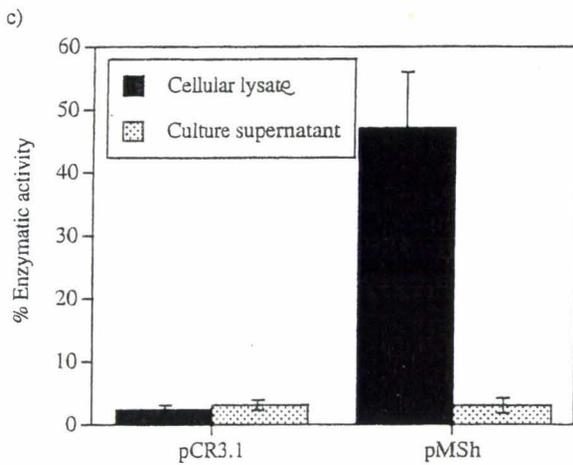
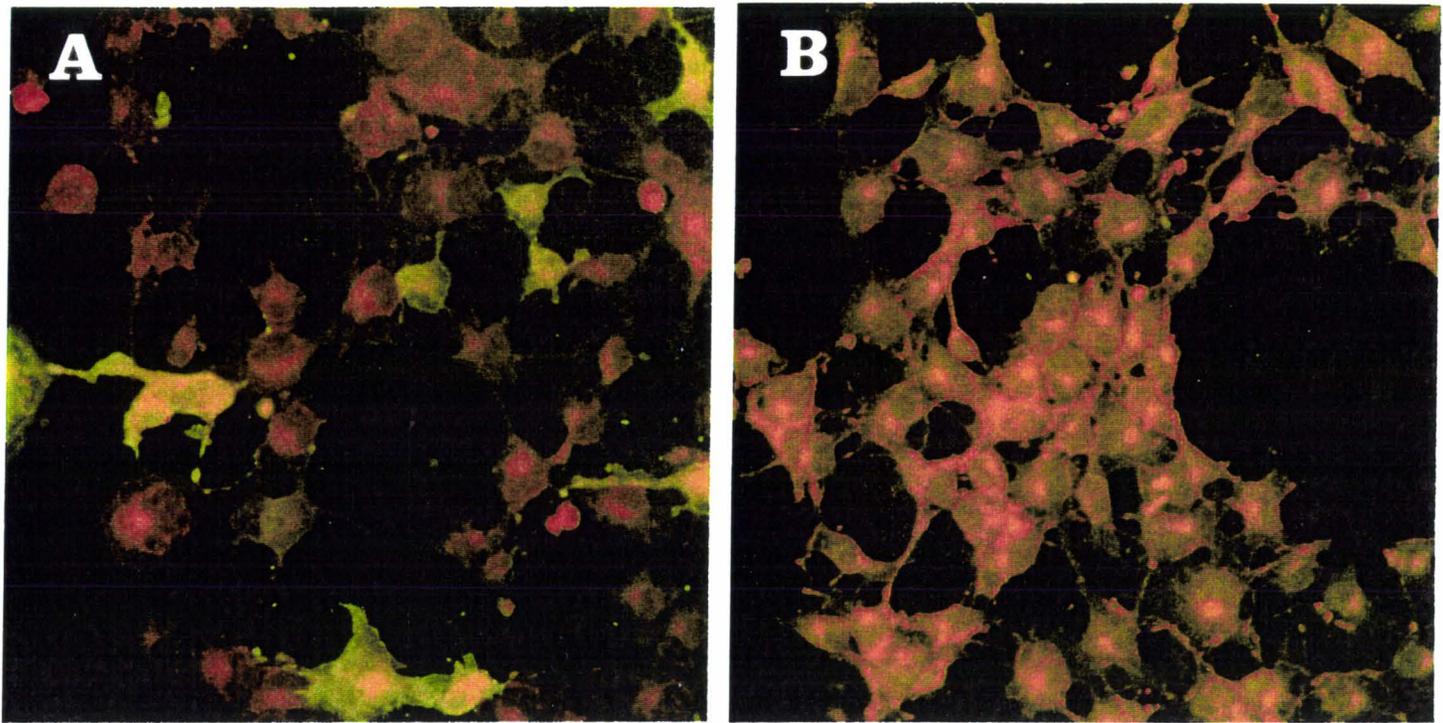


Figure 1: Detection of Sh28GST after transfection of COS-1 cells.

Sh28GST expression was detected by immunofluorescent labelling of permeabilized COS-1 cells transfected with pMSh plasmid (a) or with pCR3.1 plasmid (b). The enzymatic activity of plasmid-encoded Sh28GST was performed with 25 μ l of cellular lysate compared to that of 250 ng of recombinant Sh28GST (c). The amount of Sh28GST used in this activity enzymatic assay was evaluated by ELISA on cellular lysate of COS-1 transfected cells.

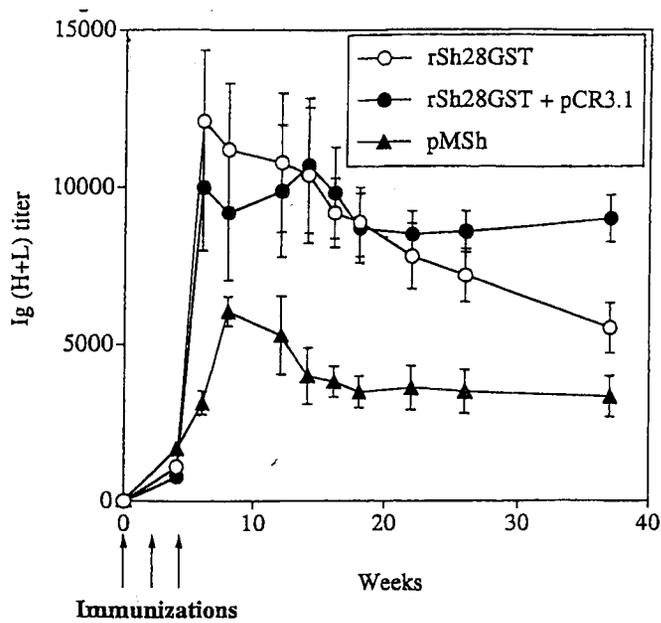


Figure 2: Anti-Sh28GST antibody response after DNA or proteic priming.

Seven immunized mice with 20 μ g of rSh28GST (open circles), 20 μ g of rSh28GST + 100 μ g of pCR3.1 plasmid (closed circles) or 100 μ g of pMSh (closed triangles) were tested for anti-Sh28GST ELISA following three intradermal immunizations with 100 μ g pMSh or 20 μ g rSh28GST performed at week 0, 2 and 4 (c). Titer was calculating as the reciprocal of serum dilution yielding 3 times the value obtained for the background (no serum added). The detection limit of the assay was a titer of 50. Individual serum response of pCR3.1 immunized and naive mice has been omitted for simplicity. Each serum was separately analyzed and the mean value of each group was calculated as standard deviation.

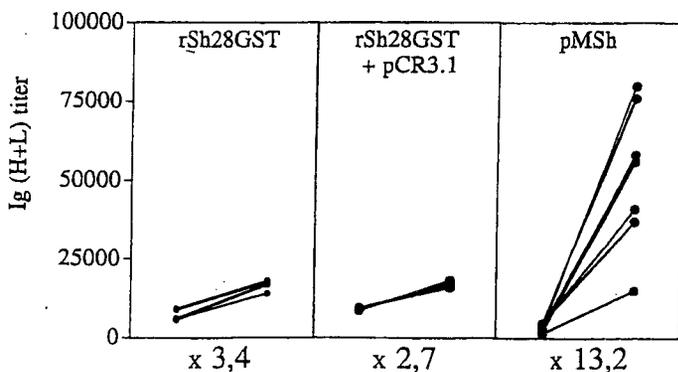


Figure 3: Boosting effect.

The primed-mice were intradermally boost with protein 20 μ g rSh28GST at week 37. Individual serum response against Sh28GST were determined in immunized mice with 20 μ g of rSh28GST, 20 μ g rSh28GST + 100 μ g of pCR3.1 plasmid, or 100 μ g of pMSh before (week 37) and two weeks after the boost (week 39). Recall index (Ig (H+L) after boost/ Ig (H+L) before boost) was indicated at the bottom of the figure correspondent to each group.

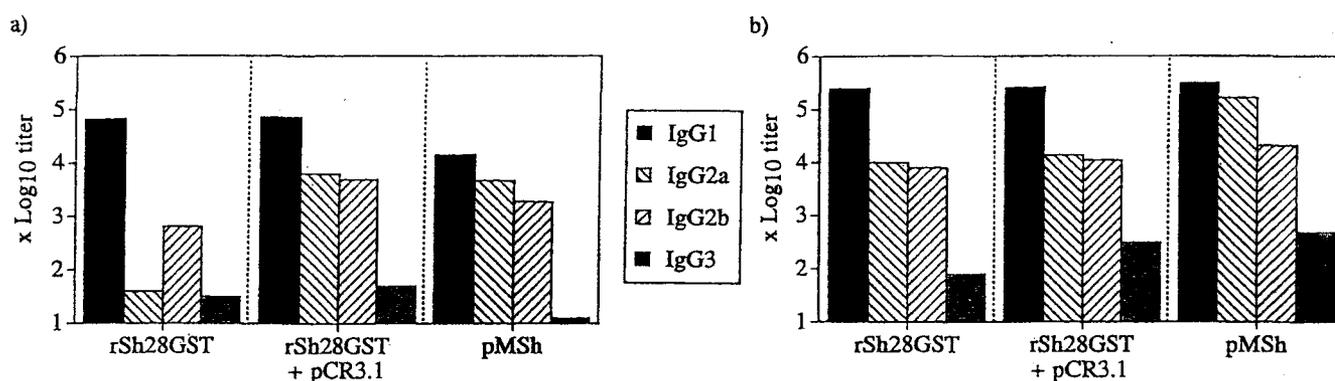


Figure 4: Antibody isotype profiles.

Anti-Sh28GST IgG1 (black bars), IgG2a (striped bars), IgG2b (striped bars) and IgG3 (grey bars) titers were determined before boost (a) and after boost with 20 µg of rSh28GST (b). Pooled sera of Balb/c mice primed with 20 µg Sh28GST, 20 µg Sh28GST + 100 µg pCR3.1 or 100 µg of pMSh were used for ELISA. Titers were calculated as the reciprocal of serum dilution yielding 3 times the value obtained for the background (no serum added) and are given in log10.

Priming	% Enzymatic inhibition	
	Before boost	After boost
rSh28GST	66,1 %	90,4 %
rSh28GST + pCR3.1	82,9 %	88,5 %
pMSh	46,3 %	93 %

Table I: Neutralization of Sh28GST enzymatic activity.

The neutralization of the enzymatic activity of 20 µg/ml of rSh28GST was evaluated with 10 µl of pooled sera of immunized mice with 20 µg Sh28GST, 20 µg Sh28GST + 100 µg pCR3.1 or 100 µg of pMSh. The neutralizing activity was analysed before (week 37) and after the boost (week 39).

5. Etude de l'efficacité de l'association vaccination ADN Sm28GST et chimiothérapie au praziquantel

5.1. RESUME

Bien que les anticorps induits par la vaccination ADN / GST semblent capables de pouvoir participer à des mécanismes impliqués dans la protection (ADCC et inhibition de l'activité enzymatique GST), l'efficacité de protection vis-à-vis d'une infection d'épreuve s'avère limitée. Il convient de rappeler que les antigènes GST, bien qu'exprimés à chacun des stades du développement du parasite ne sont pas présentés à la surface. Ainsi, les réponses immunes développées naturellement au cours de l'infection sont relativement faibles vis-à-vis de cette famille d'antigènes. Les GST sont des enzymes cruciales du parasite qui n'a donc pas intérêt à les rendre accessibles au système immunitaire de l'hôte. Nous présentons dans l'article qui suit un moyen de rendre les cibles antigéniques GST des vers adultes accessibles aux attaques de l'hôte.

Ainsi, l'emploi combiné de la vaccination ADN / Sm28GST et de la chimiothérapie au Praziquantel (PZQ) permet d'aboutir à un véritable démasquage de l'antigène GST, notamment au niveau des tubercules des vers mâles. Ce démasquage permet alors une potentialisation de la reconnaissance des parasites par les anticorps spécifiques. Cette véritable synergie entre vaccination et traitement a permis d'aboutir chez les souris vaccinées, puis traitées après infection, à un contrôle de la pathologie. Cet effet protecteur semble être induit par une potentialisation à la fois de la destruction des vers et de l'effet antifécondité. En outre, ce protocole a engendré une maturation de la réponse immune spécifique vers la production d'IgA, isotype associé à une résistance à la réinfection dans les populations humaines.

5.2. CONTROLE DE LA PATHOLOGIE INDUITE PAR *S. MANSONI* PAR L'ASSOCIATION DE LA VACCINATION ADN SM28GST ET DU TRAITEMENT AU PRAZIQUANTEL

CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS PATHOLOGY BY COMBINATION OF SM28GST DNA IMMUNIZATION AND PRAZIQUANTEL TREATMENT

Loïc Dupré, Maxime Hervé, Anne-Marie Schacht,

André Capron, and Gilles Riveau

Laboratory of Host-Parasite Interactions and Vaccine Strategies, INSERM U 167,

Pasteur Institute of Lille, France

Reprints or correspondence: Dr Gilles Riveau, INSERM U167, Pasteur Institute of Lille, 1, rue du
professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France (gilles.riveau@pasteur-lille.fr).

ABSTRACT

Today the control of schistosomiasis infection relies only on the use of praziquantel (PZQ) chemotherapy. However PZQ treatment cannot prevent reinfection and progressive development of the pathology. we assessed in a mouse model the efficiency of a combined therapy based on the association of PZQ chemotherapy with *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase (Sm28GST) DNA vaccination designed at limiting the pathology. Consequently to this combined therapy, the long-term survival of the mice was largely enhanced and the pathology was almost completely prevented by a dramatic reduction of egg deposition in the tissues. We showed that PZQ treatment induced the unmasking of native GST enzyme at the surface of the worms, thus permitting its neutralization by the antibodies raised by DNA immunization. This study provides insights into the synergistic mechanisms involved in an immunointervention strategy associated with chemotherapy for the control of a chronic infection and its associated pathology.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is the second endemic parasite disease after malaria and is responsible for 500,000 deaths annually. Schistosomiasis-associated pathology is directly linked to the number of eggs laid by the worms and in the case of *Schistosoma mansoni* infection, the accumulation of eggs in the liver leads to granuloma formation and fibrosis. The ideal treatment of the disease would thus have to combine an effect on the infection as well as an effect on parasite fecundity in order to limit deposition of eggs in the tissues and subsequent development of the pathology. PZQ chemotherapy has been the only method widely used for controlling schistosomiasis infection [1, 2]. PZQ appears to act primarily on the structure of the tegument of the worms and thus generate a Ca^{2+} influx, which leads to muscular contraction [3]. Several reports indicate that humoral response of the host is implicated in the efficiency of PZQ. Indeed, it has been reported that the efficacy of PZQ treatment was reduced in areas where outbreaks of the infection have recently occurred in patients that had not yet developed protective immunity [4]. Moreover, PZQ has a reduced potency in T-cell- [5] and B-cell- [6] deprived mice which can be restored by the passive transfer of either

homologous immune serum or purified immunoglobulins [6]. In immunologically intact mice, the efficacy of PZQ can be enhanced by the passive transfer of sera from rabbits immunized with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens [7], or by vaccination with a preparation of worm membrane antigens [8]. This mechanism would result in enhanced killing of the worms through antibody-dependent cellular reactions [9].

The implication of the humoral immune response in the efficiency of PZQ should guide the development of new control strategies aimed at complementing the effects of PZQ chemotherapy. Indeed, although PZQ chemotherapy is efficient against the infection itself, its overall efficiency is limited by the fact that it does not prevent reinfection and development of the pathology. Intensive research has led to the development of vaccine-based control strategies and a few molecules are now approaching the clinical testing stage [10]. One of the most promising vaccine candidates against *S. mansoni* infection is the 28 kDa glutathione *S*-transferase (Sm28GST) molecule [11-13]. The advantage of GST vaccination relies on its ability to strongly reduce both worm burden and female worm fecundity [14]. This anti-fecundity effect appears to be related to the induction of antibodies inhibiting GST enzymatic activity [15-17]. Hence, the need for a native antigen to generate neutralizing antibodies prompted us to use a DNA-based approach [18-22]. In the model of 28GST, DNA transfection is likely to produce the antigen with the proper folding in the eukaryote host cells as shown by our *in vitro* experiments in which enzymatic activity was assessed (unpublished results). We thus investigated whether the specific antibody response generated by Sm28GST DNA immunization [23] could potentiate the effect of PZQ treatment. This report provides the first evidence that DNA vaccination can efficiently be used in combination with drug treatment in multi-therapy strategies. The immunotherapeutic approach used here is particularly efficient for controlling *S. mansoni*-associated pathology.

MATERIAL AND METHODS

Plasmid purification and injection to mice. The Sm28GST expression plasmid, pNip28, has already been described in detail elsewhere [23]. Plasmid DNA was purified by centrifugation in a discontinuous caesium chloride gradient

and redissolved in filter-sterilized apyrogenic normal saline at a final concentration of 1 mg/ml. For DNA immunization, female Balb/C mice were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) and were aged 6 weeks at the commencement of the experiments. Three successive intradermal administration of 100 µl of the plasmid solution were performed at 2 week-intervals with the indicated dosage. Injections were made into the shaved abdominal skin of the animals at four separate locations. Blood samples were collected from the retro-orbital sinus of the animals and sera were stored at -20° C until required for further use.

Parasite infection, praziquantel treatment and perfusion. Parasite infection was performed by application of 60 furcocercariae (Guadeloupe strain) in 200 µl of mineral water (Société des Eaux de Volvic, France) to the shaved abdominal skin of anaesthetized mice for 30 minutes. A single 300 mg/kg subcurative dose of praziquantel (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was administered orally 35 days after parasite infection. Praziquantel was prepared in sterile water containing 2% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) as a 30 mg/ml solution. Deaths were recorded at regular intervals and survival rates were compared for the whole period (day 101 - day 274) using a Wilcoxon test. Worms were recovered from the surviving mice by total perfusion with a 1% heparin saline solution. The liver, intestines, spleen and lungs were digested overnight in a 4% KOH solution. The number of eggs present in the different organs as well as the number of worms was counted using optical microscopy. Statistical analysis of the differences in worms and eggs between the experimental groups was performed using a student's *t*-test.

Inhibition of Sm28GST enzymatic activity. Sm28GST enzymatic activity was measured after one hour incubation at 37° C of 100 ng recombinant Sm28GST (Transgène, Strasbourg, France) with 10 µl of the tested sera. Two hundred microliters of reaction buffer (50 mM potassium phosphate, pH 6.5 containing 0.36 mM 1-chloro-2, 4 dinitrobenzene and 4.76 mM GSH) were added and enzymatic activity was monitored spectrophotometrically at 340 nm every 15 seconds for 2 minutes using an automated microplate reader. Percent of inhibition was calculated according to the formula: $100 - [(X - Y) \times 100] / Z$, where X is the activity of enzyme in presence of tested serum, Y is the background activity of tested serum and Z is the activity of Sm28GST in the absence of serum. Each inhibition test was performed in duplicate. For the measurement of GST activity associated to the worms (PZQ-treated and untreated), the

enzymatic assay was performed with one washed worm pair per well with or without the presence of sera from immunized mice. Optical density was monitored for 2 hours following the addition of substrate buffer.

Evaluation of the pathology. Standard colorimetric aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) measurements were conducted by the Service de Biologie SpÉcialisÈe of the Pasteur Institute of Lille. Liver, spleen and lungs were examined morphologically before fixation of tissue samples in a Bouin solution (75%v/v saturated picric acid, 10%v/v formaldehyde, 5%v/v acetic acid) and dehydrated in ethanol prior to embedding in paraffin. Four-micrometer-thick sections were deparaffinated in toluene, rehydrated and stained with haematoxylin.

Tegumental expression of Sm28GST and mRNA levels in untreated and PZQ-treated worms. In a parallel experiment, naive mice were infected with 60 cercariae and treated with 300 mg/kg praziquantel 35 days latter. Worms from untreated and PZQ-treated mice were harvested 90 min after treatment. For the indirect immunofluorescence (IIF) measurements, worm pairs were incubated in a 1:500 dilution (in PBS supplemented with 5% FCS) of Sm28GST-specific or naive rabbit serum for 1 hour at 20• C. After three washes in PBS, worms were incubated in a 1:100 dilution of FITC-labelled goat anti-rabbit IgG (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France). Worms were washed again and then mounted on slides in Fluoprep (BioMÈrieux, Marcy lÈtoile, France). RT-PCR analysis was performed on RNA extracts from an aliquot of the worms used for IIF and enzymatic activity measurements. Briefly, total RNA was extracted with RNA-ZOL reagent (Bioprobe Systems, Montreuil, France). Reverse transcription was performed on 2 µg of RNA using oligo dT (Pharmacia Biotech, Orsay, France) and Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France). PCR was performed on 100 ng of reverse transcribed RNA with a primer pair specific for the Sm28GST sequence and with appropriate amplification conditions [24].

RESULTS

Antibody response. After DNA vaccination, the intensity of the specific IgG antibody response at day 65 was proportional to the amount of plasmid administered with no detectable specific antibody response in mice receiving less than 10 µg of pNIp28 and in mice receiving the control plasmid (Fig. 1A). The parasite infection through the skin systematically induced a rapid anamnestic response on the specific Sm28GST DNA-primed IgG antibody response. No specific antibody response was detected in infected mice that had received 100 µg doses of the control plasmid. At day 101, all groups of mice including the control group presented, as a consequence of the ongoing infection, a notable IgG antibody response specific to Sm28GST. However, the groups immunized with 10, 50 or 100 µg of pNIp28 had higher level of IgG antibodies than the other two groups (i.e. the groups having received 5 µg doses of pNIp28, and control group). Following the administration of PZQ treatment on day 101, an increase in the IgG antibody response was observed in immunized animals, especially in mice administered with the highest doses of plasmid. In addition, in mice immunized with 10, 50, or 100 µg of plasmid PZQ treatment induced the appearance of a specific IgA antibody response at day 126 that was undetected before the treatment (Fig. 1B). By day 274, the specific IgA antibody response had further increased in a dose-dependent manner. During the course of the experiment the dominant IgG isotype was IgG1, while neither IgM nor IgE could be detected (data not shown). Thus, PZQ treatment induced both an amplification and a maturation of the specific antibody response presumably as a result of parasite killing.

Inhibition of Sm28GST enzymatic activity by immune sera. We have shown in vitro that mammalian cells transfected with pNIp28 produced a Sm28GST protein with Glutathione S-Transferase activity (unpublished results). This attests the proper folding of the produced GST and led to the prediction that in vivo administration of pNIp28 would produce inhibitory antibodies. Effectively, the sera of mice immunized with 100 µg of pNIp28 plasmid were able to notably inhibit Sm28GST enzymatic activity (Table 1). After parasitic infection, neutralizing activity increased further in the sera of animals that received 100 µg of immunizing plasmid and was detectable in sera of animals that received 50 µg as well. The inhibitory capacity of sera from animal immunized with plasmid DNA was

again significantly enhanced After PZQ treatment. This neutralizing activity was still significant after 274 days. At this latest time point, neutralizing capacity towards Sm28GST activity could also be measured in the sera of mice that received as little as 5 or 10 µg of pNIp28. Thus, the combination of DNA vaccination and PZQ treatment induced a long-lasting inhibitory antibody response.

Survival of PZQ-treated mice. In order to assess the efficiency of the strong inhibitory antibody response obtained by the association of Sm28GST DNA immunization with PZQ treatment, the survival time course of the infected mice was recorded (Fig. 2). In the group previously injected with 100 µg doses of the control plasmid pRc/CMV, deaths occurred as early as day 108 (which corresponds to 42 days after parasite infection). By day 248, more than half of the control mice (9/17) had died. Dead animals presented severe pathology and were generally harbouring over 10 live worms (data not shown). In contrast, animals immunized with 10, 50 and 100 µg of the Sm28GST-encoding plasmid pNIp28 displayed an excellent survival rate ($p < 0.05$, Wilcoxon test) with only one animal from these groups of 7 animals dying during the time course of the experiment. Therefore, PZQ treatment efficiency was potentiated by prior immunization with Sm28GST DNA most probably by increasing parasite killing.

Egg and parasite loads in surviving mice. Eggs were systematically recovered from the liver, intestines, lungs and spleen of the mice at day 274. Immunization with 100 µg of plasmid DNA induced a significant ($p < 0.01$) 86% reduction in the number of eggs in tissues when compared to the control mice (Fig. 4A). None of the immunized mice had eggs entrapped in the lungs or spleen. Of particular interest was the fact that 3 mice out of 6 exhibited no egg charge at all (even though two of them still harboured live parasite pairs). There was also a reduction (ranging from 30 to 49%) of egg loads in the groups receiving pNIp28 plasmid doses of 10 and 50 µg, although none of the mice were completely egg-free. The group corresponding to the smallest dose of pNIp28 plasmid (5 µg) exhibited egg loads at a very similar level to the controls. Examination of the morphology of tissue eggs indicated that there was more black eggs (non-viable eggs) in mice receiving the highest dosage of pNIp28 (50%) than in mice receiving the intermediate dosages of pNIp28 (30%) and mice receiving the lowest dosage of pNIp28 or the control plasmid (<20%) (data not shown). Reduction of the egg load was not merely due to parasite death since at this latest time

point no significant difference was found in the number of worm pairs (average of one) that were recovered from the surviving mice in the different groups (Fig. 4B). Thus, these results strongly support that parasite ability to lay eggs would be affected by the Sm28GST DNA immunization.

Pathological state of surviving mice. The ratio of serum transaminases aspartate transaminase / alanine transaminase (AST/ALT) can be used as a biochemical marker for evaluation of schistosomiasis-induced pathology in humans [25]. As shown in table 2, there was a substantial increase in the AST/ALT ratio from the beginning of the experiment to day 274 for the control group as well as for the groups immunized with only 5 or 10 µg pNip28 plasmid. In contrast, the AST/ALT ratio was either unchanged or only modestly affected for the groups immunized with the two highest doses of pNip28 plasmid. The levels of the AST/ALT ratio were in accordance with macroscopic and microscopic observations of the pathology. Indeed, immunized mice exhibited no obvious macroscopic signs of pathology whereas control mice had a severe hepato-splenomegaly with signs of granuloma formation in the lungs (Fig. 5). At the histological level, organs from the mice immunized with 100 µg pNip28 presented very limited pathology with relatively few egg-induced granulomas in the liver (Fig. 6A) and any histopathological disorder in the lungs (Fig. 6D). In contrast, the lungs and the liver of only-treated mice were the site of extensive fibrosis around considerable numbers of eggs associated with cellular infiltrates (Fig. 6D). Thus, combined therapy lead not only to a better survival rate but also to a dramatic reduction of *S. mansoni*-associated pathology when compared to chemotherapy only.

Recognition of parasite Sm28GST by specific antibodies. To assess the mechanisms involved in the synergy between the DNA vaccine and PZQ therapy, we set up an independant experiment, in which we studied the effect of this drug alone on antigen expression on the parasite. Immunostaining experiments on worms collected from PZQ-treated mice were positively stained by anti-Sm28GST antibodies while worms collected from untreated mice displayed only background level of staining (Fig. 3A). The specific labelling was clearly predominant on the tubercles of the male parasites. In order to confirm the increase in surface expression of Sm28GST, the enzymatic activity was assayed on the whole worms in vitro. We showed that the rate of hydrolysis of 1-chloro-2, 4

dinitrobenzene was more than twice as high in worms harvested from PZQ-treated mice ($6.3 \cdot 10^{-3}$ OD/min) compared to the worms from untreated mice ($2.7 \cdot 10^{-3}$ OD /min) (Fig. 3B). In addition, The results of RT-PCR experiments conducted on RNA extracted from treated and untreated worms showed that there was no up-regulation of the Sm28GST mRNA levels 90 minutes after PZQ treatment (Fig. 3C). Thus, the presence of Sm28GST enzyme at the surface of adult worms was an immediate consequence of drug-induced exposure of concealed enzyme rather than a rapid transcriptional regulation and a de novo synthesis. We then tested whether the antiserum generated by Sm28GST DNA immunization could inhibit the enzymatic activity of the disclosed GST on the worm surface. The antibodies generated by Sm28GST DNA immunization were found to inhibit the worm-associated enzymatic activity from PZQ treated mice from $6.3 \cdot 10^{-3}$ OD/min to $4.1 \cdot 10^{-3}$ OD/min (Fig. 3B). Taken together, these results indicate that the unmasking of surface Sm28GST by PZQ allowed the binding of DNA-raised neutralizing antibodies.

DISCUSSION

PZQ chemotherapy applied in human populations has been suggested to be subcurative since cure rates are often reported to be less than 100% [26]. Incomplete efficiency of chemotherapy could thus lead to the selective transmission of resistant strains of parasites as it has been reported in recent reports [27-31]. Since the full potency of PZQ relies on the concomitant action of adapted immune responses [32], we developed a combined therapy, consisting of Sm28GST DNA vaccination associated with subcurative PZQ chemotherapy and evaluated its efficacy in the context of *S. mansoni* infection in mice.

We reported here that survival rate was significantly increased among those animals treated with the combined therapy compared to animals treated with PZQ only. The efficacy of this novel therapeutic approach was found to be related to the dose of immunizing plasmid administered. Indeed, more than 85% of the animals vaccinated with the three highest doses of plasmid and then treated with PZQ survived a thirty-week infection, whereas less than 50% of the animals survived when they were injected with either the lowest dose of plasmid

encoding Sm28GST (5 µg) or with 100 µg of the control plasmid and then treated with PZQ. The potency of the combined therapy suggests that the specific immune response induced by Sm28GST DNA immunization brought about the killing of the worms in conjunction with the drug and thereby limited the lethal pathology. The mechanism involved in our experiment is synergistic since Sm28GST DNA immunization alone had only a minor effect on worm and egg loads and did not significantly improve animal survival (submitted for publication).

The aetiology of schistosomiasis pathology is linked to an accumulative process of egg deposition mainly in the liver associated with inflammatory granuloma formation. An examination of mice that had died during the experiment revealed that they had developed acute hepato-splenic schistosomiasis and severe lung granulomas. Furthermore, it was striking to note that among the mice that had survived the infection, those animals immunized with the highest pNip28 plasmid doses showed only mild pathological signs if any, whereas all mice from the other groups (immunized with the two lowest pNip28 plasmid doses or with the control plasmid) developed signs of hepatomegaly and splenomegaly. The severity of the pathology determined on the basis of histological observations was related to the biochemical parameter of AST/ALT ratio. This marker of chronic schistosomiasis in humans [25] was found to be constant over the course of infection in the sera of mice immunized with 50 or 100 µg of pNip28 plasmid, whereas it increased strongly in the sera of mice from the other groups. The aetiology of hepato-splenic schistosomiasis is linked to an accumulative process of egg deposition in the tissues. We found that the number of eggs recovered from the tissues of the surviving mice was correlated with the severity of the pathology observed. Indeed, the mice vaccinated with the highest plasmid dose had little or no sign of egg deposition compared to mice in the control group.

Nevertheless, it was surprising that the number and morphological aspect of parasites harvested from surviving mice were not significantly different from one group to another and thus did not correlate with the number of eggs recovered from the tissues. The discrepancies observed between the number of eggs in the tissues and the number of worm pairs could reflect an anti-fecundity effect of the Sm28GST DNA immunization as this protective

effect has been shown to rely on a mechanism dependent on the presence of antibodies with a neutralizing effect towards Sm28GST enzymatic activity [15].

In this study we were able to demonstrate that Sm28GST DNA immunization induced Sm28GST-specific antibodies with enzyme neutralizing capacities which appeared to be correlated to the high potency of the combined therapy. In accordance with other models reported in the literature [20, 33], the level of antibody response which was proportional to the neutralizing capacity of the antibodies elicited by intradermal DNA immunization was related to the amount of injected plasmid DNA. The ability of these antibodies to neutralize the enzymatic activity of Sm28GST highlights an underestimated advantage of DNA-based strategies. Indeed, antibodies generated by DNA immunization might recognize native epitopes with a better affinity [34] because of the in situ synthesis of a optimally folded protein. We have found that DNA vaccination is superior to protein vaccination for inducing neutralizing antibodies against GST (unpublished). The IgG antibody response induced by DNA immunization was highly specific to the native antigen because the natural parasite infection induced a rapid and strong anamnestic effect on this response. This observation, which confirms similar results obtained in the rat model [23], is an indication that the skin immune system would be strongly involved in the reaction of the memory immune responses while the parasite larvae, which naturally express the Sm28GST antigen, penetrate into the organism [35]. However, we observed that the antibody response slightly decreased as the time post-infection progressed. This observation could be related to the maturation process that the parasites undergo leading to the masking of numerous antigens including Sm28GST. The antibody response induced by DNA immunization was again recalled following PZQ treatment which is known to lead to degradation of the parasite tegument [3] and thus generate a second presentation of native Sm28GST antigen and provoke a second boosting of the specific antibody response.

Because the full potency of the commonly used drug PZQ relies on the concomitant action of adapted immune responses [32], we investigated the possible involvement of synergistic mechanisms in the therapy combining Sm28GST DNA immunization and PZQ treatment. The main effector mechanism contributing to the synergy with the drug is dependent on the presence of antibodies capable of recognizing cryptic antigens at the

surface of the worm that become exposed as a consequence of the drug action. Synergistic antibodies identified so far (reviewed in [9]) include a 27-kDa esterase [36], a 200-kDa tubercle glycoprotein [37] and alkaline phosphatase [38]. We found here that, whereas Sm28GST was concealed in intact worms, it became exposed at the surface of the parasites 90 minutes after PZQ treatment. This exposure occurred mainly at the level of the male tubercles which correspond to one of the major localizations of the protein [35, 39]. Moreover, this rapid exposure was accompanied by an increased GST enzymatic activity associated to the worms collected from treated mice. We showed that the presence of the enzyme at the surface of the worms following PZQ treatment was due to an unmasking and not due to a rapid up-regulation of its synthesis as no increase in Sm28GST mRNA levels were observed. Thus, through the action of PZQ, Sm28GST became an accessible target for the antibodies generated by vaccination. These antibodies could then kill treated worms via antibody-mediated cellular reactions as has been already demonstrated in the context of Sm28GST DNA immunization in the rat model [23]. Furthermore, the fact that the antibodies were able to neutralize newly exposed GST enzymatic activity at the surface of the treated worms indicates that they could impede GST-mediated repair and detoxification processes. Indeed, GST enzymes play a determinant role in both the repair of PZQ-damaged worms [40] and the defense of the worms against immune attack [41]. The combined therapy clearly appeared to induce an anti-fecundity effect as well as an effect toward egg viability. In the present work, the treatment with PZQ was performed 6 weeks after the infection and thus corresponded to the period of oviposition and a state at which parasite susceptibility had reached a plateau phase [42-44]. This anti-fecundity effect is thought to be due mainly to the presence of neutralizing Sm28GST antibodies, but it could also be enhanced via the action of PZQ as the drug has been shown to be responsible for changes in the female reproductive system [45] at the level in which Sm28GST localization has been documented [24, 35]. Alternatively, the antifecundity effect observed here could be a consequence of a deficient feeding of the female worms by the damaged male worms.

It has been suggested recently from field studies [46] that PZQ treatment can have an immunizing effect by accelerating the development of the naturally-acquired immune response towards whole parasite antigens. In the case of natural immune responses to Sm28GST, a close association between specific IgA antibodies after PZQ treatment and resistance to reinfection has been reported [47]. We present here that PZQ treatment induced a shift in the

specific antibody response elicited by the DNA immunization leading to a heightened production of specific IgA. Thus, our study provides evidence that PZQ chemotherapy can act as a modulator of a vaccine-induced specific immune response. These observations strongly support the concept that vaccine development against schistosomiasis should be used in association with chemotherapy treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Jean-Pierre Gazet, Monique Leroux and Suzanne VanWingène for technical help and preparation of parasites. We also thank Elisabeth Ban, Jean-Marie Grzych and Ray Pierce for their critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Andrews P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmac. Ther.* **1985**; 29: 119-156.
2. Groll E. Praziquantel. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **1984**; 20: 219-238.
3. Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel J. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Arzneimittel Forschung/Drug Research.* **1981**; 31: 544-554.
4. Stelma FF, Talla I, Sow S, et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an endemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**; 53: 167-170.
5. Sabah AA, Flechter C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. *Exp. Parasitol.* **1985**; 60: 348-354.
6. Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* **1987**; 139: 215-220.

7. Doenhoff MJ, Sabah AAA, Flechter C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**; 81: 947-951.
8. Fallon PG, Doenhoff MJ. Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel. *Parasite Immunol.* **1995**; 17: 261-268.
9. Redman CA, Robertson A, Fallon PG, et al. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today.* **1996**; 12: 14-20.
10. Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccines: research to development. *Parasitol. Today.* **1998**; 14: 99-104.
11. Balloul JM, Grzych JM, Pierce RJ, Capron A. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **1987**; 138: 3448-3453.
12. Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, et al. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* **1987**; 326: 149-153.
13. Grezel D, Capron M, Grzych JM, Fontaine J, Lecocq JP, Capron A. 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.
14. Boulanger D, Reid GDF, Sturrock RF, et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **1991**; 13: 473-490.
15. Xu C-B, Verwaerde C, Grzych J-M, Fontaine J, Capron A. 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.
16. Xu CB, 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.
17. Grzych JM, De Bont J, Neyrinck JL, Fontaine J, Vercruysse J, Capron A. Relationship of impairment of Schistosome 28-Kilodalton Glutathione S-Transferase (GST) activity to expression of immunity to

- Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-Kilodalton GST. Infect. Immun. 1998; 66: 1142-1148.
18. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature. 1992; 356: 152-154.
19. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science. 1993; 259: 1745-1749.
20. Raz E, Carson DA, Parker SE, et al. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 9519-9523.
21. Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 9866-9870.
22. Tascon RC, Colston MJ, Ragno S, Stravropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nature Med. 1996; 2: 888-898.
23. Dupré L, Poulain-Godefroy O, Ban E, et al. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase. Parasite Immunol. 1997; 19: 503-513.
24. Porchet E, McNair A, Caron A, Kusnierz JP, Zemzoumi K, Capron A. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. Parasitol. 1994; 109: 565-572.
25. Ahmed SA, Gad MZ. Diagnostic value of serum lactate dehydrogenase isoenzyme and amino acid patterns in several schistosomal and non-schistosomal disorders as compared to other biochemical parameters. Disease markers. 1996; 13: 19-29.
26. Doenhoff M. Is schistosomicidal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. Parasitol. Today. 1998; 10: 434-435.
27. Fallon PG, Doenhoff MJ. 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.
28. Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, el Azony AS. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. J. Egypt. Soc. Parasitol. 1994; 24: 685-695.

29. Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao L-F, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**; 55: 214-218.
30. Fallon PG, Mubarak JS, Fookes RE, et al. *Schistosoma mansoni*: maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. *Exp. Parasitol.* **1997**; 86: 29-36.
31. Bennett JL, Day T, Liang F-T, Ismail L, Farghaly A. The development of resistance to antihelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp. Parasitol.* **1997**; 87: 260-267.
32. Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitol.* **1992**; 105: S41-S48.
33. Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine.* **1997**; 15: 71-78.
34. Boyle JS, Silva A, Brady JS, Lew AM. DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94: 14626-14631.
35. Liu JL, Fontaine J, Capron A, Grzych J-M. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol.* **1996**; 113: 377-391.
36. Doenhoff MJ, Modha J, Lambertucci JR. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. *Immunology.* **1988**; 65: 507-510.
37. Brindley PJ, Strand M, Norden AP, Sher A. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Molec. Bioch. Parasitol.* **1989**; 34: 99-108.
38. Fallon PG, Smith P, Nicholls T, Modha J, Doenhoff MJ. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. *Parasite Immunol.* **1994**; 16: 529-535.
39. Taylor JB, Vidal A, Torpier G, et al. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **1988**; 7: 465-472.
40. Ribeiro F, Coelho PMZ, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* **1998**; 116: 229-236.

41. Walker J, Crowley P, Moreman D, Barrett J. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Molec. Bioch. Parasitol.* **1993**; 61: 255-264.
42. Xiao SH, Catto BA, Webster JLT. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. *J. Infect. Dis.* **1985**; 151: 1130-1137.
43. Sabah AA, Flechter C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* **1986**; 61: 294-303.
44. Shaw MK. *Schistosoma mansoni*: stage-dependent damage after *in vivo* treatment with praziquantel. *Parasitology.* **1990**; 100: 65-72.
45. Shaw MK, Erasmus DA. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. *Exp. Parasitol.* **1988**; 65: 31-42.
46. Mutapi F, Ndhlovu P, Hagan P, et al. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. *J. Inf. Dis.* **1998**; 178: 289-293.
47. Grzych JM, Grezel D, Xu CB, et al. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **1993**; 150: 527-635.
48. Mielcarek N, Cornette J, Schacht A-M, et al. Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect. Imm.* **1997**; 65: 544-550.

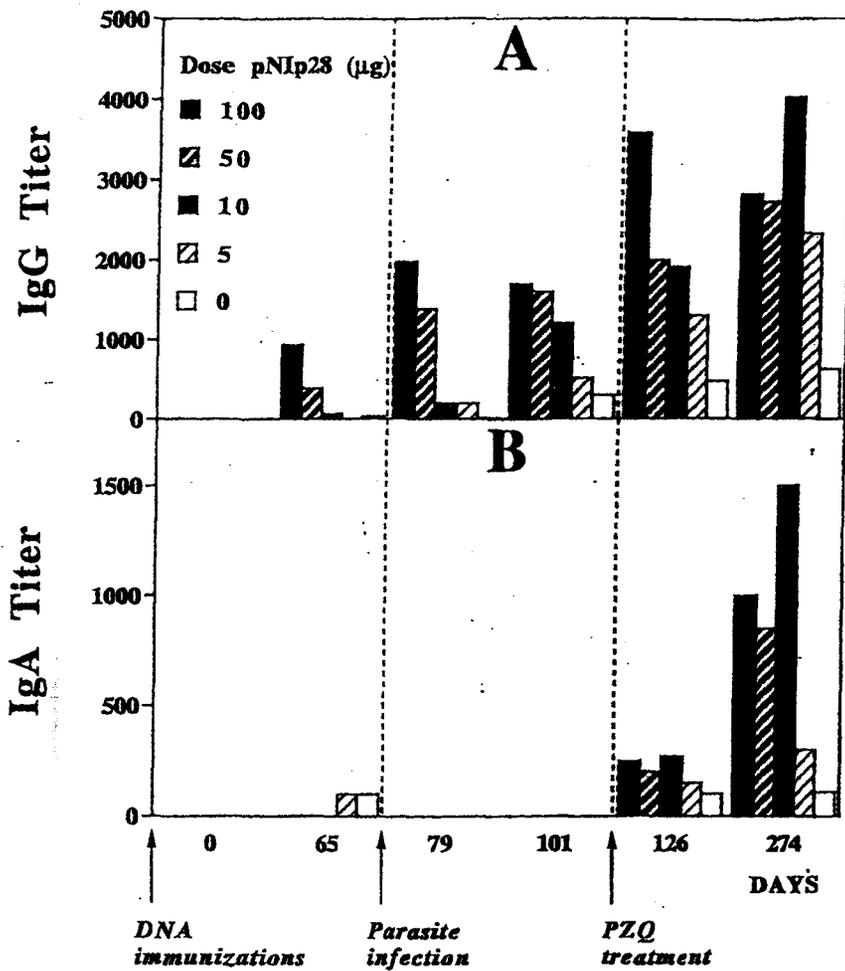


Figure 1. Specific antibody responses in mice immunized with different doses of pNip28. Groups of 7 mice were immunized on days 1, 14 and 28 with 5, 10, 50 or 100 µg of pNip28 and one group of 17 control mice received 100 µg of pRc/CMV on days 1, 14 and 28. Parasite infection was performed with 60 furcocercariae 66 days after the first DNA injection. A single 300 mg/kg dose of PZQ was administered orally 35 days after parasite infection. Sera were collected at the time points indicated. IgG antibodies (A) and IgA antibodies (B) specific to Sm28GST were determined on pooled sera by ELISA, as previously described [48].

Table 1. Capacity of pooled sera from Sm28GST DNA-immunized mice to inhibit Sm28GST enzymatic activity.

Dose pNip28 (µg)	Level of inhibition of Sm28GST enzymatic activity					
	Day 0 <i>Immunization</i>	Day 65 <i>Infection</i>	Day 79	Day 101 <i>PZQ treatment</i>	Day 126	Day 274
100	-*	+	++	++	+++	++
50	-	-	+	+	++	++
10	-	-	-	-	-	+++
5	-	-	-	-	-	+
0	-	-	-	-	-	-

*- corresponds to 0-20% inhibition, + to 20-40%, ++ to 40-60% and +++ to >60% inhibition.

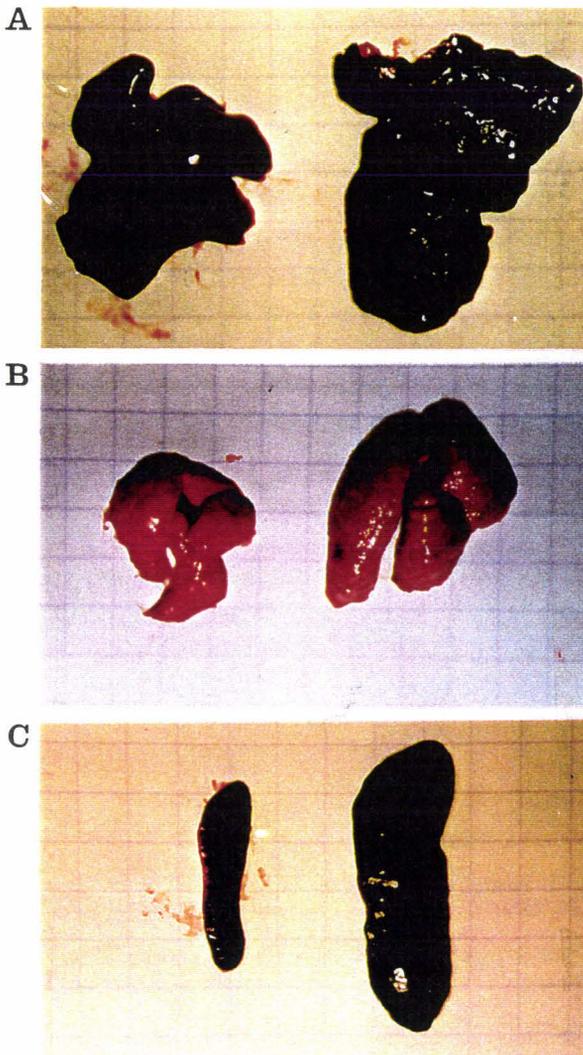


Figure 4. Pathological state.

Organs were collected from surviving mice 274 days after the first DNA injection. Livers (A), lungs (B) and spleens (C) being representative of those observed for animals from the 100 µg pNIP28 group (left panels) and from the 100 µg pRc/CMV group (right panels) are shown.

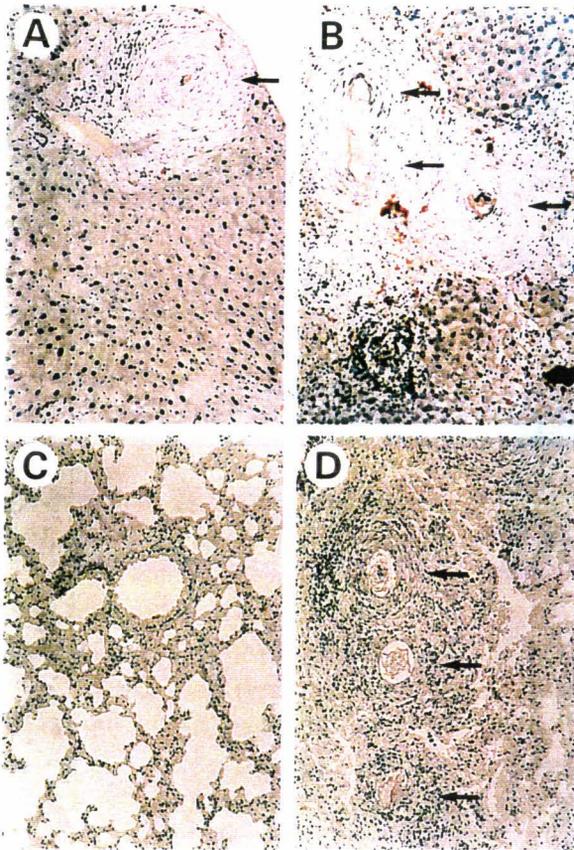


Figure 5. Histological analysis of the livers and lungs.

Paraffin-embedded sections were prepared from organs of surviving mice 274 days after the first DNA injection. Hematoxylin-stained sections of liver from one representative mouse from the 100 µg pNIp28 group (A) and one representative mouse from the 100 µg pRc/CMV group (B) are shown. Also shown from the same animals in (C) and (D) respectively are sections of the lung tissue. Arrows indicate egg-induced granulomas or cellular infiltrations. Magnification is x 200.

Table 2 . Evolution of the transaminase AST/ALT ratio in the pooled sera before (day 0) and after (day 274) combined therapy and *Schistosoma mansoni* infection.

Dose pNIp28 (µg)	AST/ALT ratio Day 0	Day 274	Percentage increase
100	3,9	3,8	0%
50	2,7	3,1	15%
10	2,7	4,8	78%
5	3,6	5,4	50%
0	2,5	4,3	72%

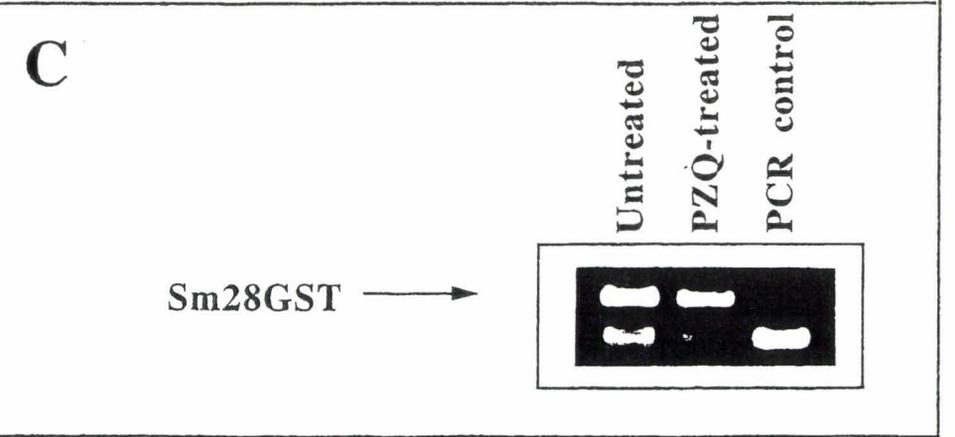
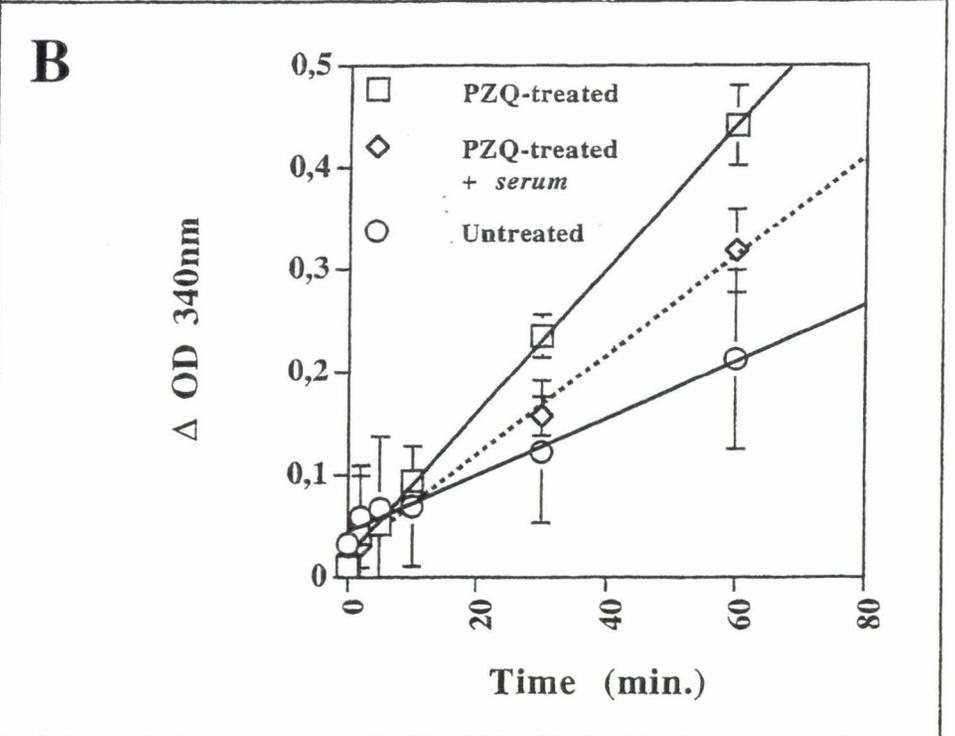
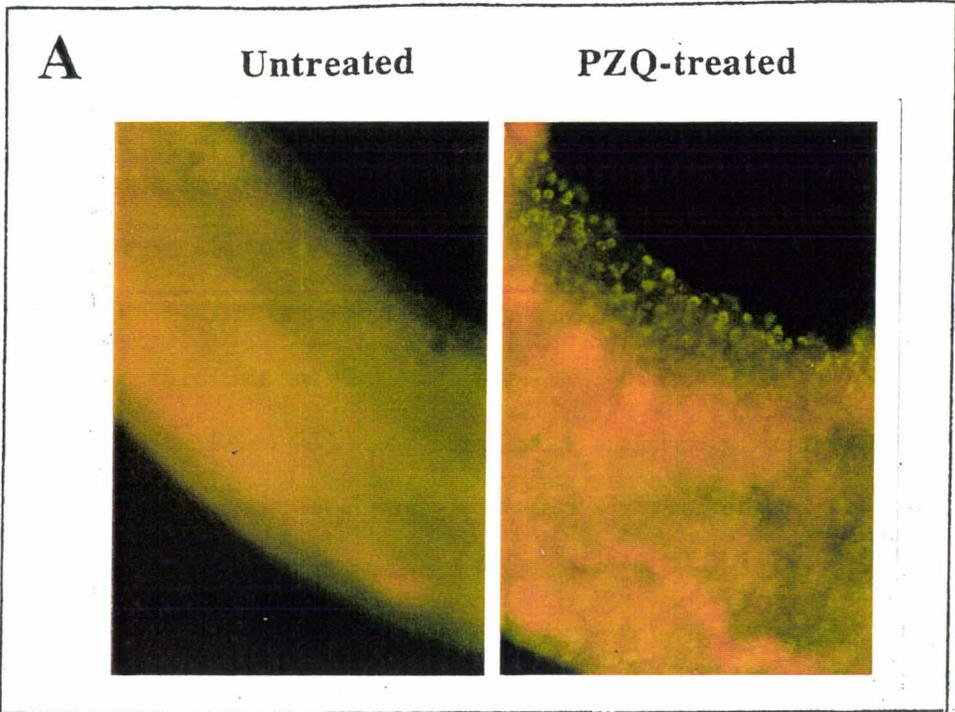


Figure 6. Sm28GST exposure at the surface of the worms following PZQ treatment and recognized by neutralizing antibodies.

A, Indirect immunofluorescence was performed either on worms (35 days infection) harvested from untreated mice (left panel) or on worms (35 days infection) harvested from mice 90 minutes after PZQ administration (right panel). Sm28GST surface expression was revealed using a relevant rabbit antiserum and an FITC-labelled goat anti-rabbit antibody (magnification x 400). **B**, The measurement of GST enzymatic activity was assessed directly on worm pairs harvested in the same conditions as for indirect immunofluorescence (squares: PZQ treated and circles: untreated). In addition, GST enzymatic activity was also assessed on PZQ-treated worms in the presence of 10 ml of pooled sera from 100 µg pNip28-immunized mice collected just before PZQ treatment (diamond shape). **C**, In parallel mRNA levels were determined by RT-PCR on worm pairs also harvested under the same conditions as for indirect immunofluorescence experiments.

6. Immunomodulation génique

6.1. RESUME

Nous avons abordé, dans cette partie du travail, l'étude du profil de la réponse immune mise en place par l'organisme lors des phases précoces de l'infection percutanée par *S. mansoni*. Notre objectif serait de reproduire, par la vaccination ADN intradermique, un profil analogue à celui induit naturellement. Le dosage, par RT-PCR, des niveaux de cytokines dans la peau, 24h après infection, met en évidence que l'expression de l'IL-18 est très fortement induite. Cette cytokine est essentielle pour l'induction d'une réponse de type Th1 puisqu'elle possède une forte activité de stimulation de production d'IFN- γ . Bénéficiant de la souplesse de l'outil ADN, nous avons entrepris un protocole de vaccination ADN associant plasmides codant pour l'antigène Sm28GST et plasmides codant pour la cytokine IL-18.

Cette étude démontre l'efficacité de la combinaison de ces deux plasmides, puisqu'une protection significative est obtenue vis-à-vis d'une infection d'épreuve à *S. mansoni*. Nous obtenons une réduction d'environ 30% de la charge parasitaire et une réduction équivalente du nombre d'œufs tissulaires. Cette protection est reliée à une modulation de la réponse immune spécifique se traduisant par un renforcement de l'axe cellulaire. Ainsi, les cellules spléniques des souris vaccinées sécrètent, après restimulation *in vitro*, 30 fois plus d'IFN- γ lorsque le protocole de vaccination inclue le plasmide IL-18.

6.2. PROTECTION VIS-A-VIS D'UNE INFECTION A *S. MANSONI* PAR ADMINISTRATION COMBINÉE DE PLASMIDES CODANT POUR LA SM28GST ET L'IL-18

CODELIVERY OF SM28GST- AND IL-18-ENCODING PLASMIDS CONFERS PROTECTION AGAINST MURINE *SCHISTOSOMA MANSONI* INFECTION

**Loïc Dupré^{1*}, Laurent Kremer², Isabelle Wolowczuk³,
Gilles Riveau¹, André Capron¹ and Camille Locht²**

INSERM U 167¹, INSERM U447², URA CNRS 1854³,

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245,

59019 LILLE CEDEX, FRANCE.

L. D. and L. K. contributed aqually to this work

*Corresponding author : Tel. : (33) 03.20.87.77.81

FAX : (33) 03.20.87.78.88

Keywords : DNA, Immunization, IL-18, Sm28GST, *Schistosoma mansoni*.

Running title : Protection against *S. mansoni* by DNA immunization and IL-18.

ABSTRACT

In vivo delivery of DNA encoding antigens has become a very efficient and simple tool for inducing immune responses against pathogens. This novel approach to vaccination also offers the possibility to codeliver genes encoding immunomodulatory molecules in order to drive immune responses towards optimal protective effects. In the model of murine *Schistosoma mansoni* infection, vaccination inducing a Th1 profile has been shown to be protective. We show here that percutaneous infection of Balb/c mice induced, in the skin, a strong expression of mRNA of IL-18, a cytokine prompting the immune response to a Th1 profile via IFN- γ induction. Injection of an IL-18 expressing plasmid, intradermally, prior to *S. mansoni* infection led to a local and transient cellular infiltration but did not significantly modify parasite migration from the skin to the lungs. However, intradermal codelivery of IL-18-encoding plasmid with Sm28GST antigen-encoding plasmid induced a moderate but highly significant protection against the infection with 23% reduction of worm burden and 30% reduction of the egg laying in both liver and intestine. This protective efficacy was significantly higher (2-fold) than the protective efficacy of immunization with Sm28GST-encoding plasmid alone. Spleen cells specific for Sm28GST were found to secrete 30 times more IFN- γ in mice immunized with IL-18- and Sm28GST-encoding plasmids than in the absence of IL-18. Therefore, this study demonstrates the potential of DNA immunization in schistosomiasis and shows that codelivery of an IL-18-encoding plasmid can increase specific cellular response and thus potentiate the protective effect.

INTRODUCTION

The development of vaccine strategies against parasite infections represents a difficult and exciting challenge particularly because of the complexity of the life cycles of parasites within their hosts and because of the complexity of the immune responses they elicit. In *Schistosoma mansoni* infection, the parasite larvae (cercariae) enter the body by active penetration through the skin and reach the lungs *via* the systemic circulation within a few days [Wilson, 86]. In the lungs, the young parasites undergo morphological transformations and by approximately 2

weeks of infection they start to gather in the portal system where they mature into adult worms. In the murine model, the infection is firstly characterized by a Th1 type immune response, which has been characterized by the secretion of IFN- γ and IL-12 cytokines [Mossman, 96]. From the onset of egg laying, a radical shift towards a Th2 type immune response (Characterized by the secretion of IL-4 and IL-10 cytokines) occurs [Grzych, 1991]. *S. mansoni* eggs are only partially excreted *via* the faeces and numerous eggs are trapped in the liver, and the intestine, where they induce granuloma formation and fibrosis which are at the origin of the pathology.

With the aim of reducing the infection intensity before the development of egg-induced pathology, a possible approach would be to reinforce the immune responses naturally occurring early in the infection process. This approach was used successfully by administrating IL-12, a cytokine capable of promoting a Th1 response, as an adjuvant to radiation-attenuated cercariae [Wynn, 95b ; Wynn, 96] or crude antigen preparations [Montford, 96]. The recently cloned IL-18 is a strong IFN- γ -inducing factor [Okamura, 95] and it has been shown to be a potent activator of the proliferation of T and NK cells [Okamura, 95 ; Kohno, 97 ; Takeda, 98]. IL-18 molecule appears to be structurally related to IL-1 β and its participation in inflammatory processes is thought to be important [Bazan, 96]. IL-18 appears to be an interesting candidate for the modulation of immune responses since it is regarded as a crucial cytokine in the regulation of defense mechanisms against infections [Kawakami, 97 ; Bohn, 98].

However, injection of cytokines has proven to be limited, due to their short half-lives and to the high toxicity induced by multiple injections. To circumvent these limitations, the use of plasmid DNA encoding the desired cytokine represents an attractive solution through prolonged release of physiological amounts of active cytokines. Indeed, the injection of cytokine genes into skeletal muscles has shown to induce systemic immunological effects [Raz, 93]. It has been demonstrated that it is possible to manipulate an immune response to a plasmid-encoded antigen by coinjection with plasmid-encoded cytokine [Xiang, 95 ; Kim, 97 ; Tsuji, 97]. We have recently developed a DNA vaccination approach against through the skin using the gene for *S. mansoni* 28-kDa Glutathione *S*-Transferase (Sm28GST) [Dupré, 97]. The rationale for using Sm28GST is that it is expressed at every maturation stages of the parasite and it has proven protective effects against *S. mansoni* infection in various experimental animal models [Balloul, 87 ; Boulanger, 91 ; Grezel, 93 ; Boulanger, 95].

In the present study, we studied the immunomodulatory effect of the intradermal delivery of the gene encoding IL-18 on the immune response induced by a Sm28GST-expressing plasmid. Our results demonstrate the usefulness of IL-18-encoding plasmid injection in the skin to induce protective immune response against *S. mansoni* infection in mice.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. Plasmid pCR3.1::IL-18 consisting of the cDNA encoding murine IL-18 has been cloned under the control of the CMV promoter as described previously [Kremer, submitted]. pNIp28 contains the gene encoding the *Schistosoma mansoni* 28-kDa protein cloned upstream of the CMV promoter [Dupré, 97]. Plasmids were prepared using Qiagen columns (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. DNA preparations were controlled for endotoxin contamination using a *Limulus* Amebocyte Lysate quantification kit (Biowhittaker, Walkersville, MD) and displayed levels of endotoxin <0.5 U/ μ g DNA. Purified DNA preparations were resuspended in apyrogenic injectable saline solution (Lavoisier, Paris, France) at a concentration of 1 mg/ml and stored at -20°C until further use.

Animals and Parasites. Six-week-old female Balb/c mice (Iffa Credo, l'Arbresle, France) were used for the DNA immunizations and infection experiments. Intradermal injections of plasmid solutions were performed in the abdominal skin with a 1-ml syringe and a 27-gauge needle. Inoculations were done with various amounts of DNA in a total volume of 100 μ l. The life cycle of the Guadeloupe *Schistosoma mansoni* strain was maintained by using *Mesocricetus auratus* hamsters as definitive hosts and *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts. Infections were performed by application of cercariae in a ring fixed on the shaved abdominal skin of the anaesthetized animals.

Schistosomula recovery from the lungs. In a first experiment, Balb/c mice were injected intradermally in the abdominal skin with either 100 μ g of control plasmid or 100 μ g of pCR3.1::IL-18 (10 to 11 mice per experimental group) and infected the next day with 580 *Schistosoma mansoni* cercariae through the same site. In a second

experiment, mice were immunized 3 times (1-week intervals) with pNIp28 alone or with pNIp28 in combination with pCR3.1::IL-18, and then infected 60 days after the first DNA injection with 410 *Schistosoma mansoni* parasites. For both protocols, lungs were excised five days after cercarial infection and cut into the small fragments before being transferred into a small glass vial containing minimum essential medium (MEM). After a 3 hours incubation at 37°C, the young worms that had migrated from the lungs into the MEM were harvested by filtration through a 90 µm mesh (Hartmann-Larochette, Châtenois, France) and counted under a light microscope.

***Schistosoma mansoni* challenge.** Balb/c mice were immunized by 3 i.d. injections (1-week intervals) with 100 µg of pNIp28 alone or with 100 µg of pNIp28 in combination with 100 µg of pCR3.1::IL-18 (10 to 11 animals per group). Mice were infected 60 days after the first DNA injection by exposition to 70 furcocercariae at the abdominal site. Total blood perfusion was carried out 48 days following infection, and the number of worms was determined using a light microscope. At the time of perfusion, small intestines and the livers were collected, digested overnight with 4% potassium hydroxyde, and eggs were counted using a light microscope. Student's *t* test was used for statistical analysis of the data.

Serum antibody determination by ELISA. Microtiter plates (Immulon 3, Dynatech, Chantilly, VA) were coated with 50 µl of recombinant Sm28GST (kindly provided by Transgène, Strasbourg, France) at 20 µg/ml in PBS, for 2h30 at 37°C. After washing three times with 0,1% Tween20 in PBS (PBS/Tw), two-fold serial dilutions of anti-sera in PBS/Tw containing 0.5% gelatin were added to the antigen-coated plates (50 µl/well for each dilution), and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed 5 times with PBS/Tw and incubated 90 min at 37°C with 50 µl of peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG at a 1/17,000 dilution (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Plates were washed 4 times with PBS/Tw, 50 µl of peroxidase substrate were added and reaction was recorded with an automated plate reader at 405 nm (Multiskan MS, Labsystem, Finland). Titers were defined as the highest dilution yielding an absorbency 3 times above the background.

Cytokines measurement in spleen-cell cultures. Sixty days after the first DNA injection, splenocytes were isolated and resuspended in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) containing 10% heat inactivated FCS and supplemented

with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). Cells were cultured at a concentration of 5×10^5 cells/well in 6-well flat-bottom culture plates in the absence or presence of 10 μ g/ml of the recombinant Sm28GST antigen. Cultures were incubated at 37°C in a humidified CO₂ incubator. For IL-4 or IFN- γ measurements, culture supernatants were harvested after 24 or 72 hours, respectively. Cytokine levels were measured by ELISA as described previously [Wolowczuk, 97].

RT-PCR analysis of cytokines in the skin. For RNA extraction, the excised skin was cut in small pieces and snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using RNeasy (Qiagen, Courcouronnes, France), according to the manufacturer's recommendations. Equal amounts of RNA (1 μ g) were reverse-transcribed with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Gibco BRL, Eragny, France). PCR amplification primers and conditions for β -actin, IFN- γ , IL-4, IL-7 and IL-12 p40 were identical to the one described previously [Wolowczuk, 97]. Primers specific for IL-18 were 5'-CCC AGG AAC CAT GGC TGC CAT GTC-3' and 5'-AAG GTA CCA CCT AAC TTT GAT GTA AG-3'. Samples of cDNA were amplified for 29 cycles at an annealing temperature of 55°C using a Perkin Elmer DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Saint-Quentin, France). For each cDNA preparation, a control synthesis reaction was performed without RT to ensure that there was no contaminating genomic DNA. PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

Histological analysis of the skin. Balb/c mice were injected i.d. with 50 μ g of pCR3.1 or pCR3.1::IL18. One, two, and 10 days after injection, animals were sacrificed. The skin corresponding to the site of injection was recovered and fixed in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin after dehydration. Four-micrometer tissue sections were prepared and rehydrated by passing through decreasing concentrations of ethanol until equilibration with buffer. The slides were counterstained with hematoxylin and examined by light microscopy.

RESULTS

IL-18 is produced in skin of mice following percutaneous infection with *S.mansoni*. IL-18 is a key cytokine in the induction of IFN- γ . Since Th1 immune responses are critical for protective immunity against murine schistosomiasis, we investigated whether *S. mansoni* percutaneous infection of Balb/c mice would naturally induce the skin production of IL-18. Three days post infection, high levels of IL-18 specific mRNA were detected in the skin, whereas non-infected animals showed no detectable levels of IL-18 mRNA. In comparison, mRNA levels for IL-4, IL-10 and IL-12p40 were not significantly increased and mRNA levels for IFN- γ and IL-7 were only slightly increased following *S.mansoni* infection (data not shown). Thus, IL-18 appears to be a potential regulatory molecule involved in the initiation of immune responses against *S. mansoni* at the first step of the infection process.

Injection of pCR3.1::IL-18 induces a transient cellular infiltrate in the skin. We have already suggested the existence of a proinflammatory activity for IL-18. We present here a direct evidence of this activity by examining the kinetic of the histological aspect of the skin at the site of injection of pCR3.1::IL-18 or control plasmid. A massive cellular infiltrate, composed of polynuclears and lymphocytes, occurred as soon as one day after the injection of pCR3.1::IL-18 (Fig. 2a) and peaked at 2 days post DNA injection (Fig. 2c). A similar cellular infiltrate could not be observed in the skin of mice injected with control plasmid (Fig. 2b, d and f). After 10 days, the cell recruitment could not be visualized anymore (Fig. 2e), indicating that this local inflammatory process was transient.

Analysis of early parasite migration to the lungs in mice injected with pCR3.1::IL18. Since i.d. injection of IL-18-encoding plasmid induced a strong cellular reaction in the skin, we wanted to assess if this non-specific immune reaction could have a direct effect on the early migration pattern of *S. mansoni* parasites. *S. mansoni* percutaneous infection was performed at the same skin site, one day after plasmid injection. The fate of *S. mansoni* schistosomula was then investigated by measuring the proportion of schistosomula that had reached the lungs five days after infection. Table 1 shows that the number of parasites recovered from the lungs of mice injected with pCR3.1::IL-18 (219 ± 46) although being lower, was not significantly different to that recovered from mice injected with pCR3.1

(249 ± 57) or control mice (241 ± 44). Examination of skin sections one day after parasite infection revealed no evidence for parasites being entrapped in inflammatory foci (data not shown).

Kinetic of the antibody response against parasite antigens. Levels of Sm28GST specific antibodies were evaluated by ELISA in sera of mice immunized with pNip28 alone or in conjunction with pCR3.1::IL18. Results shown in Fig. 3 indicate that the IgG response induced in animals immunized with pNip28 increased gradually over time. The specific anti-Sm28GST antibody response drastically increased after cercarial infection, indicating that *S. mansoni* was capable to boost the immune response primed by DNA vaccination. However, no significant differences in the anti-Sm28GST IgG response could be observed between mice immunized with both pNip28 and pCR3.1::IL-18 and mice immunized with both pNip28 and pCR3.1. Similarly, no significant shift in the Sm28GST-specific IgG isotypes balance could be observed. In addition, antibody responses towards crude antigen extracts of each developmental parasite stages were not affected by injection of pCR3.1::IL-18 (data not shown). These results indicate that the expression of IL-18 after pCR3.1::IL-18 administration did not affect the humoral response against the parasite antigen.

Cytokines production. Fig. 4 shows that spleen cells primed *in vivo* by the Sm28GST DNA immunization and restimulated *in vitro* by Sm28GST antigen produced significant amounts of IFN- γ (three times increase over control). When pCR3.1::IL-18 was codelivered with pNip28, the production of IFN- γ by the antigen specific spleen cells, after *in vitro* restimulation with the parasite antigen, was dramatically enhanced (one hundred times increase over control). In parallel, no IL-4 was detected in significant amount in the restimulated splenocytes. Therefore, codelivery of IL-18-encoding plasmid had a very defined effect on inducing the production of IFN- γ by the Sm28GST-specific spleen cells.

Protection against *S. mansoni* after coadministration of pNip28 and pCR3.1::IL-18. We assessed whether the intradermal administration of pNip28 alone or in conjunction with pCR3.1::IL-18 could have any effect on *S. mansoni* migration and viability, or on the egg deposition. First, we studied if vaccination consisting of 3 i.d. injections (1-week-intervals) of 100 μ g of each plasmid had led to a delayed migration of parasites from a challenge

infection performed 60 days after the first plasmid injection. No significant difference could be observed in the number of schistosomula reaching the lungs at day 5 post-infection (Table 1), indicating that no significant killing of worms as a result of the immunization had occurred before the lung stage. We then investigated whether administration of pNIp28 alone or in conjunction with pCR3.1::IL-18 could induce a protective effect at a later stage. For this purpose, parasites and egg-containing tissues were recovered 48 days after infection. As shown in Table 2, a significant reduction of 23%, $p=0,0002$) in worm burden was obtained in mice injected with both plasmids, although injection of pNIp28 alone had also a significant but minor effect (15%, $p=0,002$). In addition, a significant and more important reduction of the tissue egg numbers was obtained in mice injected with both plasmids (30%, $p=0,03$ in the liver and 28%, $p=0,02$ in the intestine). In mice that had received only pNIp28, the egg reduction was slightly reduced (about 16%), although this was not statistically significant. Administration of pCR3.1::IL-18 alone did not show any protective effect. Together these data indicate that the use of the IL-18-encoding plasmid as an adjuvant of the Sm28GST DNA vaccination resulted in an almost 2-fold increase of the protection levels.

DISCUSSION

Th1 immune responses has been shown to be associated with protection against murine schistosomiasis particularly in the model of vaccination with radiation-attenuated cercariae [Smythies, 92]. This has led to the development of vaccination strategies using either attenuated cercariae [Wynn, 95b ; Wynn, 96], crude parasite extracts [Montford, 96] or shistosome eggs in combination with IL-12, a major Th1-promoting cytokine. These vaccination protocols have been able to confer both resistance to infection [Wynn, 95b] and limitation of the egg-induced pathology [Wynn, 95a]. Although the precise defense mechanisms involved are not well-defined, these protective effects have been shown to be related to IFN- γ production by regulatory T cells and NK cells [Wynn, 95b ; Wilson, 96 ; Montford, 96].

In this study, we thought of combining single antigen vaccination with a novel Th1 cytokine, by using a DNA-based approach [Ulmer, 93 ; Sedegah, 94 ; Raz, 94]. Our original approach was based on the delivery of a

plasmid encoding the well-characterized Sm28GST antigen [Balloul, 87 ; Boulanger, 91 ; Grezel, 93 ; Boulanger, 95], along with a plasmid encoding IL-18. The choice of IL-18 as an immunomodulatory molecule was mainly based on the fact that this cytokine, like IL-12, is a strong inducer of Th1 immune responses *via* induction of IFN- γ production [Okamura, 95]. We have recently cloned IL-18 cDNA from activated murine macrophages and inserted this sequence into an eucaryotic expression plasmid. When injected into the skin of mice, this construction (pCR3.1::IL-18) led to the expression of a functional cytokine and induction of IFN- γ mRNA expression [Kremer, submitted]. The results of this study indicate that injection of pCR3.1::IL-18 did not affect the antibody response against Sm28GST. Furthermore, the intensity of humoral responses against crude antigen preparations of the parasite were not modulated neither. In contrast, cellular response to Sm28GST antigen was greatly influenced by the presence of IL-18. When mice were immunized with pNIp28 alone, their spleen cells were only able to produce a limited amount of IFN- γ upon *in vitro* restimulation. However, when mice received pCR3.1::IL-18 additionally, IFN- γ was produced from Sm28GST restimulated splenocytes at very high levels. No IFN- γ production could be detected upon antigen *in vitro* stimulation of splenocytes from mice receiving pCR3.1::IL-18 or control plasmid. Since IL-18 led to activation of IFN- γ secretion, only by presensitized antigen-specific cells, IL-18, in our model, can be regarded as a fine immunoregulatory factor of specific immune responses. The fact that the specific humoral response was not modified could indicate that, unless IL-12, IL-18 has not regulatory effect on Th2 cells [Kohno, 97]. Indeed, codelivery of IL-12-expressing plasmid has been shown to reduce the specific antibody response to HIV-1 antigens [Kim, 97 ; Tsuji, 97].

It has been shown that cellular responses are likely to be involved in immunity to schistosomes. In particular, Pancre *et al.* (1995) have shown that protection induced by recombinant Sm28GST could be reproduced by transfer with Sm28GST specific T-cell clones producing high level of IFN- γ . In addition, treatment with neutralizing anti IFN- γ abrogated this protection effect, demonstrating the importance of IFN- γ in the mediation of Sm28GST-induced protection. We show here that injection of pNIp28 alone had a very moderate efficiency with a significant 15% ($p=0,002$) decrease of worm burden and non-significant 16% decrease of egg counts in both the liver and the intestine. Codelivery of pNIp28- and IL-18-expressing plasmids resulted in a significant potentialization of the protective effect with a 23% ($p=0,0002$) reduction of the worm burden and with a diminution of egg deposition in the

liver and in the intestine (30%, $p=0,03$ and 28%, $p=0,02$ respectively). The levels of protection obtained with this DNA-based vaccine strategy are very encouraging. Indeed, in the mouse model, vaccination with recombinant antigens and particularly Sm28GST in presence of adjuvants have resulted in a reduction in worm burden and egg counts of about 40% (Balloul, 87 ; Boulanger, 91). It has been suggested that, in human populations, a partial reduction of egg output would greatly decrease the severe forms of the pathology [Capron, 92].

Since the use of IL-18 as an adjuvant to vaccination against *S. mansoni* potentiated levels of protection induced, we investigated whether this cytokine could play a role in the context of a natural infection. Skin responses occur during the percutaneous infection of schistosomes and might be an essential component of protective immunity. We have already characterized a number of cytokines mRNA that are induced at the level of the skin following infection [Wolowczuk, 97]. In this study, we were able to demonstrate that IL-18 mRNA levels were sharply induced. To test whether this cytokine could play a determinant role in the early phase of the immune reaction to infection, injection of the IL-18-encoding plasmid was performed in the skin prior to parasite infection. Our results show that intradermal injection of pCR3.1::IL-18 promoted a strong inflammatory reaction which appeared in less than one day and was resolved 10 days after the injection. This finding presents some similarities with previous observations [Hengge, 95] showing that injection of an IL-8-encoding plasmid into pig skin resulted in an intense neutrophil recruitment as early as 2 hours following injection. The transient cellular recruitment we characterized was localized in the hypodermis at the site corresponding to the injection point. This observation brings a new evidence that IL-18, which shares homologies with IL-1 β is involved in the regulation of inflammatory processes [Bazan, 96]. In the model of *C. neoformans* infection, IL-18 mRNA expression is induced in the lungs of infected mice. Administration of recombinant IL-18 was found to be protective through the promotion of a strong inflammatory reaction in the lungs and was accompanied by an increased level of serum IFN- γ [Kawakami, 97]. We investigated whether the inflammatory reaction induced by IL-18 could play the role of a barrier to skin-invading schistosome larvae. Our results indicate that, although there were less schistosomes reaching the lungs in 5 days when the skin was injected with pCR3.1::IL-18 prior to infection, this difference was not significant. In addition, histological examination of infected skins did not reveal the presence of more schistosomula that would have been trapped in the cellular infiltrate (data not shown). An explanation could be that this inflammation was very confined in comparison to the area of

skin exposed to the parasites. Alternatively, this non-specific immune reaction might not be effective against the schistosome larvae. Indeed, it has been described that natural infection induces a skin inflammatory response which does not seem to alter significantly parasite migration through the skin [von Lichtenberg, 76 ; Wilson, 86]. Thus, our data indicate that the early induction of IL-18 by *S. mansoni* infection is probably not critical for establishing defense mechanisms in the skin, but that it might rather be important for the orientation of the specific immune responses.

This study thus represents the first demonstration of the protective efficacy of DNA immunization against murine schistosomiasis. Our results show the usefulness of the codelivery of a IL-18 expressing plasmid to increase the secretion of IFN- γ by the antigen specific cells leading to an increased protection. More generally, the use of IL-18 as an immunoregulatory molecule appears to be promising for the prevention of infectious diseases and cancer therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Monique Leroux and Suzanne VanWingène for preparation of the parasites. L. D. holds a fellowship from the Institut Pasteur of Lille.

REFERENCES

- Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., and Capron, A. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138: 3448-3453.
- Bazan, J.F., Timans, J.C., and Kastelein, R.A. 1996. An newly defined interleukin-1? *Nature (London)* 379: 591.

- Bohn, E., Sing, A., Zumbihl, R., Bielfeldt, C., Okamura, H., Kurimoto, M., Heesemann, J., and Autenrieth, I.B. 1998. IL-18 (IFN- γ -Inducing Factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J. Immunol.* 160: 299-307.
- Boulanger, D., Reid, G.D., Sturrock, I., Wolowczuck, I., Balloul, J.M., Grezel, D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., Grimaud, J.A., Butterworth, A.E., and Capron, A. 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 13: 473-490.
- Boulanger, D., Warter, A., Trottein, F., Mauny, F., Brémond, P., Audibert, F., Couret, D., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Pierce, R.J., Lecocq, J.P., Sellin, B., and Capron, A. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* 17: 361-369.
- Capron, A. 1992. Immunity to schistosomes. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 419-424.
- Dupré, L., Poulain-Godefroy, O., Ban, E., Ivanoff, N., Mekranfar, M., Schacht, A.-M., Capron, A., and Riveau, G. 1997. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa Glutathione S-Transferase. *Parasite Immunol.* 19: 505-513.
- Grezel, D., Capron M., Grzych, J.M., Fontaine, J., Lecocq, J.P., and Capron A. 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 23: 454-460.
- Grzych J. M., Pearce, E.J., Cheever, A., Clatulada, Z.A., Caspar, P., Hieny, S., Lewis, F.A., and Sher, A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol* 146: 1322-1327.
- Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S., and Vogel, J.C. 1995. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nature Genetics* 10: 161-166.
- Kawakami, K., Qureshi, M.H., Zhang, T., Okamura, H., Kurimoto, M., and Saito, A. 1997. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J. Immunol.* 159: 5528-5534.

- Kim, J.J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Dang, K., Wang, B., Boyer, J.D., and Weiner, D.B. 1997. *In vivo* engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 158: 816-826.
- Kim, J.J., Trivedi, N.N., Nottingham, N.K., Morrison, L., Tsai, A., Hu, Y. Mahalingam, S., Dang, K., Ahn, L., Doyle, N.K., Wilson, D.M., Chattergoon, M.A., Chalian, A.A., Boyer, J.D., Agadjanyan, M.G., and Weiner, D.B. 1998. Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* 28: 1089-1103.
- Kohno, K., Kataoka, J., Ohtsuki, T., Suemoto, Y., Okamoto, I., Usui, M., Ikeda, M. And Kurimoto, M. 1997. IFN- γ -Inducing Factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158: 1541-1550.
- Kremer, L., Dupré L., Wolowczuk, I., and Locht, C. 1998. *In vivo* immunomodulatory effects following intradermal injection with DNA encoding murine IL-18. *Submitted.*
- Montford, A.P., Anderson, S., and Wilson, R.A. 1996. Induction of Th1 cell-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni* by co-administration of larval antigens and IL-12 as an adjuvant. *J. Immunol.* 156: 4739-4745.
- Mosmann, T., and Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138-146.
- Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S., and Kurimoto, M. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature (London)* 378: 88-91.
- Osaki, T., Péron, J.M., Cai, Q., Okamura, H., Robbins, P.D., Kurimoto, M. Lotze, M.T., and Tahara, H. 1998. IFN- γ -Inducing Factor/IL-18 administration mediates IFN- γ and IL-12-independent antitumor effects. *J. Immunol.* 160: 1742-1749.
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Guerret, S., Copin, M.C., Delanoye, A., Capron, A., and Auriault, C. 1994. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infect. Immun.* 62: 3723-3730.

- Raz, E., Watanabe, A., Baird, S.M., Eisenberg, R.A., Parr, T.B., Lotz, M., Kipps, T.J., and Carson, D.A. 1993. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4523-4527.
- Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M., and Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519-9523.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., and Hoffman, S.L. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9866-9870.
- Smythies, L.E., Pemberton, R.M., Coulson, P.S., Montford, A.P., and Wilson, R.A. 1992. T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 148: 1512-1518.
- Takeda, T., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. 1998. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8: 383-390.
- Tsuji, T., Hamajima, K., Fukushima, J., Xin, K.Q., Ishii, N., Aoki, I., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Kawamoto, S., Nitta, Y., Miyazaki, J.I., Koff, W., Okubo, T., and Okuda, K. 1997. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. *J. Immunol.* 158: 4008-4013.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Randall-Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Howe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.R., and Liu, M.A.. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 259: 1745-1749.
- Von Lichtenberg, F., Sher, A., Gibbons, N., and Doughty, B.L. 1976. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.* 84: 479-500.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., and Dixon, B. 1986. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae and normal mice: an attempt to identify the timing and site of parasite death. *Parasitology* 92: 101-116.
- Wilson, R.A., Coulson, P.S., Betts, C., Dowling, M.A. and Smythies, L.E. 1996. Impaired immunity and altered pulmonary responses in mice with a disrupted interferon-gamma receptor gene exposed to the irradiated *Schistosoma mansoni* vaccine. *Immunology* 87: 275-282.

- Wolowczuk, I., Delacre, M., Roye, O., Giannini, S.L., and Auriault, C. 1997. Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- γ production and leads to an aggravation of the disease. *Immunology* 91: 35-44.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Poindexter, R.W., Caspar, P., Lewis, S.A., and Sher, A. 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature (London)* 376: 594-596.
- Wynn, T.A., Jankovic, D., Hieny, S., Cheever, A.W., and Sher, A. 1995. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosoma mansoni in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. *J. Immunol.* 154: 4701-4709.
- Wynn, T.A., Reynolds, A., James, S., Cheever, A.W., Caspar, P., Hieny, S., Jankovic, D., Strand, M., and Sher, A. 1996. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J. Immunol.* 157: 4068-4078.
- Xiang, Z., and Ertl, H.C.J. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmid expressing cytokines. *Immunity* 2: 129-135.

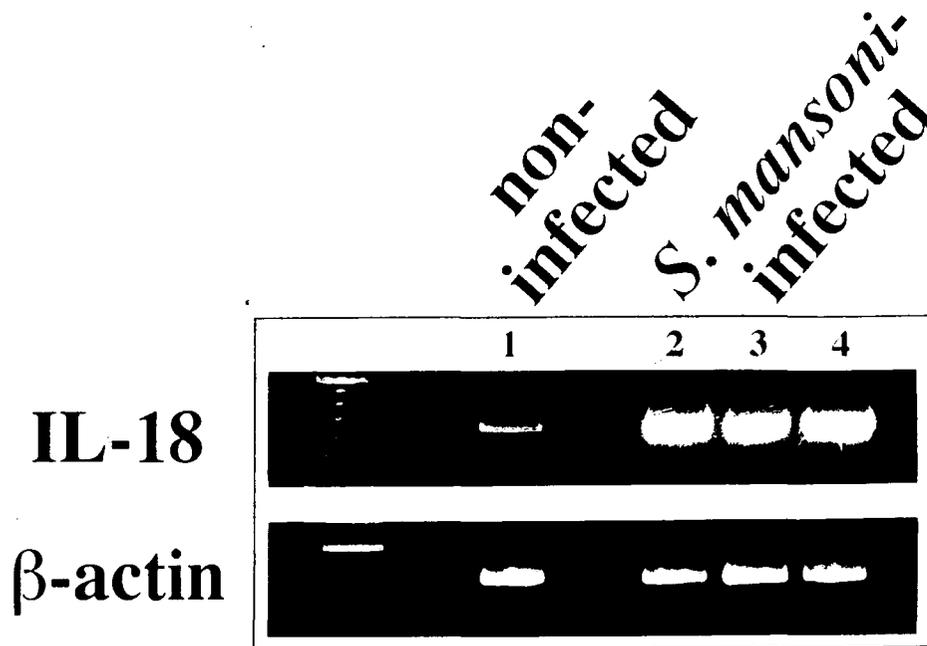


Fig. 1: IL-18 mRNA expression. RT-PCR were performed on RNA extracted from skin samples from individual mice 3 days after exposure to 70 *S. mansoni* cercariae (lanes 2, 3 and 4), or from skin of a non-infected mouse (lanes 1). B-actin was used as internal control.

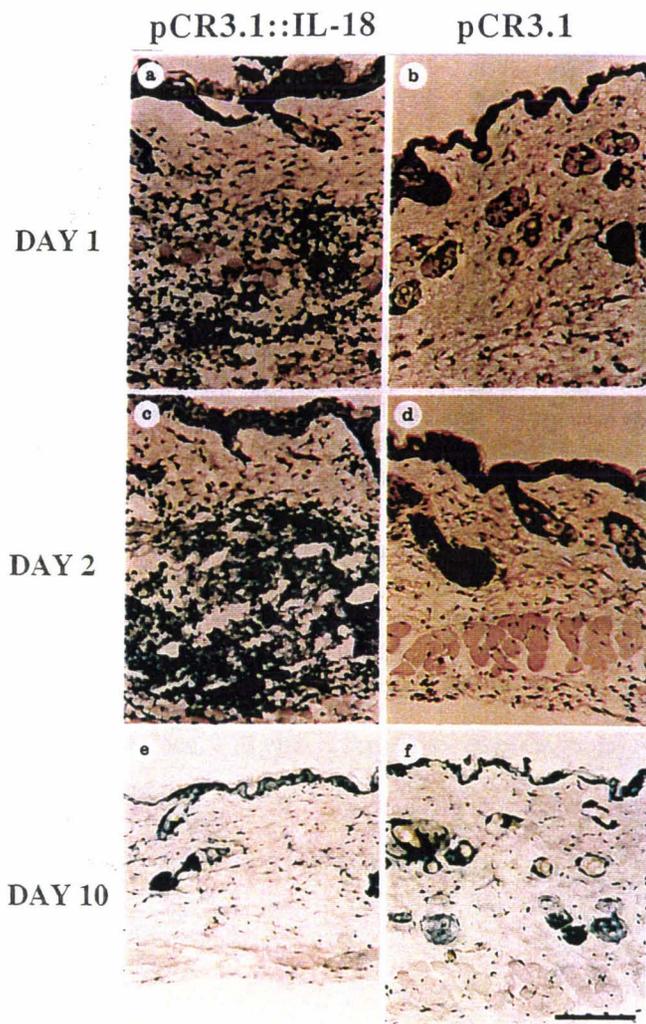


Fig. 2: Kinetic of cellular infiltration in pCR3.1::IL-18-injected skin.

Representative sections of skin one (a, b), two (c, d) and ten days (e, f) following plasmid injection are shown. Left panel (a, c and e) correspond to sites of pCR3.1::IL-18 injection and right panel (b, d and f) corresponds to sites of pCR3.1 injection. Sections were counterstained with hematoxylin, magnification x 200.

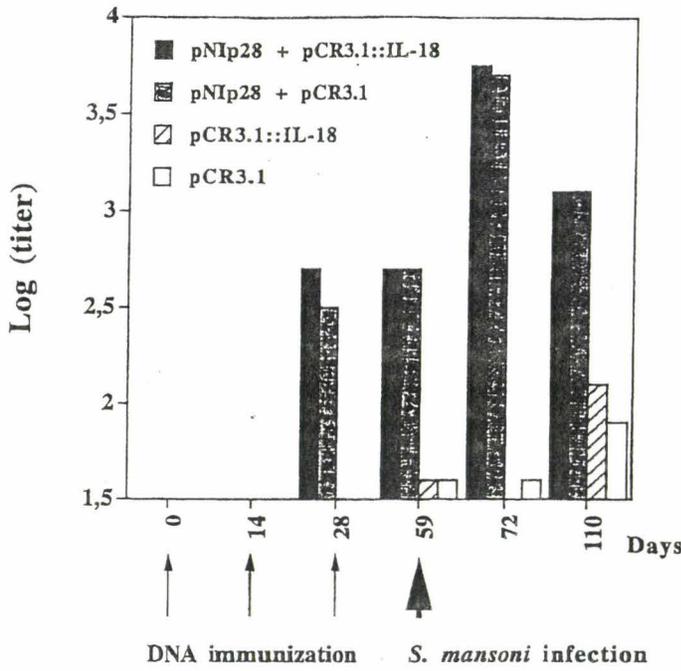


Fig. 3: Sm28GST-specific IgG antibody response.

Specific IgG titers were determined by ELISA in the sera of mice at regular intervals before and after plasmid injections and parasite infection. Plasmid injections were performed at days 0, 7 and 14 and parasite infection was performed at day 60.

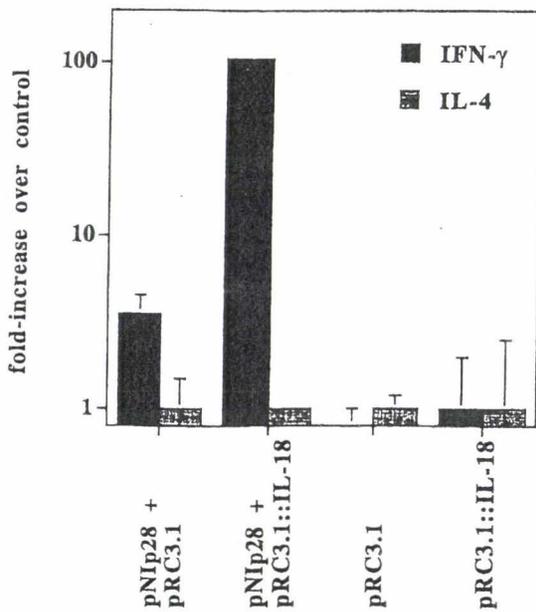


Fig. 4: IFN- γ and IL-4 production by Sm28GST-stimulated splenocytes of immunized mice.

IFN- γ and IL-4 concentrations were determined by ELISA in the supernatants of splenocytes from pNip28- and pCR3.1::IL-18-immunized mice. Cytokine production represented corresponds to the factor of increase between unstimulated and Sm28GST-stimulated cells. In unstimulated cultures, IFN- γ concentration was approximately 50

TABLE 1. Parasite loads recovered at the lung stage.

Exp. 1 Infection with 580 cercariae, 1 day after plasmid injection			Exp. 2 Infection with 410 cercariae, 60 days after DNA vaccination		
Treatment	Schistosomula Mean	SD			
pCR3.1::IL-18	219	46	pNip28 + pCR3.1::IL-18	161	28
pCR3.1	249	57	pNip28 + pCR3.1	192	20
Saline	241	44	pCR3.1::IL-18	174	18
			pCR3.1	183	11

TABLE 2. Protective effects of immunization against challenge with *S. mansoni* cercariae

Immunization protocol ^a	Worm recovery ^b (mean ± SD)	% Protection ^c (P)	Liver egg charge ^d (mean ± SD)	% Reduction ^e (P)	Intestine egg charge ^d (mean ± SD)	% Reduction ^e (P)
pNip28 + pCR3.1::IL-18	32.9 ± 5.4	22.6 (0.0002)*	12,019 ± 4,158	29.6 (0.029)*	34,310 ± 10,60 3	27.5 (0.0153)*
pNip28 + pCR3.1	36.3 ± 4.3	14.6 (0.0016)*	14,238 ± 3,678	16.6 (0.0855)	39,630 ± 10,400	16.3 (0.0863)
pCR3.1::IL-18	41.5 ± 6.2	2.4 (0.338)	17,663 ± 5,449		48,050 ± 12,270	
pCR3.1	42.5 ± 2.4		17,069 ± 4,154		47,360 ± 11,102	

^a Balb/c mice (8 per group) were immunized intradermally with 3 injections of 100 µg of plasmids separated by 7 days.

^b Mice were infected with 75 *S. mansoni* furcocercariae, 60 days after the first DNA injection. The number of adult worms was determined by portal perfusion 6 weeks later.

^c Calculated by comparison with numbers of worms recovered from the control group injected with pCR3.1. *, significant at P<0.05 (Student's t test).

^d Expressed as the number of eggs per mouse

^e Calculated by comparison with numbers of eggs per mouse from the control group injected with pCR3.1. *, significant at P<0.05 (Student's t test).

© 2005 Elsevier SAS

Discussion

1. Vers une meilleure compréhension des mécanismes de la vaccination ADN

1.1. INITIATION AU NIVEAU DE LA PEAU

La méthode de vaccination par ADN ne peut paraître relativement médiocre en terme de transfection et de quantité d'antigène synthétisé. Cependant il semble que le peu d'antigène synthétisé soit présenté dans des conditions idéales. Nos résultats indiquent que l'efficacité de la vaccination ADN pour générer des réponses immunes puissantes, du moins dans le cas particulier de l'injection de plasmides dans le derme, repose essentiellement sur une double interaction entre les plasmides et les cellules dendritiques de la peau: transfection de cellules dendritiques et migration des cellules dendritiques induite par les séquences immunostimulatrices présentes sur le corps des plasmides.

1.1.1. TYPE DE CELLULES TRANSFECTÉES

Nous avons été capables de visualiser l'expression de l'antigène Sm28GST au niveau des cellules transfectées de la peau suite à l'injection de plasmides codant pour cet antigène. La plupart de ces cellules, d'après leur morphologie, semblent être des fibroblastes. Cependant, par un immunomarquage des molécules de CMH de classe II et une observation de la morphologie, nous avons pu conclure qu'un certain nombre des cellules transfectées sont des cellules dendritiques de la peau. On peut penser que ces cellules, présentatrices d'antigènes par excellence, vont présenter de manière particulièrement efficace un antigène qu'elles ont elles-même synthétisé. La contribution d'une part des cellules douées de capacité de présentation d'antigènes et d'autre part des cellules résidentes de la peau a été analysée dans l'étude récente de Klinman [Klinman *et al.*, 1998]. Cette étude fait apparaître que cette première catégorie de cellules est responsable à la fois de l'initiation de la réponse immune spécifique et de la mise en place d'une réponse mémoire. La seconde catégorie de cellules joueraient ainsi simplement le rôle de réservoir antigénique permettant d'amplifier la réponse primaire. Nos expériences ont permis de mettre en évidence une activité intrinsèque de l'ADN plasmidique sur la maturation des cellules dendritiques de la peau, phénomène contribuant à l'efficacité de cette approche vaccinale.

1.1.2. SEQUENCES IMMUNOSTIMULATRICES ET MIGRATION DES CELLULES DENDRITIQUES

Les plasmides d'origine bactérienne portent des séquences immunostimulatrices composées d'un coeur CG non-méthylé et d'un environnement de nucléotides particuliers. Nous avons montré que ces séquences vont induire la maturation des cellules dendritiques en régulant l'expression d'une série de molécules d'adhésion, aboutissant à leur migration de la peau vers les ganglions drainants. Plusieurs observations laissent à penser que cette activation des cellules

dendritiques se fait d'une manière indépendante du mécanisme de transfection ou d'expression de l'antigène. Tout d'abord, il semble que le nombre de cellules exprimant (ou contenant l'antigène) est limité par rapport au nombre de cellules émigrantes. De plus, le mécanisme d'activation des cellules dendritiques est extrêmement rapide (quelques dizaines de minutes) et précède donc tout mécanisme d'expression de l'antigène. Ainsi, il paraît même envisageable que la plupart des cellules transfectées ne commencent à synthétiser l'antigène qu'une fois arrivées au niveau des ganglions drainant la peau. Nous n'avons pas encore d'évidence sur le type de séquences exerçant ce type d'activité et notamment sur la longueur des oligonucléotides impliqués et leur séquence. Des expériences complémentaires sont en cours notamment avec différents types de séquences et des plasmides méthylés de manière à étudier si ces derniers perdent leur capacité à induire la migration des cellules dendritiques.

Une question se pose alors: puisque les séquences immunostimulatrices de l'ADN plasmidique induisent la migration de beaucoup de cellules dendritiques, alors que peu sans doute sont transfectées, n'y a-t-il pas alors un certain gâchis? Nous estimons qu'au contraire, cette forte activation cellulaire pourrait expliquer, au moins en partie, l'efficacité de présentation d'antigène qui va avoir lieu au niveau des ganglions. Notre hypothèse est qu'au sein de ces organes lymphoïdes, les cellules dendritiques non-transfectées fournissent une aide aux cellules dendritiques transfectées. Une telle aide pourrait reposer sur un transfert de l'antigène des cellules dendritiques transfectées vers les cellules non-transfectées. Ce type de mécanisme a été récemment décrit en dehors du contexte de la vaccination ADN et il met clairement en évidence que la stimulation de lymphocytes T naïfs n'est efficace que si les cellules dendritiques chargées d'antigènes sont secondées par des cellules dendritiques non-chargées [Knight *et al.*, 1988].

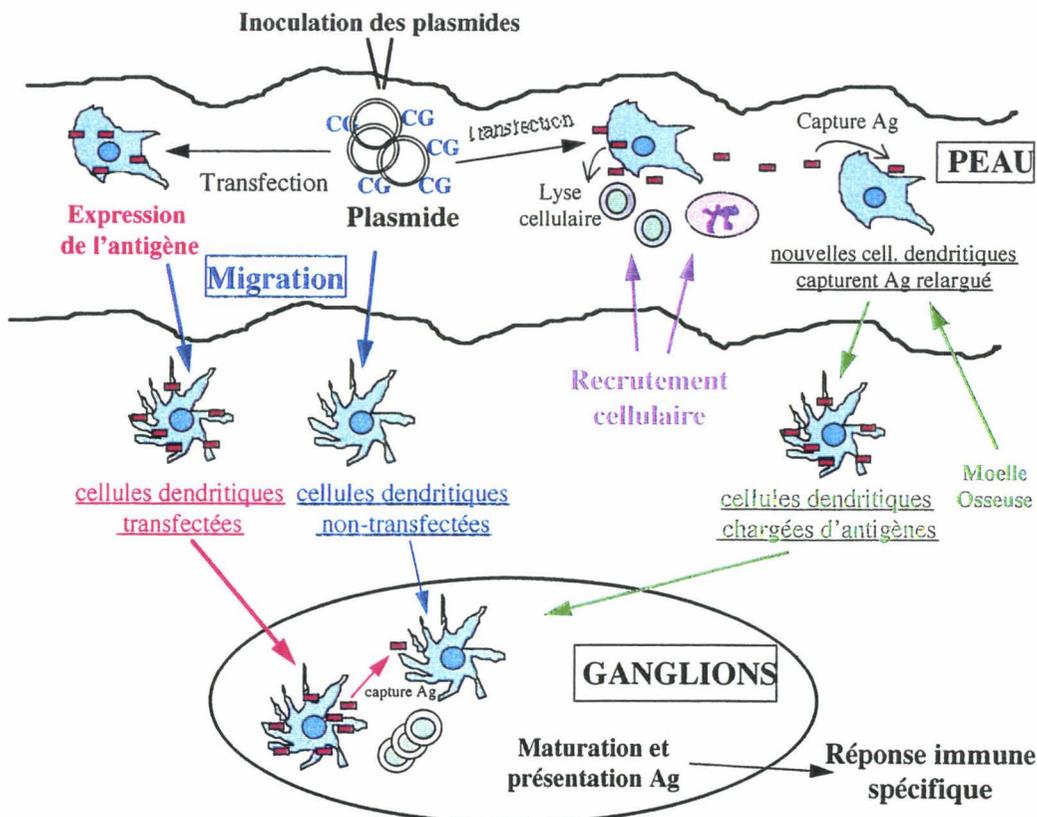
1.1.3. ACTION DES CPG SUR LES CAPACITES DE PRESENTATION DE L'ANTIGENE

Nos résultats concernant l'activation des cellules dendritiques par les séquences immunostimulatrices sont en partie contradictoires au regard de ceux obtenus par l'équipe du Dr Wagner [Sparwasser *et al.*, 1998]. En effet leur travaux montrent que les séquences CpG induisent une maturation fonctionnelle des cellules dendritiques *in vitro* passant par une augmentation des niveaux d'expression de molécules impliquées dans la présentation d'antigènes (CMH de classe II, CD86 et CD40). Dans nos expériences aussi bien *in vitro* que *in vivo*, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet des séquences CpG ou des plasmides entiers sur ces molécules. Il convient de préciser que la source de cellules dendritiques que nous utilisons est différente de la leur. De plus les oligonucléotides utilisés par l'équipe du Dr Wagner sont également différents des nôtres. C'est d'ailleurs les travaux de ce groupe qui ont clairement montré que les séquences immunostimulatrices CpG ont des actions différentes en fonction des séquences encadrant le motif CpG. Ces différences pourraient donc expliquer la dissemblance de nos résultats. Toutefois, en ce qui concerne la mise en évidence de l'action pro-migratoire, le fait d'observer des effets similaires à la fois *in vitro* et *in vivo*, aussi bien avec un oligonucléotide CpG, qu'avec des plasmides entiers semble témoigner d'un effet commun à l'ensemble des séquences ADN immunostimulatrices.

1.1.4. UNE SECONDE VAGUE DE CELLULES PRESENTATRICES DE L'ANTIGENE

Plusieurs indications indiquent que la mise en place d'une réponse immune dans le contexte particulier de la vaccination ADN dépend d'évènements secondaires à cette première vague migratoire de cellules dendritiques dont certaines sont transfectées. En effet, les travaux de Klinmann [Klinman *et al.*, 1998] montrent clairement que l'ablation de la peau à différents temps après vaccination ADN influence l'amplitude de la réponse immune primaire. Nos expériences de marquage de l'antigène dans la peau mettent en évidence une expression qui se prolonge au moins une dizaine de jours au sein de cellules résidentes de la peau (fibroblastes). Or suite à la migration rapide et massive des cellules dendritiques (il s'agit réellement d'une déplétion), on peut penser qu'il va y avoir un certain délais avant que ce pool d'antigènes puisse être à nouveau pris en charge par des cellules dendritiques. En effet, il faut attendre quelques jours avant que de nouvelles cellules dendritiques puissent se réimplanter dans la peau. Nous avons mis en évidence qu'entre-temps (au bout de 24 heures après l'injection), un phénomène de recrutement cellulaire transitoire se mettait en place. Ce recrutement cellulaire est composé de macrophages, de polynucléaires et de lymphocytes T. Il est intimement lié à l'expression de l'antigène puisqu'il n'a été observé que consécutivement à l'injection de plasmide codant pour l'antigène. Notre hypothèse est que ce type de cellules va pouvoir conduire à une lyse des cellules résidentes exprimant l'antigène et que les macrophages vont commencer à capter l'antigène relargué avant d'être relayés par les nouvelles cellules dendritiques recolonisant la peau. Ensemble, ces cellules chargées d'antigènes vont alors migrer vers les ganglions pour une stimulation supplémentaire des cellules T.

Représentation schématique de la mise en place d'une réponse immune suite à une vaccination ADN intradermique



1.2. CARACTERISTIQUES DE LA REPONSE IMMUNE SPECIFIQUE

Nous avons voulu étudier différents paramètres de la réponse immune mise en place suite à la vaccination ADN. Les paramètres essentiels pour une vaccination comprennent ainsi le niveau de la réponse immune (classiquement on estime un seuil limite d'anticorps pour l'obtention d'une immunité protectrice), le profil de cette réponse (cellulaire/humoral ; Th1/Th2), la stabilité de la réponse et la mise en place d'une mémoire immunologique.

1.2.1. PROFIL DE LA REPONSE: TH1 OBLIGATOIRE?

Nos résultats sont originaux dans le sens où le profil de réponse observé après vaccination ADN avec le gène des GST de schistosomes (Sh28GST ou Sm28GST) est différent du consensuel profil Th1 décrit pour les protocoles de vaccination ADN publiés. En effet, que ce soit dans le modèle rat ou dans le modèle souris, les sous-classes d'anticorps induites vis-à-vis de l'antigène GST témoignent d'un profil mixte dépendant à la fois de l'activation de cellules productrices d'anticorps par des cytokines Th1 et par des cytokines Th2. Ce profil particulier semble donc être dépendant de la nature des antigènes GST qui, sous forme protéique, induisent des réponses purement Th2. Donc, l'emploi de la vaccination ADN permet une orientation du profil de la réponse de Th2 vers Th1/Th2 mixte.

Nous montrons clairement que le profil de la réponse est, dans la vaccination ADN, dicté par une activité portée par le corps plasmidique, puisque l'adjonction de plasmide non-codant à la protéine Sh28GST conduit à une réponse immune spécifique présentant exactement le même profil que celle obtenue avec le plasmide codant pour l'antigène. Cette orientation de la réponse immune vers un profil Th1 (dans notre cas vers un profil mixte) semble s'exercer aux premiers stades de la mise en place de la réponse immune, sans doute par la stimulation de la sécrétion de cytokines de type Th1, par les cellules de la peau et peut être également par les cellules dendritiques qui migrent aux ganglions. Ainsi, nous avons observé que par exemple l'administration de plasmides dans la peau conduit à l'induction rapide et transitoire (24heures) de l'expression des mRNA de l'IFN- γ et de l'IL-18 (résultats non présentés dans ce rapport). Cette stimulation précoce et transitoire serait donc suffisante pour imprimer sa marque à la réponse immune spécifique.

L'orientation de la réponse immune spécifique par les séquences immunostimulatrices vers un profil de type Th1 semble être difficile à inverser, notamment par l'administration consécutive de l'antigène sous forme protéique. C'est d'ailleurs la stabilité de ce profil qui permet d'envisager d'employer la vaccination ADN dans le domaine des allergies puisque l'administration de plasmides codant pour un allergène induit une réponse spécifique de type Th1, sans sécrétion d'IgE et que l'administration de l'allergène ne permet pas d'inverser ce profil vers une production d'anticorps anaphylactiques.

1.2.2. NIVEAU DE LA REPONSE IMMUNE

Peu d'études se sont attachées à comparer la vaccination ADN à une vaccination classique (protéique par exemple) en utilisant la même voie d'administration. Au cours de ce travail, nous avons injecté en parallèle 100 µg de protéine Sh28GST ou 100 µg de plasmide codant (pMSh) à trois reprises. Nous avons estimé que l'injection de 100 µg de plasmide codant conduisait à la synthèse de quelques dizaines de nanogrammes d'antigène *in vivo*. La réponse immune spécifique initiale obtenue montre que les niveaux d'anticorps sont comparables pour la vaccination ADN et la vaccination protéique. Ce résultat met donc bien en relief l'efficacité de l'immunisation ADN. Nous avons émis l'hypothèse que l'activation des cellules dendritiques par les séquences immunostimulatrices était responsable de cet effet. Pourquoi alors n'obtient on pas de réponse d'intensité plus forte lorsque l'on adjoint des plasmides non-codants à la protéine recombinante? Notre explication est que dans ce cas les séquences CpG des plasmides vont induire une maturation et migration des cellules dendritiques de la peau avant même que ces cellules n'aient eu le temps de capter l'antigène. En effet, dans la vaccination ADN on peut estimer que l'action des CpG est concomitante de la transfection.

1.2.3. MAINTIEN DE LA REPONSE

Une caractéristique commune des résultats obtenus avec la vaccination ADN concerne la durée des réponses immunes induites. Celle-ci a d'abord été attribuée à une expression prolongée de l'antigène. Lorsque nous avons comparé vaccination protéique et vaccination ADN, la vaccination ADN s'est avérée induire une réponse humorale prolongée se maintenant à un niveau constant sur le temps de l'expérience (8 mois), alors que la vaccination protéique induit une réponse en cloche. Lorsque l'on ajoute des plasmides non-codants à la protéine, on obtient alors également une réponse soutenue et constante dans le temps, indiquant à nouveau un rôle stimulant de l'ADN plasmidique d'origine bactérienne. Nous partons du principe que l'ADN plasmidique est rapidement dégradé et que son action stimulatrice est transitoire. Ce n'est donc sans doute pas la persistance de telles séquences qui peuvent expliquer le maintien de la réponse immune. Nous pensons que ces séquences pourraient exercer une activation des cellules dendritiques les amenant à présenter durablement l'antigène dans les ganglions. On peut également imaginer que l'effet de seconde vague (qui va sans doute également se produire dans le cas de la vaccination protéine + plasmides vides) de migration de cellules dendritiques chargées produit une espèce d'effet de boost assurant une présentation/stimulation prolongée.

1.2.4. PUISSANCE DE LA MEMOIRE

La puissance de la mémoire induite par la vaccination ADN est un argument qui a été mis en avant pour vanter les avantages de cette approche de la vaccination. Cependant aucune étude n'a réellement étudié la puissance de la mémoire induite par la vaccination ADN en comparaison d'une autre forme de vaccination. Nos résultats démontrent de manière claire qu'effectivement ce type de vaccination permet de mettre en place une réponse immune capable d'être fortement réactivée suite à un boost protéique réalisé plusieurs mois après l'immunisation. Or concernant ce

paramètre de la mémoire, il semble que cette activité dépende d'un mécanisme propre à la vaccination ADN et non pas d'un effet de stimulation non-spécifique induit par les séquences immunostimulatrices des plasmides. La mise en place d'une mémoire serait donc différente en fonction de la présentation de l'antigène dans le contexte vaccination ADN/vaccination protéique. Les résultats de Klinman indiquent clairement que la mise en place d'une réponse de type mémoire est liée à la première vague d'échantillonnage de l'antigène par les cellules dendritiques migrant de la peau aux ganglions en l'espace de quelques heures après l'injection des plasmides. La migration massive des cellules dendritiques pourraient donc jouer un rôle particulier de stimulation des lymphocytes T pour l'acquisition d'un phénotype mémoire spécifique de la peau.

2. Faisabilité d'une vaccination ADN contre les schistosomiasis

2.1. MIMER L'INFECTION

2.1.1. MISE EN PLACE DE LA REPOSE IMMUNE

On part souvent du principe qu'une vaccination efficace doit mimer l'infection par le micro-organisme que l'on veut combattre. Dans notre modèle, le mode de vaccination par ADN permet un accès efficace au système immunitaire de la peau qui reproduit assez bien l'infection naturelle par les schistosomes. Par contre, en ce qui concerne les mécanismes fins de présentation d'antigènes, il est vrai que ce type de vaccination nous rapproche davantage d'infections virales que d'infections par les helminthes. Cependant on pourrait soutenir qu'une partie de la réponse immune mise en place au cours de la vaccination ADN est consécutive à l'échantillonnage, par les cellules dendritiques et les macrophages, d'antigène synthétisé par des cellules résidentes de la peau. Ce type de mécanisme pourrait s'apparenter aux événements consécutifs à l'infection, puisque l'on soupçonne un rôle important des cellules dendritiques de la peau dans l'initiation de réponses immunes vis-à-vis des schistosomes. Un des résultats marquants du travail présenté dans ce rapport de thèse est la puissance du rappel induit par l'infection percutanée d'animaux vaccinés. Ce résultat indique l'existence d'une reconnaissance précoce et affine de la Sm28GST native des schistosomes infestants par des cellules présensibilisées par la vaccination. Nous n'avons pas étudié s'il s'agit de cellules mémoires, ni où elles se localisent, mais nous apportons des évidences soutenant la notion d'une recirculation de cellules spécifiques à l'ensemble du tissu peau. Cependant l'étude fine de la réponse spécifique des épitopes majeurs de la Sm28GST semble indiquer que suite à la vaccination la réponse est dirigée vis-à-vis des trois peptides majeurs, alors que l'effet de rappel induit par l'infection semble être majoritairement dirigé vis-à-vis de l'épitope 190-211. Ce résultat pourrait indiquer que lors de l'infection (au moins à un stade précoce), la présentation de l'antigène Sm28GST est plus restreinte que lors de la vaccination.

2.1.2. IMMUNITÉ LIÉE À LA PEAU LORS DE L'INFECTION

L'immunité spécifique induite par l'administration intradermique de plasmides codant pour l'antigène GST comporte une composante locale liée à la peau en plus de l'aspect systémique. D'une part, la réponse cellulaire spécifique est initiée au niveau des ganglions drainants. D'autre part, l'infection percutanée des parasites provoque une réactivation de la réponse uniquement dans le cas d'une immunisation par la peau. De plus, nous avons mis en évidence une forte expansion de cellules B au niveau des ganglions drainants suite à l'infection uniquement dans le cas d'une immunisation intradermique. Ces résultats montrent donc qu'une réponse de type mémoire est associée au site peau, jouant ainsi un rôle d'alerte prévenant de l'entrée des parasites à l'ensemble du système immunitaire. Puisqu'une immunité spécifique est associée au tissu d'entrée des parasites il serait intéressant d'analyser par quels mécanismes le

parasite provoque la réactivation de la réponse immune. A ce niveau, les cellules dendritiques doivent certainement jouer un rôle majeur, puisque chez des animaux non-immunisés, elles échantillonnent des antigènes des jeunes larves et participent activement à la mise à la stimulation de lymphocytes T [Sato *et al.*, 1995 ; Sato *et al.*, 1998]. Dans le cas d'animaux immunisés avec les plasmides codant pour l'antigène GST, on peut envisager que les cellules dendritiques puissent réactiver des lymphocytes T mémoires directement au niveau de la peau [Streilein *et al.*, 1990].

Dans le modèle que nous avons mis en place, il serait primordial d'analyser si la peau peut constituer un site effecteur vis-à-vis des parasites en conduisant, soit directement à leur mort, soit à des effets fragilisateurs. Nos expériences de protection montrent clairement que les parasites ne sont pas stoppés de manière significative lors de leur pénétration au travers de la peau immunisée. Même dans le cas de la potentialisation de l'effet protecteur par coadministration de plasmides codant pour l'IL-18, les phases d'attritions semblent avoir lieu, soit dans le poumon, soit à des stades de développement ultérieurs. Cependant, les informations collectées au cours de ce travail mettent en évidence l'intérêt de la peau comme site d'initiation de la réponse immune dans le sens où il peut constituer un système d'alerte capable de prévenir au plus tôt le système immunitaire d'une intrusion. De plus, le rappel provoqué par l'infection permet une maturation importante de la réponse immune en terme d'intensité.

Plus généralement, nos résultats mettent en relief l'intérêt de la peau comme site de vaccination, notamment vis-à-vis de pathogènes entrant en contact avec ce tissu, même s'il ne joue pas un rôle d'élimination directe. En outre, nos expériences combinant des sites d'immunisation intradermiques et des sites d'infestation différents semblent indiquer qu'il existe un système immunitaire général de la peau, impliquant une recirculation de cellules mémoires dans l'ensemble du tissu cutané. Ces observations vont dans le sens de la découverte récente de l'induction de réponses mucoales protectrices au niveau du tractus pulmonaire, suite à l'application à la surface de la peau de toxine cholérique [Glenn *et al.*, 1998], semblant donc indiquer que le système immunitaire de la peau peut établir des connexions étroites avec le système immunitaire commun des muqueuses.

2.2. PROFIL DE LA REPOSE IMMUNE

2.2.1. QUEL PROFIL POUR UNE PROTECTION?

L'évolution des réponses immunes naturelles vis-à-vis des schistosomes, soit au cours d'une infection (modèles animaux), soit au cours d'une histoire d'infections répétées (chez l'homme), montre la mise en place de profils de réponses très caractéristiques et reproductibles. Contrairement à d'autres modèles d'infection comme leishmania par exemple, il est difficile de prédire quel type de profil sera protecteur. Chez la souris le profil Th1 est le plus souvent associé à une immunité protectrice (sauf dans le cas d'une vaccination par infections multiples), chez le rat, les primates et l'homme, il semblerait au contraire que des profils de type Th2 soient associées à une protection [Capron, 1998]. Si l'on resitue le profil induit par notre mode de vaccination dans le cadre du concept qu'une immunité vis-à-vis de la schistosomiase reposant sur

une balance entre classes d'anticorps effecteurs et classe d'anticorps bloquants, il semble que l'on n'induit pas de classe bloquante mais que l'on ne favorise pas non plus le développement de la classe effectrice majeure (on ne favorise que la classe effectrice secondaire, soit les IgG à propriétés anaphylactiques). En ce qui concerne maintenant le profil des réponses cellulaires, on favorise nettement les cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ .

Des expériences de vaccination ADN avec le gène de la Sh28GST sont actuellement en cours chez des singes erythrocebus *Patas patas* au Niger, sous la conduite du Dr Denis Boulanger. D'ores et déjà, il apparaît que l'immunisation ADN intradermique soit immunogène puisque des réponses anticorps ont été obtenues, ainsi que des réponses cellulaires (prolifération de splénocytes après restimulation *in vitro*), dont l'amplitude est corrélée aux doses de plasmides injectés. Ces animaux ont été infectés et le suivi de l'infection et du statut pathologique des animaux est en cours. Il pourrait s'avérer qu'un profil nettement Th2 soit davantage synonyme de protection dans ce modèle se rapprochant de l'homme. Pour cette raison, nous envisageons de poursuivre nos recherches en utilisant deux approches visant à induire des réponses de type Th2 ou de type muqueux. La première approche est basée sur l'administration épidermique par l'emploi du gene gun qui permet de réduire les quantités de plasmides utilisées et permet d'induire un profil Th2 marqué [Feltquat *et al.*, 1997]. La seconde approche est elle basée sur l'emploi de microsphères PLG pour une administration par la voie orale de plasmides codant pour la Sh28GST. La comparaison des profils de réponses obtenus par ces 3 approches conduites chez le singe (id - aiguille, gene gun et orale - microsphères) et les implications en terme de contrôle des niveaux d'infection et de contrôle de la pathologie devraient nous permettre d'envisager, dans les prochaines années, un protocole de vaccination ADN contre les schistosomiasés chez l'homme.

2.2.2. VACCINATION ADN ET ADCC

Ce modèle dichotomique Th1/Th2 trouve une signification au moins pour un mécanisme effecteur reconnu, l'ADCC. En effet il a été montré que ce mécanisme cellulaire dépend essentiellement d'anticorps de type anaphylactiques et notamment IgE [Capron *et al.*, 1994b]. Or l'effet immunostimulant des séquences CpG semble inhiber totalement le développement de réponses de type Th2 dont dépendent les réponses IgE. Dans notre modèle de vaccination ADN, nous n'avons pas été capable de mettre en évidence de mise en place de réponse IgE, ni de sécrétion de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5) dont dépendent ce type d'anticorps. Cependant nous avons montré que chez le rat immunisé, les sérums contenant les classes d'anticorps spécifiques IgG2a et IgG2b, sont capable de participer à des mécanismes d'ADCC dépendants d'anticorps et avec des macrophages comme cellules effectrices. Ceci montre donc que notre modèle de vaccination induit des isotypes mixtes qui, même en l'absence d'IgE, peuvent participer de manière efficace à ce type de mécanisme. Il se peut que cette activité soit possible justement parce que nous avons un profil mixte plutôt que purement Th1. Malgré l'activité d'ADCC *in vitro* observée, nos expériences de protection ont révélée une certaine limite d'efficacité (40%) et une inconstance. On peut donc penser que dans ce modèle l'immunité protectrice mise en place pourrait être augmentée si l'on parvenait à induire des anticorps de classe IgE.

2.2.3. MATURATION DE LA REPONSE SPECIFIQUE VERS LA PRODUCTION D'IGA SPECIFIQUES

Plusieurs arguments convergent pour indiquer un rôle de la classe d'anticorps IgA dans l'expression de l'effet anti-fécondité. Ainsi chez l'homme, les IgA sont étroitement reliés à un phénomène de résistance à la réinfection [Grzych *et al.*, 1993 ; Remoué, manuscrit en préparation]. Dans un protocole associant vaccination ADN et chimiothérapie au PZQ, nous avons mesuré une forte augmentation de cette classe d'anticorps chez les animaux survivants. L'apparition de ce type de réponse laisse présager de l'installation d'une immunité à la réinfection. Dans ce cas, c'est l'infection et des conséquences d'un traitement synergisé par la vaccination qui constituent les évènements entraînant la maturation de la réponse vers un profil protecteur. A la lumière de ces résultats, on peut donc entrevoir que le succès de la vaccination reposera justement sur une succession de tels stimuli amenant à une maturation séquentielle à la fois de la réponse spécifique mais également de la réponse immune vis-à-vis de l'ensemble des épitopes du parasite. Chez les personnes infectées, l'immunité s'acquière lentement après une succession d'infections, mais également de traitements chimiothérapeutiques provoquant de véritables boosts antigéniques [Mutapi *et al.*, 1998]. Les stratégies vaccinales dessinées à l'heure actuelle par notre laboratoire reposent donc sur la combinaison d'une infection en cours, d'une vaccination spécifique d'un antigène et d'un traitement au praziquantel.

3. Stratégies d'optimisation mises en oeuvre

3.1. IMMUNO-CHIMIOThERAPIE

L'avancée la plus déterminante dans la lutte contre les schistosomiasés a certainement été la découverte et la distribution du praziquantel, antihelminthique puissant. Malgré l'efficacité d'un traitement pour débarasser un individu des vers qu'il héberge, l'emploi du praziquantel n'est efficace qu'à court terme car il n'empêche pas le développement d'infections ultérieures. Le besoin d'une vaccination est donc urgent. Seulement, puisque l'on dispose d'un médicament actif, toute prise en charge de patients infectés pour l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin devra être accompagnée d'une chimiothérapie. Nous appuyant sur le fait que ce traitement particulier utilise des composantes du système immunitaire de l'hôte pour tuer les vers, nous avons délibérément pris le parti de tester la vaccination en association avec la chimiothérapie.

Il a été démontré que la pleine efficacité du praziquantel nécessitait des composantes immunologiques de l'hôte. L'action du praziquantel sur les vers constituerait en fait une atteinte ni complètement mortelle ni irréversible, mais simplement fragilisante. Les vers, de part le turnover de leurs structures tégumentaires ont en effet la possibilité de contrer au moins partiellement les effets à court terme de la drogue (demi-vie de l'ordre de 24 heures du praziquantel). Nous pensons que l'origine de l'efficacité du traitement provient des réponses immunes de l'hôte venant véritablement achever, par des mécanismes de cytotoxicité cellulaire, le parasite dont la carapace d'invisibilité que constitue le tégument a été endommagée. Dans ce contexte, on comprend qu'une réponse immune induite par la vaccination peut permettre à l'hôte de mettre davantage de moyens en jeu pour détruire les vers.

Il devient urgent de développer des approches de contrôle de l'infection qui puissent être complémentaires de la chimiothérapie au praziquantel car des formes de résistance des parasites ont été mises en évidence. Il semble en effet que le traitement ne permette pas de tuer la totalité des vers d'un individu infecté. Ce phénomène résulte peut être de l'emploi chez l'homme de doses sub-optimales [Doenhoff, 1998]. Mais il convient de noter que, chez la souris, même à des doses très élevées (500 mg/kg, soit 10 fois plus que les doses utilisées chez l'homme), une certaine fraction des vers survit. Ainsi, cette hétérogénéité pourrait être à l'image d'un mélange de parasites naturellement plus ou moins sensibles. Bien-entendu, il se peut que ce caractère soit déterminé génétiquement. Dans ce cas, un traitement sub-optimal exercerait une pression de sélection, en laissant la possibilité aux parasites les plus résistants de transmettre leurs oeufs. L'adjonction d'une immunointervention anti-pathologique (vaccination GST) permettrait donc un blocage à la fois de la pathologie et de la transmission, puisque les quelques vers résistants à l'action du praziquantel auraient leur capacité de reproduction enrayée.

3.2. LE PRAZIQUANTEL COMME MODULATEUR DE L'IMMUNITE SPECIFIQUE

Nous venons de voir qu'une immunisation active peut potentialiser l'action du praziquantel qui doit se faire de manière concomitante à des mécanismes immunologiques. Notre étude a également clairement fait ressortir que le traitement au praziquantel pouvait agir comme véritable modulateur de l'immunité spécifique induite par la vaccination. En effet, nous avons observé que chez des souris immunisées par des plasmides codant pour la Sm28GST, puis infectées, le traitement par le praziquantel provoque une maturation de la réponse: boost IgG, mise en place d'une réponse de type IgA et augmentation du pouvoir neutralisant des anticorps vis-à-vis de l'activité enzymatique GST. On peut ainsi penser que l'effet du traitement (en synergie avec les réponses immunes présentes) va conduire à une libération massive d'antigènes suite à la destruction plus ou moins complète des vers. Etant donnée la concentration de l'antigène Sm28GST au niveau des tubercules des vers males qui semblent être les premiers sites atteints par le traitement, on peut entrevoir une forte exposition de ce antigène après le traitement. Un autre critère important pour tenter de comprendre le changement de profil de la réponse spécifique pourrait être lié au fait que le traitement va conduire indirectement à une réduction drastique du nombre d'oeufs pondus et donc du nombre d'oeufs se retrouvant emprisonnés dans les tissus. Or les oeufs et les produits qu'ils sécrètent sont à l'origine d'un profil marqué de cytokines. La disparition suite au traitement d'un tel stimulus pourrait donc avoir des conséquences sur le profil de la réponse immune induite par la vaccination. D'ailleurs dans un contexte plus général, Woolhouse parle même du traitement comme quelque chose d'immunisant puisque les études de terrain conduites par son équipe montrent que le traitement induit de manière relativement rapide un shift de la réponse immune aux schistosomes vers un profil qui est celui associé à la résistance et qui s'acquière de manière naturelle sur une échelle de temps très longue [Mutapi *et al.*, 1998].

3.3. PROTOCOLE THERAPEUTIQUE

Le traitement au praziquantel et l'immunité spécifique peuvent donc agir de concert pour une meilleure efficacité à court terme (destruction des parasites au temps du traitement), mais également la mise en place d'une immunité protectrice à long terme (maturation de la réponse vers un profil protecteur). Dans le cadre du dessin des protocoles pour les futures essais cliniques avec le candidat vaccinal Bilhvax (Sh28GST), il convient de penser à inclure le traitement au praziquantel de manière à définir les meilleures combinaisons possibles. La synergie que nous avons décrite implique que la vaccination soit réalisée de manière antérieure au traitement. Une des limites envisageables de cette combinaison est que le traitement risque d'induire une forte réponse polyclonale qui pourrait noyer en quelque sorte la spécificité de la réponse immune mise en place par la vaccination. Ainsi nos protocoles vaccinaux incluront également la combinaison inverse de celle étudiée chez la souris, soit traitement d'abord, puis vaccination. En effet il faut mentionner que cette vaccination, bien qu'ayant pour cible les jeunes enfants, ne se fera pas chez des personnes indemnes de schistosomiase. Dans ce cadre, le démarrage d'une vaccination par un

traitement de fond au PZQ permettrait de niveler les réponses immunes de chaque individu (fortes variations individuelles). Ainsi, la vaccination spécifique d'un antigène devrait pouvoir jouer un rôle d'affinage des réponses immunes polyspécifiques vers l'antigène vaccinal.

4. Immunité anti-GST et mécanismes de protection contre les schistosomes

4.1. IMMUNITE ANTI-FECONDITE

De manière très reproductible dans de nombreux modèles animaux, les GST de schistosomes se révèlent être des antigènes permettant d'induire une puissante immunité anti-fécondité. On a pu relier cet effet à une action d'inhibition de l'activité enzymatique GST. Ce critère d'inhibition a d'ailleurs été retenu comme marqueur d'une immunité spécifique effectrice dans le cadre des essais cliniques avec le produit Bilhvax. Toutefois, cette relation a été établie sans que l'on comprenne réellement les mécanismes mis en jeu pour affecter la fécondité. Si l'on tente de rapprocher la localisation fine de la Sm28GST de ses propriétés protectrices on peut envisager les mécanismes suivants: Expression au niveau de l'ootype: baisse de la viabilité des oeufs, Expression nucléaire: mécanismes bloquant le contrôle de l'oxydation des acides nucléiques, cellules germinales: baisse de la fécondité, tégument: augmentation de l'ADCC et baisse des réparations membranaires.

4.2. UN DEFICIT NUTRITIONNEL DES VERS FEMELLES?

Au cours de ce travail, un effet anti-fécondité a clairement été mis en évidence dans le cadre d'une approche combinant vaccination ADN Sm28GST et chimiothérapie PZQ. Nous avons tenté d'explorer les mécanismes régissant la synergie entre l'immunointervention vaccinale et le traitement. De manière non-équivoque, le PZQ induit un décapage de déterminants antigéniques au niveau essentiellement des tubercules dorseaux des vers adultes mâles. Ce décapage permet alors la liaison d'anticorps induits par la vaccination capable d'inhiber au moins de manière partielle l'activité GST associée aux vers. A l'opposé, un tel mécanisme n'a pas été observé chez les vers femelles. Le mécanisme observé en cache-t'il un autre plus spécifique des vers femelles? Ou bien l'atteinte des vers mâle ne pourrait-elle pas être indirectement la cause d'une réduction de la fécondité?

Les conséquences du démasquage des sites devenant accessibles aux anticorps bien que non approchées en détail au cours de ce travail pourraient être les suivantes: recouvrement des vers mâles d'anticorps transperçants ainsi le voile de la mimicrie et permettant l'adhésion anticorps-médiée de cellules capables de conduire à une destruction des parasites par des mécanismes de type ADCC. D'autre part (et de manière peut-être concomitante de ce premier mécanisme), l'inhibition de l'activité GST empêche le parasite de faire face de manière adéquate aux attaques cellulaires qu'il subit. En effet les GST sont vraisemblablement impliquées dans des mécanismes de détoxification secondaires des attaques cellulaires libérant notamment des radicaux oxydants. Nous avons imaginé que le schistosome puisse mettre en oeuvre une

régulation positive de l'expression de la GST pour faire face à de telles attaques. Cependant il ne semble pas qu'une régulation précoce ait lieu.

A la lumière de ces possibles mécanismes conduisant à un affaiblissement des vers mâles (et à une mise en oeuvre probable de mécanismes de réparation des atteintes tégumentaires), on peut penser raisonnablement que les vers femelles en pâtissent. En effet il convient de rappeler que les femelles dépendent beaucoup des mâles concernant leur protection vis-à-vis des attaques extérieures et concernant leur nutrition. Ainsi les travaux de Alison Agnew mettent en évidence la dépendance énergétique concernant par exemple le glucose [Camacho *et al.*, 1995]. On sait l'importance des structures tégumentaires dans les échanges entre le milieu extérieur et intérieur et donc à fortiori entre les membres d'un couple.

Nos expériences ont donc reproduit l'effet vaccinant original de la GST, à savoir l'effet anti-fécondité. Nos investigations nous laissent penser qu'un mécanisme mettant effectivement des anticorps neutralisant l'activité GST soient en jeu, mais agissent de manière tout à fait indirecte sur la fécondité en affaiblissant le mâle le rendant plus sensible à des attaques cellulaires et en l'empêchant d'utiliser une partie de son bagage enzymatique pour se défendre pour aboutir à une levée de l'attention portée sur la femelle dépendante.

Ce type de mécanisme d'une immunité anti-fécondité permet de relier l'ensemble de nos résultats et de la relation au caractère neutralisant des anticorps. Il serait en effet difficile de soutenir l'existence d'un mécanisme direct qui impliquerait par exemple un accès direct des anticorps neutralisants aux organes de la reproduction. En outre, si effectivement les anticorps générés par la vaccination avaient la possibilité d'induire une neutralisation directe des mécanismes de fécondité des vers, alors ce type de vaccin comporterait éventuellement des risques potentiels sur la fécondité des personnes vaccinées. Ce risque a été évalué de manière fine au cours d'études de toxicologie chez le rat sans qu'aucune trace d'une telle activité n'ait pu être décelée.

4.3. IMMUNITE ANTI-VERMINEUSE

L'expression de l'antigène GST au cours des stades de maturation du parasite dans l'hôte définitif donne une indication de la possibilité d'intervention des mécanismes immunologiques déployés par l'organisme. Ainsi, même si la Sm28GST est exprimée à chacun des stades, son accessibilité aux anticorps évolue au cours du cycle.

Lors de la pénétration des parasites par la peau, cet antigène semble être sécrété en même temps que le pool d'enzymes protéolytiques de la matrice extracellulaire. Ce relargage permettrait certes d'induire ou de rappeler des réponses immunes spécifiques à un stade précoce, sans toutefois constituer une cible suffisamment ancrée sur le parasite pour favoriser un contact cellulaire. De plus, il semble bien que les parasites au stade de la pénétration active de la peau forment autour d'eux une lacune les isolant véritablement des interactions directes avec des constituants cellulaires de l'hôte.

Nous n'avons pas beaucoup de données concernant l'expression de l'antigène GST au niveau du stade pulmonaire. Toutefois, il semble raisonnable de penser que c'est à ce niveau que ce antigène doit être le plus accessible. En effet, le parasite est alors au contact direct d'un environnement cellulaire pour une durée de quelques jours et est en pleine mutation ; le parasite aura donc besoin de son pool d'enzymes (dont les GST) impliquées dans la detoxification de dérivés oxidants émanant des cellules voisines?

Au stade ultime de son développement dans l'hôte définitif, le parasite est recouvert d'un véritable masque occultant une exposition par trop voyante d'antigènes tels que la Sm28GST. Même si cette enzyme est concentrée dans des structures de surface comme les tubercules elle semble néanmoins ne pas être directement exposée vers le milieu sanguin extérieur. Ainsi nos expériences de marquage immunofluorescent montrent que la Sm28GST n'est pas directement accessible (ou du moins pas à des niveaux détectables) à des anticorps spécifiques. On peut penser qu'au cours du recyclage de son tégument, le parasite rejette des antigènes tels que la Sm28GST, sans que celle-ci ne soit associée réellement aux vers. Nos travaux montrent le rôle mécanistique que peut jouer une drogue comme le praziquantel pour le démasquage d'antigènes tégumentaires non membranaires, rendant alors le parasite vulnérable à des attaques cellulaires médiées par les anticorps en plus des atteintes propres de la drogue.

Perspectives

1. Stratégies de développement de la vaccination ADN contre les schistosomiases

1.1. ACCROISSEMENT DE L'EFFET ANTI-FECONDITE

Le bilan des recherches consacrées aux infections par les schistosomes fait apparaître qu'il semble difficile de contrôler les niveaux d'infection (au moins dans les modèles animaux) par des stratégies de prophylaxie vaccinale. A ce niveau, les efforts de démarches sanitaires et éducatives visant à limiter la transmission et l'infection sont à poursuivre et à intensifier. On part du principe que l'on sera difficilement en mesure d'enrayer l'infection, donc l'intervention médicale préventive doit s'exercer contre la véritable cause du développement de la pathologie, c'est à dire le dépôt tissulaire des oeufs. Le contrôle du développement de la réaction inflammatoire est un défi risqué car empêcher une réaction inflammatoire risque également de déstabiliser le mécanisme d'excretion des oeufs qui est relié.

Dans ce contexte, le sentiment de plusieurs groupes de recherche est qu'il faut trouver un moyen d'agir spécifiquement sur la fécondité des vers. Ainsi des démarches en ce sens visent à identifier des molécules exprimées spécifiquement par les vers femelles, pour pouvoir ensuite développer des inhibiteurs spécifiques. De manière plus large, une des fragilités des schistosomes adultes vient du fait que la femelle, étant tellement tournée vers la production de ses oeufs, dépend énormément de son compagnon pour sa nutrition. Une des possibilités d'intervention résiderait donc à couper une des voies de communication mâles-femelles. Comment agir à ce niveau par un mécanisme immunologique qui serait mis en place par une vaccination? Nos expérience de vaccination ADN avec le gene de la Sm28GST combinée avec la traitement au praziquantel indiquent que sans doute une inhibition d'une telle enzyme au niveau du mâle peut affecter la fécondité des femelles. Si l'effet observé est réellement lié à une incapacité du mâle à assurer ses propres défences (et donc à continuer à nourrir sa femelle), une stratégie de vaccination ADN combinant les gènes d'enzymes également impliquées dans les réactions de détoxification des radicaux oxydants devrait garantir un effet neutralisant d'autant plus important. Ainsi, on dispose des cDNA de la super oxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPX). Le développement d'une telle stratégie permettrait également de savoir si le mécanisme affectant la fécondité est indirect comme nous le proposons ici, ou bien s'il repose sur une fonction plus directe de la GST au niveau de la fécondation.

1.2. CROSS-REACTIVITE ENTRE GST

Les glutathion *S*-transferases des principales espèces de schistosomes ont été clonées et présentent des homologies très importantes entre-elles. Ceci laisse envisager que l'on puisse avec une seule de ces enzymes induire une immunité croisée efficace vis-à-vis des différentes espèces

de schistosomes [Riveau *et al.*, 1998]. Au cours de ce travail, nous avons entrepris des expériences de vaccination ADN avec les séquences de Sm28GST et de Sh28GST. De manière très nette, la Sh28GST s'est révélée être beaucoup plus immunogène que la Sm28GST. Ces observations sont à rapprocher d'expériences parallèles réalisées avec des BCG recombinants [Kremer, *et al.*, in press]. Dans ce modèle l'immunisation avec des BCG exprimant la Sh28GST induisent des d'anticorps qui sont capables de reconnaître la Sm28GST. En outre, les anticorps générés par une vaccination protéique Sh28GST sont capables d'inhiber fortement l'activité enzymatique de la Sm28GST. De même, les sérums de patients infectés par *S. haematobium* sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm28GST. Ces données indiquent donc que la Sh28GST pourrait être un bon candidat pour induire une immunité protectrice contre différentes espèces de parasites. Nous avons donc entrepris d'immuniser des souris avec le plasmide pMSh codant pour la Sh28GST et d'infecter ces animaux avec des cercaires de l'espèce *S. mansoni*. Nos résultats préliminaires indiquent que ce protocole permet d'induire une réduction de 30 à 40% de la charge en vers et du nombre d'oeufs tissulaires. Une connaissance encore plus fine des épitopes impliqués dans les mécanismes de protection pourrait nous permettre d'envisager prochainement de construire génétiquement une GST hybride des différentes GST de schistosomes. Ainsi, nous pourrions développer de manière rationnelle un candidat vaccinal efficace vis-à-vis des principales espèces de schistosomes.

1.3. APPROCHES MULTIVALENTES

1.3.1. APPROCHES CIBLEES

L'outil ADN pour le développement de stratégies vaccinales apporte la possibilité de mélanger autant d'antigènes d'un agent pathogène que l'on souhaite. Ainsi le Dr Hoffman et son équipe prouvent le développement d'une approche multi-valente et multi-stade vis-à-vis des plasmodiums. Dans le cas de l'infection par les schistosomes, les antigènes majeurs des différents stades et sites de maturation des parasites n'ont pas été aussi clairement établis. Cependant on peut penser que par exemple le ciblage par la vaccination des protéases impliquées dans la pénétration cutanée des parasites pourrait être envisagée. Dans le même ordre d'idées, nos travaux indiquent le potentiel d'une approche ciblée sur le blocage d'une fonction vitale du parasite. Ainsi comme nous l'avons exposé précédemment, la combinaison de plasmides codant pour les différentes enzymes impliquées dans la détoxification: GST, GPX et SOD devrait garantir une efficacité accrue de notre approche. En outre, les limites des résultats de protection obtenus font ressortir la capacité des schistosomes à échapper aux réponses immunes de l'hôte. Nous avons montré qu'un moyen de déstabiliser les parasites est l'emploi combiné de drogues comme le praziquantel. Nos expériences montrent aussi que le caractère migratoire des parasites semble être un moyen d'échapper aux réponses immunes spécifiques des tissus traversés comme la peau ou les poumons. En effet, la protection induite par les cercaires irradiées semble liée à un processus de migration plus lent de ces parasites affaiblis. Ceci est confirmé par le fait que ce type d'immunisation est inefficace avec l'espèce *S. japonicum*, dont le transit pulmonaire est plus rapide [Moloney *et al.*, 1985]. Nous pensons donc que la vaccination doit mettre en place un relais entre la peau et les poumons notamment. Ce type de relais entre deux sites locaux implique donc

le choix d'antigènes commun aux deux sites. L'approche envisagée consiste en une vaccination simultanée au niveau de la peau et au niveau des poumons. Récemment le groupe du Dr Inchauspé a ainsi pu mettre en évidence l'intérêt de combiner une vaccination ADN au niveau des muscles et de la peau pour induire un profil de réponse aussi large que possible vis-à-vis d'un antigène de l'hépatite C [Fournillier *et al.*, 1998].

1.3.2. APPROCHES GENOMIQUES

Ces dernières années des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine de la connaissance du génome des schistosomes. Ces parasites comportent 8 chromosomes par genome haploïde dont un chromosome sexuel. L'ensemble du génome s'étend sur environ $2,3 \times 10^8$ paires de bases. Presque la moitié du génome des schistosomes est constitué de régions avec des séquences répétées, régions sans doute non-codantes. L'OMS a lancé un programme international pour l'analyse du génome des schistosomes. Une démarche de séquençage systématique est difficilement envisageable à l'heure actuelle pour des raisons de durée et de coûts. Cependant les efforts se sont portés sur le séquençage de nombreux fragments de cadres ouverts de lecture ou ESTs (Expressed Sequence Tags), qui sont donc des séquences de parties codantes. Une des idées que l'on peut formuler pour une exploitation concrète de ces séquences, serait de regrouper l'ensemble de ces clones de ESTs, de les insérer dans des plasmides d'expression eucaryote et d'injecter cette banque d'EST à des animaux pour, dans un premier temps, en tester l'immunogénicité. De là, un système de tri peut être envisagé pour sélectionner les candidats les plus immunogènes dont on pourrait alors tester le pouvoir protecteur avant de réaliser l'identification de l'ensemble du gène. Une telle démarche pourrait ainsi constituer une approche rationnelle à échelle raisonnable, car force est de constater que le système déployé par le Dr Johnston n'est pas applicable aux schistosomes à cause de la taille de leur génome et à cause de l'absence d'un test de protection simple et rapide. L'identification de ces séquences constitue un premier jalon pour la caractérisation de nouveaux candidats vaccinaux ou de nouvelles cibles pour des chimiothérapies.

1.4. VACCINATION ADN ET GLYCOPROTEINES

Les antigènes fortement glycosylés sont généralement très immunogènes et il semble qu'ils puissent constituer des vaccins très efficaces. Les épitopes sucrés sont présentés par des voies différentes des voies classiques de présentation de peptide (molécules du CMH de classes I et II). En effet, ces épitopes sont retrouvés en association avec la molécule CD1a à la surface des cellules présentatrices. Dans le contexte de l'infection par les schistosomes, des motifs oligosaccharides sont impliqués dans des mécanismes d'immunorégulation et d'immunité protectrice [Velupillai *et al.*, 1994]. Ainsi un vaccin anti-idoïtype a pu être mis au point dans un modèle d'infection chez les rongeurs [Grzych *et al.*, 1985]. Cependant, ce genre d'approche est relativement lourd. Une des promesses de la vaccination ADN réside dans la possibilité de travailler avec des protéines comportant de nombreux sites de glycosilation. Cependant ce type de

développement implique que les modifications post-traductionnelles des schistosomes soient proches de celles des mammifères supérieurs. Un travail de fond sur les glycosylations dans les schistosomes reste donc à être effectué. Ce type de travail pourrait également déboucher sur la caractérisation d'enzymes spécifiques des schistosomes impliquées dans ces modifications post-transcriptionnelles et qui pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

2. La vaccination ADN dans le contexte de la médecine moderne

2.1. VECTORISATIONS ET CIBLAGES

De manière surprenante, les voies classiquement utilisées en vaccination dans des modèles animaux, à savoir les voies sous-cutanée et intrapéritonéales, s'avèrent totalement inefficaces en vaccination ADN. Ce constat souligne donc la particularité de ce mode de vaccination en ce qui concerne les mécanismes d'induction des réponses immunes, et met en relief la fragilité des plasmides au sein des espaces extracellulaires de l'organisme. Pour cette raison, le ciblage des voies muqueuses reste encore un domaine de développement sous-évalué de mode de vaccination. Pourtant, nous estimons que la vaccination ADN ne pourra se généraliser et s'imposer dans des applications larges chez l'homme que si elle offre des avantages déterminants tels que la possibilité d'une vaccination par voie orale ou nasale. Les efforts doivent donc se porter sur le développement de vecteurs capables de protéger l'ADN des dégradations et capables de faciliter la transfection de cellules immunocompétentes. Comme nous l'avons démontré dans ce travail, ce défi est réalisable puisque les plasmides sont capables d'être incorporés de manière satisfaisante à des vecteurs de type liposomes cationiques et microsphères PLG. En outre, les cellules des tissus muqueux ne semblent pas réfractaires à une transfection puisque nous avons pu caractériser l'expression de l'antigène notamment au niveau du tractus respiratoire.

Nos travaux se sont attachés à caractériser les sites d'expression de l'antigène suite à la vaccination ADN. Nos résultats montrent que la vaccination ADN peut conduire à une expression locale de l'antigène, pouvant ainsi contribuer à la mise en place d'une réponse immune à composante locale, dans le cas du ciblage d'un tissu immuno-compétent comme la peau, le tractus gastro-intestinal ou les poumons. L'accessibilité de ces sites pour une vaccination non invasive les rendent très attrayants et des efforts restent à porter dans le développement de vecteurs adaptés. Ainsi, nous avons mis au point des liposomes cationiques, dont les caractéristiques biophysiques laissent augurer d'une plus grande stabilité pour un usage *in vivo*. Il nous reste donc à tester ce type de formulation pour un ciblage du tractus respiratoire. D'autre part le développement de microsphères pour une vectorisation des plasmides au niveau du tractus gastro-intestinal donne de premiers résultats encourageants qui se poursuivent à l'heure actuelle au sein du laboratoire.

Des vecteurs synthétiques peuvent donc être utilisés pour délivrer l'ADN au niveau notamment des voies muqueuses, mais ce type de vecteurs permet également d'envisager un ciblage cellulaire des plasmides. Ainsi, un des développements de la vaccination ADN concerne le ciblage de la transfection aux cellules dendritiques puisqu'elles constituent les principales initiatrices des réponses immunes. Le développement de ce type de ciblage implique l'identification de ligands spécifiques que l'on puisse associer aux plasmides par l'intermédiaire par exemple de liposomes. Nous avons entamé une étude concernant ce type d'approche par l'étude de l'association de peptides à l'ADN, soit directement, soit par l'intermédiaire de

liposomes. Nous envisageons maintenant de tester la stabilité de tels complexes *in vivo* et de vérifier la capacité de conduire à une transfection ciblée.

D'autres approches de ciblage tissulaire ou cellulaire sont également à l'étude par d'autres groupes. Ainsi par exemple une étude rapporte la construction de plasmides codant pour des protéines chimères constituées de l'antigène couplé à des ligands spécifiques [Boyle *et al.*, 1998]. Cette étude montre ainsi qu'un ciblage vers les ganglions est possible en couplant l'antigène à la L-sélectine qui se lie spécifiquement au récepteur CD34 présent à la surface des cellules endothéliales hautes des veinules ganglionnaires. De la même façon le ciblage cellulaire des cellules présentatrices d'antigène est réalisée par le couplage à la molécule CTLA4, qui est le contre-récepteur des molécules B7.

Enfin, le type de ciblage le plus fin que l'on puisse imaginé concerne le routage intracellulaire de l'antigène néosynthétisé. Outre les stratégies visant à greffer ou supprimer des séquences signal pour la sécrétion de l'antigène [Inchaupse *et al.*, 1997], d'autres stratégies visant notamment à accroître la présentation restreinte par les molécules de CMH classe I sont envisageables. Ainsi il est possible de greffer dans la partie N-terminale de l'antigène, des acides aminés assurant un routage vers une protéolyse au niveau des protéasomes [Wu *et al.*, 1997]. Cette approche a permis d'orienter la réponse immune spécifique vers une réponse de type purement CTL. D'autre part, il a été montré que l'attachement covalent de peptides à la chaîne légère des molécules CMH classe I, permettait de protéger les peptides de dégradation et assurait une stabilité accrue du complexe MHC-peptide, garantissant par la même une forte stimulation des lymphocytes T CD8⁺ [Uger *et al.*, 1998]. Ce type d'approche est tout à fait abordable dans le cadre de la vaccination ADN visant à induire des réponses CTL fines vis-à-vis d'épitopes bien précis.

2.2. IMMUNOMODULATION

Notre travail a mis en évidence que la modulation de réponses immunes spécifiques pouvait dépendre d'événements tels que l'infection naturelle ou l'association à la vaccination d'un traitement chimiothérapeutique. Ainsi nous entrevoyions l'immunomodulation comme un maturation de la réponse immune vers un profil protecteur. Cette démarche trouve en quelque sorte son parallèle dans l'infection naturelle, au cours de laquelle un profil associé à une forme de résistance se met progressivement en place. Nous pensons que des protocoles combinés vont pouvoir induire ce type de maturation tout en garantissant des réponses immunes avec des profils plus larges. Nous avons abordés en détail l'association vaccination ADN et chimiothérapie au praziquantel [Dupré *et al.*, 1997]. Nous avons également abordé la réalisation de protocoles combinants vaccination ADN et rappel protéique, qui s'est révélé efficace dans le modèle de HIV [Letvin *et al.*, 1997]. D'autre part, l'association vaccination ADN et vaccination par des vecteurs viraux s'est révélée également très efficace dans le modèle du paludisme [Schneider *et al.*, 1998].

Les progrès considérables réalisés dans le domaine de l'immunologie moléculaire ont ouvert la porte à des approches très fines de modulation de réponses immunes. Ces approches bénéficient maintenant de l'outil ADN qui s'avère être adapté à la synthèse prolongée de quantités physiologiques de molécules régulatrices. Les premières études ont portées sur l'administration de cytokines, et de molécules costimulatrices. Grâce à des progrès récents dans la compréhension des mécanismes de recrutement cellulaire [Dieu *et al.*, 1998 ; Sallusto *et al.*, 1998], les prochaines étapes pourraient bien concerner l'emploi de gènes codant pour des chémokines, notamment dans le but d'accroître le recrutement de cellules dendritiques au site d'expression de l'antigène. Finalement, le transfert de gènes de molécules impliquée dans la présentation d'antigène et de molécules immunomodulatrices en même temps que celui de gènes d'antigènes peut laisser penser que l'on pourra reconstituer la cellule présentatrice idéale, qui devient alors une cellule complètement transformée génétiquement, véritable cellule vaccinale jouant à la fois le rôle d'usine à vaccin et de vitrine à antigène.

Il semble bien que la nature de l'antigène joue également un rôle important dans l'orientation de la réponse immune. Ainsi, les antigènes GST que nous avons employés semblent en mesure d'interférer avec le profil Th1 habituellement obtenu par vaccination ADN. Notre hypothèse est que l'activité GST, régulant le potentiel redox intracellulaire de la cellule transfectée, inhibe partiellement l'activité des séquences immunostimulatrices CpG, dont le signal de transduction passerait par la voie redox. D'ailleurs, un article récent démontre le rôle crucial des niveaux de glutathion dans la balance Th1/Th2 [Peterson *et al.*, 1998]. Enfin, dans le domaine de la potentialisation et l'orientation de l'immunité, l'ADN d'origine bactérienne et plus spécifiquement les séquences nucléotidiques CpG semblent être promis à des applications thérapeutiques multiples.

2.3. AVENIR: RISQUES MAITRISES OU DERIVE?

Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse s'inscrit dans une approche fascinante de la médecine moderne consistant à transférer dans nos cellules des gènes, dans un but de correction de défauts génétiques (thérapie génique) ou dans le but d'induire des réponses immunes protectrices (vaccination ADN). Le développement de ce type d'outil d'intervention chez l'homme n'est pas sans dangers et soulève d'importantes questions d'éthique. Mon devoir de chercheur n'est pas de juger, mais plutôt de tenter de développer des moyens de maîtrise des risques. En outre, le monde de la recherche ne doit pas se cloisonner derrière les portes des laboratoires, mais doit s'ouvrir à l'ensemble des citoyens. Dans cette optique, je me permets d'exposer un scénario plausible de développement de la vaccination ADN dans la prochaine décénies.

L'EXTRA-CHROMOSOME THERAPEUTIQUE ET VACCINAL

La multiplication des applications thérapeutiques ou prophylactiques pour lesquelles on tente de développer un transfert de gènes me laisse à penser (et cela germera dans l'esprit d'autres chercheurs) qu'il serait plus aisé de pouvoir disposer d'un chromosome satellite, base avancée au coeur de nos cellules pour un transfert de gènes sans risque de perturbation de notre génome naturel par des mécanismes d'insertion aléatoire. Un tel chromosome supplémentaire pourrait ainsi être porteur de gènes clonés de tout un ensemble de microorganismes pathogènes (en couplage par exemple avec la technologie développée par le Dr Johnston pour le tri de gènes protecteurs et le séquençage systématique de ces microorganismes).

Ce concept est réalisable puisque l'on peut maintenant reconstituer des souris avec des chromosomes artificiels de levure (YAC) [Green *et al.*, 1998]. L'expression des différents gènes présents, ou qui pourraient venir se greffer par l'intermédiaire de sites d'insertion aménagés, pourrait être contrôlée par des promoteurs inductibles. Ainsi, de manière idéale la simple prise orale d'un inducteur spécifique permettrait l'expression des gènes de tel ou tel pathogène et induirait ainsi une vaccination ou un rappel de vaccination. Une question cruciale concerne l'insertion d'information génétique nouvelle au sein des cellules germinales. Pour l'instant de telles manipulations ne sont pas autorisées car elles ouvrent la voie d'une dérive théorique incontrôlée du patrimoine génétique de l'espèce humaine. Mais qu'en sera-t'il demain?

Autrefois l'homme ne comprenait pas le monde sauvage et naturel qui l'entourait. A force de vouloir maîtriser la nature, il a créé un nouvel environnement artificiel. Toutefois, cet environnement fragilise et déstabilise le monde naturel. Par analogie, l'extrachromosome thérapeutique et vaccinal ne risque t'il pas d'influencer ou de déstabiliser notre patrimoine génétique naturel? L'homme continuera d'inventer de nouveaux outils technologiques, mais il lui faudra avoir la sagesse de prendre suffisamment de recul et de réflexion pour que sa course à l'innovation ne vienne pas détruire ses rêves.

Bibliographie

- Abdel-Salam, E., Ishaac, S. & Mahmoud, A.A.F. 1979. Histocompatibility-linked susceptibility for hepatosplenomegaly in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **123**: 1829-1831.
- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D., Jani, A., Walsh, F., Gurusinghe, A., Wolff, J. & Davies, K. 1991. Human dystrophin gene expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature.* **352**: 815-818.
- Allen, J.F. 1888. *Practitioner* **40**: 310.
- Allsopp, C., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G. & Hill, A. 1996. Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1951-1959.
- Amiri, P., Locksley, R.M., Parslow, T.G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. & McKerrow, J.H. 1992. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature.* **356**: 604-607.
- Anderson, R., Gao, X.M., Papakonstantinou, A., Roberts, M. & Dougan, G. 1996. Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of Tetanus toxin. *Infect. Immun.* **64**: 3168-3173.
- Andrews, P. 1985. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmac. Ther.* **29**: 119-156.
- Aravinda, S., Gopalakrishnan, B., Dey, C.S., Totey, S.M., Pawshe, C.H., Salunke, D., Kaur, K. & Shaha, C. 1995. A testicular protein important for fertility has glutathione S-transferase activity and is localized extracellularly in the seminiferous tubules. *J. Biol. Chem.* **270**: 15675-15685.
- Armas, J., Morello, C., Caranmer, L. & Spector, D. 1996. DNA immunization confers protection against cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **70**: 7921-7928.
- Asakura, Y., Hamajima, K., Fukushima, J., Mohri, H., Okubo, T. & Okuda, K. 1996. Induction of HIV-1 Nef-specific cytotoxic T lymphocytes by Nef-expressing DNA vaccine. *Am. J. Hematol.* **53**: 116-117.
- Asakura, Y., Hinkula, J., Leandersson, A.C., Fukushima, J., Okuda, K. & Wahren, B. 1997. Induction of HIV-1 specific mucosal immune responses by DNA vaccination. *Scand. J. Immunol.* **46**: 326-330.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Wolowczuk, I., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Neyrinck, J.L., Drobecq, H., Tartar, A. & Capron, A. 1988. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* **55**: 1687-1694.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R.J., Butterworth, A.E., Wolowczuk, I., Capron, M., Ouma, J.H., Balloul, J.M., Khalife, J., Neyrinck, J.L., Tartar, A., Koech, D. & Capron, A. 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant P28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1918-1924.
- Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A. & Tartar, A. 1991. Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28GST). *Peptide Res.* **4**: 6-11.
- Auriault, C., Pancré, V., Wolowczuk, I., Asseman, C., Ferru, I. & Verwaerde, C. 1996. Cellular immune response and pathology in schistosomiasis. *Parasite* **3**: 199-208.
- B**allas, Z.K., Rasmussen, W.L. & Krieg, A.M. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**: 1840-1845.
- Balloul, J.M., Grzych, J.M., Pierce, R.J. & Capron, A. 1987a. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**: 3448-3453.
- Balloul, J.M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J.M., Pierce, R.J., Carvallo, D., Lecocq, J.P. & Capron, A. 1987b. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* **326**: 149-153.
- Barry, M.A., Lai, W.C. & Johnston, S.A. 1995. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature.* **377**: 632-635.
- Bennett, R.M., Gabor, G.T. & Merritt, M.M. 1985. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA. *J. Clin. Invest.* **76**: 2182-2190.
- Bergerot, I., Ploix, C., Petersen, J., Moulin, V., Rask, C., Fabien, N., Lindblad, M., Maye, R.A., Czerkinsky, C., Holmgren, J. & Thovolet, C. 1997. A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4610-4614.
- Berglung, P., Smerdou, C., Fleeton, M., Tubulekas, L. & Liljeström, P. 1998. Enhancing immune responses

- using suicidal DNA vaccines. *Nature Biotech.* **16**: 562-565.
- Bevan, M. 1995. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.* **188**: 639-641.
- Bilharz, T. 1852. *Z. wiss. Zool.* **4**: 53.
- Bobek, L., Rebosh, D., Keulen, H.V. & Loverde, P. 1986. Characterization of a female-specific cDNA derived from a developmentally regulated mRNA in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5544.
- Bos, J.D. & Kapsenberg, M.L. 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Tod.* **14**: 75-78.
- Boulanger, D., Reid, G.D.F., Sturrock, R.F., Wolowczuck, I., Balloul, J.M., Grezel, D., Pierce, R.J., Otieno, M.F., Guerret, S., Grimaud, J.A., Butterworth, A.E. & Capron, A. 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **13**: 473-490.
- Boulanger, D., Warter, A., Trottein, F., Mauny, F., Bremond, P., Audibert, F., Couret, D., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Pierce, R.J., Lecocq, J.P., Sellin, B. & Capron, A. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase clones from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* **17**: 361-369.
- Bout, D., Dupas, H., Carlier, Y., Afchain, D. & Capron, A. 1977. High resistance induced by young live bacillus Calmette-Guérin (BCG) to *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ann. Immunol.* **128C**: 811-816.
- Boyer, J., Ugen, K., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M., Chattergoon, M., Frost, P., Janadian, A., Williams, W., Rafeli, Y., Cicarelli, R., McCallus, D., Coney, L. & Weiner, D. 1997. Protection from high dose heterologous HIV-1 challenge in chimpanzees by DNA vaccination. *Nature Med.* **3**: 526-532.
- Boyle, J.S., Brady, J.L. & Lew, A.M. 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature.* **392**: 408-411.
- Bright, R., Beames, B., Shearer, M. & Kennedy, R. 1996. Protection against lethal tumor challenge with SV-40-transformed cells by direct injection of DNA encoding SV-40 large tumor antigen. *Cancer Res.* **56**: 1126-1130.
- Brindley, P.J. & Sher, A. 1987. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* **139**: 215-220.
- Brindley, P.J., Strand, M., Norden, A.P. & Sher, A. 1989. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Shistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Molec. Bioch. Parasitol.* **34**: 99-108.
- Büeler, H. & Mulligan, R. 1996. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: Enhanced tumor protection by coexpression of GM-CSF and B7-1. *Molec. Medicine* **2**: 545-555.
- Bushara, H.O., Bashir, M.E.N., Malik, K.H.E., Mukhtar, M.M., Trottein, F., Capron, A. & Taylor, M.G. 1993. Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol.* **15**: 383-390.
- Butterworth, A.E., Vadas, M.A., Martz, E. & Sher, A. 1979. Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *J. Immunol.* **122**: 1314-1321.
- Butterworth, A.E., Bensted-Smith, R., Capron, A., Capron, M., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Grzych, J.M., Kariuki, H.C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J.H., Arap Siogok, T.K. & Sturrock, R.F. 1987. Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitol.* **94**: 281-300.
- Camacho, M. & Agnew, A. 1995. Glucose uptake rates by *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. bovis* adults using a flow *in vitro* culture system. *J. Parasitol.* **81**: 637-640.
- Caplen, N.J. *et al.* 1995. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Medicine* **1**: 39-46.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. & Bazin, H. 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature.* **253**: 474-475.
- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. & Capron, A. 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.* **126**: 1764-1768.
- Capron, M. & Capron, A. 1986. Rats, mice and men. Models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today* **2**: 69-75.

- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Ouma, J.H. & Butterworth, A.E. 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science*. **238**: 1065-1072.
- Capron, A. 1992. Immunity to schistosomes. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 419-424.
- Capron, A., Riveau, G., Gryzch, J.M., Boulanger, D., Capron, M. & Pierce, R. 1994a. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis: background and update. In *Biology of parasitism*. R. Ehrlich and A. Nieto (ed.), p. 119.
- Capron, M. & Capron, A. 1994b. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science*. **264**: 1876-1877.
- Capron, A. 1995. Le langage moléculaire des parasites. *Médecine Sciences* **11**: 431-439.
- Capron, A. 1998. Schistosomiasis: forty years' war on the worm. *Parasitol. Today* **14**: 379-384.
- Cardoso, A., Bixenkrone-Moller, M., Fayolle, J., Liu, M., Buckland, R. & Wild, T. 1996. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology*. **225**: 293-299.
- Caspar, C., Levy, S. & Levy, R. 1997. Idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma induce polyclonal immune responses that cover mutated tumor idiotypes: comparison of different vaccine formulations. *Blood* **90**: 3699-3706.
- Chan, M., Woolhouse, M. & Bundy, D. 1997. Human schistosomiasis: potential long term consequences of vaccination programmes. *Vaccine* **15**: 1545-1550.
- Chen, L., Rekosh, D. & LoVerde, P.T. 1992. *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 39-52.
- Chen, S.C., Jones, D.H., Fynan, E.F., Farrar, G.H., Clegg, J.C.S., Greenberg, H.B. & Herrmann, J.E. 1998. Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J. Virol.* **72**: 5757-5761.
- Chensue, S., Wellhausen, S. & Boros, D. 1981. Modulation of granulomatous hypersensitivity. II. Participation of Ly 1⁺ and Ly 2⁺ T lymphocytes in the suppression of granuloma formation and lymphokine production in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.* **127**: 3630-3635.
- Chow, Y.-H., Huang, W.-L., Chi, W.-K., Chu, Y.-D. & Tao, M.-H. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and Interleukin-2. *J. Virol.* **71**: 169-178.
- Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V. & Harding, C.V. 1997. CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* **186**: 1623-1631.
- Ciernik, I.F., Berzofsky, J.A. & Carbone, D.P. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J. Immunol.* **156**: 2369-2375.
- Conry, R.M., LoBuglio, A.F., Loechel, F., Moore, S.E., Sumerel, L.A., Barlow, D.L. & Curiel, D.T. 1995. A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has *in vivo* antitumor activity. *Gene Therapy* **2**: 59-65.
- Cordeiro da Silva, A., Lepresle, T., Capron, A. & Pierce, R.J. 1992. Molecular cloning of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 275-278.
- Cornfold, E. & Fitzpatrick, A. 1985. Glucose transfer from male to female schistosomes: definition of the mechanism and rate constant. *Molec. Biochem. Parasitol.* **17**: 131.
- Corr, M., Lee, J.L., Carson, D.A. & Tighe, H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* **184**: 1555-1560.
- Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., Ribeiro, M., Schenkman, S. & Rodrigues, M.M. 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of *trans*-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* **16**: 768-774.
- Couissinier-Paris, P. & Dessein, A.J. 1995. *Schistosoma*-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are TH0/2. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2295-2302.
- Cox, G., Zamb, T. & Babiuk, L. 1993. Bovine herpes virus 1. Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* **67**: 5664-5667.
- Crabtree, J.E. & Wilson, R.A. 1986. The role of pulmonary cellular reactions in the resistance of vaccinated mice to *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **8**: 265-285.
- Danko, I. & Wolff, J.A. 1994. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* **12**: 1499-1502.
- Davis, H.L., Michel, M.L. & Whalen, R.G. 1993a. DNA-based immunization for hepatitis B induces

- continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1847-1851.
- Davis, H.L., Whalen, R.G. & Demeneix, B.A. 1993b. Direct gene transfer in skeletal muscle in vivo: factors influencing efficiency of transfer and stability of expression. *Hum. Gen. Ther.* **4**: 151-156.
- Davis, H., McCluskie, M., Gerin, J. & Purcell, R. 1996a. DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7213-7218.
- Davis, H.L., Mancini, M., Michel, M.L. & Whalen, R.G. 1996b. DNA-mediated immunization to Hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14**: 910-915.
- Davis, H.L., Weeranta, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J. & Krieg, A.M. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant Hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* **160**: 870-876.
- De Bont, J., Vercruyse, J., Grzych, J.M., Meeus, P.F.M. & Capron, A. 1997. Potential of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. I. Parasitological results. *Parasitol.* **115**: 249-255.
- Dean, D. 1974. *Schistosoma mansoni*: absorption of human blood group A and B antigens by schistosomula. *J. Parasitol.* **60**: 260-263.
- Deelder, A. 1989. Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 268-272.
- Denis, O., Tanghe, A., Palfliet, K., Jurion, F., Berg, T.v.d., Vanonckelen, A., Ooms, J., Saman, E., Ulmer, J., Content, J. & Huygen, K. 1998. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial Antigen 85A stimulates a CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun.* **66**: 1527-1533.
- Dieu, M.-C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.-M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S. & Caux, C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**: 373-386.
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. & Walker, C. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8578-8583.
- Doenhoff, M.J., Sabah, A.A.A., Flechter, C., Webbe, G. & Bain, J. 1987. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 947-951.
- Doenhoff, M.J., Modha, J. & Lambertucci, J.R. 1988. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. *Immunology.* **65**: 507-510.
- Doenhoff, M.J. 1998. Is schistosomicidal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. *Parasitol. Today* **10**: 434-435.
- Donnelly, J., Martinez, D., Jansen, K., Ellis, R., Montgomery, D. & Liu, M. 1996. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J. Infect. Dis.* **713**: 314-320.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W. & Liu, M.A. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 617-648.
- Doolan, D.L., Sedegah, M., Hedstrom, R.C., Hobart, P., Charoenvit, Y. & Hoffman, S.L. 1996. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8⁺ T cell-, interferon γ , and nitric oxide-dependent immunity. *J. Exp. Med.* **183**: 1739-1746.
- Doolan, D. & Hoffman, S. 1997. Multi-gene vaccination against malaria: a multi-stage, multi-immune response approach. *Parasitol. Today* **13**: 171-178.
- Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J.C., Curtis Kariuki, H., Langley, J.G., Ouman, J.H., Capron, A., Pierce, R.J. & Sturrock, R.F. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1483-1494.
- Dunne, D.W., Hagan, P. & Abath, F.G.C. 1995. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *Lancet* **345**: 1488-1492.
- Dupré, L., Poulain-Godefroy, O., Ban, E., Ivanoff, N., Mekranfar, M., Schacht, A.-M., Capron, A. & Riveau, G. 1997. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding 28kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* **19**: 503-513.
- Duvaux-Miret, O., Stefano, G., Smith, E., Dissous, C. & Capron, A. 1992. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of

immunoreactive neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 778-781.

Ebbel, B. 1927. *Z. Aegypt. Sprache* **62**: 16.

Eisenbraun, M., Fuller, D.H. & Haynes, J.R. 1993. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol.* **12**: 791-797.

Fallon, P.G. & Doenhoff, M.J. 1994a. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 83-88.

Fallon, P.G., Smith, P., Nicholls, T., Modha, J. & Doenhoff, M.J. 1994b. Praziquantel-induced exposure of *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase: drug-antibody synergy which acts preferentially against female worms. *Parasite Immunol.* **16**: 529-535.

Fallon, P.G. & Doenhoff, M.J. 1995a. Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel. *Parasite Immunol.* **17**: 261-268.

Fallon, P.G., Sturrock, R.F., Niang, A.C. & Doenhoff, M.J. 1995b. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 61-62.

Felgner, P., Gadek, T., Holm, M., Roman, R., Chan, H., Wenz, M., Northrop, J., Ringold, G. & Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7413-7417.

Feltquate, D.M., Heaney, S., Webster, R.G. & Robinson, H.L. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* **158**: 2278-2284.

Fomsgaard, A., Nielsen, H., Bryder, K., Nielsen, C., Machca, R., Bruun, L., Hansen, J. & Buus, S. 1998. Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV-1 following genetic immunization with a chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the Hepatitis B surface antigen. *Scand. J. Immunol.* **47**: 289-295.

Fooks, A., Jeevarajah, D., Warnes, A., Wilkinson, G. & Clegg, J. 1996. Immunization of mice with plasmid DNA expressing the measles virus nucleoprotein gene. *Viral Immunol.* **9**: 65-71.

Fournillier, A., Nakano, I., Vitvitski, L., Depla, E., Vidalin, O., Maertens, G., Trepo, C. & Inchauspè, G. 1998. Modulation of immune responses to hepatitis C virus envelope E2 protein following injection of plasmid DNA using single or combined delivery routes. *Hepatology* **28**: 237-244.

Fu, T.-M., Friedman, A., Ulmer, J., Liu, B. & Donnelly, J. 1997. Protective cellular immunity: Cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. *J. Virol.* **71**: 2715-2721.

Fujii, Y. 1847. *Chugai Iji Shimpo (Int. Med. J.)* **691**: 55.

Fujinami, A. & Nakamura, H. 1909. *Kyoto Igakkai Zasshi (J. Kyoto med. Ass.)* **6**: 224.

Giachetti, C. & Chin, D. 1996. Increased oligonucleotide permeability in keratinocytes of artificial skin correlates with differentiation and altered membrane function. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 412-418.

Glenn, G., Scharon-Kersten, T., Vassell, R., Mallett, C., Hale, T. & Alving, C. 1998. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J. Immunol.* **161**: 3211-3214.

Green, L. & Jakobovits, A. 1998. Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes. *J. Exp. Med.* **188**: 483-495.

Gregoriadis, G. 1998. Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm. Res.* **15**: 661-670.

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

Grzych, J.M., Capron, J.M., Dissous, C. & Capron, A. 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **133**: 998-1004.

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

Grzych, J.M., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P.H. & Capron, A. 1987. *Schistosoma mansoni* shares a protective epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* **165**: 865-878.

- Grzych, J.M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z.A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F. & Sher, A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **146**: 1322-1327.
- Grzych, J.M., Grezel, D., Xu, C.B., Neyrinck, J.L., Capron, M., Ouma, J.H., Butterworth, A.E. & Capron, A. 1993. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **150**: 527-635.
- Grzych, J.M., De Bont, J., Neyrinck, J.L., Fontaine, J., Verduyck, J. & Capron, A. 1998. Relationship of impairment of Schistosome 28-Kilodalton Glutathione S-Transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-Kilodalton GST. *Infect. Immun.* **66**: 1142-1148.
- Gurunathan, S., Sacks, D., Brown, D., Reiner, S., Charest, H., Glaichenhaus, N. & Seder, R. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **186**: 1137-1147.
- Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunn, D., Simpson, A.J.G. & Wilkins, H.A. 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature.* **349**: 243-245.
- Harder, A., Andrews, P. & Thomas, H. 1987. Chlorpromazine, other amphiphilic cationic drugs and praziquantel: effects on carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **73**: 245-249.
- Hass, W., Granzer, M. & Garcia, G. 1987. Host identification by *Schistosoma japonicum* cercariae. *J. Parasitol.* **73**: 568-577.
- Hassett, D., Zhang, J. & Whitton, J. 1997. Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. *J. Virol.* **71**: 7881-7888.
- Hedley, M.L., Curley, J. & Urban, R. 1998. Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses. *Nature Med.* **4**: 365-368.
- Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S. & Vogel, J.C. 1995. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nature Genet.* **10**: 161-166.
- Herrero, M., Lorenzo, V.D. & Timmis, K. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Herrmann, J., Chen, S., Fynan, E., Santoro, J., Greenberg, H., Wang, S. & Robinson, H. 1996. Protection against rotavirus infection by DNA vaccination. *J. Infect. Dis.* **174**: 93-97.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N. & Svennerholm, A.M. 1994. Strategies for induction of immune responses at mucosal surface making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier and adjuvant. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 42-54.
- Hosie, M., Flynn, J., Rigby, M., Cannon, C., Dunsford, T., Mackay, N., Argyle, D., Willett, B., Miyazawa, T., Onions, D., Jarrett, O. & Neil, J. 1998. DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies. *Infect. Immun.* **72**: 7310-7319.
- Hsu, C.-H., Chua, K.-Y., Tao, M.-H., Lai, Y.-L., Wu, H.-D., Huang, S.-K. & Hsieh, K.-H. 1996. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness *in vivo* by genetic immunization. *Nature Med.* **2**: 540-544.
- Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Orme, I.M., Baldwin, S., D'Sousa, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandenbussche, P., Vooren, J.-P.V., Liu, M.A. & Ulmer, J.B. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med.* **2**: 893-898.
- Incari, R. & McLaren, D. 1984. Histopathological and ultrastructure studies of cutaneous reactions elicited by invading schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *International J. Parasitol.* **14**: 259-276.
- Inchaupé, G., Major, M.E., Nakano, I., Vitvitski, I. & Trepo, C. 1997a. DNA vaccination for the induction of immune responses against hepatitis C virus proteins. *Vaccine* **15**: 853-856.
- Inchaupé, G., Vitvitski, L., Major, M., Juang, G., Spengler, U., Maisonnas, M. & Trepo, C. 1997b. Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol.* **16**: 185-195.
- Irvine, K.R., Rao, J.B., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. 1996. Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. *J. Immunol.* **156**: 238-245.

- Isenberg, D.A., Rahman, M.A., Ravirajan, C.T. & Kalsi, J.K. 1997. Anti-DNA antibodies: from gene usage to crystal structures. *Immunol. Today* **18**: 149-153.
- Ishii, N., Fukushima, J. & Kaneko, T. 1997. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine candidate constructed with HIV-1 env and rev genes. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **13**: 1421-1428.
- Ismail, M., Metwally, A., Farghaly, A., Bruce, J., Tao, L.-F. & Bennett, J.L. 1996. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 214-218.
- Ito, Y. 1961. Heat-resistance of the tumorigenic nucleic acids of Shope papillomatous. *Virology*. **12**: 596-601.
- Ivanoff, N., Phillips, N., Schacht, A.M., Heydari, C., Capron, A. & Riveau, G. 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm28kDa glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**: 1123-1131.
- Iwasaki, A., Torres, C., Ohashi, P., Robinson, H. & Barber, B. 1997. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J. Immunol.* **159**: 11-14.
- Jacob, T., Walker, P.S., Krieg, A.M., Udey, M.C. & Vogel, J.C. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* **161**: 3042-9.
- James, S., Correa-Oliveira, R., Sher, A., Medvitz, L. & McCall, R. 1987. Genetic association of defects in macrophage larvicidal activity and vaccine-induced resistance to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. *Infect. Immun.* **55**: 1884-1889.
- James, S. & Glaven, J. 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginin-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.* **143**: 4208-42103.
- James, S. & Sher, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. In *Current topics in microbiology and immunology*. Springer-Verlag (ed.), Berlin. p. 21-31.
- Jenkins, M., Kerr, D., Fayer, R. & Wall, R. 1995. Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine* **13**: 1658-1664.
- Joseph, M., Tonnel, A.B., Capron, A. & Voisin, C. 1980. Enzyme release and superoxyde anion production by human alveolar macrophages stimulated with Immunoglobulin E. *Clin. Exp. Parasitol.* **40**: 416-422.
- Kamiya, H., Smithers, S. & McLaren, D. 1987. *Schistosoma mansoni*: autoradiographic tracking studies of isotopically-labelled challenge parasites in naive and vaccinated CBA/Ca mice. *Parasite Immunol.* **9**: 515-529.
- Katsurada, F. 1904. *Annot. Zool. Japan* **5**: 146.
- Ketterer, B., Meyer, D.J. & Clark, A.G. 1988. Soluble glutathione transferase isoenzymes. In *Glutathione conjugation: its mechanisms and biological significance*. H. Sies and B. Ketterer (ed.), Academic Press, London. p. 73-135.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J.M., Butterworth, A.E., Dunne, D.W. & Ouma, J.H. 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* **164**: 1626-1640.
- Khan, C.M.A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Riveau, G., de Hormaeche, R.D., Capron, A., Dougan, G. & Hormaeche, C.E. 1994a. The construction, expression and immunogenicity of multiple tandem copies of the *S. mansoni* peptide comprising 115-131 of the P28 glutathione S-transferase, expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in live attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J. Immunol.* **153**: 5634-5642.
- Khan, C.M.A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Riveau, G., de Hormaeche, R.D., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G. & Hormaeche, C.E. 1994b. 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11261-11265.
- Kim, J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M., Chattergoon, M., Dang, K., Wang, B., Boyer, J. & Weiner, D. 1997a. *In vivo* engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* **158**: 816-826.
- Kim, J., Bagarazzi, M., Trivedi, N., Hu, Y., Kazahaya, K., Wilson, D., Ciccarelli, R., Chattergoon, M., Dang, K., Mahalingam, S., Chalian, A.,

- Agadjanya, M., Boyer, J., Wang, B. & Weiner, D. 1997b. Engineering of *in vivo* immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat. Biotech.* **15**: 641-646.
- Kim, J., Trivedi, N., Nottingham, L., Morrison, L., Tsai, A., Hu, Y., Mahalingam, S., Dang, K., Ahn, L., Doyle, N., Wilson, D., Chattergoon, M., Chalian, A., Boyer, J., Agadjanya, M. & Weiner, D. 1998. Modulation of amplitude and direction of *in vivo* responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* **28**: 1089-1103.
- King, C., Medhat, A., Malhotra, I., Nafeh, M., Helmy, A., Khaudary, J., Ibrahim, S., El-Sherbiny, M., Zaky, S., Stupi, R., Brustoski, K., Shehata, M. & Shata, M. 1996. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. *J. Immunol.* **156**: 4715-4721.
- Klinman, D.M., Sechler, J.M., Conover, J., Gu, M. & Rosenberg, A.S. 1998. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.* **160**: 2388-2392.
- Klinman, D.M., Yamshchikov, G. & Ishigatsubo, Y. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* **158**: 3635-3639.
- Knight, S., Iqbal, S., Roberts, M., Macatonia, S. & Bedford, P. 1988. Transfer of antigen between dendritic cells in the stimulation of primary T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **28**: 1636-1644.
- Knopf, P., Cioli, D., Mangold, B. & Dean, D. 1986. Migration of *Schistosoma mansoni* in normal and passively immunized laboratory rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 1173-1184.
- Krasemann, S., Groschup, M., Hunsmann, G. & Bodemer, W. 1996. Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP⁰ mice. *J. Immunol. Methods* **199**: 109-118.
- Krieg, A.M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. & Klinman, D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* **374**: 546-549.
- Kuklin, N., Daheshia, M., Chun, S. & Rouse, B. 1998. Immunomodulation by mucosal gene transfer using TGF- β DNA. *J. Clin. Invest.* **102**: 438-444.
- Kuklin, N., Daheshia, M., Karem, K., Manickan, E. & Rouse, B.T. 1997. Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.* **71**: 3138-3145.
- Lai, W.C., Bennett, M., Johnston, S.A., Barry, M.A. & Pakes, S.P. 1995. Protection against *Mycoplasma pulmonaris* infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol.* **14**: 643-651.
- Leclerc, C., Dériaud, E., Rojas, M. & Whalen, R.G. 1997. The preferential induction of a Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunostimulatory effect of the plasmid DNA. *Cell. Immunol.* **179**: 97-106.
- Lee, K.W., Thakur, A., Karim, A.M. & LoVerde, P.T. 1995. Immune response to *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate kinase during natural and experimental infection: identification of a schistosome-specific B-cell epitope. *Infect. Immun.* **63**: 4307-4311.
- Leiper, R.T. & Atkinson, E.L. 1915. *Brit. Med. J.* **i**: 201.
- Lekutis, C., Shiver, J., Liu, M. & Letvin, N. 1997. HIV-1 env DNA vaccine administered to rhesus monkeys elicits MHC class II-restricted CD4⁺ T helper cells that secrete IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* **158**: 4471-4477.
- Letvin, N., Montefiori, D., Yasutomi, Y., Perry, H., Davies, M., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D., Lord, C., Handt, L., Liu, M. & Shiver, J. 1997. Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9378-9383.
- Lichtenberg, F.v., Sher, A., Gibbons, N. & Doughty, B. 1976. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.* **84**: 479-500.
- Liu, J.L., Fontaine, J., Capron, A. & Grzych, J.-M. 1996. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol.* **113**: 377-391.
- Liu, S.X., Song, G.C., Xu, Y.X., Yang, W. & McManus, D.P. 1995a. Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione-S-transferase. *Parasite Immunol.* **17**: 335-340.
- Liu, S.X., Song, G.C., Xu, Y.X., Yang, W. & McManus, D.P. 1995b. Immunization of mice with recombinant Sjc26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* **13**: 603-607.
- Livingston, J.B., Lu, S., Robinson, H. & Anderson, D.J. 1998. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect. Immun.* **66**: 322-329.

- Lodmell, D., Nancy, B., Parnell, M., Ewalt, L., Hanlon, C., Shaddock, J., Sanderlin, D. & Rupprecht, C. 1998. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nature Med.* **4**: 949-952.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J.M. & Lemoine, Y. 1989. High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **5**: 497-507.
- Loke, S., Stein, C., Zhang, X., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J. & Neckers, L. 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3474-3478.
- Lu, S., Santoro, J., Fuller, D., Haynes, J. & Robinson, H. 1995. Use of DNAs expressing Env and non-infectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology*. **209**: 147-154.
- Maecker, H., Umetsu, D., DeKruyff, R. & Levy, S. 1997. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumine. *Vaccine* **15**: 1687-1997.
- Major, M., Vitvitski, L., Mink, M., Schleef, M., Whalen, R., Trépo, C. & Inchauspé, G. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the Hepatitis C virus nucleocapsid. *J. Virol.* **69**: 5798-5805.
- Mangold, B. & Dean, D. 1983. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration from skin to lungs in naive mice. Evidence that most attrition occurs after the skin phase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 785-789.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. In *A laboratory Manual*, (ed.), Cold spring harbor laboratory press.
- Manickan, E., Rouse, R.J.D., Wire, W.S. & Rouse, B.T. 1995a. Induction of protective immunity against Herpes simplex virus with DNA encoding the immediate early protein ICP-27. *Viral Immunol.* **8**: 53-61.
- Manickan, E., Rouse, R.J.D., Yu, Z., Wire, W.S. & Rouse, B.T. 1995b. Genetic immunization against Herpes Simplex Virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **155**: 259-265.
- Manickan, E., Kanangat, S., Rouse, R., Yu, Z. & Rouse, B. 1997. Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **61**: 125-132.
- Manson, P. 1902. Report of a case of bilharzia from the West Indies. *Brit. Med. J.* **2**: 1894.
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M. & Dwarki, V. 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Ther.* **4**: 419-431.
- Marikovsky, M., Arnon, R. & Fishelson, Z. 1988. Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *J. Immunol.* **141**: 273-278.
- Marquet, S., Abel, L., Hillaire, D., Dessein, H., Kalil, J., Feingold, J., Weissenbach, J. & Dessein, A. 1996. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nature Genet.* **14**: 181-184.
- Marsh, D., Neely, J., Breazeale, D., Ghosh, B., Freidhoff, L., Ehrlich-Kautzky, E., Schou, C., Krishnaswamy, G. & Beaty, T. 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. **264**: 1152-1156.
- Martinez, X., Brandt, C., Saddallah, F., Tougne, C., Barrios, C., Wild, F., Dougan, G., Lambert, P. & Siegrist, C. 1997. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8726-8731.
- Mastin, A.J., Bickle, Q.D. & Wilson, R.A. 1983. *Schistosoma mansoni* : migration and attrition of irradiated and challenge schistosomula in the mouse. *Parasitol.* **87**: 87-102.
- Mathew, R.C. & Boros, D.L. 1986. Anti L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin 2 production in *schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.* **54**: 820-826.
- Mc Clements, W., Armstrong, M., Keys, R. & Liu, M. 1996. Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of Herpes simplex virus-2 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11414-11420.
- Mc Ghee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. & Kiyono, H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**: 75-88.
- Mei, H., Hirai, H., Tanaka, M., Hong, Z., Rekosh, D. & LoVerde, P.T. 1995. *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of a gene encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **80**: 250-259.

- Mestecky, J., Abraham, R. & Ogra, P.L. 1994. Common mucosal immune system and strategies for the development of vaccines effective at the mucosal surfaces. In *Handbook of mucosal immunology*. P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. R. McGhee, and J. Bienstock (ed.), Academic Press, Orlando, Florida. p. 357-372.
- Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.-M., Pierce, R., Locht, C., Capron, A. & Riveau, G. 1997. Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect. Immun.* **65**: 544-550.
- Mielcarek, N., Riveau, G., Remoué, F., Antoine, R., Capron, A. & Locht, C. 1998. Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nature Biotech.* **16**: 454-457.
- Moelling, K. 1997. DNA for genetic vaccination and therapy. *Cytokines, Cell. Mol. Ther.* **3**: 127-136.
- Moloney, N.A., Garcia, E.G. & Webbe, G. 1985. The strain specificity of vaccination with ultra violet attenuated cercariae of the Chinese strain of *Schistosoma japonicum*. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.* **79**: 245-247.
- Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.N., Perry, H.C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. & Liu, M.A. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination : optimisation of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* **12**: 777-783.
- Moore, D., Yolles, T. & Melleney, H. 1954. The relationship of male worms to the sexual development of female *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **40**: 166.
- Mor, G., Yamshchikov, G., Sedegah, M., Takeno, M., Wang, R., Houghten, R., Hoffman, S. & Klinman, D. 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice. *J. Clin. Invest.* **98**: 2700-2705.
- Mosmann, T.R. & Coffman, L.R. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* **46**: 111.
- Mountford, A., Coulson, P., Pemberton, R., Smythies, L. & Wilson, R. 1992. The generation of interferon- γ producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology.* **75**: 250-259.
- Musiani, P., Modesti, A., Giovarelli, M., Cavallo, F., Colombo, M., Lollini, P. & Forni, G. 1997. Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity: a question of choice. *Immunol. Today* **18**: 32-36.
- Mutapi, F., Ndhlovu, P., Hagan, P., Spicer, J., Mduluzi, T., Turner, C., Chandiwana, S. & Woolhouse, M. 1998. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. *J. Inf. Dis.* **178**: 289-293.
- Nakano, I., Maertens, G., Major, M.E., Vitvitski, L., Dubuisson, J., Fournillier, A., De Martynoff, G., Trepo, C. & Inchaups, G. 1997. Immunization with plasmid DNA encoding hepatitis C virus envelope E2 antigenic domains induces antibodies whose immune reactivity is linked to the injection mode. *J. Virol.* **71**: 7101-7109.
- O'Leary, K.A. & Tracy, J.W. 1991. *Schistosoma mansoni* : glutathione S-transferase-catalyzed detoxification of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* **72**: 355-361.
- Okada, E., Sasaki, S., Ishii, N., Aoki, I., Yasuda, T., Nishioka, K., Fukushima, J., Miyazaki, J.-I., Wahren, B. & Okuda, K. 1997. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and GM-CSF-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J. Immunol.* **159**: 3638-3647.
- Orth, G., Athanasiu, P., Borion, M., Rebiere, J.P. & Paoletti, C. 1964. Infectious and oncogenic effect of DNA extracted from cells infected with polyoma virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **115**: 1090-1095.
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Bossus, M., Gras-Masse, H., Guerret, S., Delanoye, A., Capron, A. & Auriault, C. 1994a. Evaluation of the effect of Sm28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis: interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Molec. Immunol.* **31**: 1247-1256.
- Pancré, V., Wolowczuk, I., Guerret, S., Copin, M.C., Delanoye, A., Capron, A. & Auriault, C. 1994b. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. *Infect. Immun.* **62**: 3723-3730.
- Pancré, V., Gras-Masse, H., Delanoye, A., Herno, J., Capron, A. & Auriault, C. 1996. Induction of cytotoxic T-cell activity by the protective antigen of *Schistosoma mansoni* Sm28GST or its derived C-terminal lipopeptide. *Scand. J. Immunol.* **44**: 485-492.

- Pearce, E. & McLaren, D. 1986. *Schistosoma mansoni*: the cutaneous response to cercarial challenge in naive guinea pigs and guinea pigs vaccinated with highly irradiated cercariae. *Internat. J. Parasitol.* **16**: 491-510.
- Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E. & Sher, A. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non surface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5678-5682.
- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.M., Lewis, F.A. & Sher, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* **173**: 159-166.
- Pedras-Vasconcelos, J. & Pearce, E. 1996. Type I CD8⁺ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **157**: 3046-3053.
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K. & Waltenbaugh, C. 1998. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3071-3076.
- Philip, R., Liggitt, D., Philip, N., Dazin, P. & Debs, R. 1993. *In vivo* gene transfection of T lymphocytes in adult mice. *J. Biol. Chem.* **268**: 16087-16092.
- Phillips, N.C., Loufti, A., A'Kareem, A.M., Shibata, H.R. & Baines, M.G. 1990. Clinical evaluation of liposomal tumour antigen vaccines in patients with stage-III melanoma. *Cancer Detec. Prevent.* **14**: 491-496.
- Pierce, R.J., Khalife, J., Williams, D.L., Kanno, R., Trotein, F., LePresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T. & Capron, A. 1994. *Schistosoma mansoni*: characterization of sequence variants of the 28-kDa glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* **79**: 81-84.
- Pisetsky, D.S. 1996. Immune activation by bacterial DNA: A new genetic code. *Immunity* **5**: 303-310.
- Porgador, A., Irvine, K.R., Iwasaki, A., Barder, B.H., Restifo, N.P. & Germain, R.N. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* **188**: 1075-1082.
- Postma, D., Bleecker, E., Amelung, P., Holdroyd, K., Xu, J., Panhuysen, C., Meyers, D. & Levitt, R. 1995. Genetic susceptibility to asthma - bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N. Engl. J. Med.* **333**: 894-900.
- Poulain-Godefroy, O., Gaubert, S., Lafitte, S., Capron, A. & Grzych, J.M. 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis: stimulatory role of egg antigens. *Infect. Immun.* **64**: 763-768.
- Poulain-Godefroy, O., Mielcarek, N., Ivanoff, N., Remoué, F., Schacht, A.M., Phillips, N., Loch, C., Capron, A. & Riveau, G. 1998. Enhancement of immunogenicity by intranasal antigen delivery using liposomes bearing the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* **66**: 1764-1767.
- Prayaga, S., Ford, M. & Haynes, J. 1997. Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization. *Vaccine* **15**: 1349-1352.
- Precious, W.Y. & Barrett, J. 1989. The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem. Biophys. Acta* **992**: 215-222.
- Rakhmievich, A., Turner, J., Ford, M., McCabe, D., Sun, W., Sondel, P., Grotz, K. & Yang, N.-S. 1996. Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6291-6296.
- Ramalho-Pinto, F.J., de Rossi, R. & Smithers, S.R. 1979. Murine Schistosomiasis mansoni: anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement- and eosinophil-mediated killing of schistosomula *in vitro*. *Parasite Immunol.* **1**: 295-308.
- Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M. & Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9519-9523.
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J.A., Roman, M., Swain, S.L., Spiegelberg, H.L. & Carson, D.A. 1996. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5141.
- Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J. & Martin, R.J. 1996. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* **12**: 14-20.
- Renauld-Mongenie, G., Mielcarek, N., Cornette, J., Schacht, A.M., Capron, A., Riveau, G. & Loch, C. 1996. 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* **93**: 7944-7949.
- Reynolds, S.R., Shoemaker, C.B. & Harn, D. 1992. T and B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **149**: 3995-4001.
- Reynolds, S.R., Dahl, C.E. & Harn, D.A. 1994. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *S. mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* **152**: 193-200.
- Rihet, P., Demeure, C.E., Bourgois, A., Prata, A. & Dessein, A.J. 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* **21**: 2679-2686.
- Riveau, G.J. & Capron, A. 1996. Vaccination against schistosomiasis: concepts and strategies. In *Concepts in Vaccine Design*. S.H.E. Kaufmann (ed.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York. p. 509-532.
- Riveau, G.J., Poulain-Godefroy, O., Dupré, L., Remoué, F., Mielcarek, N., Loch, C. & Capron, A. 1998. Glutathione S-transferases of 28kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **93** (suppl. 1): 87-94.
- Robertson, J.S. 1994. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* **12**: 1526-1528.
- Robinson, H.L., Hunt, L.A. & Webster, R.G. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* **11**: 957-960.
- Roche, C., Williams, D.L., Khalife, J., LePresle, T., Capron, A. & Pierce, R.J. 1994. Cloning and characterization of the gene encoding *Schistosoma mansoni* glutathione peroxidase. *Gene* **138**: 149-152.
- Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A. & Raz, E. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature Med.* **3**: 849-854.
- Ruffer, M.A. 1910. *Brit. Med. J.* **i**: 16.
- Sabah, A.A., Flechter, C., Webbe, G. & Doenhoff, M.J. 1985. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. *Exp. Parasitol.* **60**: 348-354.
- Sakaguchi, M., Nakamura, H., Sonoda, K., Hamada, F. & Hirai, K. 1996. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. *Vaccine* **14**: 747-752.
- Salafsky, B., Wang, Y., Fusco, A. & Antonacci, J. 1984. The role of essential fatty acids and prostaglandins in cercarial penetration (*Schistosoma mansoni*). *J. Parasitol.* **70**: 656-670.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C., Qin, S. & Lanzavecchia, A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2760-2769.
- Sambon, L.W. 1907. Remarks on *Schistosomum mansoni*. *J. Trop. Med. Hyg.* **10**: 303.
- Sato, H. & Kamiya, H. 1995. Role of epidermal Langerhans' cells in the induction of protective immunity to *Schistosoma mansoni* in guinea pigs. *Immunology.* **84**: 233-240.
- Sato, H. & Kamiya, H. 1998. Accelerated influx of dendritic cells into the lymph nodes draining skin sites exposed to attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* in guinea-pigs. *Parasite Immunol.* **20**: 337-343.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.-D., Silvermann, G.J., Lotz, M., Carson, D.A. & Raz, E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* **273**: 352-354.
- Schirmbeck, R., Böhm, W., Ando, K., Chisari, F.V. & Reinmann, J. 1995. Nucleic acid vaccination primes Hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol.* **69**: 5929-5934.
- Schneider, J., Gilbert, S.C., Blanchard, T.J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G.L. & Hill, A.V.S. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature Med.* **4**: 397-402.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S.L. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9866-9870.
- Sexton, J., Milner, A., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T., Mitchell, G. & Campbell, N. 1990. Glutathione S-transferase - Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* **145**: 3905-3910.

- Sher, A., Hall, B.F. & Vadas, M.D. 1978. Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* **148**: 46-52.
- Sies, H. & Ketterer, B. 1988. Glutathione conjugation. In (ed.), Academic Press Limited, London. p. 145-148.
- Simon, M., Gern, L., Houser, P., Zhong, W., Neilson, P., Kramer, M., Brenner, C. & Wallich, R. 1996. Protective immunization with plasmid DNA containing the outer surface lipoprotein A gene of *Borrelia burgdorferi* is independent of an eukaryotic promoter. *Eur. J. Immunol.* **26**: 2831-2840.
- Sizemore, D.R., Branstorm, A.A. & Sadoff, J.C. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science.* **270**: 299-302.
- Soisson, L.M., Masterson, C.P., Tom, T.D., McNally, M.T., Lowell, G.H. & Strand, M. 1992. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* **149**: 3612-3620.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Häcker, H., Heeg, K. & Wagner, H. 1997a. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α mediated shock. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1671-1679.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Häcker, H., Heeg, K. & Wagner, H. 1997b. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature.* **386**: 336-337.
- Sparwasser, T., Koch, E.S., Valulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W. & Wagner, H. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2045-54.
- Spier, R.E. 1996. International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid (DNA) vaccines. *Vaccine* **14**: 1285-1288.
- Stacey, K.J., Matthew, J.S. & Hume, D.A. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**: 2116-2122.
- Stasney, J., Cantarow, A. & Paschkis, K.E. 1950. Production of neoplasms by fractions of mammalian neoplasms. *Cancer Res.* **10**: 775-782.
- Stelma, F.F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., Deelder, A.M. & Gryseels, B. 1995. Efficacy and side effects of praziquantel in an endemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 167-170.
- Streilein, J., Grammer, S., Yoshikawa, T., Demidem, A. & Vermeer, M. 1990. Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naïve and to memory/effector T Lymphocytes. *Immunol. Rev.* **117**: 159-183.
- Stribling, R., Brunette, E., Liggitt, D., Gaensler, K. & Debs, R. 1992. Aerosol gene delivery *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11277-11281.
- Sun, J.B., Holmgren, J. & Czerkinsky, C. 1994. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10795-10799.
- Sun, W., Burkholder, J., Sun, J., Culp, J., Turner, J., Lu, X., Pugh, T., Ershler, W. & Yang, N.-S. 1995. *In vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2889-2893.
- Svanholm, C., Löwenadler, B. & Wigzell, H. 1997. Amplification of T-cell and antibody responses in DNA-based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with GM-CSF expression vector. *Scand. J. Immunol.* **46**: 298-303.
- Tang, D.C., DeVit, M. & Johnston, S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* **356**: 152-154.
- Tascon, R.C., Colston, M.J., Ragno, S., Stravropoulos, E., Gregory, D. & Lowrie, D.B. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Med.* **2**: 888-898.
- Taylor, J.B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D.J., Roitsch, C., Balloul, J.M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J.P., Capron, A. & Ketterer, B. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**: 465-472.
- Tendler, M., Brito, C., Vilar, M., Serra-Freire, N., Diogo, C., Almeida, M., Delbem, A., Da Silva, J., Savino, W., Garratt, R., Katz, N. & Simpson, A. 1996. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 269-273.
- Théron, A. & Combes, C. 1988. Genetic analysis of cercarial emergence rhythms of *Schistosoma mansoni*. *Behav. Gen.* **18**: 201-209.
- Tighe, H., Corr, M., Roman, M. & Raz, E. 1998. Gene vaccination: plasmid DNA is more than a blueprint. *Immunol. today* **90**: 89-97.

- Trottein, F., Kieny, M.P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R.J., Balloul, J.M., Schmitt, D., Lecocq, J.P. & Capron, A. 1990. Molecular cloning and tissue distribution of a 26 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 35-44.
- Trottein, F., Godin, C., Pierce, R.J., Sellin, B., Taylor, M.G., Gorrillot, I., Sampaio, S.M., Lecocq, J.P. & Capron, A. 1992. Interspecies variation of schistosome 28 kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 63-72.
- Tsuji, T., Fukushima, J., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Bukawa, H., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T., Dorf, M. & Okuda, K. 1997a. HIV-1-specific cell-mediated immunity is enhanced by co-inoculation of TCA3 expression plasmid with DNA vaccine. *Immunology.* **90**: 1-6.
- Tsuji, T., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Fukushima, J., Xin, K.-Q., Kawamoto, S., Sasaki, S., Matsunaga, K.-I., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T. & Okuda, K. 1997b. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on HIV-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.* **27**: 782-787.
- Unger, R.A. & Barber, B.H. 1998. Creating CTL targets with epitope-linked β_2 -microglobulin constructs. *J. Immunol.* **160**: 1598-1605.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L. & Liu, M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* **259**: 1745-1749.
- Ulmer, J., Deck, R., DeWitt, C., Donnelly, J. & Liu, M. 1996a. Generation of MHC class I restricted CTL by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology.* **59**: 89-94.
- Ulmer, J.B., Sadoff, J. & Liu, M.A. 1996b. DNA vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 531-536.
- Van Dam, G.J., Stelma, F.F., Gryseels, B., Falcao Ferreira, S.T.M., Talla, I., Niang, M., Rotmans, J.P. & Deelder, A.M. 1996. Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal. *J. Infect. Dis.* **173**: 1232-1241.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 18-22.
- Vitiello, A., Sette, A., Yuan, L., Farness, P., Southwood, S., Sidney, J., Chesnut, R., Grey, H. & Livingston, B. 1997. Comparison of cytotoxic T lymphocyte responses induced by peptide or DNA immunization: implications on immunogenicity and immunodominance. *Eur. J. Immunol.* **27**: 671-678.
- Waine, G.J., Becker, M., Kalinna, B., Yang, W. & McManus, D.P. 1993a. Cloning and functional expression of a *Schistosoma japonicum* cDNA homologous to the enolase gene family. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **195**: 1211-1217.
- Waine, G.J., Becker, M., Yang, W., Kalinna, B. & McManus, D.P. 1993b. Cloning, molecular characterization, and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica. *Infect. Immun.* **61**: 4716-4723.
- Waisman, A., Ruiz, P., Hirschberg, D., Gelman, A., Oksenberg, J., Brocke, S., Mor, F., Cohen, I. & Steinman, L. 1996. Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nature Med.* **2**: 899-905.
- Walker, J., Crowley, P., Moreman, D. & Barrett, J. 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Molec. Biochem. Parasitol.* **61**: 255-264.
- Wang, R., Doolan, D.L., Le, T.P., Hedstrom, R.C., Coonan, K.M., Charoenvit, Y., Jones, T.R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W.R., Sedegah, M., De Taisne, C., Nieman, J.A. & Hoffman, S.L. 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science.* **282**: 476-480.
- Wang, Y., Xiang, Z., Pasquini, S. & Ertl, H. 1997. Immune response to neonatal genetic immunization. *Virology.* **228**: 278-284.
- Ward, R. & McLaren, D. 1988. *Schistosoma mansoni*: evidence that eosinophils and/or macrophages contribute to skin phase challenge attrition in the vaccinated CBA/Ca mouse. *Parasitol.* **96**: 63-84.
- Webster, M., Fulford, A.J.C., Braun, G., Ouma, J.H., Kariuki, H.C., Havercroft, J.C., Gachuhi, K.,

- Sturrock, R.F., Butterworth, A.E. & Dunne, D.W. 1996. Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6 kilodalton-antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. *Infect. Immun.* **64**: 4042-4046.
- Whalen, R.G., Leclerc, C., Deriaud, E., Schirmbeck, R., Reinmann, J. & Davies, H.L. 1995. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen. Activation and entrainment of the immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **772**: 64-76.
- Wilson, R.A. 1993. Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Curr. Op. Immunol.* **5**: 538-547.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science.* **247**: 1465-1468.
- Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. & Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **1**: 363-369.
- Wolowczuk, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R., Grezel, D., Reid, G.D., Tartar, A. & Capron, A. 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse and monkey. *J. Immunol.* **146**: 1987-1995.
- Wu, Y. & Kipps, T.J. 1997. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* **159**: 6037-6043.
- Wyler, D. 1990. Cell biology of schistosomes. In *Modern Parasite Biology*. (ed.), Freeman, New York. p. 91-106.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Pointdexter, R.W., Caspar, P., Lewis, F.A. & Sher, A. 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* **376**: 594-596.
- Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J. & Ertl, H.C.J. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology.* **199**: 132-140.
- Xiang, Z.Q. & Ertl, H.C.J. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* **2**: 129-135.
- Xin, K.Q., Hamajima, K., Sasaki, S., Housho, A., Tsuji, T., Ishii, N., Cao, X.R., Lu, Y., Fukushima, J., Shapshak, P., Kawamoto, S. & Okuda, K. 1998. Intranasal administration of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA vaccine with interleukin-2 expression plasmid enhances cell-mediated immunity against HIV-1. *Immunology.* **94**: 438-444.
- Xiong, S., Gerloni, M. & Zanetti, M. 1997. *In vivo* role of B lymphocytes in somatic transgene immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6252-6257.
- Xu, C.-B., Verwaerde, C., Grzych, J.-M., Fontaine, J. & Capron, A. 1991. A monoclonal antibody blocking the *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1801-1807.
- Xu, C.B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. & Capron, A. 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *J. Immunol.* **150**: 940-949.
- Xu, D. & Liew, F.Y. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology.* **84**: 173-176.
- Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z.Y., Zaki, S.R., Nabel, E.G., Nichol, S.T. & Nabel, G.J. 1998. Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med.* **4**: 37-42.
- Yabukov, L., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V. & Vlassov, V.V. 1989. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6454-6458.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yano, O. & Tokunaga, T. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* **148**: 4072-4076.
- Yang, W., Waite, G.J. & McManus, D.P. 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **212**: 1029-1039.
- Yasutomi, Y., Robinson, H., Lu, S., Mustafa, F., Lekutis, C., Arthos, J., Mullins, J., Voss, G., Manson,

K., Wyand, M. & Letvin, N. 1996. Simian immunodeficiency virus specific cytotoxic T lymphocyte induction through DNA vaccination of Rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**: 678-681.

Yi, A.-K., Klinman, D.M., Martin, T.L., Matson, S. & Krieg, A.M. 1996. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**: 5394-5402.

Yokoyama, M., Zhang, J. & Whitton, L. 1995. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* **69**: 2684-2688.

Zemzoumi, K., Serra, E., Montovani, R., Trolet, J., Capron, A. & Dissous, C. 1996. Cloning of *Schistosoma mansoni* transcription factor NF-YA subunit: phylogenetic conservation of the HAP-2 homology domain. *Molec. Bioch. Parasitol.* **77**: 161-172.

Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G., Röcken, M., Wagner, H. & Heeg, C. 1998. CpG oligonucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol.* **160**: 3627-3630.

Publications et
Présentations
personnelles

Publications

Loïc Dupré, Odile Poulain-Godefroy, Elisabeth Ban, Nathalie Ivanoff, Mohamed Mekranfar, Anne-Marie Schacht, André Capron and Gilles Riveau. 1997. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* **19**: 505-513.

Laurent Kremer, **Loïc Dupré**, Gilles Riveau, André Capron and Camille Locht. 1998. Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of a recombinant BCG expressing a glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Infect. Immun.* **66**: 5669-5676.

Gilles Riveau, Odile Poulain-Godefroy, **Loïc Dupré**, Franck Remoué, Nathalie Mielcarek, Camille Locht and André Capron. 1998. Glutathione S-transferases of 28kDa as major vaccine candidates against schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **93** (suppl. 1): 87-94.

Loïc Dupré, Maxime Hervé, Anne-Marie Schacht, André Capron and Gilles Riveau. Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and Praziquantel treatment. *Submitted*.

Loïc Dupré, Laurent Kremer, Isabelle Wolowczuk, Gilles Riveau, Camille Locht and André Capron. Codelivery of Sm28GST- and IL-18-encoding plasmids confers protection against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Submitted*.

Laurent Kremer, **Loïc Dupré**, Isabelle Wolowczuk and Camille Locht. *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory effect of intradermally-injected DNA encoding IL-18. *Submitted*.

Benoit Baras, Marie-Ange Benoit, **Loïc Dupré**, Odile Poulain-Godefroy, Anne-Marie Schacht, André Capron, Jean Gillard and Gilles Riveau. Systemic and mucosal immune responses against *Schistosoma mansoni* antigen using mucosally-administered biodegradable microparticles. *Submitted*.

Elisabeth Ban, **Loïc Dupré**, Emmanuel Hermann, Catherine Vendeville, Brigitte Quatannens, Paola Ricciardi-Castagnoli, André Capron and Gilles Riveau. CpG motifs induce dendritic cell migration. *Submitted*.

Loïc Dupré, Elisabeth Ban, Florence Rivenet, Odile Poulain-Godefroy, Catherine Vendeville, André Capron and Gilles Riveau. Central role of dendritic cells in the initiation of immune responses after intradermal DNA immunization. *Manuscript in preparation*.

Loïc Dupré, Mohamed Mekranfar, Anne-Marie Schacht, Odile Poulain-Godefroy, André Capron and Gilles Riveau. DNA immunization to the respiratory tract with *Schistosoma mansoni* antigen-encoding plasmids. *Manuscript in preparation*.

Présentations orales

Loïc Dupré, Anne-Marie Schacht, Mohamed Mekranfar, Nathalie Ivanoff, Odile Poulain-Godefroy, André Capron & Gilles Riveau. Characterization of antigen expression and immune response following immunization with DNA encoding *S. mansoni* 28 kDa glutathione *S*-transferase. *Biology of Parasitism course*. Woods Hole, USA, 13 Juin-16 Août 1996.

Loïc Dupré, Odile Poulain-Godefroy, Nathalie Ivanoff, Mohamed Mekranfar, Anne-Marie Schacht, André Capron et Gilles Riveau. Immunisation intradermique avec de l'ADN plasmidique codant pour la glutathione *S*-transférase de *Schistosoma mansoni*. *Journée des jeunes chercheurs de l'Institut Pasteur de Lille*. Lille, 18 Novembre 1996.

Loïc Dupré. Immunisation par ADN contre *Schistosoma mansoni*. *Séminaires Laveran*. Les Pensières, Annecy, 23 -25 Avril 1997.

Loïc Dupré, Maxime Hervé, Denis Boulanger, Odile Poulain-Godefroy, Anne-Marie Schacht, André Capron and Gilles Riveau. Intradermal DNA immunization against schistosomiasis with *S. mansoni* and *S. haematobium* glutathione *S*-transferases encoding plasmids. *International symposium on schistosomiasis and national meeting on schistosomiasis*. Belo Horizonte, Brésil, 19-24 Octobre 1997.

Loïc Dupré, Florence Rivenet, Laurent Kremer, Isabelle Wolowczuk, Anne-Marie Schacht, Jean-Pierre Gazet, André Capron and Gilles Riveau. Intradermal DNA immunization : initiation and development of memory immune responses against *Schistosoma mansoni* antigen at the skin level. *5th Annual meeting of the Society for Immunology*. Brighton, Grande- Bretagne, 2-5 Décembre 1997. Résumé publié dans *Immunology*, 92 (Suppl. 1): 52.

Loïc Dupré. Vaccination ADN: les parasitoses en première ligne. Conférencier invité, *Congrès de la Société Française de Parasitologie*. Le Pharo, Marseille, 10 Décembre 1998.

Présentations de posters

Gilles Riveau, Ray Pierce, Nathalie Ivanoff, Nathalie Mielkarek, Odile Poulain-Godefroy, **Loïc Dupré**, Anne-Marie Schacht, Christelle Leportier, Jocelyne Cornette & André Capron. Development of new vaccination strategies against schistosomiasis. *Colloque Lille - Université Libre de Bruxelles*. Lille, 30 Mai 1995.

Loïc Dupré, Anne-Marie Schacht, Mohamed Mekranfar, Nathalie Ivanoff, Odile Poulain-Godefroy, André Capron & Gilles Riveau. Characterization of antigen expression and immune response following immunization with DNA encoding *S. mansoni* 28 kDa glutathione *S*-transferase. *IBC's 3rd annual Conference on Vaccines*, Rockville, USA, 26 & 27 Février 1996.

Loïc Dupré, Odile Poulain-Godefroy, Nathalie Ivanoff, Mohamed Mekranfar, Anne-Marie Schacht, André Capron et Gilles Riveau. Immunisation intradermique avec de l'ADN plasmidique codant pour la glutathion *S*-transférase de *Schistosoma mansoni*. *Colloque Lille - Université Libre de Bruxelles*. Bruxelles, 9 Janvier 1997.

Loïc Dupré, Odile Poulain-Godefroy, Nathalie Ivanoff, Mohamed Mekranfar, Anne-Marie Schacht, André Capron et Gilles Riveau. Immunisation intradermique avec de l'ADN plasmidique codant pour la glutathion *S*-transférase de *Schistosoma mansoni*. *Cibles thérapeutiques et vaccinales en parasitologie*. Bordeaux, 5 & 6 Février 1997.

Marie-Ange Benoit, Benoit Baras, **Loïc Dupré**, Odile Poulain-Godefroy, Anne-Marie Schacht, André Capron, Jean Gillard and Gilles Riveau. Nasal vaccination against schistosomiasis using biodegradable microparticles. *International Biomedical Science and Technology Symposium*. Istanbul, Turquie, 15-17 Septembre 1997.

Maxime Hervé, **Loïc Dupré**, Anne-Marie Schacht, André Capron et Gilles Riveau. Immunisation ADN intradermique: induction d'une réponse immune adaptée aux schistosomes et restriction génétique associée. *Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie*. Marseille, 26-29 Novembre 1997.

Loïc Dupré, Maxime Hervé, Anne-Marie Schacht, André Capron and Gilles Riveau. Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and Praziquantel treatment. *Conférence Jacques Monod: Interactions entre les parasites et le système immunitaire: protection ou pathologie?* Aussois, 14-17 Septembre 1998.

ABSTRACT

DNA vaccination Strategies against schistosomiasis

Schistosomiasis is caused by parasites living in the blood stream of their host. The eggs they lay in the tissues are at the origin of a severe pathology affecting chronically 300 million people and causing 1000 deaths every day. Although chemotherapy has been used extensively, infection levels have not regressed. The first vaccine candidate, which has been developed at the Pasteur Institute of Lille has just entered clinical trials. It is a crucial Glutathione *S*-Transferase (GST) enzyme that is expressed at every developmental stages of the parasite. In animal models, the efficiency of vaccination with GST relies on a worm burden reduction mediated by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and on a reduction of parasite fecundity that correlates with inhibition of GST enzymatic activity by the specific antibodies.

DNA vaccination is based on the administration of antigen-encoding plasmids. This novel approach to vaccination could prove to be well-adapted for applications in tropical endemic regions, since plasmids are heat-stable and easy to develop. In this approach, transfected cells synthesize the antigen, which then induces specific immune responses. Our work focuses on the administration of GST-encoding plasmids through the skin. This tissue combines permissivity to transfection with a highly organized immune system. Plasmids themselves have an adjuvant activity since they induce maturation of dendritic cells that present the GST antigen. Specific antibodies raised in immunized mice or rats are able to participate to the mechanisms of protection: killing of worms by ADCC and inhibition of GST enzymatic activity. In comparison to protein vaccination, DNA vaccination induces a more sustained response and a memory response that is strongly boosted by a natural percutaneous infection. Codelivery of IL-18-encoding plasmids strengthens the cellular immune response and results in a significant reduction of infection levels. Another protocol associating GST DNA vaccination with Praziquantel chemotherapy is particularly efficient at controlling the pathology through a Praziquantel-induced exposure of GST at the surface of the worms, thus rendering them more susceptible to immune attacks. In conclusion, this work demonstrates the feasibility of a DNA vaccination approach for controlling schistosomiasis infection and its associated pathology and defines lines of future developments for a clinical application.

KEY WORDS

**Schistosomiasis, Glutathione *S*-Transferases,
DNA vaccination, Skin, Chemotherapy, Immunomodulation**

FIELD

Vaccinology

HOST LABORATORY

**INSERM U167 - Stratégies Vaccinales et Relations Hôtes-Parasites
INSTITUT PASTEUR DE LILLE
BP 245 - 59019 LILLE CEDEX - FRANCE**

RESUME

Stratégies de vaccination ADN contre les schistosomiasés

Les schistosomiasés sont causées par des parasites hématophages (schistosomes) contractés au contact de l'eau. Les oeufs pondus par les schistosomes s'embolisent dans les tissus (foie, intestins ou vessie) et occasionnent une pathologie qui affecte de manière chronique 300 millions de personnes et cause un millier de décès par jour. Malgré l'application massive d'une chimiothérapie, les niveaux d'infection n'ont pas reculé. La mise au point d'un vaccin suscite donc les principaux espoirs. Le premier candidat vaccinal, développé à l'Institut Pasteur de Lille, est en cours d'évaluation chez l'homme. Il s'agit d'une Glutathion S-Transférase (GST), enzyme cruciale du parasite, exprimée à chacun des stades de son développement. Dans les modèles animaux, l'efficacité de la vaccination GST repose sur une réduction du nombre de vers, médiée par une cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), et sur une réduction de la fécondité des vers, reliée à une inhibition de l'activité enzymatique GST par les anticorps.

L'approche récente de vaccination par ADN, basée sur l'administration de plasmides codant pour un antigène, pourrait s'avérer la mieux adaptée pour des applications en zones tropicales, car les plasmides sont stables et faciles à développer. Dans cette approche, ce sont les cellules transfectées qui synthétisent elles-mêmes l'antigène, à l'origine de réponses immunes spécifiques. Notre travail souligne l'avantage d'administrer les plasmides par la peau, car il s'agit d'un tissu alliant efficacité de transfection et qualité d'immunosurveillance. Les plasmides sont leur propre adjuvant en induisant la maturation des cellules dendritiques, présentatrices de l'antigène GST. Les anticorps spécifiques induits chez des souris ou des rats immunisés sont capables de médier les mécanismes de la protection: destruction des vers par ADCC et inhibition de l'activité enzymatique GST. En regard de la vaccination protéique, la vaccination ADN induit une réponse plus durable, ainsi qu'une mémoire puissamment rappelée lors d'une infection percutanée naturelle. Une réduction significative des niveaux d'infection est obtenue par coadministration de plasmides codant pour l'IL-18 qui renforcent la réponse cellulaire. De manière encore plus déterminante, l'association de la vaccination ADN GST à la chimiothérapie (Praziquantel) permet de contrôler la pathologie, notamment *via* un effet anti-fécondité s'exerçant grâce à un démasquage de la GST à la surface des vers. Finalement, ce travail montre la capacité d'une vaccination ADN contre les schistosomiasés à contrôler l'infection et la pathologie et ouvre la voie vers des développements pour une application chez l'homme.

MOTS-CLES

Schistosomiasés, Glutathion S-Transférases,
Vaccination ADN, Peau, Chimiothérapie, Immunomodulation

DISCIPLINE

Vaccinologie

LABORATOIRE D'ACCUEIL

INSERM U167 - Stratégies Vaccinales et Relations Hôtes-Parasites
INSTITUT PASTEUR DE LILLE
BP 245 - 59019 LILLE CEDEX - FRANCE

