

N° d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement par

Alexandra Monica BASTOS VIANA DA COSTA

L'INFECTION MURINE PAR *Schistosoma bovis*

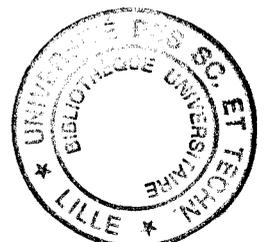
I - Analyse des Paramètres Parasitaires et Immunologiques

**II - Approche des Mécanismes Protectors Induits par la
S. bovis 28 kDa Glutathion S-transférase**

Soutenue le 12 Février 1998 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse : Professeur A. Capron

Président du Jury :	Professeur	G. SPIK
Rapporteurs :	Professeur Professeur	J. VERCRUYSSSE H. GRAS-MASSE
Examineurs :	Professeur Professeur Docteur Docteur	A. CAPRON M. TAYLOR C. VERWAERDE J.M. GRZYCH



Ce travail a été réalisé

**au centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167
Institut Pasteur de Lille**

sous la direction du Professeur A. Capron

**et plus particulièrement dans le groupe de recherche
dirigé par le Docteur J.M. Grzych**

et en

**collaboration avec le Laboratorio de Parasitologia
do Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge Porto - Portugal
dirigé par le Professeur Maria de Lourdes Sampaio Silva**

Ce travail a été financé par la CEE (Fellowship - contrat ERBCHBICT 941496)

Je dédie cette thèse à :

Mes parents....

*Merci pour votre encouragement
et votre soutien, je vous porte dans mon coeur.*

Qualquer musica, ah, qualquer,
Logo que me tire da alma
Esta incerteza que quer
Qualquer impossivel calma!

Qualquer musica - guitarra,
Viola, harmonio, realejo...
Um canto que se desgarra...
Um sonho em que nada vejo...

Qualquer coisa que nao vida!
Jota, fado, a confusao
Da ultima dança vivida...
Que eu nao sinta o coração!

Estas so. Ninguém o sabe. Cala e finge.
Mas finge sem fingimento.
Nada esperes que em ti ja nao exista,
Cada um consigo é triste.
Tens sol se ha sol, ramos se ramos buscas,
Sorte se a sorte é dada.

Fernando Pessoa

A Monsieur le Professeur A. Capron,

Vous m'avez chaleureusement accueillie dans votre unité. C'est avec votre permission et soutien que ce travail a pu aboutir.

Que ce mémoire soit le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur G. Spik qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse.

A Madame le Professeur H. Gras-Masse et Monsieur le Professeur J. Vercrusse qui ont accepté de juger ce travail. Je vous en suis très reconnaissante.

A Madame le Docteur C. Verwaerde pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, pour votre disponibilité, la qualité de vos suggestions scientifiques et vos précieuses critiques au cours de ces deux dernières années, je tiens à vous remercier chaleureusement.

A Monsieur le Professeur G. Taylor pour l'honneur que vous me faites en participant à mon jury, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J.M. Grzych pour m'avoir fait confiance tout au long de ce travail, je vous remercie.

A Monsieur le Docteur R.J. Pierce pour votre coopération et votre participation dans la correction des articles et de ce manuscrit.

A Madame le Professeur M. Capron pour votre disponibilité et votre enthousiasme.

A Madame le Professeur Maria de Lourdes Sampaio Silva pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir permis de débiter le dur travail qu'est la recherche.

A mes chères...

Sophia, pour tes précieux enseignements, tes sages conseils et les "millions de cellules"!...

Josette, aux longues heures partagées, à tes inoubliables enseignements et au "petit bout... encore un petit bout d'intestin"!...Que cette thèse soit le témoignage de mon amitié et sincère respect.

A ma Sophie...à notre heure de folie, à nos rires et à nos larmes. Merci... d'avoir eu toujours le temps de m'écouter, de tes sincères conseils et de ton amitié. Merci encore de m'avoir fait "tatie portugaise" de ta belle Julie. Tu sais..."C'est pas écrit dans les livres... le temps c'est de l'Amour...."

A ma Joaquina...à nos longues soirées de bavardage!! ...aux notes musicales... aux silences partagés...aux astronautes complices... "Je regarderai la nuit, une étoile me sourira..."

Thank you

Karine...à nos disputes dépassées... aux bons souvenirs de nos premiers pas en ski.... et le retour à Stoneage. A la blondinette Vinca...un phénomène. Pascal...à nos murmures and hard-hot Wales nights. A Kader, le "pas assez beau et intelligent" Sénégalais que je connais. Bertrand...le plus grand « nain ch'ti » et tes drôles de blagues. A Estelle...pour le baby-sitting du cactus.

Rodolfo... "Je crois bien que j'aurai besoin de te voir
 Quand tu dances, quand tu dances
 Sans te parler, ni déranger, mais te voir
 Quand tu dances, y songes-tu ?
 Quand tu dances, y songes-tu ?
 Et toutes les peines, toutes, contre une seule de nos minutes.....J.J.Goldman"

Sylvain...aux longues soirées de café portugais...au cafard de "Michel Portal"...et à nos explorations gabonaises !! Merci pour tous les bons moments....d'amitié.

A Marina... à qui je dédie une partie de ce mémoire et à nos loisirs communs. A Tobias... je n'oublierai jamais ta patience et ta gentillesse. Merci de votre amitié.

A ceux qui sont déjà partishablando.....Hector et Esteban ...et le "du pipo" de G. Renom.

A tous ceux qui "traînent" à la machine à café du CIBP.

A Jean-Loup Neyrinck... pour m'avoir « informatisée » et aux pensées communes.

A Chantal Kizonzolo et Jean Marc pour leurs disponibilité et efficacité.

A Florent....le plus rigolo des "Gaubert" et à Gaëlle...pour son délicieux Tiramisu.

A mes compagnons du PortugalSusana et sa famille,Lurdinhas et Aninhas, Sr. Seixas, Zé-Manel, Filipa et tous ceux que je ne peux pas citer.....Merci de votre amitié.

Et encore à ma famille.....

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications

Viana da Costa A., Gaubert S., Fontaine J., Lafitte S., Seixas A., Sampaio Silva M.L., Capron A., Grzych J.M. **1997**. "Murine *Schistosoma bovis* infection : analysis of parasitic and immune parameters". **Accepté dans Parasit. Immunol.**

Viana da Costa A., Gaubert S., Lafitte S., Fontaine J., Bossus M., Gra Masse H., Capron A., Grzych J.M., **1997**. "Antibodies to *Schistosoma bovis* 28kDa Glutathione S-Transferase affect schistosome egg viability : relationship with GST activity" **Soumis à J. Immunol.**

Viana da Costa A., Fontaine J., Lafitte S., Seixas A., Sampaio Silva M.L., Capron A., Grzych J.M., Verwaerde C., **1997**. "Resistance to reinfection with *Schistosoma bovis* in the mouse" **En preparation.**

Communications

*SFI-Société Française d'Immunologie, Marseille, France 25-27 November **1997**. "*Schistosoma bovis* glutathion S-Transferase (rSb28GST) : inhibition de la viabilité des oeufs."

*SPP-Sociedade Portuguesa de Parasitologia (V Congrès Ibérique de Parasitologie), Evora, Portugal 6-10 October **1997**. **Deux présentations orales.** "Infeção murina por *Schistosoma bovis* : análise dos parametros Parasitologicos e Imunologicos" et "Analyse *in vivo* e *in vitro* das propriedades biologicas dos anticorpos monoclonais contra a *S. bovis* r28GST".

*BSP-British Society of Parasitology -Spring Meeting Manchester UK, 8-10 April **1997**. **Présentation orale.** "*In vitro* and *in vivo* analysis of biological properties of murine monoclonal antibodies to *Schistosoma bovis* 28GST protective antigen".

*Meeting Université Libre de Bruxelles-Lille, 9 Janvier **1997**.

*Meeting "Journée Jeunes Chercheurs"-Lille France, 18 November **1996**. "Analyse des propriétés biologiques *in vivo* des anticorps monoclonaux anti-*S. bovis* 28 Glutathion-S-Transférase".

*Meeting Lille-Université Libre de Bruxelles, 30 May **1995**. "Approches des propriétés effectrices des IgA dans les schistosomiasés".

* Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge-Porto Portugal, 30 June **1995** at the Meeting "Seminario sobre Schistosomiase". **Présentation orale.**

Aux cours de ces années, j'ai également participé aux travaux suivants :

Gaubert S., **Viana da Costa A.**, Maurage C.A., Santos Lima E.C., Fontaine J., Lafitte S., Minoprio P., Capron A., Grzych JM., **1997.** "X-linked immunodeficiency affects the outcome in *Schistosoma mansoni* in the murine model". **Soumis à Int. Immunol.**

Gaubert S., Santos Lima E.C., **Viana da Costa A.**, Lafitte S., Fontaine J., Minoprio P., Capron A., Grzych JM., **1997.** "CD5 B cells in mucosal IgA response during *S. mansoni* murine infection". **En préparation.**

Sampaio Silva M., Correia Costa J.; **Viana da Costa A.**, Pires M.A., Lopes A., Castro A., Monjour L. **1996.** "Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections". **Am. J. Med. Hyg.,54(2), 146-148.**

Monteiro L., Silveira A., Sampaio Silva M.L., Correia J.M., **Costa A.M.**, Carvalho M.T., Coelho J.M., and Coelho T. **1996.** "Taeniasis-Cisticercose por *Taenia solium*. Estudo epidemiológico piloto numa aldeia do Norte de Portugal". **Rev. Portuguesa de Doenças Infectiosas Vol.3/4 : 182-188.**

Correia da Costa J.M., **Viana da Costa A.**, Monteiro L., Oliveira P., Sampaio Silva M.L. "Immunodiagnosis of Human Neurocysticercosis : evaluation of ELISA and Immunoblotting using a commercial antigen preparation". **Soumis.**

* 2^{ème} Congrès de Maladies Infectieuses-Octobre **1993** Porto "Diagnostico laboratorial da Cisticercose humana pela técnica enzimatica de ELISA e Hemaglutinação indirecta"

* Abstracts présentés au Congrès ICASEP I-Valencia **1991.** "Immunobiology of the infection by *Schistosoma bovis* in the Balb/C model: extrapolation of the immunodiagnosis of the human schistosomiasis" et "Excretory- Secretory products of *Fasciola hepatica* , utilization in the immunodiagnosis of fascioliasis" et "Immunodiagnosis of humain Neurocysticercosis".

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
CHAPITRE I : GENERALITES	18
1- Place des schistosomes dans le règne animal	18
2- Cycle évolutif	19
2.1- Stade adulte	
2.2- Le miracidium	
2.3- Le sporocyste	
2.4- La cercaire	
2.5- Le schistosomule et le ver adulte	
3- Biologie des schistosomes	22
3.1- Nutrition et métabolisme	
3.2- Excrétion	
3.3- Respiration	
3.4- Reproduction	
4- Le génome des schistosomes	26
5- Pathologie associée aux schistosomoses	27
5.1- Phase d'infestation	
5.2- Phase d'invasion	
5.3- Phase d'état	
6- Diagnostic	29
7- Lutte contre la schistosomiase	29
7.1- Traitement	
7.2- Prophylaxie sanitaire	
7.3- Prophylaxie médicale	
8- Immunologie des schistosomiasés	32
8.1- Immunité naturelle	
8.2- Immunité acquise	
8.2.1- Réponse humorale	
8.2.2- Réponse cellulaire	
9- Mécanismes d'échappement du parasite	38
10- Les candidats vaccinaux	40
11- Les glutathion S-transférases	44
11.1- Les GSTs de Vertébrés	44
11.1.1- Les GSTs microsomaux	
11.1.2- Les GSTs cytosoliques	

11.2- Les GSTs chez les Helminthes	46
11.2.1- Les fonctions biologiques des GSTs	37
11.2.1.1- Détoxification des xénobiotiques	
11.2.1.2- Détoxification des produits des peroxydations lipidiques	
11.2.1.3- Détoxification passive et transport	
11.2.1.4- Protection de l'ADN	
11.2.1.5- Les mécanismes d'action	
11.3- Les GSTs de schistosomes	50
11.4- Les sites d'expression	52
11.5- La régulation de l'expression du gène codant pour la Sm 28GST	53
11.6- Le pouvoir protecteur des GSTs	54
11.6.1- L'effet protecteur de la Sm 28GST	
11.6.1.1- Sm 28GST et anticorps	
11.6.1.2- Sm 28GST et réponse cellulaire T	
11.6.1.3- Sm 28GST dans l'infection humaine	
11.6.2- Les GST de <i>S. japonicum</i>	
11.6.3- Les GST de <i>S. bovis</i>	59
CHAPITRE II : Schistosomiase à <i>Schistosoma bovis</i>	62
1- Biogéographie et cycle biologique de <i>Schistosoma bovis</i>	62
1.1- Biogéographie	
1.2- Cycle biologique	
1.2.1- Le miracidium	
1.2.2- La cercaire	
1.2.3- Le schistosomule et sa migration	
1.2.4- Les adultes	
1.2.5- L'oeuf	
2- Transmission	71
3- Pathologie	71
3.1- Aspects cliniques chez les bovins	
3.1.1- Symptômes	
3.1.2- Paramètres parasitologiques	
3.1.2.1- Charge parasitaire	
3.1.2.2- Charge en oeufs tissulaires	
3.1.2.3- Excrétion fécale	
3.2- Aspects cliniques chez les petits ruminants et chez les modèles expérimentaux	
4- Diagnostic	76
4.1- Diagnostic clinique	

4.2-Diagnostic parasitologique	
4.3- Diagnostic immunologique	
5- Traitement	78
6- Prophylaxie sanitaire	80
7- Prophylaxie médicale	80
8- Développement de l'immunité	80
8.1- Immunité dans les infections naturelles des bovins	81
8.2- Immunité dans les infections expérimentales des bovins	82
8.3- Etudes des mécanismes de résistance acquise dans l'infection bovine	83
8.4- Immunité chez les petits ruminants	87
8.5- Protections croisées	88
9- Essais de protection chez <i>Schistosoma bovis</i>	90
RESULTATS	95
Article 1	95
Article 2	126
Article 3	160
DISCUSSION et PERSPECTIVES	207
ANNEXE TECHNIQUE	222
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	226

ABREVIATIONS

AcMc	Anticorps monoclonal
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HSP	Heat-shock protein
IL	Interleukine
IFN	Interféron
i. v.	Intra-veineux
kDa	Kilo Dalton
kbp	Kilo paire de bases
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PZQ	Praziquantel
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEA	Soluble Egg Antigen
SWAP	Soluble Worm Antigen Preparation
Sb 28GST	<i>Schistosoma bovis</i> 28kDa Glutathion S-transférase
Sm 28GST	<i>S. mansoni</i> 28kDa Glutathion S-transférase
Sh 28GST	<i>S. haematobium</i> 28kDa Glutathion S-transférase
Sj 26GST	<i>S. japonicum</i> 26kDa Glutathion S-transférase
TNF	Tumor Necrosis Factor

ANGLICISMES

Attrition	Elimination naturelle des vers
Challenge	Infection d'épreuve

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies parasitaires exercent à l'échelle de la planète des répercussions souvent trop méconnues aux niveaux sanitaire, social et économique.

Parmi ces infections, les schistosomiasés ou bilharziosés tiennent une place toute particulière puisqu'après les infections palustres, elles représentent la seconde cause de morbidité. En effet, selon l'O.M.S., 650 millions d'individus vivent dans les zones d'endémie, 200 millions de personnes sont infectées et 80.000 décès sont imputables chaque année à cette pathologie.

Si à juste titre, ces infections humaines sont considérées comme un véritable problème de santé publique, les conséquences des schistosomiasés animales demeurent beaucoup plus confidentielles, bien que sur le plan vétérinaire, ces infections du bétail soient responsables d'importantes pertes économiques dans les pays où elles sévissent.

Qu'il s'agisse des infections humaines ou animales, l'accélération des programmes d'irrigation et d'aménagement des cours d'eau en zone tropicale a multiplié l'émergence de biotopes favorables à la prolifération des mollusques vecteurs. L'accent a donc été plus particulièrement porté au cours de la dernière décennie sur l'établissement de programmes de lutte à grande échelle dans les zones d'endémie. Le contrôle sanitaire des conditions de transmission restant embryonnaire dans la plupart des pays concernés, le développement d'une stratégie basée sur la vaccination des populations est très vite apparue nécessaire.

Dans ce contexte, de nombreux travaux ont été consacrés à une meilleure compréhension de la biologie du parasite et à la nature des relations le liant à son hôte, préalable essentiel à l'identification des mécanismes immunitaires sous-jacents et à l'élaboration d'une stratégie vaccinale efficace dans le contrôle à long terme des schistosomiasés.

La schistosomiasé animale à *Schistosoma bovis* a fait l'objet de nombreuses études sur le terrain visant à appréhender dans les hôtes naturels (bovins, ovins et caprins) les paramètres parasitologiques de l'infection et à identifier les phénomènes de résistance à la réinfection ainsi que leurs mécanismes, mais également à évaluer les propriétés protectrices de différentes préparations vaccinales.

L'un des candidat vaccinal, analysé dans ces conditions est une glutathion S-transférase de 28kDa identifiée dans différentes espèces de schistosome et qui confère par immunisation des niveaux hautement significatifs de protection vis-à-vis d'une infection d'épreuve se traduisant en fonction de l'hôte étudié, sur la charge vermineuse ou sur la fécondité du parasite.

Malgré les progrès considérables accomplis dans ce domaine, les mécanismes responsables de ces phénomènes restent mal compris.

Le modèle naturel étant très coûteux, le modèle expérimental murin s'est naturellement justifié.

Les travaux présentés dans ce mémoire comportent 3 objectifs :

- approfondir nos connaissances sur le déroulement de l'infection expérimentale murine par *Schistosoma bovis*, par évaluation des paramètres de nature parasitologique mais aussi immunologique (humoraux et cellulaires).
- analyser les mécanismes impliqués dans les phénomènes de fécondité et de viabilité du parasite, par intermédiaire d'anticorps monoclonaux produits contre l'antigène *S. bovis* 28GST.
- enfin, explorer, pour la première fois, les répercussions de l'immunisation par la rSb 28GST chez la souris infectée par *Schistosoma bovis*.

Ces trois thèmes constituent l'axe central des résultats exposés dans ce mémoire après un chapitre de généralités sur les schistosomiasés, et plus particulièrement sur la schistosomiase à *Schistosoma bovis*.

CHAPITRE I

CHAPITRE I : GENERALITES

1- Place des schistosomes dans le règne animal

Les schistosomes appartiennent à l'embranchement des Plathelminthes (vers plats non segmentés), classe des Trématodes (appareil digestif avec coecum), sous-classe digènes (deux hôtes au sein du cycle parasitaire), super-ordre des prostomata (bouche antérieure), ordre des distomes (deux ventouses : buccale et ventrale), sous-ordre des schistosomoïdes (sexes séparés), famille des schistosomatidés (furcocercaires libres), genre *Schistosoma* (hôte définitif mammifère) (Euzeby, 1970). Le genre *Schistosoma* rassemble 18 espèces dont 5 parasitent l'homme (Short, 1983). La distinction entre les espèces est basée sur des critères taxonomiques comme la morphologie, les caractéristiques de cycle de vie et de comportement, la carte chromosomique, la spécificité de l'hôte et sur des études de l'ADN et des isoenzymes.

Le groupe des schistosomes renferme des espèces strictement zoophiles ou strictement anthropophiles et d'autres espèces dont la spécificité pour l'homme et les animaux, est moins nettement marquée.

* Espèces zoophiles

- Ruminants : *Schistosoma bovis*, *Schistosoma mattheei*, *Schistosoma leiperi*, *Schistosoma margrebowiei*, *Schistosoma indicum*, *Schistosoma spindale*, *Schistosoma nasale*, *S. curassoni* et le genre *Orientobilharzia*
- Rongeurs et Carnivores : *Schistosoma rodhaini*
- Suidés : *Schistosoma incognitum*

* Espèces anthropophiles

- *Schistosoma mansoni* (bilharziose intestinale)
- *Schistosoma intercalatum* (bilharziose intestinale)
- *Schistosoma haematobium* (bilharziose urogénitale)

* Espèces anthrozoophiles

- *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongii* (bilharziose intestinale)

Sur la base du critère de la morphologie et de la biométrie des oeufs de schistosome, un regroupement de différentes espèces a été réalisé (Figure 1). On distingue trois groupes :

- oeuf ovale muni d'un éperon terminal (*S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis*, *S. mattheei*)
- oeuf rond muni d'un éperon minuscule (*S. japonicum* et *S. mekongii*)
- oeuf ovale muni d'un éperon latéral (*S. mansoni*)

La taxonomie des schistosomes est complexe car l'apparition d'hybrides naturels ainsi que des variations au sein d'une espèce peuvent générer des différences dans les capacités d'infectivité et de développement chez l'hôte (Nadler, 1987).

2- Cycle évolutif

Parasites digènes, les schistosomes utilisent un hôte définitif vertébré et un hôte intermédiaire invertébré : un mollusque aquatique.

2.1- Stade adulte

Les schistosomes adultes vivent accouplés en quasi permanence dans les capillaires d'organes creux de leur hôte définitif, majoritairement le long du tube digestif (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. bovis*), mais également autour du système uro-génital (*S. haematobium*) ou dans des localisations plus rares, comme la muqueuse pituitaire nasale (*S. nasale*).

Les femelles pondent de nombreux oeufs embryonnés, le nombre d'oeufs pondus varie suivant l'espèce de schistosome. Les oeufs peuvent avoir deux destinées :

- soit, ils sont bloqués dans les tissus, principalement le foie et l'intestin, et donnent lieu à la formation du granulome bilharzien, responsable de la pathologie,

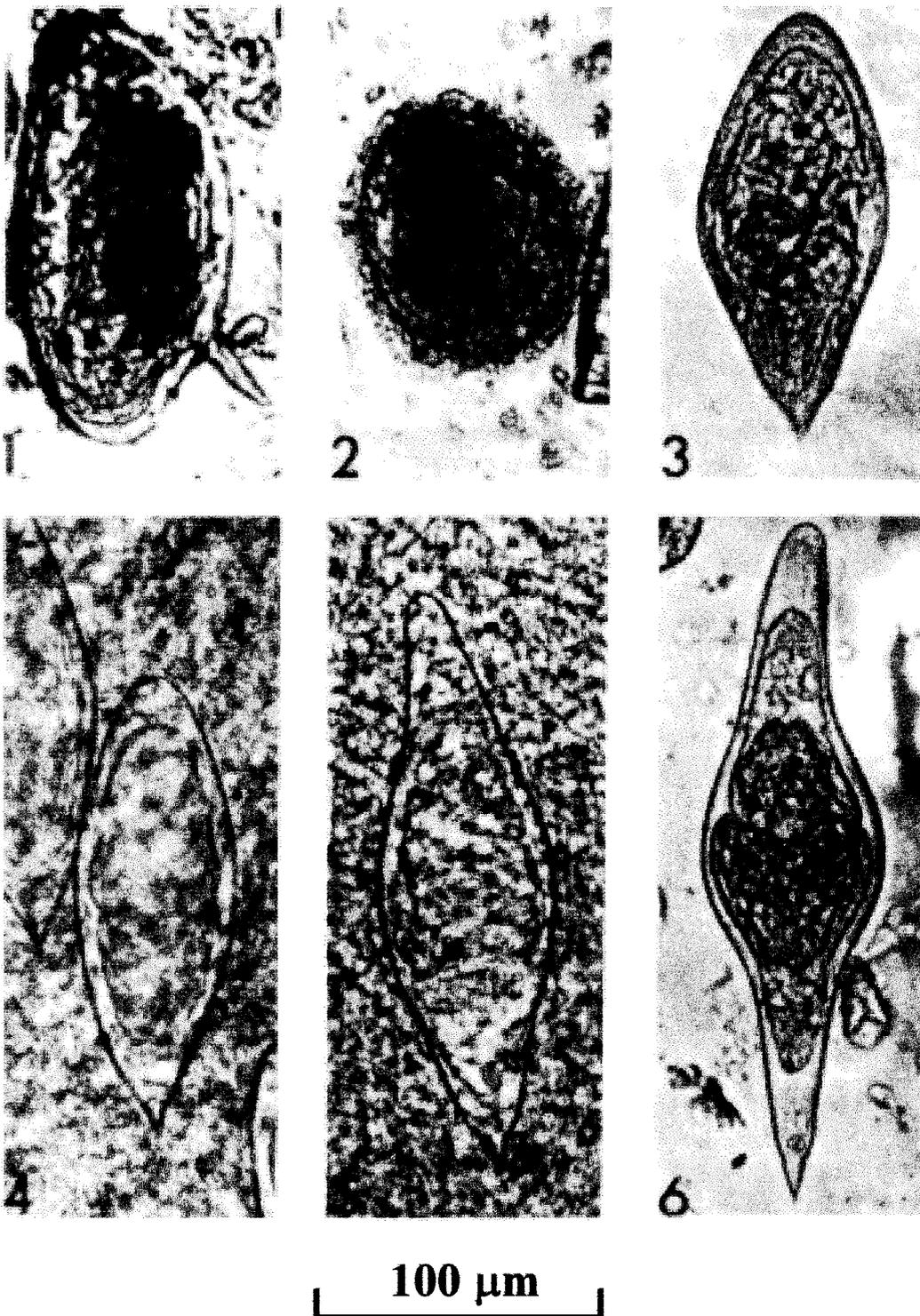


Figure 1- Morphologie des oeufs de schistosomes :

(1) *S. mansoni*, (2) *S. japonicum*, (3) *S. haematobium*,
 (4) *S. intercalatum*, (5) *S. mattheei*, (6) *S. bovis*
 (d'après " Human schistosomiasis ", R.F. Sturrock,
 CABI Ed.)

- soit, ils sont excrétés dans le milieu extérieur après passage trans-pariétal dans les fécès, l'urine ou les sécrétions nasales, selon l'espèce.

2.2- Le miracidium

Les oeufs de schistosomes excrétés par l'hôte définitif éclosent au contact de l'eau, libérant une larve, le miracidium doté de cils vibratiles. Les premières études sur les conditions d'éclosion indiquent que la température (entre 25-30°C), la luminosité et la pression osmotique (hypotonicité de l'eau proche de 12 mOsM) sont les principaux facteurs nécessaires à l'éclosion.

Le mécanisme d'éclosion semble être un phénomène purement physique, l'eau pénètre dans les vacuoles créant un phénomène de turgescence qui va aboutir à l'éclatement de l'enveloppe de l'oeuf (Kusel, 1970).

Le miracidium représente la première forme larvaire libre du cycle du schistosome permettant la transmission entre le vertébré et le mollusque, dans lequel il pénètre activement guidé par divers stimuli d'ordre chimique et sensoriel.

2.3- Le sporocyste

A l'intérieur du mollusque, le miracidium se transforme en sporocyste primaire qui va donner des sporocystes secondaires. La suite du développement s'effectue dans l'hétopancreas du mollusque et aboutit à la formation de quantités considérables de cercaires, deuxième forme libre infestante du cycle. La période prépatente varie en fonction de la température, de l'hôte intermédiaire et de sa localisation géographique.

2.4- La cercaire

Dotées d'une queue bifide et vibrante, les cercaires ou furcocercaires, nagent alors activement à la rencontre d'une cible adaptée, sous l'influence de signaux physiques et chimiques encore mal connus. Pourvues d'une durée de vie de 24 heures au maximum, les

cercaires pénètrent l'épiderme de l'hôte définitif. La pénétration à travers la peau fait intervenir une action mécanique et une composante chimique (sécrétion d'enzymes protéolytiques) (Landsperger *et al*, 1982).

La production de cercaires dépend de facteurs biotiques et abiotiques (Webbe, 1965). La productivité en cercaires est majoritairement déterminée par l'espèce invertébrée et la chronobiologie des émissions cercariennes par l'hôte définitif.

2.5- Le schistosomule et le vers adulte

Lors de leur pénétration transcutanée, les furcocercaires perdent leur partie caudale pour devenir, chez l'hôte définitif, un schistosomule. Cette modification morphologique s'accompagne d'une modification de structure et de modifications biochimiques, comme l'expression de nouvelles molécules, qui vont permettre au schistosomule de s'adapter à l'organisme de l'hôte définitif (Stirewalt *et al*, 1974 ; McLaren, 1980).

Après un séjour cutané de 3 à 5 jours, les schistosomules arrivent aux poumons, par les voies lymphatiques ou veineuses, d'où ils gagnent ensuite le système porte intra-hépatique par la voie circulatoire (cette phase migratoire dure de 10 à 21 jours). Ils poursuivent leur développement jusqu'à la différenciation et leur maturation sexuelle. Après accouplement, le couple va migrer à contre-courant le long de la veine porte et s'installer dans les capillaires pariétaux de l'organe creux, où la ponte pourra être initiée.

3- Biologie des schistosomes

3.1- Nutrition et métabolisme

La nutrition est nettement influencée par le sexe du schistosome. La femelle, localisée dans le canal gynécophore du mâle, semble essentiellement spécialisée dans la reproduction, alors que le mâle, qui possède une musculature importante et un tégument développé, assure les fonctions de protection, de nutrition et de locomotion (Basch, 1990). L'absorption se fait par

voie buccale et trans-tégumentaire suivant la nature des nutriments. Les éléments solubles (glucose, acides aminés, sels minéraux) peuvent traverser le tégument et être absorbés par le schistosome.

Le schistosome est un parasite sanguicole et hématophage. La femelle consomme plus d'hématies (1,4 million/jour) que les mâles (0,1 million/jour) (Lawrence, 1973c). Les globules rouges sont lysés, puis dégradés par une hémoglobinase et la cathepsine B (Chappell et Dresden, 1986 ; Klinkert *et al*, 1989), fabriquées par le système digestif. Les produits du catabolisme constitueront la source principale des acides aminés disponibles pour les néosynthèses. Les produits terminaux du catabolisme protidique sont l'ammoniaque et l'urée.

3.2- Excrétion

L'appareil excréteur spécifique des schistosomes est constitué de protonéphridies : système de tubules s'ouvrant sur un néphridiopore qui assurent la fonction d'excrétion des déchets. Le tégument participe également à l'élimination des déchets toxiques. La mise en évidence de sa participation directe dans ce processus reste toutefois parcellaire.

Les dernières études suggèrent l'implication du système néphridial dans l'élimination des déchets issus du métabolisme de l'azote. L'accumulation de disulfide isomérase (capable de fixer des polypeptides et catalyser des réactions de réduction) au niveau tissulaire, est corrélée avec le taux de synthèse de protéines destinées à l'excrétion (Noiva et Lennarz, 1992). Sa présence en forte concentration au niveau des cellules néphridiales des schistosomes, est une indication de l'implication de ces organes dans les processus d'excrétion des protéines (Finken *et al*, 1994).

3.3- Respiration

La respiration peut s'effectuer par la voie aérobie ou anaérobie. Le glycogène peut être mobilisé à la demande, sous l'action d'une phosphorylase glycogénique pour fournir du glucose qui, selon les conditions, sera utilisé par la voie aérobie ou anaérobie. Les enzymes nécessaires

à la conversion du glucose en acide lactique sont présentes : hexokinase, phosphofructokinase, aldolase, triose phosphate isomérase (TPI), lactate déshydrogénase, pyruvate kinase. Le schistosome est ainsi capable de s'adapter aux disponibilités énergétiques variables susceptibles d'être rencontrées au cours de son existence. La dégradation du glycogène est induite par la limitation du catabolisme de glucose externe. La fonction physiologique des réserves de glycogène est de fournir un substrat pendant les périodes d'approvisionnement déficientes en glucose.

Pour leur métabolisme énergétique, les stades adultes sont dépendants des carbohydrates provenant de l'hôte. Le parasite s'adapte aux différentes voies d'obtention de l'énergie, en fonction des conditions externes, surtout selon la disponibilité de nutriments et de l'oxygène. Ce dernier varie en fonction de l'habitat du parasite, par exemple, l'oxygène est absent au niveau des canaux biliaires, mais présent au niveau de l'intestin.

Les schistosomes adultes vivant dans le système circulatoire, habitat aérobie, présentent néanmoins un métabolisme par la voie de la fermentation, produisant principalement du lactate, mais ils sont aussi capables d'utiliser la voie aérobie. Le choix du métabolisme par voie anaérobie des helminthes n'est pas nécessairement une conséquence de l'absence d'oxygène, due à une anoxie environnementale, ni à la difficulté de diffusion de l'oxygène au niveau du parasite, vu sa petite taille.

Une étude comparative du métabolisme des carbohydrates entre différentes espèces de schistosomes (*S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis* et *S. mansoni*) a été effectuée, montrant l'absence de différence au niveau du contenu en protéines et en glycogène. Pour toutes les espèces, le lactate est le produit final du catabolisme des carbohydrates et le glucose est dégradé en CO₂ via le cycle de Krebs (Tielens *et al*, 1989).

Les stades de vie libre du parasite (oeufs, miracidium et cercaires) sont complètement dépendants des provisions d'énergie endogènes, surtout le glycogène, dégradé en CO₂, via le cycle de Krebs ; la production d'énergie se fait par la voie aérobie (Horemans *et al*, 1991). Lorsque la cercaire pénètre l'hôte définitif, elle se transforme en schistosomule. Cette étape s'accompagne de changements morphologiques et physiologiques, mais aussi d'une transition biochimique importante. Le schistosomule passe très rapidement d'un métabolisme lié au cycle

de Krebs à la production de lactate (Horemans *et al*, 1992). Toutefois, la transformation biologique de cercaire en schistosomule et le changement biochimique vers la fermentation, prennent des voies différentes non obligatoirement liées. La production de lactate est induite par la concentration extérieure de glucose et est dépendante de l'hexokinase. Cette commutation vers la production de lactate se fait uniquement au niveau de la tête et non de la queue de la cercaire (Horemans *et al*, 1991).

Dans l'hôte intermédiaire, la transformation du miracidium en sporocyste entraîne aussi des commutations biochimiques. Les sporocystes sont des anaérobies facultatifs ; ils ajustent leur métabolisme aux différentes conditions chez le mollusque. En présence d'oxygène, ils métabolisent via le cycle de Krebs mais ils produisent aussi du lactate, tandis qu'en anaérobiose, rencontrée parfois chez le mollusque, les productions de succinate et lactate sont prédominantes (Tielens, 1994).

3.4- Reproduction

Les schistosomes sont des trématodes digènes, caractérisés par la présence d'individus à sexes séparés (gonochoriques) (Yamaguti, 1971), dont le développement et la maturation sexuels se font chez l'hôte définitif.

Des essais d'infestation monosexuée ont démontré qu'en l'absence de femelles, les mâles sont incapables de poursuivre normalement leur maturation et que les femelles sont de petite taille avec un appareil reproducteur immature. Seules les glandes vitellines, qui produisent les précurseurs des protéines de la coquille et qui assurent la nutrition de l'oeuf, sont atrophiées (Basch et Basch, 1984). De même, des femelles matures et fertiles dégénèrent rapidement, mais réversiblement si elles sont transplantées seules chez un nouvel hôte (Clough, 1981).

Des phénomènes d'hermaphrodisme peuvent être observés chez les espèces de schistosomes dans certaines conditions de milieu (Basch, 1990). Ce mode de reproduction classiquement décrit chez les mâles, est rarement décrit chez les femelles (Chien et Lia, 1960). Il se traduit par la présence d'un utérus et d'ovaires (Buttner, 1950). Il s'agirait d'un mécanisme de secours, dû à la carence momentanée en femelles chez l'hôte infesté.

Les schistosomes peuvent aussi se reproduire par parthénogenèse, sous certaines conditions notamment lorsque les femelles se trouvent en présence de mâles stériles ou hétérospécifiques (Basch et Basch, 1984).

Après fécondation, les femelles libèrent des oeufs qui, selon l'espèce, seront pondus isolément (*S. mansoni*) ou en groupes (*S. haematobium*, *S. bovis*). Le nombre d'oeufs excrétés quotidiennement varie selon les espèces de schistosomes. A la sortie de l'utérus, l'oeuf est immature et le reste pendant 6 jours jusqu'à l'apparition d'un miracidium développé. L'oeuf embryonné circule chez l'hôte définitif. Une partie de ces oeufs embryonnés passe dans le milieu extérieur avec les fécès, l'urine ou les sécrétions nasales selon l'espèce, assurant ainsi la continuité du cycle parasitaire. L'autre partie reste bloquée dans les tissus de l'hôte et va susciter le développement d'une réponse inflammatoire connue sous le nom de granulome.

4- Le génome des schistosomes

Le génome nucléaire des schistosomes comporte environ 2.7×10^8 paires de bases (bp), avec une haute proportion de bases A et T (66%) (Simpson *et al*, 1982). Ce génome est structuré en huit chromosomes, sept autosomes et une paire de chromosomes sexuels du type ZZ pour le mâle, et WZ pour la femelle.

Encore aujourd'hui, les données sur la structure du génome et la régulation des gènes des schistosomes restent partielles et fragmentaires. La structure générale des gènes connus semblerait être similaire à celle d'autres eucaryotes. La présence d'introns de diverses tailles a été montrée dans de nombreux gènes. Chez *S. mansoni*, des introns de très petite taille (entre 30 et 51 pb) ont été décrits dans l'extrémité 5' des gènes codants pour la glycéraldéhyde-3-déhydrogénase (Charrier-Ferrara *et al*, 1992), l'alpha-tubuline (Duvaux-Miret *et al*, 1991), la triose phosphate isomérase (Reis *et al*, 1993) et la glutathion peroxydase (Roche *et al*, 1994). Des introns de grande taille (plus de 3 kb) et des gènes ne présentant aucun type d'intron, comme ceux codant pour la coquille de l'oeuf ont aussi été décrits dans la littérature (Henkle *et al*, 1990a).

Le génome des schistosomes ne montre pas de bases méthylées. Parallèlement, il existe un déficit des séquences CpG et un pourcentage élevé des séquences TpG (Musto *et al*, 1994). Ces résultats suggèrent l'hypothèse selon laquelle une méthylation ancestrale serait à l'origine de ce déplacement. De plus, l'existence de séquences riches en C et G a été décrite dans la région 5' du gène codant pour la glutathion peroxydase de *S. mansoni*, suggérant l'existence d'îlots CpG non méthylés dans ce génome.

Les régions promotrices de divers gènes sont déjà connues, elles ont été séquencées et partiellement analysées, comme par exemple, celles des gènes codant pour la Gp22 (El Sherbeini *et al*, 1991), la « heat shock protein » de 70kDa (HSP 70) (Neumann *et al*, 1995), la protéine de la coquille de l'oeuf (Henkle *et al*, 1990a), la calréticuline (Khalife *et al*, 1995), le gène F10 spécifique de la femelle (Gianninni *et al*, 1995) et la glutathion S-transferase de 28kDa (Sm 28GST) (McNair *et al*, 1993).

5- Pathologie associée aux schistosomes

Suivant l'espèce de schistosomes, les pathologies associées vont varier en fonction de la localisation des vers adultes. En effet, les oeufs pondus non évacués par l'hôte seront à l'origine de la plupart des lésions en induisant la formation d'un granulome inflammatoire.

La maladie s'exprime en plusieurs phases:

5.1.- Phase d'infestation

Lors du bain d'un individu en eau infestée, la pénétration transcutanée des cercaires s'effectue en quelques minutes. Elle induit une réaction cutanée allergique, dermite, qui est également dûe aux schistosomules morts incapables de poursuivre leur cycle normal. Cette phase est suivie d'un prurit, d'érythème et plus tard de vésicules. Cette phase d'infestation cercarienne est souvent discrète et dépend de l'espèce de schistosome en cause.

5.2.- Phase d'invasion

Au bout de quelques semaines ou mois, la phase d'invasion se manifeste par des réactions immuno-allergiques. Les principaux symptômes associés sont, entre autre, la fièvre, les troubles digestifs et la rétention urinaire.

5.3.- Phase d'état

La phase d'état correspond à l'installation des vers adultes dans leur site définitif, à la fin de leur migration dans l'organisme, c'est-à-dire après un minimum de 2 mois ; mais les troubles cliniques peuvent se manifester beaucoup plus tard. Les troubles de la phase d'état varient selon les schistosomes en cause, qui migrent dans leur territoire préférentiel (mais non exclusif). Les femelles pondent des oeufs qui provoquent des lésions tissulaires au cours de leur migration. Ils progressent grâce à la sécrétion d'enzymes protéolytiques qui provoquent une nécrose et une inflammation des tissus environnants (Pino-Heiss *et al*,1985).

S. haematobium induit des lésions uro-génitales avec des hématuries quasi constantes. Des lésions rénales, urétrales, génitales ou rectales peuvent compliquer cette forme. Une des particularités des oeufs de *S. haematobium* est leur forte propension à provoquer une calcification. L'évolution peut se faire vers la sclérose vésicale, ou la nécrose et l'ulcération, voir la cancérisation.

S. mansoni occasionne des lésions de la paroi intestinale, du foie, avec fibrose et hypertension portale secondaire et parfois, à un stade avancé, des signes pulmonaires et respiratoires. La gravité de cette forme est liée à l'atteinte hépatique, essentiellement due aux réactions inflammatoires autour de l'oeuf aboutissant ainsi à une destruction progressive du tissu hépatique.

6- Diagnostic

Le diagnostic biologique des schistosomiasés repose à la fois sur des techniques de mise en évidence directe des oeufs, dans les selles ou les urines, et sur les techniques sérologiques pour détecter des anticorps dirigés contre des antigènes des différents stades du parasite. Cependant, si la présence des oeufs de schistosomes affirme le diagnostic, leur absence n'exclut pas l'existence d'une bilharziose évolutive. La ponte des oeufs ne débute en effet qu'après plusieurs semaines et même à la période de phase d'état, les oeufs ne sont retrouvés que dans 60 à 70% des cas, avec des variations individuelles importantes (Charmot et Amat-Roze, 1993). C'est alors que le diagnostic sérologique indirect prend toute sa valeur, soit par des arguments cliniques et biologiques, soit par des examens immunologiques, comme la quantification des anticorps, la détection d'antigènes circulants ou la recherche de complexes immuns. L'imagerie médicale (échographie, cystoscopie) permet aussi la visualisation de fibroses hépatiques ou vésicales, mais l'absence d'infrastructures locales appropriées dans les pays touchés et le coût élevé de ces techniques limitent son usage.

7- Lutte contre les schistosomiasés

7.1.- Traitement

Le traitement spécifique des bilharziosés est largement simplifié par l'apparition des schistosomicides, qui ne sont malheureusement pas toujours disponibles sur le terrain. Cependant, le problème du traitement spécifique reste et restera toujours fondé sur un diagnostic précoce avant l'apparition de lésions séquellaires définitives. En attendant les progrès de la prévention, la chimioprophylaxie de masse par l'utilisation du Praziquantel (PZQ) reste indispensable chaque fois que cela est possible.

Actif sur toutes les espèces de schistosomes, le PZQ tue rapidement les vers adultes par action directe sur la cuticule puis sur la musculature. Il agit aussi, à un moindre degré, sur les schistosomules et sur les oeufs en transit dans les tissus. Le PZQ est donc un excellent

schistosomicide, actif en prise unique et bien toléré. Cependant, il présente plusieurs inconvénients (Zwingenberger *et al*, 1990) :

- il ne prévient pas les réinfections qui peuvent réapparaître en zone d'endémie
- il diminue l'immunité acquise à la réinfection (Moloney *et al*, 1987)
- il peut, dans certains cas, aggraver le tableau clinique du patient par la libération massive d'antigènes parasitaires et l'apparition de complexes immuns

De plus, des observations récentes montrent qu'il est possible d'induire une résistance au PZQ chez des souris infectées par *S. mansoni* (Fallon et Doenhoff, 1994).

7.2- Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie doit commencer par l'éducation sanitaire des populations en zone d'endémie. Prévenir la transmission implique donc des mesures ayant pour but à la fois de réduire ou de stopper le contact avec les eaux polluées et de réduire la contamination de l'eau par les oeufs du parasite. Des mesures spécifiques ont été développées :

- le contrôle des populations de mollusques vecteurs : par l'emploi de molluscicides ou par l'introduction de mollusques compétiteurs de *Biomphalaria glabrata*.
- ainsi que des mesures non spécifiques visant à améliorer globalement le niveau de vie dans les pays en voie de développement, constituant un objectif à long terme.

La prophylaxie contre les schistosomiasés doit alors combiner plusieurs mesures citées ci-dessus et associer entre autre, une lutte biologique à un traitement chimioprophylactique des populations et une prophylaxie médicale.

7.3- Prophylaxie médicale

Devant les difficultés à établir et à maintenir un programme de lutte efficace contre les schistosomiasés, les démarches actuelles sont essentiellement dirigées vers l'élaboration d'un vaccin. La vaccination doit permettre la réduction du niveau de réinfection et/ou la réduction de

la fécondité du parasite, conduisant ainsi à une diminution de la morbidité et à un effet sur la pathologie et le contrôle de la transmission.

Dans ce contexte, de nombreux candidats vaccinaux ont été identifiés et leurs pouvoirs protecteurs ont été testés. Cet aspect sera abordé dans le chapitre I, § 10 et 11.

8- Immunologie des schistosomiasés

8.1- Immunité naturelle

L'immunité naturelle se définit par la susceptibilité à l'infection. Les hôtes expérimentaux ont été divisés en 3 catégories suivant leur comportement face à l'infection (Kagan, 1958) :

- les hôtes résistants, comme le pigeon, dans lesquels les cercaires sont détruites au niveau de l'épiderme,
- les hôtes semi-permissifs, comme le rat, qui rejettent les vers adultes avant la ponte. En effet, le parasite n'y effectue pas son cycle en totalité : les vers n'atteignant pas leur maturité, ils ne pondent pas d'oeufs et sont éliminés entre 3 et 4 semaines après l'infection,
- les hôtes permissifs ou susceptibles, comme la souris, le hamster, le singe Rhésus et le babouin, qui permettent la maturation complète des parasites et la ponte des oeufs.

Le rat, même s'il ne permet pas le développement complet du parasite, est un modèle très intéressant car il développe une forte immunité à la réinfection. De plus, cette immunité protectrice fait essentiellement intervenir des mécanismes dépendants d'anticorps qui existent aussi chez l'homme, d'où son intérêt pour la compréhension et l'explication de ce phénomène.

La souris constitue le modèle de référence pour l'étude des modifications immunopathologiques liées au dépôt des oeufs dans les tissus. D'autre part, l'existence de nombreuses souches parfaitement définies sur le plan génétique permet l'étude, dans ce modèle, du contrôle génétique de la réponse immune dirigée contre le parasite.

L'homme se comporte comme un hôte susceptible (maturation complète des parasites et la ponte des oeufs) chez lequel la durée d'infection peut atteindre des années. Diverses études épidémiologiques réalisées en zone d'endémie de *S. mansoni* et de *S. haematobium* suggèrent l'acquisition d'une résistance à l'infection avec l'âge (Butterworth *et al*, 1985 ; Hagan *et al*, 1985). La réinfection a été démontrée comme dépendante de nombreux facteurs mais aussi et

surtout fonction du nombre d'expositions au parasite. Cependant, le développement d'une immunité protectrice y a été associée.

Deux autres paramètres semblent aussi influencer l'acquisition de cette immunité. Il s'agit :

- du statut génétique de l'individu : certaines familles développent aisément une immunité à la réinfection alors que d'autres non. Un gène à expression co-dominante serait responsable de cette dichotomie (Abel *et al*, 1991).
- de l'intensité de l'infection primaire. Plus celle-ci serait lourde, moins le patient deviendrait immun (Dessein *et al*, 1992).

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

8.2- Immunité acquise

L'hôte définitif infecté développe une réponse immune intense à l'encontre du parasite. L'une des caractéristiques originales de cette réponse réside dans le fait que, contrairement à l'immunité stérilisante observée dans le cas de nombreuses infections virales ou bactériennes, l'immunité dans la schistosomiase ne conduit pas à l'élimination des parasites adultes de primo-infection mais s'exerce essentiellement sur le stade larvaire après réinfection (le schistosomule). Le terme d'immunité concomitante est utilisé pour décrire cette situation où une immunité à la réinfection apparaît en présence d'une infection active (Clegg *et al*, 1971).

Différents mécanismes effecteurs non-spécifiques et spécifiques ont été identifiés *in vitro* chez les divers modèles expérimentaux, mais aussi chez l'homme. On décrit à la fois une réponse spécifique humorale et cellulaire, ainsi que des phénomènes d'activation des cellules inflammatoires (Capron et Capron, 1986 ; Sher *et al*, 1989), qui dépendent de l'espèce de l'hôte infecté et de l'espèce parasitaire.

8.2.1- Réponse humorale

La participation des anticorps dans l'acquisition de l'immunité à la réinfection a été démontrée par de nombreux travaux réalisés chez l'homme et chez les divers modèles expérimentaux.

Les infections par *S. mansoni* chez les populations kenyanes (Dunne *et al*, 1992) et brésiliennes (Rihet *et al*, 1991 ; Demeure *et al*, 1993) montrent une corrélation positive entre la réponse IgE spécifique des antigènes du parasite et l'acquisition d'une résistance à la réinfection, après chimiothérapie. Cette corrélation a été aussi observée lors d'une infection par *S. haematobium*, principalement chez les jeunes enfants (Hagan *et al*, 1991 ; Ndhlovu *et al*, 1996).

Cependant, cette immunité semble être modulée par différents isotypes liés à la susceptibilité à la réinfection. Ainsi des études réalisées au Kenya ont montré la présence d'anticorps IgM capables de bloquer la cytotoxicité dépendante des éosinophiles médiée par les IgG. De plus, une corrélation positive entre l'intensité de réinfection et les taux d'IgM et d'IgG2 spécifiques d'épitopes carbohydrates présents dans les antigènes d'oeufs a été décrite (Khalife *et al*, 1986 ; Butterworth *et al*, 1987 ; Dunne *et al*, 1988). Des anticorps IgG4 partageraient également cette propriété, aussi bien lors de l'infection par *S. haematobium* que par *S. mansoni* (Hagan *et al*, 1991 ; Rihet *et al*, 1992 ; Demeure *et al*, 1993). Plus récemment, une association positive entre le taux d'anticorps IgA spécifiques de l'antigène Sm 28GST de *S. mansoni* et l'acquisition de l'immunité à la réinfection dépendante de l'âge a été observée (Auriault *et al*, 1990 ; Grzych *et al*, 1993).

Le modèle expérimental du rat, hôte semi-permissif pour le schistosome, a permis aussi de mettre en évidence le rôle des composants humoraux de l'immunité anti-schistosome.

Le rat, pour détruire les schistosomules après réinfection, met en place des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC pour Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), qui font intervenir des cellules pro-inflammatoires non lymphoïdes telles que les macrophages (Capron *et al*, 1975), les éosinophiles (Capron *et al*, 1981) et les plaquettes (Joseph *et al*, 1983), et des anticorps anaphylactiques (IgG2a et IgE). La relevance de ces

mécanismes a été confirmée *in vivo* par la protection obtenue après transfert passif des anticorps monoclonaux IgG2a et IgE, spécifiques d'une protéine de 38kDa du parasite (Grzych *et al*, 1982 ; Verwaerde *et al*, 1986). D'autre part, des anticorps de la même spécificité antigénique sont capables d'inhiber cette cytotoxicité (Capron *et al*, 1987). Ces anticorps, IgG2c chez le rat (Grzych *et al*, 1984), IgM, IgG2 et IgG4 lors d'une infection humaine (Khalife *et al*, 1986 ; 1989 ; Demeure *et al*, 1993), sont dits « bloquants » par leur capacité à neutraliser la formation de l'interaction cellules effectrices/anticorps/schistosomule.

Le rôle des anticorps a été aussi démontré au niveau d'expériences d'immunisation par des cercaires irradiées, dans le modèle murin. Le transfert passif des sérums d'immunisation a induit une réduction de 20-50% sur la charge en vers après challenge. Cette résistance, due probablement aux IgG, étant plus prononcée si le transfert s'effectue quelques jours après l'infection d'épreuve, ce qui coïncide avec la présence des schistosomules au niveau du poumon (Mangold et Dean, 1986).

Le schistosomule semble donc être la cible principale de la réponse immune. L'importance de ces mécanismes a été observée *in vitro* par l'action cytotoxique des macrophages vis-à-vis des schistosomules en présence de sérums immuns de patients infectés (Capron *et al*, 1975) et aussi par des plaquettes sanguines capables de lyser les schistosomules (Joseph *et al*, 1983).

Ainsi, les anticorps bloquants constituent une composante importante de l'expression clinique de l'immunité, les degrés variables de susceptibilité et de résistance apparaissant liés à un équilibre entre les anticorps bloquants et les anticorps effecteurs.

8.2.2- Réponse cellulaire

Il y a quelques années, Mosmann *et al* démontraient l'existence, chez la souris, de deux sous-populations lymphocytaires T auxiliaires CD4⁺ (ou Thelper CD4⁺), Th1 et Th2, caractérisées par leur production différenciée de cytokines. Les cellules Th1 produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2 alors que les cellules Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 mais pas d'IL-2 ni d'IFN- γ (Mosmann *et al*, 1986). Ces deux populations produisent également

de l'IL-3, du TNF- α et du GM-CSF. Les fonctions effectrices de ces deux types cellulaires sont étroitement liées au rôle de ces différentes cytokines.

Dans les infections parasitaires expérimentales, la schistosomiase murine a été utilisée pour étudier les mécanismes et les facteurs de polarisation impliqués dans la différenciation des cellules Th1 et Th2 à partir des cellules précurseurs communes (Th0). Dans ce modèle, la pathologie granulomateuse est le résultat d'une réaction immunitaire qui implique les lymphocytes T. En particulier, le traitement par des anticorps dirigés contre le récepteur CD4 réprime la formation de granulomes (Mathew et Boros, 1986). D'autre part, le profil de cytokines produites en réponse à une stimulation *in vitro* des cellules spléniques de souris infectées est d'abord de type Th1 (peu d'IL-4 et beaucoup d'IFN- γ), puis lorsque la ponte des oeufs est commencée, le profil devient de type Th2 (production d'IL-4, d'IL-5 et peu d'IFN- γ) (Grzych *et al*, 1991). L'inhibition de la réponse Th1 a été suggérée comme étant liée à la nature biochimique des oeufs du schistosome, et plus précisément à la présence d'antigènes oligosaccharidiques de type Lewis^X, capables de stimuler la production d'IL-10 par les lymphocytes B de souris infectées et donc d'orienter plutôt la réponse vers un profil de type Th2 (Vilupillai et Harn, 1994). L'IL-10 étant connue comme inhibitrice de la prolifération des cellules Th1 (Sher *et al*, 1991 ; Villanueva *et al*, 1993).

D'autres études suggèrent la participation des cellules Th1 CD8⁺ comme d'importants modulateurs de la réponse Th2 établie, liée à leur capacité à persister dans un environnement Th2 en utilisant l'IL-4 comme cytokine "helper" (Pedras -Vasconcelos *et al*, 1996).

D'autre part, des études *in vitro* ont montré l'implication de l'IL-12. Le traitement par cette cytokine induit une réduction de la réaction granulomateuse (Wynn *et al*, 1995). Chez des souris, lors de l'injection d'oeufs par voie sous-cutanée, une réponse Th2 se développe, mais elle peut être réprimée par une réponse Th1 en traitant les animaux avec de l'IL-12, 2 jours après l'injection (Oswald *et al*, 1994).

Le rôle de l'IFN γ a été aussi abordé, surtout au niveau d'expériences d'immunisation par des cercaires irradiées. Dans ce modèle, l'immunité est associée à la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 générés au niveau de la peau puis recrutés au niveau des poumons (Smythies *et al*, 1992). Cette protection peut être abolie à 90%, après administration

d'un anticorps monoclonal anti-IFN γ . D'autre part, l'IFN γ joue un rôle inducteur au début de la réaction granulomateuse. Durant la maturation des granulomes, il régule la production inflammatoire d'IL-2 et d'IL-4 et contrôle ainsi l'expansion des granulomes et la fibrose tissulaire.

Ces études ont pu être comparées aux diverses observations épidémiologiques de la réponse immune et cellulaire au cours de l'infection chez l'homme. La plupart des analyses de réactivité cellulaire, de sujets infectés, a été réalisée à partir de lymphocytes périphériques du sang circulant mis en contact avec des antigènes de différents stades du parasite. En phase aiguë, cette réponse est essentiellement dirigée contre les antigènes d'oeuf, par contre la réactivité lymphocytaire vis-à-vis d'antigènes de vers adulte et de cercaire augmente avec la chronicité de l'infection (Ottesen *et al*, 1978).

Des études épidémiologiques, dans certaines populations humaines, ont montré que la résistance à la réinfection est significativement associée à une augmentation de IL-5, alors qu'il n'y a pas de corrélation avec la production de IFN γ (Roberts *et al*, 1993).

Plus récemment, le rôle de la réponse cellulaire T dans la résistance à l'infection à *S. mansoni* a également été exploré. L'évidence que les clones CD4⁺ de cellules T spécifiques du parasite dérivés de PMBC (Polynuclear Blood Mononuclear Cells) d'un sujet vivant en région endémique, mais résistant à l'infection, sécrétaient de l'IL-4 et de IFN γ avec une prédominance d'IL-4 (profil sécrétoire Th0/2) (Couissinier-Paris et Dessein, 1995).

Il existe par ailleurs une cytotoxicité due aux macrophages ou aux plaquettes activées par les lymphocytes T spécifiques, par le biais des cytokines IL-6, IFN γ et TNF α et TNF β (James et Sher, 1990 ; Pancré *et al*, 1990 ; Damoneville *et al* 1988).

L'analyse des mécanismes effecteurs *in vivo* et *in vitro* suggère que l'immunité protectrice dans les schistosomiasis humaines fait intervenir à la fois une réponse Th1 et Th2.

9- Mécanismes d'échappement du parasite

Parallèlement aux mécanismes de régulation mis en place par l'hôte pour contrôler et limiter l'infection parasitaire, le parasite développe, lui aussi, des mécanismes particulièrement ingénieux pour échapper à la réponse immune de son hôte.

Ces mécanismes sont les suivants :

---> mécanisme de mimétisme moléculaire ou de "détournement" des composantes de la réponse de l'hôte. En fait, quelques jours après la pénétration cutanée, des modifications du tégument du schistosomule apparaissent avec le remplacement de déterminants antigéniques par d'autres créant ainsi un leurre pour les mécanismes effecteurs spécifiques (Torpier *et al*, 1977). Ainsi, le schistosomule va rapidement acquérir des antigènes de l'hôte. Ce phénomène peut se faire par acquisition passive de molécules comme celles du CMH et des groupes ABO (Torpier *et al*, 1979) et a comme conséquence un échappement et une résistance au système immunitaire (Damian, 1987).

---> le parasite libère un facteur capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et B (Dessaint *et al*, 1977). Ce facteur appelé "Schistosome Derived Inhibitory Factor" (SDIF) peut aussi inhiber la réponse IgE et la dégranulation mastocytaire dont la conséquence est la diminution de l'activation des éosinophiles (Mazingue *et al*, 1980). De plus, les schistosomes produisent à tous les stades de leur développement, des quantités significatives de dérivés du précurseur ProOpioMelanoCortine (POMC), conduisant à une immunosuppression des immunocytes de l'hôte intermédiaire ainsi que des monocytes de l'hôte définitif (Duvaux-Miret *et al*, 1991).

---> certaines enzymes parasitaires (sérine-protéases et métalloprotéases) peuvent hydrolyser les IgG fixées à la surface du schistosomule, donnant naissance à des peptides possédant des fonctions immunomodulatrices *in vitro* sur les macrophages (Auriault *et al*, 1981). La cytotoxicité macrophage dépendante est également diminuée en présence de ces peptides, dont la composante essentielle est un tri-peptide (TKP) (Auriault *et al*, 1983). D'autre part, les

protéases de *S. mansoni* ont également été impliquées dans une augmentation de la réponse IgE non spécifique chez le rat (Verwaerde *et al* ,1986).

---> le parasite peut induire la production d'anticorps bloquants. Chez le rat, ces anticorps sont d'isotype IgG2c et bloquent, par compétition, les fonctions effectrices des éosinophiles dépendantes des IgG2a. En effet, ces anticorps bloquants se fixent sur les récepteurs Fc des IgG2a chez les éosinophiles ou se fixent aux antigènes normalement reconnus par les IgG2a (Grzych *et al*, 1982 ; 1984).

Le parasite est aussi capable de tirer bénéfice de la réponse immune qu'il induit. Ainsi, le TNF- α serait capable de stimuler directement la production d'oeufs par les vers femelles. (Amiri *et al*, 1992). D'autre part, après infection par la voie cutanée, la production locale d'IL-7 présenterait un effet positif sur la survie des larves infectantes et aurait une action directe sur la migration du parasite dans l'hôte infecté (Auriault *et al*, 1996).

10- Les candidats vaccinaux

Le principe de la vaccinologie est de protéger, sans déclencher de pathologie, les individus contre la maladie et d'en contrôler aussi la transmission. La complexité des mécanismes de l'immunité chez l'homme comme chez l'animal et les nombreux mécanismes d'échappement mis en place par le parasite reflètent les difficultés rencontrées pour la mise en place d'un vaccin contre la schistosomiase (Pierce *et al*, 1994a).

Deux caractéristiques de l'infection par les schistosomes sont essentielles à la conception d'un tel vaccin :

- les schistosomes ne se multiplient pas dans les tissus de leur hôte définitif, et donc une immunité partielle non stérilisante, acquise de façon naturelle ou suite à une vaccination, peut avoir un impact considérable sur la charge en vers et donc sur l'incidence de la pathologie et la transmission de la maladie ;
- puisque les oeufs sont les principaux responsables de la pathologie, une immunisation qui réduirait la fécondité des vers ou qui diminuerait la réaction granulomateuse autour des oeufs, accompagnée ou non par une réduction du nombre de vers adultes, entraînerait une diminution de la morbidité des populations touchées, limiterait les formes aiguës de la maladie et contrôlerait sa transmission.

Les antigènes à potentiel vaccinal

L'introduction des techniques des anticorps monoclonaux et de la biologie moléculaire a contribué à la caractérisation de différents antigènes du schistosome à potentialité vaccinale. Ces antigènes ont été caractérisés, clonés et produits dans la bactérie ou la levure, et quelques un d'entre eux présentent un effet protecteur chez l'animal contre l'infection par des schistosomes.

L'OMS a retenu 6 antigènes comme candidats vaccinaux contre l'infection par *S. mansoni* (Bergquist, 1995), décrits ici de façon schématique :

La Paramyosine (Sm97)

La paramyosine est une protéine myofibrillaire qui se trouve exclusivement chez les invertébrés, y compris le schistosome (Butterworth, 1992). Il s'agit d'une protéine de 97 kDa isolée à partir des antigènes de vers adultes. L'injection intradermique de la paramyosine native ou recombinante en présence de BCG confère une protection, chez la souris, de l'ordre de 26 à 33% (Pearce *et al*, 1988).

L'antigène IrV5 (irradiation-associated vaccine antigen)

L'antigène IrV5 est une protéine recombinante de 62kDa. Il a été exprimé à partir d'une banque d'ADN complémentaire de *S. mansoni* et sélectionné par des sérums de souris vaccinées à l'aide de cercaires irradiées (Amory Soisson *et al*, 1992). Un taux élevé de protection (60 à 80%) est obtenu chez la souris après trois injections intrapéritonéales ou sous-cutanées de la protéine recombinante, mais des taux de protection plus variables sont obtenus chez le babouin.

L'antigène Sm23

L'antigène Sm23 a été initialement rapporté comme étant la cible d'un anticorps monoclonal se fixant à la surface des schistosomules de poumon. Cet anticorps confère, par transfert passif, une protection contre l'infection chez la souris (Harn *et al*, 1985). D'autre part, des expériences d'immunisation par la Sm23 native purifiée ont montré des taux de protection de 40 à 50% au niveau de la charge parasitaire chez la souris, ainsi que le peptide synthétique contenant les épitopes B et T (45 à 80% de réduction) (Harn *et al*, 1987 ; Reynolds *et al*, 1992).

L'antigène Sm14 ou FABP-14 (Fatty Acid Binding Protein)

L'antigène Sm14 possède des homologies significatives avec une famille de protéines fixant les acides gras. Cette famille de protéines intervient dans la liaison, le transport et le métabolisme des lipides (Glatz et Van der Vusse, 1990 ; Peeters et Verkamp, 1989 ; Kaikaus *et al*, 1990).

Les schistosomes sont incapables de synthétiser les acides gras *de novo* et les stérols (Meyer *et al*, 1970). Il semble que les acides gras des schistosomes proviennent de leur hôte et sont acquis, transportés et compartimentalisés par les FABPs (Glatz et Van der Vusse, 1990 ; Ockner, 1990). La Sm14 recombinante montre une affinité pour les acides gras et elle est localisée au niveau des tubercules qui contiennent des lipides. Ces observations suggèrent que la Sm14 pourrait jouer un rôle dans le transport des acides gras (Moser *et al*, 1991). L'immunisation par la Sm14 confère une protection de 65% chez la souris et de 95% chez le lapin contre l'infection d'épreuve par *S. mansoni* et de 100% contre l'infection par *Fasciola hepatica* (Tendler *et al*, 1996).

La Triose Phosphate isomérase (TPI)

Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme du glucose. La TPI est une protéine de 28kDa présente à tous les stades du parasite (Harn *et al*, 1985 ; 1992). L'anticorps monoclonal spécifique de cette protéine confère une protection partielle (41-49%) par transfert passif chez la souris. La protéine recombinante complète a été produite dans *E. coli* et exprime une activité enzymatique.

La Sm 28GST

C'est une protéine de 28kDa, à activité glutathion S-transférase (GST : EC 2.5.1.18), exprimé à divers stades du parasite. La protéine a été caractérisée et clonée, la production de la Sm 28GST recombinante a été réalisée par voie génétique dans une bactérie (*E. coli*), une levure

(*Saccharomyces cerevisiae*) et le virus de la vaccine (Balloul *et al*, 1987b). Ces propriétés protectrices ont été largement étudiées dans différents modèles animaux, l'ensemble de ces caractéristiques et propriétés seront développées dans le chapitre I, § 11.6.

11- Les glutathion S-transférases (GSTs)

11.1- Les GSTs de Vertébrés

Largement distribuées dans le règne végétal et animal, les GSTs (EC 2.5.1.18) sont des enzymes ubiquitaires et multifonctionnelles, impliquées dans des mécanismes de détoxification et de transport de molécules lipophiles (Mannervik, 1985a). Elles catalysent l'attaque nucléophile du glutathion (GSH : γ -Glu-Cys-Gly) sur une large gamme de composés hydrophobes renfermant un centre électrophile. Ceux-ci peuvent être des substrats exogènes ou endogènes résultant du métabolisme oxydatif et possèdent généralement une fonction de type : époxyde, hydroperoxyde, thiocyanate, ester, alkène, alkènal, lactone (Danielson et Mannervik, 1985). La conjugaison du GSH diminue la réactivité et augmente l'hydrophilie de ces molécules toxiques, favorisant ainsi leur solubilisation et leur excrétion sous forme inactivée (Boylard et Chasseaud, 1969).

En plus du rôle essentiel de ces enzymes dans la protection des tissus face aux dommages oxydatifs, les GSTs participent également à la synthèse de molécules physiologiquement actives, comme les prostaglandines et leucotriène C₄, et jouent un rôle dans le transport et le stockage intracellulaire de molécules lipophiles (Ketterer *et al*, 1988b).

Chez les vertébrés, les GSTs appartiennent à deux catégories distinctes et génétiquement non apparentées : les GSTs microsomales et les GSTs cytosoliques.

11.1.1- Les GSTs microsomales

Les GSTs microsomales sont actives sous forme trimérique (sous-unités de 18 kDa). Elles sont très importantes dans le foie où elles représentent environ 1% des protéines totales, dans les testicules et dans les muqueuses intestinales (Morgenstern et DePierce, 1988). Au niveau cellulaire, elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique et dans les membranes externes des mitochondries. Ces enzymes microsomales présentent une activité catalytique très

importante vis-à-vis des hydrocarbures polyhalogénés (l'hexachlorobutadiène et le tétrafluoroéthylène) (Dohn *et al*, 1985), qui leur confèrent un rôle central dans le métabolisme de ces xénobiotiques. Les GSTs microsomales sont impliquées dans les premières étapes de biotransformation de ces composés. D'autre part, certaines GSTs microsomales possèdent aussi une activité peroxydasique (Reddy *et al*, 1988). La localisation de ces enzymes au niveau du réticulum endoplasmique et dans les membranes externes des mitochondries constitue un argument indirect vis-à-vis de leur fonction. En effet, la distribution cellulaire de ces enzymes coïncide avec les sites d'accumulation des xénobiotiques et des produits de peroxydations membranaires associées aux transports d'électrons.

11.1.2- Les GSTs cytosoliques

Les GSTs cytosoliques sont des enzymes composées de sous-unités allant de 24 à 28 kDa, capables de s'associer entre elles par des interactions non covalentes pour former des homo ou hétérodimères actifs. La classification est basée sur la masse moléculaire, le point isoélectrique, les propriétés enzymatiques, la spécificité vis-à-vis du substrat, l'antigénicité et l'alignement des séquences primaires en acides aminés.

Les GSTs représentent des familles multigéniques dont la taille des gènes est variable (3 à 10 Kb et présentent de 3 à 7 introns). La conversion génique pourrait jouer un rôle dans l'évolution des GSTs (Pickett et Lu, 1988). Aucune modification post-traductionnelle de type glycosylation n'a été décrite pour les GSTs. Cependant, des phosphorylations sélectives pourraient participer à la régulation de l'activité GST dans le cytosol (Pyerin *et al*, 1987).

Les GSTs cytosoliques possèdent une double fonction : elles sont capables de catalyser l'attaque nucléophile du glutathion sur une grande variété de composés hydrophobes pourvus d'un centre nucléophile. Ces enzymes sont aussi associées au transport et au stockage intracellulaire de molécules lipophiles (Ketterer 1988a) et peuvent se fixer aux stéroïdes, aux carcinogènes et à certains anions organiques. Ces activités de fixation sont plus souvent associées au transport et à l'excrétion des produits toxiques.

Les GSTs peuvent assurer la détoxification des produits endogènes, cytotoxiques ou génotoxiques, issus de la peroxydation des lipides (Danielson *et al*, 1987). Les hydroperoxydes dérivés des acides nucléiques et des lipides, sont des substrats de certaines GSTs cytosoliques. La localisation nucléaire de certaines isoformes de GSTs, témoigne en faveur de l'existence de cette activité. Ces enzymes sont aussi capables de participer dans la synthèse des substances physiologiquement actives, par suite de leur conjugaison avec le GSH.

Chez les mammifères, la plupart des tissus héberge des GSTs à une concentration de 0.05 à 0.2 mM. Cependant, l'expression étant tissu-spécifique, la répartition des différentes familles est hétérogène suivant les organes (Tu *et al*, 1983).

De façon expérimentale, l'expression des GSTs peut être induite par certains xénobiotiques ou hormones. Différentes études avec les GSTs humaines, de rat et de souris ont démontré l'implication des hormones dans la régulation des GSTs. Des expériences récentes ont montré que les hormones sexuelles pouvaient réguler l'expression des isoenzymes GST murines (Awasthi *et al*, 1993) et que les GST s'expriment de façon sexe-dépendante, au niveau du foie du rat adulte, où elles sont régulées par différentes hormones dépendantes de la glande pituitaire par des mécanismes prétranslationnels (Srivastava et Waxman, 1993).

11.2- Les GSTs chez les Helminthes

Les GSTs suscitent un intérêt croissant dans les domaines de la chimiothérapie et de la vaccinologie chez les helminthes (Capron *et al*, 1990; Mitchell, 1989; Sexton *et al*, 1990; Cherfas, 1991).

Comme chez les mammifères, les helminthes expriment de nombreuses formes de GST, essentiellement retrouvées dans le cytosol, les GSTs d'helminthes présentent des ressemblances biochimiques et séquentielles avec les GSTs de mammifères. Ces enzymes semblent être particulièrement importantes chez les helminthes par le fait que ces organismes possèdent un nombre réduit d'enzymes de réparation et semblent être dépourvus de cytochrome P-450 (Precious et Barret, 1989). Ce dernier, chez les mammifères, joue un rôle essentiel dans les processus d'oxydation-réduction constitutifs de la phase primaire de détoxification (Coon et

Vaz, 1988). Comme chez les mammifères, les activités GSTs peuvent être induites par certains xénobiotiques (Morello *et al*, 1982 ; Brophy et Barret,1990a).

Les GSTs semblent représenter le système majeur de détoxification chez les helminthes (Brophy, 1988). L'activité GST est plus importante chez les plathelminthes à tégument d'origine cytoplasmique (Cestodes et Trématodes) que chez les némathelminthes à tégument cuticulaire (Brophy et Barret, 1990b).

Tableau - Les Glutathion S-transferase caractérisées chez les helminthes.

CLASSE	GENRE	REFERENCES
Némathelminthes	Ascaris Haemonchus Dirofilaria Brugia Rhabditis Onchocerca Panagrellus	Doutch et Buchanan, 1978 Kawalek <i>et al</i> , 1984 Jaffe et Lambert, 1986 Jaffe et Lambert, 1986 Below <i>et al</i> , 1987 Pemberton et Barret, 1989 Papadopoulos <i>et al</i> , 1989
Plathelminthes Cestodes	Caenorhabditis Echinococcus Hymenolepsis	Weston <i>et al</i> , 1989 Morello <i>et al</i> , 1982 Brophy et Barret, 1990
Plathelminthes Trématodes	Fasciola Schistosoma	Howell <i>et al</i> ,1988 Smith <i>et al</i> , 1986 Taylor <i>et al</i> , 1988 O'Leary et Tracy, 1988

11.2.1- Les fonctions biologiques des GSTs

11.2.1.1- Détoxification des xénobiotiques

Une association a pu être établie entre l'activité enzymatique des GSTs et la résistance aux drogues de cellules tumorales de mammifères, d'insectes et de plantes. Ceci suggérerait que les GSTs d'helminthes peuvent également constituer les agents majeurs de résistance aux médicaments.

Les GSTs de Trématodes et de Cestodes sont capables de fixer plusieurs drogues anti-helminthiques dont elles assurent l'excrétion (Brophy et Barret, 1990 a b c). Chez *S. mansoni*, les GSTs catalysent une réaction de O-déméthylation sur le métabolite d'une drogue anti-helminthique : le Métrifonate (O'Leary et Tracy, 1991).

Des phénomènes d'induction différentielle des isoenzymes GSTs *in vitro* chez *S. mansoni* ont été observés après traitement de souris infectées par des xénobiotiques (3-méthylcholanthrène, hydroxyanisole butylé et phénobarbital) (Van de Waa *et al*, 1993). Ces auteurs suggèrent aussi que l'altération de l'expression des GST peut influencer la survie du parasite dans l'environnement de l'hôte.

D'autre part, les GSTs peuvent être les cibles des médicaments ou même faciliter le transport intracellulaire de certains agents chimiothérapeutiques (Brophy 1990a). Dans ce cas, la liaison drogue-GSH peut entraîner la formation d'un conjugué inhibant l'activité enzymatique des GSTs et ainsi conduire à des conséquences métaboliques néfastes pour le parasite. Par contre, la GST de 26 kDa de *S. japonicum* porte un site de fixation pour le Praziquantel, ce qui suggère un rôle possible des GSTs dans la résistance des parasites à ce médicament (Mc Tighe *et al*, 1995).

11.2.1.2- Détoxification des produits des peroxydations lipidiques

Chez les helminthes, les GSTs paraissent occuper une fonction particulièrement importante de protection contre les composés réactifs générés par les radicaux libres et en

particulier contre les peroxydes de lipides. Le processus de la peroxydation des lipides s'initie par des réactions en chaîne des radicaux libres et entraîne des dommages au niveau des lipides membranaires par libération d'hydroperoxydes lipidiques qui vont se décomposer en produits secondaires comme, par exemple, les dérivés carbonylés (Ketterer *et al*, 1988b).

Une source potentielle de radicaux libres chez les helminthes provient des mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte (Callahan *et al*, 1988). La libération de radicaux libres oxydants représente un puissant mécanisme effecteur contre les agents pathogènes intra- et extracellulaires. Le processus secondaire de défense contre la peroxydation des lipides implique la détoxification des hydroperoxydes lipidiques et des dérivés carbonylés (Brophy et Barret, 1990a).

11.2.1.3- Détoxification passive et transport

La capacité des GSTs de fixer des ligands hydrophobes (hématine, acides gras insaturés, pigments biliaries....) a été mise en évidence chez les helminthes. Il est possible que cette propriété favorise des mécanismes de détoxification passive comme le font les GSTs hépatiques chez les mammifères. On a qualifié cette fonction « d'éponges biochimiques ». L'interaction de la Sm 28GST et de la Sj 26GST avec l'hématine, décrite récemment, est un argument en faveur de leur implication dans la détoxification de ce composé. Ces deux molécules sont capables de s'y fixer passivement afin d'éviter sa cristallisation qui risque de bloquer la circulation sanguine (Smith *et al*, 1986). Cependant, certains auteurs pensent que les GSTs d'helminthes ont d'avantage une fonction de transport et de fixation de composés toxiques et non-toxiques plutôt qu'une fonction enzymatique intégrée dans la chaîne des oxydo-réductions (Brophy et Barret, 1990a).

11.2.1.4- Protection de l'ADN

Les hydroperoxydes dérivés des bases nucléiques représentent également des substrats pour les GSTs à fonction GSH-péroxydase et expliquent la mise en évidence d'une localisation

nucléaire pour certaines d'entre elles. En effet, certains travaux suggèrent que les GSTs pourraient intervenir dans la cascade des réactions enzymatiques impliquées dans la réparation de l'ADN (Ketterer *et al*, 1987; Ketterer et Meyer, 1989).

11.2.1.5- Les mécanismes d'action

D'un point de vue chimique, les GSTs catalysent trois types de réactions :

a -) réduction de fonction hydroperoxyde



b -) conjugaison du GSH



c -) isomérisation par déplacement d'une double liaison



Le transfert du groupe GSH augmente l'hydrophilie du xénobiotique et favorise ainsi son excrétion.

11.3- Les GSTs de schistosomes

Cinq isoformes de GSTs sont retrouvés chez *S. mansoni*, essentiellement présentes dans le cytosol.

La famille SmGST-1/2/3, aussi appelée Sm 28GST, est représentée par des enzymes dimériques formées de monomères de 28 kDa de poids moléculaire. SmGST -1/2/3 représente jusqu'à 4% des protéines totales de vers adultes et peut être trouvée sous trois formes : SmGST-

1, SmGST-2 et SmGST-3. SmGST-1 et SmGST-3 sont homodimériques tandis que SmGST-2 est hétérodimérique (1/3) (O'Leary et Tracy, 1988). Les séquences en acides aminés des sous-unités 1 et 3 diffèrent seulement par des acides aminés en position 61 et 136 (Pierce *et al*, 1994b).

Les autres deux isoformes constituent la famille Sm 26GST. SmGST-4 est une enzyme trimérique formée par des monomères de 26 kDa et représente la deuxième forme des GSTs la plus importante.

Ces deux types de GST (26 et 28kDa) existent aussi chez *S. haematobium* (Sh 28GST), *S. japonicum* (Sj 28GST) et *S. bovis* (Sb 28GST). La proportion de ces deux formes dépend de l'espèce de schistosome. Chez le ver adulte de *S. mansoni*, la forme 28kDa est 20 fois plus abondante que la forme 26kDa. Chez *S. japonicum*, ces formes seraient représentées en proportions équivalentes (Trottein *et al*, 1992b; Smith *et al*, 1986).

L'analyse des séquences d'acides aminés a permis la comparaison entre les différentes formes de GSTs chez ces espèces de schistosomes. Elle montre 75% de résidus conservés pour les GSTs de 28kDa au sein des 4 espèces. L'homologie entre Sb 28GST et Sm 28GST est de 90%, et celle entre Sh 28GST et Sb 28GST de 98%, ce qui indique une bonne conservation de ces 3 protéines dans les espèces considérées (Trottein *et al*, 1992b). Au contraire, l'homologie de la Sj 28GST par rapport à ces 3 GSTs est nettement inférieure (77%). En ce qui concerne les GSTs de 26kDa, 79% d'homologie existent entre *S. mansoni* et *S. japonicum* (Henkle *et al*, 1990b).

Des études biochimiques réalisées sur la Sm 28GST native, en présence d'autres marqueurs de GSTs, ne permettent pas de classer cette enzyme de façon certaine parmi les sous-classes des GSTs de mammifères (O'Leary et Tracy, 1991). La Sm 28GST recombinante possède une activité enzymatique caractéristique des GSTs de classe π et des homologies de structures dispersées avec les classes α et μ .

Le rôle de ces GSTs est encore très peu élucidé, mais comparativement à celui des GST de mammifère, ces enzymes pourraient constituer à côté des superoxyde-dismutases (Simurda *et al*, 1988) et des glutathion-péroxydases (Williams *et al*, 1992), un des moyens de défense du parasite contre l'attaque oxydative liée à la réponse immune de l'hôte : libération de radicaux

libres (O_2^- et H_2O_2) par les plaquettes, les macrophages et les éosinophiles activés, qui engendre via la formation de radicaux OH^\cdot la peroxydation lipidique de la membrane du ver et la formation de dérivés secondaires toxiques. Chez *S. mansoni*, la 28GST semble intervenir en neutralisant les hydroperoxydes lipidiques (Taylor *et al*, 1988 ; Boulanger *et al*, 1991b) tandis que la GST de 26kDa interviendrait plus tardivement en neutralisant les dérivés secondaires aldéhydiques toxiques (Trottein *et al*, 1992a).

11.4- Les sites d'expression

L'ontogénie des GSTs de foie de rat pendant le développement foetal et postnatal indique que l'expression des GST augmente au cours du développement, et d'une façon différentielle, en fonction des sexes (Tee *et al*, 1992).

L'augmentation de l'activité enzymatique, en fonction des stades de développement, a été observée chez les schistosomes (Nare *et al*, 1990). La quantité de GST est trois fois plus importante chez les mâles que chez les femelles (O'Leary et Tracy, 1991). Ces différences d'activité peuvent être liées à la localisation des parasites chez l'hôte et à l'environnement biologique de ces organismes. La diversité des produits toxiques et la nature des mécanismes effecteurs de l'immunité de l'hôte, peuvent changer cette activité catalytique (Brophy *et al*, 1994).

Chez les schistosomes, tous les stades expriment une activité GST (Brophy et Barret, 1990a). La Sm 28GST n'est pas une protéine intégrale de membrane mais c'est un antigène transitoirement présent à la surface du parasite quel que soit son stade de développement (schistosomule, vers adulte ou miracidium).

Les premières observations d'immunocytochimie ont montré une forte localisation tégumentaire et sub-tégumentaire de Sm 28GST chez le ver adulte, et aussi dans le système d'excrétion protonéphridien. Il est suggéré que la Sm 28GST est présente à la surface du parasite lors de la formation de la structure multilamellaire du tégument qui est constamment régénéré (Taylor *et al*, 1988 ; Holy *et al*, 1989).

D'autres expériences d'immunocytochimie et localisation ultrastructurale réalisées dans le laboratoire ont montré que cette enzyme est présente à la surface des cellules protonéphridiales et largement distribuée dans le parenchyme et les tubercules dorsaux (Porchet *et al*, 1994). En général, l'expression de Sm 28GST est plus forte chez les mâles que chez les femelles. Les fibres musculaires du parenchyme et l'épithélium digestif n'expriment pas cette enzyme. En ce qui concerne le système génital, l'intensité de l'immunomarquage est variable selon le parasite observé. Chez les vers mâles, les testicules peuvent présenter des cellules marquées distribuées au hasard, et avec une localisation préférentiellement nucléaire. Au niveau de l'ovaire, le nombre de cellules qui expriment la Sm 28GST diminue de la région antérieure (contenant des oocytes immatures) vers la région intermédiaire pour disparaître complètement dans la région postérieure (contenant des oocytes matures). La Sm 28GST est exprimée aussi dans l'oocyte et l'oocyte contenu dans l'oeuf, alors qu'elle semblerait être absente des glandes vitellines et de l'utérus (Liu *et al*, 1996). Dans les stades miracidium, sporocyste, cercaire et jeune schistosomule sa localisation tissulaire est difficile à déterminer. Cependant une augmentation de l'expression de cette enzyme et une accumulation au niveau des tissus sont observées pendant le développement du schistosomule en ver adulte.

11.5- La régulation de l'expression du gène codant pour la Sm 28GST

Le gène codant pour Sm 28GST a été cloné et entièrement séquencé (McNair *et al*, 1993). Une analyse détaillée de la séquence 5' du gène Sm 28GST a montré l'existence de nombreux motifs reconnus pour leur capacité à fixer divers facteurs de transcription communs à diverses espèces. Des expériences préliminaires suggèraient également une conservation fonctionnelle des mécanismes de régulation chez le schistosome, comme par exemple, la capacité du promoteur du gène codant pour l'HSP70 de *S. mansoni* à être activé par la chaleur dans les cellules d'origine mammifère (Levy-Holtzman et Schechter, 1995).

Dans les 1333bp situées en 5' du gène de Sm28GST, on trouve deux sites AP-1 et trois boîtes CCAAT. Dans la région promotrice on trouve des motifs moins conservés pouvant correspondre au site HSE (Heat-Shock Element), à la séquence NF-AT et la séquence DR2

(pouvant lier des récepteurs nucléaires de type RXR). La fonction des séquences AP-1 et CCAAT a été étudiée dans des expériences de retard sur gel, qui ont montré que chacune de ces séquences pouvait lier des protéines contenues dans les extraits nucléaires du parasite. Des expériences de super-shift ont confirmé la spécificité de l'interaction, indiquant par la même l'existence des facteurs de transcription se liant AP-1 et NF-Y chez le parasite et leur conservation structurale et fonctionnelle à travers l'évolution.

Les expériences de Van de Waa *et al* (1993) ont montré que l'injection de xénobiotiques chez la souris infectée par *S. mansoni* induisait l'expression de la protéine Sm 28GST. La possible implication de la région promotrice de Sm 28GST dans la réponse à différents xénobiotiques a été étudiée, les résultats obtenus n'ont indiqué aucun effet de stimulation du promoteur du gène Sm 28GST par aucun des xénobiotiques étudiés dans plusieurs lignées cellulaires (Serra *et al*, 1996, 1997). Ces auteurs suggèrent aussi la participation du site AP-1 dans les mécanismes de régulation dépendant de la voie des PKCs, de l'expression de Sm 28GST, au niveau de certains tissus comme le tégument. D'autre part, l'hypothèse que la Sm 28GST puisse être régulée au cours du développement, lors du contact du parasite avec son hôte et lors de la maturation des parasites, par une transactivation dépendante de Fos/Jun en coordination avec d'autres facteurs nucléaires, plutôt que par des mécanismes dépendants majoritairement des xénobiotiques a été soulignée.

11.6- Le pouvoir protecteur des GSTs

11.6.1 - L'effet protecteur de la Sm 28GST

L'immunisation avec la molécule native (purifiée à partir de l'extrait antigénique total du parasite) et suivant un protocole de double injection a conduit à une protection significative : jusqu'à 70% chez le rat et 45% chez la souris (Balloul *et al*, 1987a). Ces potentialités protectrices ayant été déjà démontrées par des expériences *in vitro*, en présence d'éosinophiles de rat sain, les Acs anti-Sm28GST sont capables d'induire une cytotoxicité vis-à-vis des schistosomules (Balloul *et al*, 1985).

La Sm 28GST recombinante induit une immunité protectrice chez le rat et le hamster (Balloul *et al*, 1987b; Grezel *et al*, 1993), le babouin (Balloul *et al*, 1987c; Boulanger *et al*, 1991a) et la souris (Boulanger *et al*, 1991a; Xu *et al*, 1993; Pancré *et al*, 1994b; Wolowczuck *et al*, 1989). Les taux de protection conférés contre l'infection varient de 50 à 70% chez le rat, de 30 à 45% chez la souris et 40% chez le babouin. Cependant, d'importantes variations individuelles sont notées dans ce dernier modèle, en effet, les taux individuels de protection varient de 0% à 80%, probablement liés à l'utilisation d'animaux qui ne sont pas syngéniques. Toutefois, même chez les animaux peu protégés, un effet sur la diminution de la taille des granulomes périovulaires hépatiques et sur l'excrétion fécale d'oeufs est observé (Boulanger *et al*, 1991a). De même, les singes *Patas patas* immunisés par la Sm 28GST puis infestés par des cercaires de *S. haematobium* développent une diminution marquée des lésions vésicales (Boulanger *et al*, 1995).

Cet effet protecteur de la Sm 28GST au niveau d'une réduction de la charge parasitaire, dans certains modèles expérimentaux et suivant le protocole d'immunisation utilisé, est accompagné d'une réduction de la fécondité des vers femelles qui se traduit par une diminution des oeufs excrétés et/ou une diminution de la charge tissulaire en oeufs (Boulanger *et al*, 1991b; Wolowczuck *et al*, 1989). En effet, l'immunisation par la Sm 28GST contre une infection hétérologue par *S. haematobium*, chez le singe *Patas*, induit une réduction significative des oeufs excrétés dans les urines et les selles de 55% et 77% respectivement. De plus, la viabilité des oeufs urinaires est significativement réduite par la vaccination (Boulanger *et al*, 1995). En résumé, la protection conférée par la Sm 28GST, lors d'une immunisation, se manifeste par une réduction de la charge parasitaire et/ou l'inhibition de la fécondité du parasite.

Ces observations accentuent l'intérêt vaccinal de la Sm 28GST dans le contrôle de la pathologie induite par les oeufs et la transmission de la schistosomiase, même lorsqu'il s'agit d'une infestation hétérologue.

11.6.1.1- Sm 28GST et anticorps

En fonction du modèle expérimental et du protocole d'immunisation appliqué, l'effet protecteur de la Sm 28GST se manifeste, particulièrement, au niveau d'une réduction de la charge parasitaire et/ ou une réduction de la fertilité des vers femelles et de la viabilité des oeufs. Cependant les mécanismes d'expression et de régulation de l'immunité restent encore incompris. Leur analyse est pourtant essentielle pour la compréhension de la biologie du parasite et la réponse immunitaire de l'hôte.

L'importance de cette molécule ayant une activité enzymatique GST et ainsi que l'immunité induite par immunisation, a pu être dévoilé par des expériences de transfert passif, à partir de Acs monoclonaux dirigés contre la Sm 28GST. Deux Acs ont été caractérisés, en particulier : l'Ac S13 d'isotype IgM qui est capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm 28GST, et l'Ac H12 également d'isotype IgM, mais qui ne bloque pas l'activité enzymatique de la Sm 28GST. Par transfert passif, S13 et H12 entraînent une réduction du nombre de vers chez le rat Fischer préalablement infecté par *S. mansoni* de 45% et 34%, respectivement (Xu *et al*, 1991).

Le transfert passif de ces Acs chez la souris BALB/c préalablement infectée par *S. mansoni* a montré que l'Ac monoclonal S13 induit une diminution sur le nombre de vers quand il est injecté en i.v. le jour de l'infection, au 15^{ème} et 30^{ème} jour post-infection. Une forte réduction du nombre d'oeufs dans les tissus est mise en évidence, par voies i.p. et i.v. sur ces 3 périodes, ainsi qu'une réduction de la viabilité des oeufs *in vivo* et *in vitro*. L'Ac H12, induit qu'une réduction de la charge parasitaire par voie i.v. (pas par voie i.p.) au 30^{ème} jour post-infection. Aucun effet n'a pu être observé concernant la réduction d'oeufs tissulaires et leur viabilité (Xu *et al*, 1991). Ces résultats laissent supposer un lien entre l'inhibition de l'activité GST et l'immunité anti-fécondité.

D'autre part, le cartographie épitopique de la Sm 28GST a été déterminée. Une analyse informatisée de la séquence protéique, suivant des critères d'hydrophobicité, d'accessibilité et de mobilité, a permis de prédire trois régions épitopiques particulières : 23-43, 115-131 et 190-211. Les propriétés protectrices des peptides correspondant à ces régions épitopiques de la

Sm28GST, ont été étudiées chez la souris. La vaccination par le peptide 115-131 (contenant l'épitope B et T de Sm 28GST) a donné une réduction de 40-45% au niveau de la charge parasitaire (Wolowczuck *et al*, 1991a). L'immunisation par les peptides N-terminal (10-43) et C-terminal (190-211) de la molécule (séquences impliquées au site actif de la molécule), conduit à une réduction de la ponte et de la viabilité des oeufs, mais sans effet sur la charge parasitaire (Xu *et al*, 1993).

Le transfert passif de lymphocytes T CD4+ et CD8+ de souris immunisées par Sm 28GST, à des souris saines ultérieurement infectées n'induit pas de réduction de la charge parasitaire; il induit toutefois une forte diminution du nombre des oeufs hépatiques (Wolowczuk *et al*, 1991b).

11.6.1.2- Sm 28GST et réponse cellulaire T

La réponse cellulaire T contre la Sm 28GST joue un rôle important par son implication dans la réduction du nombre d'oeufs dans le foie et dans la diminution de la pathologie hépatique, mesurée par le taux de collagène contenu dans le foie des souris infectées (Pancré *et al*, 1994a). L'étude des mécanismes de protection montre que les cellules T spécifiques de Sm 28GST (C-terminal) essentielles pour la protection, produisent peu d'IL-4 mais un niveau élevé d'IFN- γ , ce qui indique que l'IFN- γ serait un inhibiteur de la synthèse du collagène, qui est un des composants importants du granulome (Pancré *et al*, 1994a).

Récemment, il a été mis en évidence que l'immunisation par la Sm 28GST induit une réponse T-cytotoxique, par des lymphocytes CD8+ - classe CMH 1. Les mêmes auteurs observent aussi que l'immunisation par le lipopeptide (C-terminal 190-211) de la molécule induit une activation CTL identique à celle de la molécule complète, suggérant de cette façon l'applicabilité d'un peptide synthétique comme immunogène d'une réponse CTL contre les épitopes de la Sm 28GST.

11.6.1.3- Sm 28GST dans l'infection humaine

Des études épidémiologiques indiquent que l'antigène Sm 28GST est reconnu par les sérums d'individus infectés par *S. mansoni*. Ainsi, sur 129 enfants bilharziens kenyans âgés de 9 à 16 ans, 64% présentent des IgA anti-Sm 28GST, 97% ont des IgE spécifiques de l'antigène Sm 28GST et 47% des IgG anti-Sm 28GST (Auriault *et al*, 1990). Après traitement chimiothérapeutique, les enfants classés comme susceptibles à la réinfection, présentent beaucoup plus d'IgG4 et beaucoup moins d'IgG1 spécifiques de l'antigène Sm 28GST que ceux définis comme résistants à la réinfection. Par contre, aucune différence n'a été observée dans les taux d'IgG3, d'IgE ou d'IgA.

Lors d'une autre étude, portant sur des individus âgés de 6 à 66 ans, les taux d'IgA anti-Sm 28GST augmentent avec l'âge et parallèlement à l'acquisition de l'immunité à la réinfection (Grzych *et al*, 1993).

Une étude réalisée en zone d'endémie à *S. mansoni* au Kenya, a montré que 77% des enfants infectés par ce parasite ont, parmi leurs lymphocytes périphériques, des cellules spécifiques de l'antigène Sm 28GST (Wolowczuk, 1991b). L'ensemble de ces résultats montre donc que la Sm 28GST est chez l'homme aussi, un antigène majeur.

11.6.2- Les GSTs de *S. japonicum*

La GST recombinante de *S. japonicum*, protéine à 26kDa, est capable d'induire différents niveaux de protection par immunisation dans divers modèles expérimentaux. En fait, des expériences d'immunisation par la Sjc 26GST chez des souris NIH (non-syngéniques) ont montré une diminution faible (24%), mais significative, de la parasitémie mais surtout un fort effet anti-fécondité, observé par la réduction du nombre d'oeufs au niveau du foie (31-59%) et de la rate (67-79%) (Liu *et al*, 1995a). Des résultats similaires ont été observé chez des porcs immunisés par cet antigène (Liu *et al*, 1995b).

Des expériences plus récentes ont démontré chez un hôte naturel, le buffle chinois (*Bos buffelus*), que la vaccination par la rSjc 26GST induisait un effet anti-fécondité très marqué.

Exprimé par une réduction de 22% de la charge parasitaire, 50% de réduction du nombre d'oeufs tissulaires (foie et intestin) et une diminution du nombre d'oeufs excrétés. En plus des effets anti-fécondité, la rSjc 26GST induit 40% de réduction de la capacité d'éclosion des oeufs en miracidiums viables (Shuxian *et al*, 1997). En terme de stratégies de vaccination, ces effets combinent une diminution de la pathologie à une réduction de la transmission.

11.6.3- Les GSTs de *S. bovis*

Le pouvoir protecteur de la GST native de *S. bovis* chez les bovins infectés de façon expérimentale par des cercaires de *S. bovis* a été évalué. Ces résultats ont montré une réduction non significative de la charge parasitaire, mais une diminution marquée et significative du nombre d'oeufs hépatiques (43-57%), du nombre d'oeufs présents dans gros intestin (68-82%) et du nombre d'oeufs dans l'intestin grêle (80-86%) (Trottein, 1992a).

L'immunisation par la GST native de *S. bovis* dans le modèle bovin montre que malgré l'absence d'une réduction effective de la charge parasitaire, le nombre d'oeufs tissulaires et le nombre d'oeufs fécaux sont réduits (Bushara *et al*, 1993). D'autre part, l'immunisation par rSb 28GST chez les chèvres ultérieurement infectées par des cercaires de *S. bovis*, a montré une réduction de 45% de la charge parasitaire, mais aucune réduction au niveau des oeufs. De plus, l'état général des animaux immunisés se présentait amélioré (gain de poids) par rapport aux animaux témoins (perte de poids) (Boulanger *et al*, 1994). Ces résultats montrent bien la difficulté de l'efficacité d'un protocole d'immunisation et du modèle d'étude.

Des travaux plus récents de De Bont *et al* (1997) ont aussi démontré le potentiel protecteur de l'immunisation par rSb 28GST au cours d'une infection des bovins par *S. mattheei*. Une infection expérimentale massive ne montre aucune protection, alors que, l'infection naturelle, légère en intensité, présente une réduction de 50% de la charge parasitaire (vers femelles), une réduction de 89% du nombre d'oeufs fécaux et une réduction de 93% du nombre de miracidiums.

Le tableau suivant résume quelques caractéristiques des GSTs de schistosomes étudiées et leurs potentialités protectrices.

L'effet protecteur des GSTs de Schistosome

SCHISTOSOME	GST	ANTIGENE	HOTE	% PROTECTION a)	ACTION sur la FECONDITE	REFERENCES
<i>S. mansoni</i>	28	Native	Rat	50-72		Balloul <i>et al.</i> , 1987a
	28	Clonée	Rat	67		Balloul <i>et al.</i> , 1987b
	28	Clonée	Hamster	52		Balloul <i>et al.</i> , 1987b
	28	Clonée	Babouin	38	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1991
	28	Native	Souris	40-43		Balloul <i>et al.</i> , 1987a
	28	Clonée	Souris	27-36	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1991
	28	Clonée	Singe Patas*	Non	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1995
Peptide N-terminal		Clonée	Souris	20	Oui	Xu <i>et al.</i> , 1993
Peptide C-terminal		Clonée	Souris	40	Oui	Xu <i>et al.</i> , 1993
Peptide T-épitopic		Clonée	Souris	40-50	Oui	Wolowczuk <i>et al.</i> , 1991
<i>S. bovis</i>	26,28	Native	Bovin	Non	Oui	Bushara <i>et al.</i> , 1993
	28	Recombinante	Chèvre	48	Non	Boulanger <i>et al.</i> , 1994
	28	Recombinante	Bovin**	43	Oui	De Bont <i>et al.</i> , 1997
<i>S. haematobium</i>	28	Recombinante	Singe Patas	Non	Oui	Boulanger <i>et al.</i> , 1997 (soumis)
<i>S. japonicum</i>	26	Protéine de Fusion	Souris(WEH1 129/J)	30		Mitchell <i>et al.</i> , 1988
	26	Protéine de Fusion	Souris(BALB/c)	Non		
	26	Recombinante	Souris(NIH)	24	Oui	Liu <i>et al.</i> , 1995
	26	Recombinante	Porc	Non	Oui	Liu <i>et al.</i> , 1995
	26	Recombinante	Buffle	22	Oui	Shuxian <i>et al.</i> , 1997

a) Protection en termes de la charge parasitaire

* Infection hétérologue par *S. haematobium*

** Infection hétérologue par *S. mattheei*

CHAPITRE II

SCHISTOSOMIASE A *Schistosoma bovis*

INTRODUCTION

Les schistosomiasés sont des maladies parasitaires qui affectent diverses espèces de vertébrés. Parmi les 5 espèces affectant le bétail, dans différents pays de l'Afrique, *Schistosoma bovis* est responsable d'une zoonose.

La plupart des infections en zone d'endémie s'exprime de façon subclinique. Toutefois, il a été établi qu'une prévalence élevée d'infections subcliniques apporte des pertes significatives au niveau de la croissance et de la productivité des animaux, vu sa longue durée, mais augmente également la susceptibilité à d'autres parasitoses et infections bactériennes (Dargie 1980, McCauley *et al* 1983, 1984).

1- Biogéographie et cycle biologique de Schistosoma bovis

Schistosoma bovis a été identifié pour la première fois en 1876 par Sosino, en Egypte, soit un quart de siècle après la découverte du premier schistosome (*S. haematobium*) par T. Bilharz dans ce même pays. Au sein des schistosomiasés africaines du bétail, il revêt une importance vétérinaire majeure, du fait de son impact particulier chez les ruminants domestiques.

Dans les régions où les conditions de transmission sont favorables, le taux de prévalence de l'infection par *S. bovis* peut atteindre 40-70%, ou plus (Christensen *et al*, 1983). Des observations dans les abattoirs ont montré que la plupart des infections naturelles du bétail présentent un état subclinique, caractérisé par une haute prévalence de petite ou moyenne charge parasitaire (Dargie, 1980 ; Kassuku *et al*, 1986)

1.1- Biogéographie

L'aire de répartition de *S. bovis* (Figure 2) regroupe une partie de l'Europe méditerranéenne, le Moyen-Orient, une très grande partie de l'Afrique du Nord-Est, de l'Ouest (excepté l'Égypte) et de l'Est et s'étend vers l'Angola central, le Sud-Ouest zaïrois et vraisemblablement vers le Nord-Est de la Zambie (Christensen *et al*, 1983).

1.2- Cycle biologique

S. bovis possède un cycle biologique hétéroxène à deux hôtes obligatoires (Figure 3).

L'hôte intermédiaire :

Deux genres de mollusques appartenant à la famille des *Planorbidae* jouent le rôle d'hôtes intermédiaires : *Planorbarius* (Froriep, 1806) et *Bulinus* (Müller, 1781). En Espagne et au Portugal, *P. metidjensis* est l'hôte intermédiaire (Forbes, 1838) ; dans les autres régions, ce sont les *Bulinus* des groupes *africanus*, *forskalli*, *reticulatus* et *truncatus* qui sont impliqués.

L'hôte définitif :

L'hôte définitif naturel est un vertébré du sous-ordre des ruminants ou solénodontes, mais d'autres mammifères peuvent héberger *S. bovis*. Au laboratoire *S. bovis* peut passer expérimentalement sur le rat, le rat du Nil, le hamster, la souris, le lapin et le cobaye.

Le cycle, comme celui de tous les schistosomes de mammifères, est caractérisé par deux formes larvaires de dispersion libre : le miracidium issu des oeufs émis par le vertébré et la cercaire émise par le mollusque.



Figure 2- Répartition géographique de *Schistosoma bovis*.

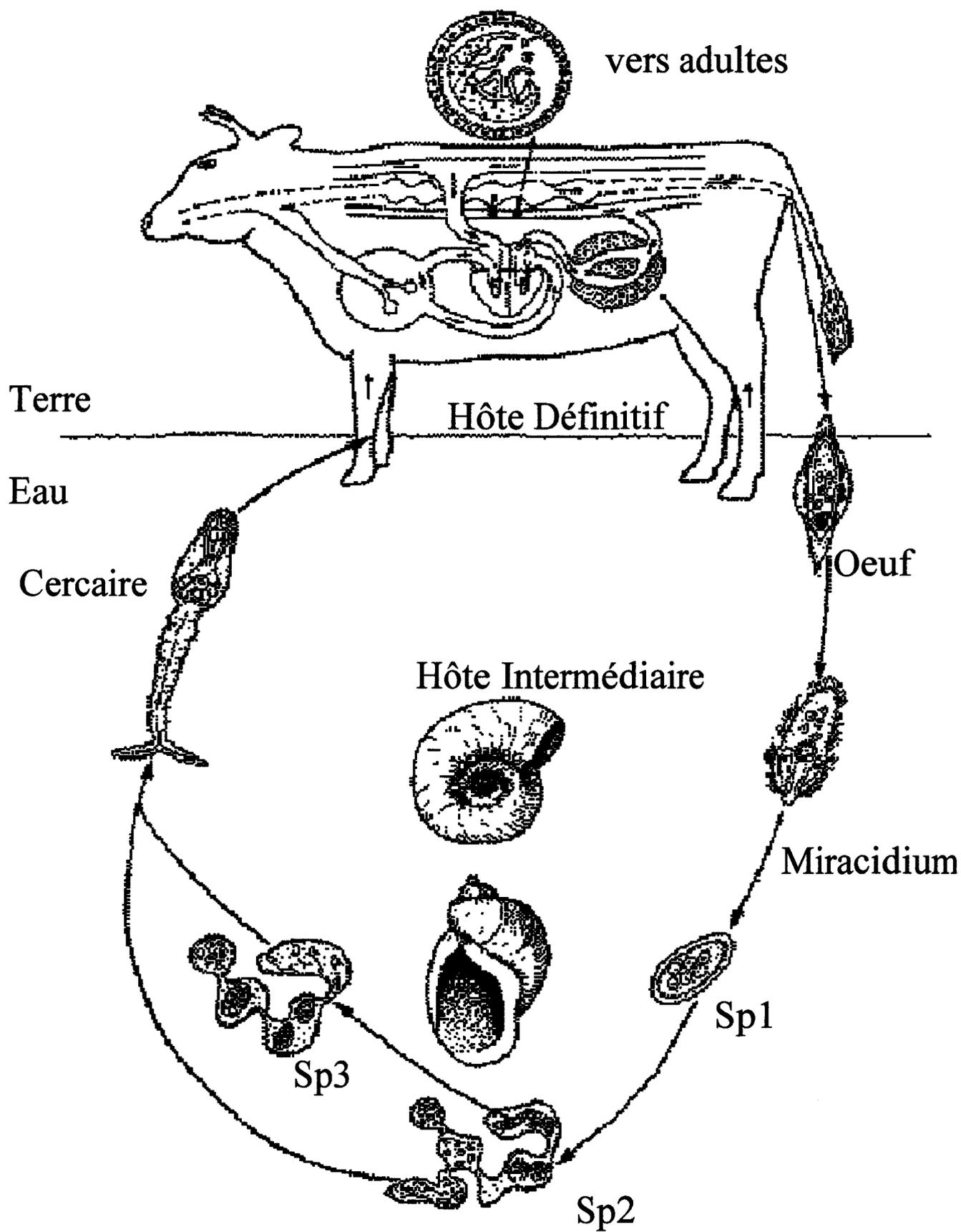


Figure 3- Cycle évolutif de *Schistosoma bovis*.

1.2.1- Le miracidium

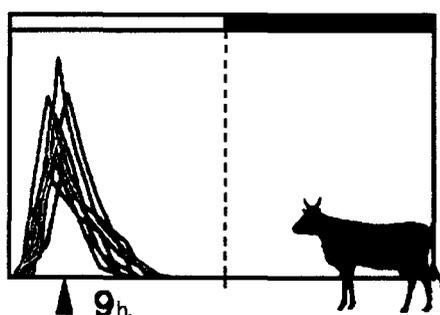
Le miracidium contenu dans l'oeuf doit séjourner 6 à 8 jours dans les tissus de l'hôte définitif pour accomplir son développement. Le jeune miracidium a une allure ovale ou sphérique ; sa taille varie en fonction de son état (étendu, relâché ou contracté) de 92 à 218 μm de long sur 29 à 55 μm de large. Sur le plan morpho-anatomique, le miracidium de *S. bovis* ressemble beaucoup à celui des autres schistosomes. La larve qui vient d'éclore a une durée de vie maximale de 24 heures mais son pouvoir infestant diminue après 6 heures. Pour continuer son développement, le miracidium doit rechercher et pénétrer activement le mollusque-cible.

1.2.2- La cercaire

La cercaire de *S. bovis* appartient au groupe des furcocercaires, elle présente une partie antérieure ovoïde (corps cercarien) et une partie postérieure plus effilée (partie caudale).

La larve nageante est caractérisée par : une région céphalique qui mesure 92-250 μm de long et 26-55 μm de large, un tronc caudal qui mesure 120-239 μm de long et 22-37 μm de large et une furca qui mesure 55-92 μm et 11-16 μm de large (mesures moyennes).

Le rythme d'émission des cercaires est étroitement corrélé à l'activité de l'hôte à infester. *S. bovis* présente un rythme circadien (un pic d'émission par jour), situé aux environs de 9 heures du matin (Cf figure ci-dessous).



L'infection par des cercaires de *S. bovis* se fait par pénétration de la peau. Des observations réalisées en conditions naturelles et expérimentales d'infestation laissent cependant penser que la voie orale représente une alternative tout à fait envisageable au maintien du cycle parasitaire. L'apparente répugnance des ovins et caprins à entrer en contact direct avec l'eau conforte, la pertinence potentielle de cette modalité de transmission en zone d'endémie. Malgré son efficacité réduite par rapport à la voie transcutanée, elle pourrait en constituer une composante importante chez les petits ruminants et les bovins (Van Wyk *et al*, 1974; Kassuku *et al*, 1985).

1.2.3- Le schistosomule et sa migration

La migration des schistosomules de *S. bovis* n'a pas fait l'objet d'études précises comme dans le cas d'autres schistosomes. Mais tout laisse supposer que les caractéristiques morpho-anatomiques et le circuit de migration ressemblent beaucoup à celui des autres schistosomes.

1.2.4- Les adultes

Les schistosomules deviennent vers adultes au niveau des ramifications intra-hépatiques de la veine porte, où ils s'accouplent alors qu'ils ne sont pas au terme de leur maturation sexuelle.

Le mâle : sa longueur varie entre 9 et 20mm pour une largeur de 1 à 2 mm. Son corps est courbé, il possède un canal gynécophore dans lequel se loge la femelle. Le tégument est recouvert, sauf dans la région céphalique, de tubercules disposés en quinconce. Du point de vue anatomique, le mâle présente les structures suivantes : un système digestif, un système génital comprenant 3 à 5 testicules et un système excréteur.

La femelle : sa longueur atteint 12 à 28mm pour une largeur moyenne de 200 μ . Son corps est mince et filiforme. Le tégument est non tuberculé. Du point de vue anatomique, la femelle présente les structures suivantes : un système digestif, un système génital formé par un ovaire contourné en spirale de taille variable suivant le stade de développement et un système excréteur.

1.2.5- L'oeuf

Les couples de *S. bovis* migrent à contre courant du foie vers les veinules mésentériques où s'effectue la ponte. L'oeuf est en forme de fuseau à éperon terminal postérieur. Leur taille dépend de leur stade de maturation et de leur localisation (*in utero*, foie, fécès). En position utérine, il mesure 140-185 μ de long sur 60 μ de diamètre alors que dans les fécès, leur longueur atteint 150-260 μ pour 80-90 μ de diamètre médian. L'existence d'un polymorphisme des oeufs est aussi observée en fonction des souches géographiques, et en fonction de l'hôte définitif.

En ce qui concerne la dynamique de production des oeufs à la suite d'une infestation, les premiers oeufs de *S. bovis* font leur apparition dans les fécès à des jours variables selon les auteurs et selon l'hôte comme le montre le tableau ci-dessous :

AUTEURS	JOURS POST- INFECTION	HOTES
BRUMPT (1930)	41-60	Souris
PORTES (1938)	69 75	Lapin Rat blanc
SCHWETZ (1956)	50-60	Souris
LENGY (1962)	35-45	Souris
MALEK (1969)	52-60	Rat du Nil, Souris
SOUTHGATE et KNOWLES (1975)	33-37	Hamster

Il est assez difficile d'évaluer le nombre d'oeufs produits chaque jour par les femelles des différentes espèces de schistosomes parce que d'une part, un grand nombre d'oeufs produits est retenu dans les tissus de l'hôte où ils sont détruits et que d'autre part, il est difficile d'évaluer la quantité d'adultes surtout chez un hôte de grande taille. Par contre, il est possible de comptabiliser le rejet des oeufs dans les fécès.

Nous ne disposons que de peu de données sur la production quotidienne des oeufs de *S. bovis* : Brumpt (1930) a dénombré 25 à 111 oeufs/jour/femelle chez la souris ; Massoud (1973) en compte 67 à 106/jour/femelle chez le boeuf, 57 à 112 oeufs/jour/femelle chez le mouton et 48/jour/femelle chez la chèvre ; Southgate et Knowles (1975) ont numéré chez le hamster 19 oeufs/jour/femelle pour le *S. bovis* de Sardaigne, 28 oeufs/jour/femelle pour le *S. bovis* du Maroc et 58 oeufs/jour/femelle pour le *S. bovis* d'Iran. Ceci laisse supposer que l'hôte a une importance dans la quantité d'oeufs produits de même que la souche du parasite. Le tableau suivant permet de comparer ces données à ceux concernant les autres schistosomes (Touassem, 1984).

Production d'oeufs par les différents Schistosomes

ESPECES DE SCHISTOSOMES	NOMBRE D'OEUFS REJETES/JOUR/FEMELLE	HOTES	NOMBRE D'OEUFS DANS L'UTERUS	AUTEURS
<i>S. haematobium</i>	22	Babouin	4-56	JORDAN <i>et al</i> (1967)
	203	Homme	(29)	CHEEVER <i>et al</i> (1975)
<i>S. intercalatum</i>	10	Hamster	12-54	WRIGHT <i>et al</i> (1972)
	411	Babouin	(30)	TAYLOR <i>et al</i> (1973 b)
<i>S. mattheei</i>	640	Boeuf	5-42	LAWRENCE (1973a)
	3285		(26)	
<i>S. margrebowiei</i>	66	Hamster	30-205 (130)	MOORE et SANDGROUND (1956)
<i>S. mansoni</i>	54-184	Singe	1	CHEEVER et DUWALL (1974)
	70-90	Souris		CHEEVER et ANDERSON (1971)
	54-60	Rat Noir		IMBERT-ESTABLET (1982)
<i>S. japonicum</i>	560	Hamster	?	MOORE et SANDGROUND (1956)
	2200	Singe		CHEEVER <i>et</i> DUVALL (1974)

2- Transmission

Cet aspect a été plus particulièrement étudié en raison de ses importantes répercussions épidémiologiques, connaissances indispensables à la mise en place de moyens efficaces de lutte.

Les différents facteurs de transmission des schistosomiasés du bétail ont été revus par Christensen *et al* (1983). D'une part, les facteurs écologiques qui affectent la biologie et la survie des populations de mollusques vecteurs et la production de cercaires sont bien documentés. Les effets de l'environnement, pluie et température, sont en accord avec les tendances de transmissions saisonnières pour certains habitats (Majid *et al*, 1980, Chandiwana *et al*, 1987, Lawrence, 1978).

D'autre part, le comportement de l'hôte définitif, son immersion dans l'eau et sa capacité à contaminer l'environnement ont été aussi étudiés. Au contraire de l'homme, chez le bétail, l'exposition aux cercaires est constante au cours de leur vie, aucune variation n'a été trouvée avec l'âge. Sur la base du nombre d'oeufs fécaux, des études épidémiologiques en zone d'endémie, ont montré que la prévalence et l'intensité de l'infection diminuent au cours de l'âge (Majid *et al*, 1980). Les jeunes animaux sont alors les grands responsables de la contamination de l'environnement.

3- Pathologie

3.1- Aspects cliniques chez les bovins (Schistosomiase viscérale)

3.1.1- Symptômes

Les premiers symptômes, sous forme de diarrhée mucohémmorragique, apparaissent vers la 7ème semaine pour se maintenir jusqu'au 4ème mois après infestation. Pendant cette période, les animaux présentent un aspect maladif et de l'inappétence. L'atteinte générale est d'autant plus sévère que les animaux sont jeunes.

Les bovins infectés au cours de leur croissance présentent une perte de poids à partir de la 4^{ème} semaine, plus particulièrement marquée entre la 6^{ème} et la 12^{ème} semaine post-infection. Une anémie importante se développe progressivement entre la 5^{ème} et la 12^{ème} semaine d'infection, représentée par une réduction du nombre de globules rouges et par une augmentation du volume plasmatique. Ces paramètres augmentent à nouveau en phase chronique de la maladie, sans pour autant retrouver leur niveau initial (Saad *et al*, 1980).

Une hypoalbuminémie s'installe dès la 4^{ème} semaine, atteignant un maximum à la 12-13^{ème} semaine d'infection. Le taux d'albumine sérique est réduit de 20 à 55% suivant l'intensité de la maladie. Le taux de globulines augmente, engendrant une hyperprotéinémie globale.

Au cours de l'infection, seuls les éosinophiles voient leur nombre s'élever dès la 3^{ème} semaine pour atteindre un plateau ($\pm 900/\text{mm}^3$) entre la 8^{ème} et la 25^{ème} semaine d'infection. Ensuite, l'éosinophilie redevient modérée ($400/\text{mm}^3$), mais significativement différente des valeurs témoins ($100/\text{mm}^3$).

3.1.2- Paramètres parasitologiques

3.1.2.1- Charge parasitaire

En fonction de la souche parasitaire, de la dose de cercaires et de la durée de l'infection le nombre de vers récupérés, après perfusion, est variable. Les récoltes en vers varient entre 10 et 28% au bout de 3 à 4 mois d'infestation, avec un rapport mâle/femelle compris entre 2 et 3. Après 3 à 6 mois d'infection, le nombre de vers récupérés diminue. En phase chronique, après 6 mois, la population vermineuse se stabilise autour de 5% par rapport à la dose infestante, soit 500 vers adultes pour 10000 cercaires (Saad *et al*, 1980).

Un suivi d'infection de 2 ans, en zone d'endémie au Soudan, chez le bétail infecté par *S. bovis* a montré une prévalence d'infection très élevée, par rapport au nombre d'œufs fécaux. Les animaux d'un an et demi présentent une prévalence d'infection de 90%, qui se réduit à 60% vers 5 ans et à 30% vers 10 ans, et s'accompagne aussi d'une réduction de l'intensité de l'infection. Le contact quotidien avec l'eau étant similaire pour tous les animaux et indépendant

de l'âge, ces observations suggèrent l'existence d'une résistance à la réinfection (Majid *et al*, 1980).

La fécondité des schistosomes adultes est difficile à évaluer *in vivo* dans le modèle bovin. On estime, que quelque soit la dose cercarienne, la fécondité moyenne des vers femelles est maximale entre 3 et 6 mois d'infestation, environ 900 oeufs/jour, alors que la ponte moyenne en phase chronique n'est plus que de 250 oeufs/jour/femelle.

3.1.2.2- Charge en oeufs tissulaires

Le nombre d'oeufs tissulaires augmente au cours de l'infection, plus fortement entre le 3ème et le 6ème mois d'infection. Au delà de 10 mois, il se stabilise à un niveau faible si l'infestation est légère, à un niveau élevé si l'infestation est forte.

La répartition des oeufs par organe varie avec le temps, alors que le pourcentage dans le foie, toujours mineur par rapport à l'intestin, reste stable au cours du temps : on assiste à un rééquilibrage en faveur du gros intestin lorsque l'infestation se prolonge. La distribution relative des oeufs dans l'intestin montre de très grandes différences au cours de l'infection. Les oeufs s'accumulent très rapidement dans les premières semaines dans la muqueuse, pendant qu'une petite partie s'installe dans la sous-muqueuse. Les oeufs de la muqueuse migrent rapidement vers le lumen, ceux de la sous-muqueuse persistent plus longtemps, jusqu'à ce qu'ils soient phagocytés. En même temps que la ponte des oeufs est supprimée par la réponse immunologique de l'hôte, le nombre d'oeufs dans la muqueuse diminue rapidement tandis que celui de la sousmuqueuse reste élevé.

3.1.2.3- Excrétion fécale

Les premiers oeufs fécaux apparaissent vers la 6-8ème semaine, l'excrétion atteint un pic entre la 10ème à la 13ème semaine, pour diminuer ensuite rapidement au cours des 8 semaines succédant ce pic. Ensuite, le nombre d'oeufs excrétés se stabilise à un faible niveau.

Des observations d'Hussein (1971) chez des jeunes bovins infestés par 5000 à 11000 cercaires de *S. bovis* puis perfusés entre 30 et 180 jours après infection, ont montré les premières modifications pathologiques au 30ème jour après l'infection. On observe dans le foie, au sein du parenchyme hépatique, la présence d'infiltrats de cellules mononuclées provenant des espaces portes. A partir de la 5ème semaine, les animaux développent des diarrhées intenses et une faiblesse musculaire. Des oeufs ont été trouvés 48 jours après l'infection dans les fécès. Après 60 jours, les manifestations se résument par une perte de poids, une réaction cellulaire autour des oeufs liée aux éosinophiles, aux cellules épithéliales et plasmiques, aux lymphocytes, aux fibroblastes et aux cellules géantes. Ceci s'accompagne d'une dégénérescence hépatique, de fibrose périovulaire et d'une forte réaction inflammatoire autour de la veine porte. Plus tard dans l'infection on observe une diminution de la dissémination des granulomes et quelques lésions périvasculaires des tissus qui se transforment en fibroses. La pathologie est similaire dans l'infection naturelle et expérimentale, les différences qui ont pu être observées sont dues à des variations de gravité et de durée d'infection.

3.2- Aspects cliniques chez les petits ruminants et chez les modèles expérimentaux

A- Les ovins

Une période prépatente entre 7 à 10 semaines (Hussein, 1976b au Soudan ; Monrad *et al*, 1982 en Tanzanie), suivant la souche, a été observée, les animaux deviennent progressivement affaiblis et amaigris.

Les animaux infectés présentent une perte de poids ou une difficulté à en gagner. Ils développent des diarrhées hémorragiques, de l'inappétence, une anémie marquée, une hypoalbuminémie, une hyperglobulinémie, une hyperprotéinémie et une éosinophilie. Ces profils deviennent plus marqués au moment de la ponte des oeufs et leur gravité est généralement liée à l'excrétion fécale.

Vers la 12^{ème} semaine, le pourcentage de vers adultes récoltés varie entre 14-31% pour la souche londonienne (Bickle *et al*, 1979), entre 36-64% pour la souche soudanaise (Hussein, 1976b), et est accompagné de quantités élevées d'oeufs au niveau de l'intestin et du foie.

Des études au Soudan sur des ovins du désert n'ont montré aucune infection chez les animaux de moins d'un an, mais à partir de 18 mois, la prévalence augmente progressivement de 20 à 60 % chez les animaux âgés de 6 ans. Ceci est associé à une augmentation de l'intensité de l'infection, déterminée par le nombre d'oeufs fécaux. Contrairement aux observations décrites chez les bovins dans la même région, les ovins ne présentent pas de résistance effective à la réinfection (Majid *et al*, 1983).

B- Les caprins

Vers la 7^{ème} semaine, les animaux infectés développent une série d'aspects cliniques typiques, qui incluent la diarrhée hémorragique, l'anorexie et un état général très affaibli. Ces aspects cliniques coïncident avec l'apparition des oeufs dans les fécès et leur gravité augmente pendant 1 mois à 1 mois et demi lorsque les oeufs fécaux sont encore très nombreux. L'état général des animaux s'améliore avec la diminution du nombre d'oeufs fécaux excrétés, observée en phase tardive de l'infection.

Entre la 6^{ème} et la 14^{ème} semaine, coïncidant avec le début de l'oviposition et le développement de la phase aigüe, les caprins présentent un pic de perte de poids, puis une récupération plus tardive qui ne revient jamais au niveau initial. En phase aigüe les caprins présentent aussi une anémie marquée, une hypoalbuminémie, une hyperglobulinémie, une hyperprotéinémie et une éosinophilie. Vers la 20^{ème} semaine, le pourcentage de vers adultes récoltés est de 23% (Saad *et al*, 1984). La pathologie est plus marquée au niveau du foie et de l'intestin, tandis que certains organes comme la rate et les poumons sont occasionnellement affectés. Malgré une charge vermineuse et en oeufs tissulaires plus faible (par rapport aux ovins), les caprins présentent un taux d'excrétion fécale plus élevé confirmant la sévérité de la maladie.

C- Les modèles expérimentaux de laboratoire

Le hamster

Sampaio Silva *et al* (1990) a montré que ce rongeur permettait une excellente stabilité de la souche espagnole de *S. bovis* car aucune dérive ni dans la production cercarienne, ni dans les récoltes parasitaires n'ont été observées même après 32 passages successifs.

Les travaux de Taylor *et al* (1973a), sur des hamsters infectés par la souche iranienne, à raison de 100 cercaires et perfusés 10 semaines plus tard ont permis d'observer une récolte moyenne de vers adultes de 21%. Les oeufs tissulaires se localisent préférentiellement au niveau du foie (97%), traduisant une très faible migration des couples de schistosomes vers les capillaires mésentériques.

La souris

Différents travaux d'infection par *S. bovis* chez la souris ont montré un pourcentage de vers adultes récoltés variant de 10 et 50%. Une survie moyenne de 70 jours a été obtenue dans cette espèce, 20% des souris étant toujours en vie 19 semaines après l'infestation (Murare *et al*, 1987a ; Agnew *et al*, 1993). La répartition des oeufs, plus important au niveau du foie qu'au niveau intestinal, suggère une faible migration des couples de schistosomes vers les capillaires mésentériques. Ce modèle sera discuté plus longuement dans ce mémoire.

4- Diagnostic

4.1- Diagnostic clinique

Les premiers signes se caractérisent par un état général faible, de l'inappétence, une déshydratation et des diarrhées hémorragiques. Aucun de ces signes n'étant hautement

spécifiques, le contexte épidémiologique doit faire penser à cette étiologie mais elle doit être confirmée par le diagnostic parasitologique et immunologique.

4.2-Diagnostic parasitologique

La coproscopie est la méthode la plus utilisée, la recherche des oeufs fécaux est relativement simple, spécifique et peu coûteuse, mais peut donner lieu à des réactions faussement négatives lors d'infestations faibles, en phase tardive ou lors de résistance acquise chez les bovins adultes. Cependant, cette technique ne permet pas l'estimation de la charge vermineuse sur la seule base du nombre d'oeufs fécaux. Dans le contexte des schistosomiasés du bétail, l'intensité de l'excrétion fécale reste toutefois une excellente indication de l'état pathologique et immunologique des animaux.

Une autre façon de diagnostiquer est la biopsie rectale, qui est assez délicate. Le prélèvement direct d'un fragment de muqueuse rectale constitue cependant le moyen le plus sûr d'identifier les porteurs chroniques.

4.3- Diagnostic immunologique

Le diagnostic immunologique peut être fait soit par la recherche des antigènes, soit par la recherche des anticorps.

-Recherche des antigènes : les antigènes circulants sous forme libre ou complexée avec des anticorps, peuvent être détectés. Dans la plupart des cas, cette recherche est basée sur l'emploi d'anticorps monoclonaux.

La recherche d'antigènes circulants par l'utilisation d'extraits de vers adultes ou d'antigènes d'oeufs a pu être appliquée à une étude épidémiologique chez des caprins en Afrique (Johansen *et al*, 1996a). Cependant, l'existence d'antigènes communs entre *Fasciola hepatica*,

S. bovis et *Dicrocoelium hospes*, qui cohabitent chez les ruminants, limite l'utilisation et l'application des sérodiagnostics comme méthode de routine.

-Recherche d'anticorps : Bien qu'ayant fait l'objet de recherches intensives dans le domaine des bilharzioses humaines, le diagnostic sérologique reste délaissé chez les ruminants. Les techniques utilisant des préparations antigéniques totales ou des antigènes figurés (miracidium, cercaire, oeuf) induisent beaucoup de fausses positivités et un grand nombre de réactivités croisées. Les communautés antigéniques entre *S. bovis* et d'autres parasites sont en effet nombreuses, notamment au sein des Trématodes.

Duffus *et al* (1975), a fractionné un extrait total de vers adultes de *S. bovis*, afin d'obtenir des fractions purifiées et plus spécifiques, mais aucun avantage n'a pu être mis en évidence, car les réactions croisées persistent. Par contre le test d'hémagglutination indirecte est plus sensible : jusqu'à 98% de positivité ont pu être mis en évidence (Preston et Duffus, 1975).

L'antigène brut préparé à partir de vers adultes de *S. bovis* a été utilisé avec succès dans le diagnostic des bilharzioses humaines, dûes notamment à *S. haematobium* et *S. intercalatum* (Roffi et Lemasson, 1981; Sampaio Silva *et al*, 1990). A notre connaissance, aucun antigène purifié spécifique n'a été proposé pour la détection des anticorps sériques chez les ruminants infestés.

En zone d'endémie, ces méthodes sérologiques restent toutefois d'un emploi restreint et d'un coût élevé pour être utilisées à grande échelle. Par contre, dans un contexte expérimental, ces méthodes sont de la plus grande utilité.

5- Traitement

L'efficacité thérapeutique des médicaments à potentialité schistosomicide repose sur des critères de survie du ver adulte et sur la quantité des oeufs pondus. Le coût élevé, la présence d'effets secondaires indésirables et la lourdeur des protocoles d'utilisation ont limité leur emploi.

Différentes drogues connues pour leur activité schistosomicide ont été employées contre les schistosomiasis animales, mais se révèlent assez toxiques et peu actives. Par contre des médicaments comme le Métrifonate et le Praziquantel, appliqués sur le terrain se sont montrés efficaces. Le Métrifonate (diméthyl-trichloro-hydroxyéthyle) provoque une paralysie chez le parasite, le plus souvent réversible aux doses curatives. En ce qui concerne les schistosomes, cette paralysie entraîne le décrochement des vers attachés par leurs ventouses aux parois vasculaires. Dans le cas de *S. mansoni*, les vers ainsi décrochés retournent par la veine porte jusqu'au foie. Dès que l'action du Métrifonate s'estompe, les vers sont capables de remigrer vers les capillaires mésentériques. Dans le cas de *S. haematobium*, par contre les vers décrochés vont remonter jusqu'aux poumons d'où il leur sera beaucoup plus difficile, voire impossible, d'accomplir cette migration rétrograde. En conséquence, le Métrifonate est beaucoup plus efficace contre *S. haematobium* que contre *S. mansoni*, mais le traitement présente de gros risques d'embolisation au niveau de la circulation pulmonaire.

Le Métrifonate s'est toutefois révélé efficace dans le traitement de bovins naturellement infestés par *S. bovis* au Kenya, à la dose de 75mg/kg répété 7 à 8 fois tous les 2-3 jours. Bushara *et al* (1982) a uniquement réussi le traitement, après doses de 25mg/kg à trois jours d'intervalle.

Le Praziquantel (PZQ) s'est révélé actif sur de nombreuses espèces de schistosomes, doué d'une efficacité remarquable *in vitro* et *in vivo*, et est dépourvu d'effets toxiques sur les tissus de l'hôte (Andrews, 1981). Il est considéré comme le traitement de choix des bilharzioses humaines et a déjà été largement utilisé lors d'expériences pilotes. Son application chez des bovins infectés s'est montrée très efficace, l'excrétion fécale fut considérablement réduite en l'espace de 3 semaines, après administration unique de PZQ à la 9^{ème} semaine post-infestation (20mg/kg). Quatre semaines après traitement, les selles ne contiennent plus d'oeufs. Les animaux présentaient aussi une réduction de la charge vermineuse ou même n'hébergeaient aucun vers à la perfusion, suggérant une guérison quasi complète (Bushara *et al*, 1983b).

Le traitement par le PZQ chez les caprins infectés expérimentalement s'est également montré efficace : une réduction du nombre de vers entre 95,7-100% a été observée, accompagnée d'une réduction d'oeufs au niveau intestinal (mais pas au niveau du foie) et d'une

réduction entre 84-98% de l'excrétion fécale (Johansen *et al*, 1996b). Les effets pathologiques se manifestaient par des lésions sévères au niveau du foie attribuées à la mort des vers, ce qui implique des précautions lors du traitement d'animaux présentant un nombre de vers élevé ou une pathologie du foie importante (Johansen *et al*, 1996c).

6- Prophylaxie sanitaire

Elle a longtemps constitué la seule méthode pratique de lutte contre les schistosomiasés humaines et animales. Basée sur l'interruption du cycle parasitaire, elle peut se résumer à un contrôle des contacts entre l'hôte définitif et le biotope aquatique où séjourne l'hôte intermédiaire.

Pour *S. bovis* comme pour toutes les autres schistosomiasés animales, l'interruption du cycle parasitaire est encore plus difficile à mettre en oeuvre et il semble utopique de vouloir empêcher tout contact entre les points d'eau et les animaux.

7- Prophylaxie médicale

Toute prophylaxie médicale doit s'appuyer sur une bonne connaissance du comportement immunologique de l'individu face à l'agent pathogène. Devant toutes les difficultés à établir et à maintenir un programme de lutte efficace, l'avenir encourage la recherche dans la voie de la vaccination contre les schistosomiasés bovines.

8- Développement de l'immunité

Les études sur le développement de l'immunité contre la schistosomiasé chez le bétail ont clairement montré l'existence d'une résistance acquise à la réinfection, la protection induite se présentant différemment en fonction de l'infection, soit expérimentale soit naturelle.

8.1- Immunité dans les infections naturelles des bovins

Plus tard, des études réalisées dans la région du Nil Blanc au Soudan (Majid *et al*, 1980) ont permis de suivre les animaux dans le temps : les animaux âgés d'un an et demi présentaient une prévalence et une intensité d'infection très élevées, de 90% environ, en évaluant le nombre d'oeufs fécaux excrétés. Chez les animaux plus âgés, la prévalence et l'intensité diminuaient de 60% à l'âge de 5 ans. Ces résultats suggèrent, donc, l'existence d'une résistance acquise à la réinfection.

Pour tester l'existence d'une immunité à la réinfection, des expériences sur des bovins naturellement infectés en zone d'endémie au Soudan, âgés de plus de 4 ans : ces bovins, qualifiés de "chroniques", ont été infestés expérimentalement avec une forte dose de cercaires de *S. bovis* (70 000), par rapport à des témoins du même âge provenant d'une région dépourvue de schistosomiase bovine (Bushara *et al*, 1980). Les observations cliniques ont pu démontrer que les animaux chroniques étaient capables de récupérer presque complètement des effets de l'infection d'épreuve, tandis que les contrôles développaient des infections létales. Les différences entre les deux groupes étaient plus marquées en termes de poids, de paramètres hématologiques, histopathologiques, physiopathologiques et parasitologiques.

Au cours de l'infestation expérimentale, les animaux chroniques n'ont pas développé les symptômes classiquement observés chez les animaux témoins soumis à un tel niveau d'infestation : aucune perte de poids, aucune diarrhée hémorragique et peu de lésions anatomopathologiques.

Les animaux chroniques présentaient une réduction de la charge vermineuse de 45% et une réduction de la charge tissulaire en oeufs de plus de 90% au niveau de l'intestin. L'excrétion fécale des animaux chroniques était modérée, le pic se situant à 25 oeufs par gramme (epg), contre 900 epg chez les témoins. Le nombre d'oeufs hépatiques étant aussi élevé chez les animaux chroniques que chez les animaux témoins, mais beaucoup moins élevé au niveau intestinal, nous indique que les vers qui se sont installés après challenge, ont déposés la plupart de leurs oeufs au niveau du foie chez les animaux naturellement résistants.

Ces résultats confirment l'existence d'une résistance acquise à la réinfection chez les animaux infectés naturellement, conséquence d'un contact prolongé et répété avec le parasite qui se manifeste surtout par une suppression de la production d'oeufs par les vers après challenge, au lieu d'une prévention de la maturation des vers. Des observations similaires ont été rapportées chez le bétail infecté naturellement par *S. mattheei* (Pitchford et Visser, 1982 ; De Bont *et al*, 1995a).

8.2- Immunité dans les infections expérimentales des bovins

Des différences ont été observées entre une infection expérimentale et une infection naturelle. Des bovins primo-infestés par 10000 cercaires, ont été réinfestés 24 semaines plus tard par 20000 cercaires de *S. bovis*. Dans ce cas, la résistance à la réinfection s'est manifestée aussi bien sur l'excrétion fécale (réduit 88%) qu'au niveau des oeufs tissulaires, réduits de 78% dans le foie, de 100% dans l'intestin grêle et de 96% dans le gros intestin. Par contre le nombre de vers de l'infestation d'épreuve n'a pas été modifié.

Les mêmes résultats ont été observés par Massoud and Nelson (1972), des expériences de primo-infestation unique et massive suivie d'une infection d'épreuve n'ont démontré aucune protection contre la charge en vers, mais une réduction significative de la fécondité des vers adultes après réinfection. Ce modèle expérimental, basé sur une primo-infestation unique et massive, ne reproduit donc pas exactement l'état d'immunité conféré par des infestations naturelles répétées, où l'on avait observé une réduction de la charge en vers. (Bushara *et al*, 1980 ; Majid *et al*, 1980)

Toutefois, il faut noter que les deux situations d'infection ne sont pas identiques : d'une part, les doses cercariennes diffèrent (20000 versus 70000) ; d'autre part, au moment de l'infestation d'épreuve, les bovins chroniques hébergeaient déjà des vers. Ces deux paramètres pourraient rendre compte des mécanismes partiellement divergeants observés dans les deux modèles, mais qui conduisent également à une réduction de la pathologie. Des observations similaires ont pu être rapportées dans l'infection par *S. mattheei* (Lawrence 1973a ; De Bont *et al*, 1995b).

8.3- Etudes des mécanismes de résistance acquise dans l'infection bovine

L'immunité semble s'exercer à deux niveaux distincts :

- sur l'excrétion fécale nettement réduite chez les bovins chroniques, que ce soit en zone d'endémie ou après un challenge massif, malgré la présence d'une charge conséquente en vers et en oeufs tissulaires,
- sur la charge vermineuse et sur la fécondité des vers femelles du challenge.

La suppression de la production d'oeufs étant la manifestation parasitologique chez les animaux naturellement résistants à *S. bovis*, des études préliminaires des mécanismes de résistance acquise ont été réalisées par Bushara *et al* (1983c). Des vers adultes d'animaux résistants, à faible nombre d'oeufs fécaux (0-8 epg), ont été transférés chez des animaux receveurs sains. Le taux de vers récupérés chez les animaux receveurs varie entre 0.1-78%. Après transplantation, un grand nombre d'oeufs fécaux ont été excrétés chez les animaux receveurs, 5 à 16 jours après transfert, atteignant 55-405 epg après 6 à 20 jours.

L'inhibition de l'excrétion fécale est un phénomène réversible et actif, puisque les vers transplantés récupèrent leur ponte et l'inhibition réapparaît chez les animaux receveurs en l'espace de quelques semaines, en absence de toute fibrose installée.

Le fait que, en conditions naturelles, l'inhibition n'apparaisse qu'au delà de 2 ans de contact est surprenant. Quelques hypothèses peuvent être suggérées comme : l'immaturation du système immunitaire des jeunes bovins ou la nécessité de multiples réinfestations auxquelles sont soumis les animaux.

D'autre part, l'injection intrapéritonéale de sérum d'animaux résistants chez des animaux receveurs a montré un effet négligeable sur le nombre de vers et sur le nombre d'oeufs fécaux. Cependant, une évidence de réduction de la fécondité des vers, par rapport au nombre d'oeufs tissulaires, a été observée chez les animaux receveurs traités par le sérum d'animaux résistants.

Ces expériences confirment que les vers adultes qui survivent chez les animaux résistants sont dans un état de suppression de production d'oeufs et que des mécanismes immunologiques spécifiques pourraient en être responsables. De plus, en maintenant des bovins

chroniques au laboratoire à l'abri de toute réinfestation, on s'aperçoit que leurs charge, vermineuse et tissulaire, chutent de 85% en l'espace de 16 semaines (Bushara *et al*, 1980). L'adulte semble donc bien une cible de la résistance acquise, initiée en zone d'endémie.

L'ensemble de ces observations suggère un mécanisme de résistance de nature immune dirigé contre le stade adulte, concept assez nouveau dans le contexte des bilharzioses, par opposition au concept d'immunité concomittante dans lequel les vers adultes induisent en effet une réponse immune ayant pour cible les stades larvaires de réinfection (schistosomules), sans y être eux-mêmes sensibles (Smithers *et al*, 1969).

De façon à clarifier si la présence des vers adultes était nécessaire à l'obtention d'une réponse protectrice acquise chez les animaux résistants, Bushara *et al* (1983b) a traité des bovins chroniques par le PZQ, connu comme excellent schistosomicide dans ce modèle (Bushara *et al*, 1982). Deux traitements ont été appliqués et 7 semaines plus tard les animaux ont été infestés par 70000 cercaires de *S. bovis*, en utilisant comme contrôles un groupe d'animaux "résistants" non-traités et un groupe antérieurement non-infecté. Ces résultats ont confirmé, une fois de plus que les animaux "résistants" non-traités étaient très résistants à la réinfection expérimentale. Chez les animaux traités, une réduction marquée de la charge parasitaire a pu être aussi observée (69%) mais aussi une réduction du nombre total d'oeufs tissulaires (89%) par rapport au contrôle (groupe antérieurement non-traité), suggérant que chez les animaux résistants la protection s'exerce au niveau de la charge parasitaire, mais aussi sur la fécondité après réinfection. Le traitement n'abolit pas la protection acquise dans les infections naturelles, tout au moins dans la période de 7 semaines.

Ces résultats apportent de très bonnes informations mais quelques questions se posent encore, puisqu'il est impossible de conclure définitivement sur le rôle des vers adultes. Ni les vers ni les oeufs tissulaires ne sont nécessaires à l'expression de la résistance acquise à la réinfection ou un état de résistance était maintenu au moins 7 semaines après disparition du stimulus antigénique initial, la réinfestation pouvant contribuer en un rappel efficace.

Cette deuxième explication est confortée par des observations chez la souris infectée par *S. mansoni* où l'état de résistance s'est maintenu 1 à 2 mois, mais pas pendant 6 mois, après traitement, ce qui va dans le sens d'une médiation immunitaire (Andrade et De Brito, 1982).

Afin de conforter cette hypothèse, des couples ou des vers mâles seuls provenant de bovins expérimentalement infestés par 10000 cercaires 14 semaines avant le prélèvement, ont été transplantés dans des bovins sains 10 semaines avant un challenge par 20000 cercaires de *S. bovis* (Bushara *et al*, 1983c). Bien qu'aboutissant à des résultats non significatifs au sens statistique du terme, une résistance partielle a pu être induite par les couples mais aussi par les mâles, sans intervention des stades migratoires antérieurs.

La résistance s'est exercée à la fois sur l'excrétion fécale (38% pour les mâles, 64% pour les couples), sur les oeufs tissulaires (63 à 76% pour les mâles, 39 à 63% pour les couples) et sur les vers (37% pour les mâles, 43% pour les couples). Le fait que les mâles seuls soient capables d'induire une réponse protectrice va dans le sens d'un mécanisme effecteur de nature immunitaire, les oeufs pouvant créer des réactions inflammatoires non spécifiques dans le foie et les poumons, résultats également démontrés dans le modèle souris/*S. mansoni* (Harrison *et al*, 1982; Wilson *et al*, 1983).

Afin d'expliquer le rôle des facteurs humoraux dans l'immunité acquise, différentes expériences de transfert de sérum ont été réalisées chez le modèle bovin. Comme nous l'avons décrit auparavant, le transfert de "sérum résistant" chez des animaux sains un jour avant l'infection expérimentale, a un effet négligeable sur la réduction du nombre de vers et d'oeufs fécaux, mais un effet modeste sur le nombre d'oeufs tissulaires (Bushara *et al*, 1983c). Les effets modérés trouvés dans ce modèle peuvent être dûs au fait que les anticorps ont été catabolisés avant la phase de ponte des oeufs (\pm 4-5 semaines après le transfert).

De nouvelles expériences ont été réalisées : la première consistait à injecter un sérum provenant d'animaux naturellement résistants chez des animaux ayant reçu 10000 cercaires de *S. bovis* 4 semaines avant, en pleine phase de maturation des vers et en début de ponte. Le sérum a été injecté toutes les semaines jusqu'à semaine 12 d'infection. Aucune différence n'a pu être observée concernant la charge parasitaire, ni le nombre d'oeufs tissulaires et fécaux. Dans

une deuxième expérience, le sérum d'un groupe d'animaux infectés expérimentalement par 10000 cercaires, prélevé à semaine 4, 8 et 12 d'infection a été injecté chez des bovins préalablement infectés par 20000 cercaires. Le sérum a été injecté toutes les semaines à partir de la 4ème semaine, jusqu'à la 10ème semaine d'infection. Dans ces conditions, les animaux traités présentaient une réduction du nombre d'oeufs tissulaires et fécaux et du nombre de vers par rapport aux contrôles. De plus, les animaux ayant reçu un transfert de sérum à la semaine 8 et 12 d'infection présentaient une réduction plus importante du nombre d'oeufs tissulaires et fécaux que de réduction de vers, ce qui suggère que ces sérums, provenant d'animaux en phase de production d'oeufs, présentent des facteurs capables d'être létaux pour les vers, mais aussi capables de supprimer leur fécondité (Bushara *et al*, 1994).

Ces résultats nous indiquent que la suppression de la fécondité est une manifestation de la résistance acquise chez le bétail et fait appel à l'implication des facteurs sériques, cependant ces mécanismes sont encore mal connus.

Il faut donc tenir compte de deux situations :

- L'immunité acquise naturellement : les bovins provenant d'une zone d'endémie développent, face à un challenge massif, une forte résistance, s'exprimant au niveau de la charge et de la fécondité des vers. Le stade adulte semble pouvoir en être à la fois l'inducteur et la cible. L'inhibition de ponte constatée en conditions naturelles d'infestation est un phénomène actif et réversible, sous contrôle de facteurs sériques, en particulier.
- L'immunité induite expérimentalement : la résistance, dans le cas d'une primo-infestation, s'exerce à différents niveaux suivant la phase atteinte. Les facteurs sériques induits au cours de la phase précoce affectent la charge parasitaire sans altérer la fécondité des vers, alors que ceux produits en phase aigüe affectent les deux paramètres. En phase chronique, seule la ponte des parasites est diminuée. Là aussi, le stade adulte ou préadulte apparaît comme une cible potentielle alors que son rôle inducteur reste imprécis. Les expériences réalisées avec des larves irradiées ont d'autre part montré que les stades migratoires précoces étaient suffisants pour induire une résistance acquise dans ce modèle (Bushara *et al*, 1978).

8.4- L'immunité chez les petits ruminants

A- Les ovins

Des études réalisées en zone d'endémie au Soudan ont montré un comportement différent des ovins vis-à-vis de l'infestation naturelle (Majid *et al*, 1983). Ceux-ci présentent une excrétion fécale et une intensité d'infection qui augmentent avec l'âge des animaux, contrairement aux bovins de la même région qui voient leur excrétion fécale diminuée en intensité et en prévalence.

Ces résultats suggèrent que l'acquisition d'une résistance à la réinfection ne semble pas se produire chez le mouton en conditions d'infection naturelle. Cependant, lors d'infection expérimentale, il semble qu'une réduction de l'excrétion fécale se vérifie, associée à des améliorations physiologiques, qui semble donc suggérer une résistance acquise après infection expérimentale (Saad *et al*, 1984).

B- Les caprins

Les premières études (Monrad *et al*, 1990) sur la résistance acquise à la réinfection, chez des caprins (West African Dwarf), ont été réalisées sur une période de 34 semaines sur deux groupes d'animaux, l'un primo-infesté expérimentalement par 3000 cercaires par animal, l'autre primo-infesté au même moment recevant un challenge à la 17ème semaine d'infection par 2500 cercaires. Dans les deux groupes, le pic d'excrétion a été observé entre les semaines 8-12 après primo-infection et il est accompagné des mêmes aspects clinicopathologiques. Le challenge n'a pas induit une excrétion additionnelle d'oeufs, ni d'effets contraires chez les animaux primo-infectés. De ces travaux, ils en ont conclu que les caprins étaient capables d'induire une réponse régulatrice effectrice contre une infection unique par *S. bovis* ou contre une double infestation. Des travaux de la même équipe ont aussi démontré que l'effet anti-fécondité était un composant essentiel de la réponse immune soit dans une primo-infection soit après challenge par *S. bovis* (Johansen *et al*, 1997).

D'autres expériences ont confirmé que les animaux primo-infectés à faible dose pouvaient acquérir une résistance significative contre un challenge homologue, sur la base du nombre d'oeufs fécaux et des aspects clinicopathologiques. La réponse régulatrice semble plus efficace chez les animaux ayant été infectés par plusieurs doses de cercaires par rapport à une seule dose. Ces études ont permis de conclure que chez les caprins infectés par *S. bovis* la résistance acquise, mise en évidence par une réduction de l'excrétion fécale et une suppression des aspects clinicopathologiques après challenge, était associée à une diminution de la fécondité des vers et non à une inhibition et installation d'une nouvelle infection (Lindberg *et al*, 1997).

8.5- Protections croisées

Dans les zones d'endémie la susceptibilité à l'infection par *S. bovis* peut être aussi modifiée du fait de l'existence d'autres parasitoses dont l'agent responsable présente des antigènes proches du parasite *S. bovis*. Ces protections croisées ont été largement décrites chez les Trématodes.

Bovins

Les bovins sont protégés contre une infestation d'épreuve par *S. bovis* s'ils ont déjà été mis en contact avec *S. haematobium* ou avec *Orientobilharzia* (Massoud et Nelson, 1972).

D'autres observations de protection croisée ont été décrites, des bovins "Sudanese zebu" ayant une primo-infection en phase patente par *Fasciola gigantica* sont très résistants à l'infection d'épreuve par des cercaires de *S. bovis* et vice-versa (Yagi *et al*, 1986). Une résistance à un challenge hétérologue par *Fasciola hepatica* a été démontrée chez des bovins ayant une primo-infection par *S. bovis* en phase patente, présentant une réduction du nombre de douves de 30% (Sirag *et al*, 1981).

Ovins

L'infection par *S. bovis* protège le mouton contre *Fasciola hepatica*, uniquement si la primo-infestation est en phase patente (7-8 semaines) ou prépatente (2-3 semaines), mais non en phase chronique (16-17 semaines) (Monrad *et al*, 1981).

Des travaux plus récents ont démontré que des ovins infectés par *Fasciola hepatica* ayant reçus, après 10 semaines d'infection, un challenge par *S. bovis* présentaient une protection de 87% de réduction du nombre de vers par rapport au groupe contrôle. Par contre aucune protection contre la schistosomiase n'a pu être observée chez des animaux infectés par *S. bovis* ayant reçu un challenge par *Fasciola hepatica* 6 semaines plus tard. Cette étude suggère, que d'une part, *Fasciola hepatica* échappe au système immunitaire de l'hôte, bien que provoquant une réponse humorale et cellulaire contre des épitopes non-essentiels pour lui, mais qui peut être létale pour *S. bovis*. D'autre part, les mécanismes déclenchés par *Fasciola hepatica* agissent sur les stades précoces de *S. bovis* mais non sur les vers adultes (Rodriguez-Osorio *et al*, 1993).

Rongeurs et primates

Les premières observations de protection hétérologue par *S. bovis* date de 1968, où des souris et des singes rhésus étaient partiellement protégés contre un challenge par *S. mansoni* s'ils avaient été préalablement exposés à *S. bovis* ou à *S. mattheei* (Amin *et al*, 1968; Amin et Nelson, 1969; Nelson *et al*, 1968).

S. bovis est capable de protéger des souris contre une infestation d'épreuve par *Fasciola hepatica* et par *Echinostomum*, à condition que le challenge ait lieu durant la phase chronique de la primo-infestation (Christensen *et al*, 1981). De même, en système homologue (*S. bovis* versus *S. bovis*), les souris sont protégées à 65% en terme de vers adultes et à 49% en terme de nombre d'oeufs (Massoud et Nelson, 1972).

L'infection par *S. bovis* protège le babouin comme le singe rhésus contre une infestation d'épreuve par *S. mansoni* (Taylor, 1975). Il est intéressant de souligner que les larves de *S.*

bovis ne parviennent pas à maturation dans ces espèces, ce qui semble suggérer que le stade adulte n'est pas forcément nécessaire au développement de la réponse protectrice.

9- Essais de protection chez *Schistosoma bovis*

S. bovis est l'un des premiers parasites utilisé dans des études de l'immunité hétérologue (protection croisée), en effet, il a été démontré qu'une immunisation par *S. bovis* pouvait protéger partiellement, souris et babouins, contre un challenge par *S. mansoni* (Nelson *et al*, 1968 ; Amin *et al*, 1968 ; Taylor *et al*, 1973b) et singes rhésus contre un challenge par *S. mansoni* ou *S. haematobium* (Hsu *et al*, 1966 ; Amin *et al*, 1968 ; Eveland *et al*, 1969).

Les premiers travaux sur les effets protecteurs de *S. bovis* ont été réalisés par Bushara *et al* (1978) chez des bovins « Zebu » immunisés par des cercaires irradiées ou schistosomules de *S. bovis*. Les animaux vaccinés présentaient une augmentation de poids associée à une réduction des lésions histopathologiques. De plus, une réduction de 64% de la charge parasitaire, de 60% du nombre d'oeufs tissulaires et de 80% du nombre d'oeufs excrétés a été enregistrées, par rapport aux animaux non-vaccinés. Par contre, les divers protocoles d'immunisation ou le fait d'immuniser par des cercaires/ ou des schistosomules irradiés n'entraînaient pas de différences significatives.

Quelques expériences ont été réalisées chez un autre hôte naturel, l'ovin. Dans ce cas, l'immunisation par des cercaires ou schistosomules irradiés ou par des schistosomules irradiés atténués cryopréservés, ont montré également une protection de longue durée (au moins 37 semaines) vis-à-vis d'un challenge par des cercaires normales de *S. bovis*. Cette protection s'exprime par la réduction de la charge en vers et des oeufs fécaux (Hussein et Bushara, 1976b ; Taylor *et al*, 1979 ; James *et al*, 1985).

Des résultats similaires ont été observés chez des ovins immunisés par des cercaires ou schistosomules irradiés de *S. mattheei*, suivie d'une infection d'épreuve homologe (Taylor *et al*, 1976 ; Bickle *et al*, 1979) mais aucune protection n'a été observée dans le cas d'une infection d'épreuve hétérologue, par *S. bovis* (Massoud et Nelson, 1972 ; Bickle *et al*, 1979).

D'autre part, des larves irradiées de *S. bovis* ne protègent pas contre *Fasciola hepatica*, dans le modèle caprin (El Sanhoury *et al*, 1987).

Beaucoup moins d'expériences ont été réalisées dans les modèles expérimentaux murins. L'équipe de Murare et Doenhoff (1987a) a fait une étude comparative entre des souris normales et des souris déficientes en cellules-T. Les premières présentaient une réaction de "self-cure" 10 semaines après l'infection par *S. bovis*, tandis que les souris déficientes en cellules-T ne la présentaient pas et survivaient plus longtemps. Cette réaction de "self-cure" s'exprimait par une réduction du nombre de vers adultes entre les semaines 10-13 après infection (au même temps d'infection pour le groupe déficient en cellules T), une réduction du nombre d'oeufs totaux dans le foie. Cependant, aucune différence au niveau du nombre d'oeufs foie/femelle ou nombre d'oeufs totaux dans l'intestin et nombre d'oeufs intestin/femelle n'ont été obtenues entre les deux souches de souris. Le taux d'oeufs excrétés était inférieur chez les souris déficientes en cellules T.

Des études complémentaires (Murare *et al*, 1987b) sur la réponse immune et sur la pathologie entre ces deux groupes de souris ont montré des titres plus élevés d'IgM et d'IgG (contre les antigènes stade adulte et l'oeuf) et de transaminase (GOT) chez les souris normales et une hépatotoxicité des oeufs au niveau du foie plus marquée. Ces aspects diffèrent dans l'infection des souris déficientes en cellules T par *S. mansoni* en comparaison avec *S. bovis*, suggérant l'existence de composants différents au niveau des oeufs qui impliqueraient une réponse immunologique d'hépatotoxicité de nature différente (Byram *et al*, 1979 ; Lucas *et al*, 1980 ; Doenhoff *et al*, 1981 ; Dunne *et al*, 1981).

Des travaux plus récents d'Agnew *et al* (1989) établissent chez la souris un système de protection croisée par des cercaires irradiées. Des souris exposées à des cercaires irradiées (20krad) et suivies d'une infection d'épreuve, ont montré des niveaux significatifs de résistance:

- dans le système homologue (46-53% pour *S. haematobium*; 36-50% pour *S. bovis* et 39-59% pour *S. mansoni*) ;
- dans le système hétérologue, *S. mansoni* ne protège pas contre un challenge par *S. haematobium* (partiellement) ou *S. bovis* ; *S. haematobium* ne protège pas contre un challenge

par *S. mansoni* ou *S. bovis*, mais *S. bovis* protège contre un challenge par *S. haematobium* (34-56%) mais pas contre *S. mansoni*. Ces résultats diffèrent de ceux décrits antérieurement par Nelson *et al* (1968), mais les conditions d'expérimentation diffèrent en ce qui concerne l'hôte et des doses de cercaires irradiées.

L'induction d'une protection croisée reflète les relations phylogénétiques entre ces espèces, *S. bovis* et *S. haematobium* plus proches par rapport à *S. mansoni*. Ces conclusions sont ainsi confortées du fait que les schistosomes à éperon terminal, *S. bovis* et *S. haematobium*, présentent des phénomènes d'attrition immune, dans le modèle murin, absents chez *S. mansoni* et *S. japonicum* (Agnew *et al*, 1993).

D'autres essais de protection ont été réalisés avec des protéines spécifiques de *S. bovis*, en particulier une protéine de 28kDa (GST), sous forme native ou recombinante qui a induit des niveaux significatifs de protection (Bushara *et al*, 1993 ; De Bont *et al*, 1997). Ces travaux sont décrits dans le chapitre I, § 11.6.

La rSb 28GST a aussi été utilisée dans le modèle expérimental souris, travaux présentés au cours de ce mémoire.

RESULTATS

ARTICLE 1

La plupart des connaissances acquises dans le domaine des schistosomiasés animales a été obtenue dans les infections par *S. bovis*, *S. japonicum* et *S. mattheei*.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à *S. bovis*, espèce dans laquelle les différentes études expérimentales dans l'hôte naturel ont montré une résistance acquise à la réinfection après infection naturelle ou expérimentale. Dans cette infection, les effets sur la fécondité et la viabilité des oeufs sont plus marqués, par rapport aux autres schistosomes parasitant l'homme ou l'animal. Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont très peu connus. Ils impliqueraient des facteurs sériques, mais aussi cellulaires par le biais des cytokines produites et libérées. A l'heure actuelle, seule la participation humorale a été démontrée par des études réalisées sur le terrain.

L'hôte naturel d'infection par *S. bovis* apparaît comme un modèle d'étude intéressant, car il représente l'hôte approprié. De plus, *S. bovis* fait partie du même complexe que *S. haematobium* et *S. intercalatum*, schistosomes infectant l'homme, ce qui ouvre des perspectives dans le domaine des vaccins vétérinaires et humains. Cependant, la difficulté de manipulation de ces animaux, le coût élevé, mais aussi la disponibilité restreinte de matériel biologique et de réactifs immunologiques limitent l'utilisation de ces modèles.

Pour ces différentes raisons, nos études ont été développées dans un modèle d'infection expérimental : le modèle murin, qui présente le double avantage de la diversité et de la disponibilité des réactifs.

Dans ce contexte, les travaux que nous avons développés se sont attachés à l'étude du comportement de ce parasite au cours de l'infection murine, à l'analyse de la réponse humorale et cellulaire mais aussi à la compréhension et la régulation des mécanismes immunitaires développés. Cette étude nous a permis au travers des données parasitologiques et immunologiques de définir les paramètres de l'infection par *S. bovis* dans ce modèle et nous a ouvert de nouvelles perspectives dans la caractérisation des antigènes spécifiques de *S. bovis* .
(Articles 1 et 2)

ARTICLE 1

ANALYSE DES PARAMETRES PARASITOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DANS L'INFECTION MURINE PAR *Schistosoma bovis*.

La réponse humorale et cellulaire au cours de l'infection par *S. bovis* a été évaluée sur des souris OF1 et BALB/c infectées par 160 cercaires, sur une période de 11 semaines. De même, les paramètres parasitologiques analysés en terme de charge en vers et en oeufs tissulaires ont été analysés.

Cette analyse nous a révélé :

- une réduction de la charge parasitaire, particulièrement marquée pour les vers femelles, entre les jours 60 et 80 de l'infection, qui suggère une susceptibilité plus importante des vers femelles aux mécanismes d'attrition immune.

- une forte production d'anticorps spécifiques d'isotype IgG1, IgE et IgA, associée à une production, par les cellules spléniques, de cytokines type Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) après l'oviposition.

- contrairement aux résultats rapportés au cours de l'infection murine par *S. mansoni*, la production d'IL-10 chez *S. bovis* apparaît plus précocement avant l'oviposition.

Ces résultats soulèvent d'autres questions sur la grande susceptibilité de *S. bovis* vis-à-vis des phénomènes d'attrition immune, qui affectent préférentiellement les vers femelles et qui suggèrent leur implication possible au niveau des mécanismes de régulation de la fécondité.

**MURINE *SCHISTOSOMA BOVIS* INFECTION : ANALYSIS OF PARASITIC
AND IMMUNE PARAMETERS.**

**Alexandra VIANA DA COSTA*¹, Sophie GAUBERT¹, Josette FONTAINE¹,
Sophia LAFITTE¹, Antonio SEIXAS², Maria de Lourdes SAMPAIO SILVA²,
André CAPRON¹ & Jean-Marie GRZYCH¹.**

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

² Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, Laboratorio de Parasitologia, 16, R. Sao Luis, Porto Portugal.

running title : Murine *Schistosoma bovis* infection

Keywords *Schistosoma bovis*, infection, immune responses, cytokines

*Corresponding author : Tel .(33) 3 20 87 78 09

Fax (33) 3 20 87 78 88

E mail:A-monica.Vianadacosta@pasteur-lille.fr

SUMMARY

Humoral and cellular responses to *Schistosoma bovis* antigens have been evaluated over a period of 11 weeks in mice exposed to *S. bovis* cercariae and data analyzed in the context of the parasitic parameters (worm and egg loads) recorded at days 30, 60 and 80 of the ongoing infection. Results revealed a decrease of worm burden particularly marked for female worms, between day 60 and day 80 of infection suggesting a higher susceptibility of female schistosomes to attrition mechanisms. The B-cell response, studied by measuring the production of different isotypes, was directed against different stage specific antigens, with a predominance of IgG1 antibodies associated with a significant increase of IgA and IgE antibodies after egg deposition. The T-cell response, assessed after *in vitro* stimulation of splenocytes, showed a predominant production of Th-2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10) occurring after egg laying. Interestingly in contrast to *S. mansoni* infection the Th-2 polarization did not seem to be exclusively triggered by egg-associated antigens since significant amounts of IL-10 were produced after stimulation with adult worm antigen preparation (SWAP) before the beginning of egg deposition.

INTRODUCTION

Schistosoma bovis is widely distributed in many African countries (Christensen, Mutani & Frandsen 1983) where naturally acquired infections have been reported in cattle, sheep and goats (Pitchford 1977). This infection is characterized in the short term by very slight clinical changes, but in the long term as a long-standing chronic disease. Pathology is essentially linked to damage caused by egg excretion through the wall of small and large intestines, which induces severe intestinal lesions accompanied by weight loss, nutritional as well as growth problems and catabolic and metabolic disfunctions (Dargie 1980, Lindberg *et al.* 1995). Cattle schistosomiasis causes major economic losses by reducing animal breeding. Chemotherapy is expensive and alone is inefficient against reinfection. Even now, the real veterinary impact of this infection is underestimated.

Naturally acquired resistance to challenge exposure to *S. bovis* has been described in cattle and goats, acting through impairment of worm fecundity, by reducing fecal egg count, and/or by limiting worm burden (Bushara *et al.* 1980, Bushara *et al.* 1983a, Majid *et al.* 1980). Evidence of partial resistance to *S. bovis* infection has also been demonstrated in calves after immunization with irradiated schistosomula or cercariae (Bushara *et al.* 1983b), but this strategy could not be applied on a large scale because of the requirement for cryopreservation and enormous amounts of antigen. Thus, current research is directed towards the production of defined antigens and non-living vaccines.

Protective antigens such as schistosome glutathione S-transferases (GSTs) (Balloul *et al.* 1987) have given promising results in both experimental and natural infections. Experiments performed in the Sudan, in calves immunized with the Sb28GST native protein showed highly significant reductions in fecal egg counts with no effect upon worm number (Bushara *et al.* 1993), indicating a strong effect upon parasite fecundity. However, studies performed in goats immunized with rSb28GST demonstrated a reduction in the worm burden (48%) and an increase of the body weight, without any effect on schistosome fecundity (Boulanger *et al.* 1994). These results emphasize the differences in the effect of vaccination according to the animal model and immunization protocols.

Fundamental questions in the dynamics of schistosome infections remain unanswered,

hampering the development of epidemiological models, and consequently of tools and strategies for control.

The *S. bovis*/cattle system is very attractive as a study model since represents a natural host system and also, because *S. bovis* belongs to the same species complex as the human pathogens *S. haematobium* and *S. intercalatum*, results obtained are relevant to the acceptability of veterinary and human vaccines.

Animal models represent a tool to understand immune and anti-fecundity mechanisms in animal and human infections. The major problem with natural hosts in *S. bovis* infection is related to the cost of the studies, and is also limited by the restricted access to specific anti-cytokine reagents.

In order to avoid these problems, we have studied *S. bovis* infection in the murine model, which is justified by the availability of specific reagents, a lower cost and easy manipulation and allows the analysis of possible relationships between parasitological parameters and the expression of humoral and cellular responses during the time course of infection, together with the evolution of the host-parasite relationship.

MATERIALS AND METHODS

Host animals and parasites

The Salamanca strain (Spain) of *S. bovis* was maintained in *Bulinus truncatus* snails as intermediate hosts and golden hamsters as definitive hosts (Porto laboratory). For experimental infections, cercariae were used within 1h after collection from 35 day infected snails incubated 30 minutes at 37°C and then exposed to light and to a temperature of 30°C for 1h. Female BALB/c and OF1 mice, 6 to 8 week old at the beginning of the experiment, were purchased from Iffa Credo (I'Arbresle, France).

Infection protocols

Animals were exposed percutaneously to 160 *S. bovis* cercariae at day 0. Infected mice were bled through the retroorbital sinus every two weeks during the time course of the experiment.

Worm recovery and tissue sampling

Animals were sacrificed at different periods of the infection by injection of pentobarbital solution.

The intensity of the infection was assessed by total perfusion to determine worm burden. Tissue egg loads were evaluated after alkali digestion of livers and intestines in 4% KOH solution, incubated for 16 h at 37°C. Aliquots of the final suspension were counted under the microscope.

Antigens

Soluble worm adult proteins (SWAP bovis) were prepared from adult worms washed in phosphate buffered saline (PBS), homogenized with an Ultra-turrax (Janke et Kundel, IKA Labortechnik) for 1 min, disrupted by a 5 min sonication (Labsonic U., B. Braun), and centrifuged for 20 min at 10,000 g.

Soluble egg antigens (SEA bovis) were extracted from homogenized eggs isolated from the livers of 55-day infected hamsters. Briefly, frozen eggs were disrupted by 10 passages through an X-press (A.B. Biox, Jarfalla, Sweden) and the soluble fraction was collected after centrifugation for 15 min at 10,000 g.

Cercarial soluble antigens (FC bovis) were prepared from cercariae washed in PBS at 4°C, disrupted by a 5 min sonication, and centrifuged for 15 min at 10,000 g. *S. mansoni* SWAP and SEA antigens were prepared as described for *S. bovis* antigens.

The recombinant *S. bovis* glutathione-S-transferase (rSb28GST) was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strain TGY 73.4 containing the plasmid pTG8887 (Trottein *et al.* 1992). rSb28GST protein was purified (98%) by passage through a glutathione-Sepharose column. The recombinant *S. mansoni* glutathione-S-transferase (rSm28GST) was expressed in *Escherichia coli* by using a PL expression vector (Courtney *et al.* 1984) and purified under similar conditions (95%).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc, Intermed S.A., Denmark) were incubated overnight at 4°C with a 5µg/ml solution of either SWAP bovis, SEA bovis, FC bovis or rSb28GST antigen diluted in sodium carbonate buffer (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.6 ; 100 µl per well). After two washes with PBS-0.1% Tween 20, plates were saturated for 1 h with 0.5% gelatin-PBS solution (200µl/well). The amounts of specific mouse antibody bound to each antigen preparation were measured using the appropriate anti-mouse Ig isotype specific reagent, diluted in PBS-0.1% Tween 20 as follows : IgM, goat-horseradish peroxidase (HRP) conjugate, anti-

mouse IgM (used at 1:15000, Clonotyping System-Southern Biotechnology Associates Inc., USA) ; IgG1, goat anti-mouse IgG1 HRP (1: 10000, SBA Inc.); IgG2a, goat anti-mouse IgG2a-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgG2b, goat anti-mouse IgG2b-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgG3, goat-anti-mouse IgG3-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgA, goat anti-mouse IgA biotin (1:6000, Sigma) with streptavidin-peroxidase conjugate (1:2000, Amersham, France); total IgG, sheep-anti-mouse IgG-HRP (1:20000, Sanofi Diagnostic Pasteur, France); IgE, rat anti-mouse IgE biotin (1:750, PharMingen - San Diego Calif.) with streptavidin-peroxidase conjugate (1:2000, Amersham, France). Mouse sera were tested at a dilution of 1:200, except for total IgM, IgG and IgE assays diluted respectively, at 1:400, 1:1000 and 1:10 in PBS-0,1% Tween 20 buffer and incubated overnight at 4°C. Assays were developed for 30 min at 37°C using O-phenylenediamine (1mg/ml,Sigma) (100µl/well) and reactions were stopped with HCl 2N (100µl/well). Colour development was measured spectrophotometrically at 492 nm (Titertek Multiskan^R Mcc 1340, Labsystems). Values correspond to the mean of duplicate assays.

Cytokine culture medium and reagents

For all cultures, RPMI 1640 (Gibco,Courbevoie, France) was supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (JRH BioSciences, Lenexa,Kans), gentamicin (50µg/ml; Schering-Plough, Levallois-Perret, France), 2mM glutamine (Seromed, Berlin, Germany), 1% non-essential amino acids (Seromed), 1mM sodium pyruvate (Sigma), and 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany).

Cytokine production was evaluated by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific monoclonal antibodies (mAb) purchased from PharMingen (San Diego, CA.). For IFN- γ detection, purified anti-IFN- γ mAb R4-6A2 was used in combination with the biotinylated anti-IFN- γ mAb XMG1-2. Purified anti-IL-4 mAb and biotinylated anti-IL-4 mAb were derived from clones BV4-1D11 and BVD6-24G2, respectively. Purified anti-IL-5 mAb and biotinylated anti-IL-5 mAb were purified from clones TRFK5 and TRFK4, respectively. Purified anti-IL-2 mAb and biotinylated anti-IL-2 mAb were obtained from clones JES6-1A12 and JES6-5H4, respectively. Purified anti-IL-10 mAb and biotinylated anti-IL-10 mAb were obtained from clones JESS-2A5 and SXC-1(B), respectively. Recombinant mouse IL-4 (rIL-4), rIL-5 and rIL-10 were from PharMingen , rIFN- γ and rIL-2 were purchased from Genzyme

(Cambridge, U.K.)

Cytokine production

Spleens were removed from infected mice, and cell suspensions were prepared as previously described (Grzych *et al.* 1991). Briefly, spleens were forced through fine wire mesh and splenic erythrocytes were lysed by osmotic treatment (170mM Tris-buffered saline, 155mM ammonium chloride solution) followed by three washes in RPMI 1640. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion and 10^7 cells were resuspended in 1 ml of culture medium. One milliliter of cell suspension was incubated alone or in the presence of SWAP bovis (50µg/ml), SWAP mansoni (50µg/ml) or SEA bovis (50µg/ml), SEA mansoni (50µg/ml) or rSb28GST (50µg/ml), rSm28GST (50µg/ml) antigens or concanavalin A (5µg/ml, Seromed) in 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected after 24 h for IL-2 and IL-4 measurements and after 72 h for IFN γ , IL-5 and IL-10 measurements.

Cytokine assays

Cytokine detection was performed on Maxisorp plates coated overnight at 4°C with 100 µl/well of purified anti-cytokine mAb in coating buffer (0,1 M NaHCO₃, 0,1 M Na₂CO₃, pH9,6), except for IL-10 where mAb was coated in PBS buffer, at 2 µg/ml, 0.25 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml and 2µg/ml for anti-IFN- γ mAb, anti-IL-4 mAb, anti-IL-2 mAb, anti-IL-5 mAb and anti-IL-10 mAb respectively. Unoccupied sites were blocked with 200 µl/well of PBS-0.5% gelatin for one hour. Supernatants were added and incubated overnight at 4°C; plates were incubated for 90 min at 37°C with biotinylated anti-cytokine mAb (100 µl/well) diluted in PBS-0.1% Tween-20 at 0.4 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml and 1.0 µg/ml for biotinylated anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-2, anti-IL-5 and anti-IL-10 mAb respectively. Amplification and detection with streptavidin-peroxydase conjugate were performed as previously described for ELISA assays. Cytokine concentrations were calculated by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. Values were ranged between 0.1 to 10 ng/ml for IL-5, IL-10 and IFN- γ , between 1.56 to 100U/ml for IL-2 and between 20 to 1250 pg/ml for IL-4.

Statistics analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t* -test. A value of $p < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Parasitological Parameters

Results presented in Table 1 and 2 summarize the follow up study performed in two different infection experiments carried out in OF1 and BALB/c mouse strains. Data indicate that both strains are susceptible to *S. bovis* infection, since adult worms are recovered until day 80 post-infection. Interestingly, whereas no significant decrease in the total number of worms is observed, a marked reduction in the number of female worms is recorded, 79 % in OF1 ($p < 0.014$) and 85% in BALB/c ($p < 0.015$). In contrast, the number of male worms remains stable between the 2 time points of the experiment.

Evaluation of the tissue egg loads both in liver and intestine reveals the presence of eggs at day 60 (23 days after the beginning of egg laying) as well as at day 80. It is important to notice that a major trapping of eggs is observed in liver when compared to intestine. Since the female worm population decreases significantly between day 60 and day 80, it seems difficult to consider the number of eggs per female worm at the end of the experiment and we should most accurately consider the total number of eggs/g of tissue.

Antibody responses during *S. bovis* infection

The production of specific antibodies to *S. bovis* antigens was monitored during 80 days in mice infected with 160 cercariae. Results summarized in Fig. 1-2, indicate a strong signal for IgG1, IgG2b, IgG2a subclasses against SWAP and FC bovis antigens in the OF1 mice. A progressive increase from day 30 to day 80 is recorded, whereas a weak signal for specific IgM and IgA antibodies is observed. Specific antibodies to SEA bovis antigen are predominantly of IgG1 and IgA subclasses after day 55. No significant signal is observed for IgG2a and IgM. The antibody response to rSb 28GST antigen is almost inexistant.

In BALB/c mice, a strong signal is detected for specific anti-SWAP bovis IgG1 and IgM, whereas a weak signal is noticed for IgG2a and IgA. During the time course of infection, the Ab

responses toward FC bovis antigens are variable, with a marked signal for IgG1, IgM and IgA after day 55. Furthermore, antibodies detected against SEA bovis antigen are predominantly of the IgG1 and IgA isotypes and a significant and progressive signal is also recorded for IgM, after day 55. No significant response for IgG2a is detected. The antibody response detected against rSb 28GST antigen is again very weak. In OF1 mice, specific IgE antibody responses against *S. bovis* antigens remain low until day 55 and increase thereafter (Fig 3A), while an earlier and stronger signal is observed in the BALB/c strain. (Fig 3B)

Cytokine Production

Cytokine production was only analysed in BALB/c mice, since outbred OF1 mice do not allow the pooling of cells for this study. Figures 4 and 5 summarize the analysis of the *in vitro* cytokine production of spleen cells stimulated with ConA or parasite antigens at days 30,60 and 80 post-infection. No significant production of IL-2 or IFN γ is observed after antigenic stimulation, at the three time points. Although response for IFN γ is present at day 30 after SEA bovis stimulation, it is absent thereafter. No significant production of IL-4 and IL-5 is observed at day 30, after antigenic stimulation. But IL-4 production is elicited in splenocytes culture at days 60 and 80 with SWAP or SEA bovis antigens, and is higher at day 60 than at day 80.

Similar results are recorded for IL-5 production in response to SEA bovis stimulation, the strongest IL-5 production in response to SEA bovis is recorded at day 60 when compared to day 80. No significant response is detected with SWAP bovis at the same time points. Only a weak IL-5 production is observed at day 80 in splenocyte culture with rSb28 GST. IL-10 production is elicited in splenocytes after SWAP or SEA bovis antigen stimulation at days 30,60 and 80. A stronger IL-10 production in response to SWAP bovis is observed at day 30, decreasing thereafter (days 60 and 80). In contrast, IL-10 production in response to SEA bovis is weak at day 30, but increases at days 60 and 80.

In parallel, stimulation of splenocytes with the corresponding *S. mansoni* antigen preparations, led to the same cytokine production pattern, but at a lower magnitude, except at day 60 where no significant production of IL-5 is observed with SEA mansoni when compared to SEA bovis.

DISCUSSION

Data reported here address several questions about the host-parasite relationship in mice experimentally exposed to *S. bovis* with regard to the parasitological, humoral and cellular parameters recorded in our experiments.

Analysis of the parasitological parameters indicated a slight decrease in total worm numbers during the time course of the *S. bovis* infection, being pronounced between day 30 to 60 and day 30 to 80 rather than between day 60 to 80. Interestingly, this reduction was much more marked for the female worm burden since reductions of 79% (OF1) and 85% (BALB/c) were recorded. In these experiments male/female ratio was 4:1 at day 60, and 22:1 at day 80. Other infection experiments (data not shown) performed in BALB/c mice demonstrate a ratio of 2:1 and 3:1 at day 47 (Mean of 5 different infection experiments : total worm burden $45,0 \pm 2,5$; female burden $14,8 \pm 1,5$), later in infection (days 94 ; 127) less or no worms were found.

The heterogeneity in the worm recovery from each animal is a real phenomenon, possibly associated with *S. bovis* host-parasite relationships and is not involved in technical problems of infection protocol and perfusion. Data recorded from total worm recovery in natural and experimental (mouse) *S. bovis* infections are sometimes variable (Bushara *et al* 1980, Agnew *et al.* 1993, Murare & Doenhoff 1987).

S. bovis eggs were mainly sequestered in the liver rather than in the small intestine. In BALB/c mice, the number of eggs/g/f (liver ; intestine) increased from day 60 to day 80, by a factor of 3.5 and 2.0, respectively. In OF1 mice this increase was less marked (2.4 and 1.3 respectively).

Similar results have been already reported by Agnew *et al.* in CBA/ca *S. bovis* infected mice, where the worm burden remained stable over a period of 6 weeks after the cercarial challenge, followed by a rapid reduction 3 weeks after the start of the egg laying. However no data were given by these authors concerning individual female worm burdens. In contrast, in T-cell deprived animals an increase in the adult life span, worm burden and total numbers of hepatic eggs have been reported at the same period of infection. No comparable reductions were observed in *S. mansoni* or *S. japonicum*, but a significant reduction in the rate of egg

production was reported in murine and human *S. haematobium* infections (Murare & Doenhoff 1987, Murare *et al.* 1987, Agnew *et al.* 1996).

In this context, our data further support the idea that, in contrast to *S. mansoni* or *S. japonicum*, *S. bovis* adult worms appear to be more vulnerable to immune attrition, independently of the mouse strain. Mechanism(s) underlying the susceptibility of adult worms still remain unclear but several hypotheses could be proposed. The mouse is an unsatisfactory definitive host to maintain the parasite life cycle since mature schistosomes arrive to full patency but present a short life-span. This, together with anatomic modifications, portal hypertension and vascular changes induced both by the egg-associated liver pathology and the worms themselves may account for this. Furthermore it has been shown that the passive transfer of sera collected from animals with acute infections into T-cell deprived mice significantly reduced the worm burden, suggesting the involvement of specific immune factors. Other experiments carried out in natural hosts have also stressed the importance of serum factors in the reduction of faecal and tissue egg output, indicating an impairment of the worm fecundity since negligible effects on worm burdens were recorded (Bushara *et al.* 1983a). These effects appear to be correlated to the period of infection when sera were collected from donor calves (Bushara *et al.* 1994).

Comparative studies between *S. bovis* and *S. mansoni* egg hepatotoxicity demonstrated important differences. Eggs of both schistosome species are similar with respect to the T-dependence of granuloma induction, but they differ in their effect on livers from T-cell deprived mice. *S. bovis* eggs exerted low toxicity on deprived mouse hepatocytes and there was no hepatocellular damage around eggs, in contrast to the hepatotoxicity observed in *S. mansoni* - infected immunosuppressed mice (Byram & Lichtenberg 1977, Byram *et al.* 1979, Lucas *et al.* 1980). The *S. mansoni* egg induced hepatotoxicity can be reversed by transferring homologous chronic serum or anti-*S. mansoni* egg serum, but not by anti-*S. bovis* serum (Murare *et al.* 1987).

Since in our experiments elimination of female worms seems to be linked with the egg laying, we might suppose that this phenomenon may be related to the participation of serum factors and/or related to egg excreted antigens. Moreover, egg antigens induce different pathologies

and may also elicit an immune response more directly against worms. Phylogenetic divergence and schistosome egg elicited immune responses may in some way explain these differences in the development of *S. bovis* and *S. mansoni* infections.

In our experiments the kinetic analysis of isotype antibody responses to different *S. bovis* antigens indicated a polyisotypic response in the OF1 strain, with expression of all IgG subclasses and weak responses for IgM and IgA. Predominant IgG1 and IgA response to SEA were observed after egg deposition. In the BALB/c strain, a permanent anti-SWAP IgG1 response was observed during the time course of the infection, accompanied by an anti-SWAP IgM response after the onset of oviposition. On the other hand, a permanent IgM response was recorded against SEA antigen with anti-SEA IgG1 and IgA production only after egg deposition and no significant IgG2a production. An IgA response to FC bovis antigen was also observed after egg deposition which might reflect antigenic communities between different stages of the parasite. These intense productions of IgG1 and IgA after egg deposition associated with a weak IgG2a response has been also described during murine *S. mansoni* infection in which comparative studies between uni and bisexual infections support the idea that eggs or egg-associated antigens play an important role in the induction of the IgA antibody response to schistosomes (Mountford, Fisher & Wilson 1994, Poulain *et al.* 1996). The marked IgM response found after egg deposition might be linked to carbohydrate epitopes, which are known to be well represented in SEA antigen. Furthermore, a weak immune response was found against rSb28GST antigen during the time course of *S. bovis* infection, as has already been reported for other schistosome infections (Boulanger *et al.* 1994).

It has been shown that cytokines derived from T cells play a critical role in isotype switching. Lymphocytes of the Th1 subset are characterized by the secretion of IFN γ and IL-2, whereas those of the Th2 subset produce IL-4, IL-5 and IL-10 (Golding, Zaiteva & Goding 1994). In our experiments, performed in BALB/c mice, an intense production of IL-4 and IL-5, coincident with the beginning of egg deposition, was observed, accompanied by low levels of IFN γ and IL-2 production. The association of IL-4 and IL-5 production together with the

induction of IgG1 and IgA support the Th2 nature of the immune response, previously described in *S. mansoni* experimental infection (Poulain *et al.* 1996).

Velupillai & Harn 1994 have demonstrated that lacto-N-fucopentose (LFNP III) is capable of inducing IL-10 via the Lewis^x determinant and that this sugar is present in SEA from *S. mansoni*. Interestingly, in our studies the early IL-10 production induced by SWAP bovis antigen at day 30 raises some questions about the Th2 polarization. The analysis of SWAP and SEA bovis / mansoni indicate that Lewis^x is more represented in SEA antigens when compared to SWAP antigens (data not shown). This suggests that IL-10 production before egg deposition is not essentially induced by this sugar but perhaps by other(s) carbohydrate(s) components or other antigens. The most likely explanation is that adult worms and egg antigens share homologous proteins and carbohydrates, thus allowing cross reactions which are expressed at cellular and humoral levels (Mountford, Fisher & Wilson 1994, Omer-Ali *et al.* 1988).

In BALB/CS. *bovis* infected mice, production of IgE was observed between weeks 8 and 10, just before worm elimination. It is accepted that immunity to helminths involves eosinophils, macrophages, platelets, mast cells and IgE, and thus it seems reasonable to assume that immunity might be dependent on Th2 cells (Finkelman *et al.* 1991). In *S. mansoni* infection this response seems to be associated with pathology (Wilson 1993). Studies in this latter model revealed that depletion of eosinophils or IgE antibodies using, respectively, anti-IL4 or anti-IL5 treatment does not affect anti-schistosome immunity in mice (Sher *et al.* 1990). This leads to the idea of a synergistic interaction between other cell subsets and other cytokines. A possible role for the Th1 subset was supported by the studies of Smythies *et al.* (1992), which demonstrate the importance of IFN γ produced by CD4+T helper cells in anti-schistosome effector mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae. Th1 and Th2 cell involvement has been also suggested in human schistosomiasis (Couissinier & Dessein 1995).

In the murine infection, the importance of Th1 or Th2 responses conferring resistance to parasitic infection seems to be largely dependent on the type of parasite (intra or extracellular) and it is less clear whether Th2 responses elicited by parasites play some protective effect or whether they promote parasite survival. Accumulating evidence suggests that preferential Th1 or Th2 responses not only influence the type of protection mechanisms against offending agents,

but may also be responsible for some immunopathological disorders (Del Prete, Maggi & Romagnani 1994).

Our studies raise many questions about the mechanisms underlying the preferential female worm burden reduction, and the possible role in fecundity mechanisms and regulation. This kind of kinetic parasitological studies have never been fully explored in natural hosts, so it seems to be interesting to analyse these phenomena. Studies are already in progress in acute and chronic *S. bovis* murine infection to clarify both at the humoral and/or cellular levels the antibody and/or cell subsets involved in these mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr Claudie Verwaerde, Dr Colette Dissous and Dr Raymond Pierce for their helpful discussions. These investigations received financial support from the European Economic Community - Fellowship Grant contract ERBCHBICT 941496. This work was also supported by the Institut Pasteur de Lille, IFR n°17, Unité INSERM U-167.

We also would like thank to A.Silva and M.Lurdes Delgado for maintaining the *S. bovis* life cycle.

REFERENCES :

- Agnew, A. M., H. M. Murare, and M. J. Doenhoff (1993) Immune attrition of adult schistosomes. *Parasite Immunology* **15**, 261-271.
- Agnew, A., A. J. C. Fulford, M. T. Mwanje *et al* (1996) Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans. *American Journal of Medicine and Hygiene* **55**, 338-343.
- Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer *et al* (1987) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* **326**, 149-153.
- Bashir, M., Q. Bickle, H. O. Bushara *et al* (1994) Evaluation of defined antigen vaccines against *Schistosoma bovis* and *S. japonicum* in bovines. *Tropical and Geographical Medicine* **46**, 255-258.
- Boulanger, D., F. Trottein, F. Mauny *et al* (1994) Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione-S-transferase. *Parasite Immunology* **16**, 399-406.
- Bushara, H. O., A. A. Majid, A. M. Saad *et al.* (1980) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine : II. Experimental Demonstration of Naturally Acquired Resistance to *Schistosoma bovis* . *American Journal of Medicine and Hygiene* **29**, 442-451.
- Bushara, H. O., M. F. Hussein, A. Miriam *et al* (1983a) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine : IV. Preliminary observations on the mechanism of naturally acquired resistance. *American Journal of Medicine and Hygiene* **32**, 1065-1070.
- Bushara, H. O., A. A. Gameel, B. Y. A. Majid *et al.* (1983b) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine : VI. Demonstration of Resistance to *Schistosoma bovis* Challenge After a Single Exposure to Normal Cercariae or to Transplanted Adult Worms. *American Journal of Medicine and Hygiene* **32**, 1375-1380.

- Bushara, H. O., M. E. N. Bashir, M. M. Malik *et al* (1993) Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione-S-transferase or Keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunology* **15**, 383-390.
- Bushara, H. O., O. H. Omer, K. H. E. Malik *et al* (1994) The effect of multiple transfers of immune serum on maturing *Schistosoma bovis* infections in calves. *Parasitology Research* **80**, 198-202.
- Byram, J. E., and F. Von Lichtenberg (1977) Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *American Journal of Medicine and Hygiene* **26**, 944-956 .
- Byram, J. E., M. F. Doenhoff, R. Musallam *et al* (1979) *Schistosoma mansoni* infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administration homologous chronic infection serum. II.Pathology. *American Journal of Medicine and Hygiene* **28**, 274-285.
- Christensen, N. O., A. Mutani, and F. Frandsen. (1983) A review of the biology and transmission ecology of African bovine species of the genus *Schistosoma*. *Zeitschrift Parasitenkunde*. **69**, 551-570.
- Couissinier-Paris, P. and A. J. Desein (1995) *Schistosoma*-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *European Journal of Immunology* **25**, 2295-2302.
- Courtney, M., A. Buchwalder, L. H. Tessier *et al* (1984) High level production of biologically active human- antitrypsin in *Escherichia coli*.. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **81**, 669-674.
- Dargie, J. D. (1980) The pathogenesis of *Schistosoma bovis* infection in sudanese cattle. *Transactions of the Royal Society Tropical Medecine and Hygiene* **74**, 560-562.
- Del Prete, G., E. Maggi, and S. Romagnani (1994) Biology of Disease - Human Th1 and Th2 cells : functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Laboratory Investigations* **70**, 299-306.
- Finkelman, F. D., J. E. Pearce, J. F. Urban Jr *et al* (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Parasitology Today* **A62-A76**.
- Golding, B., M. Zaitava, and H. Golding (1994) The potencial for recruiting immune responses toward Type 1 or Type 2 cell help. *American Journal of Medicine and Hygiene* **50**, 33-40.

- Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever *et al* (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* **146**, 1322-1327.
- Lindberg, R., J. Monrad, M. V. Johansen *et al.* (1995) Tissue response of goats to single or repeated low-level doses and to a massive challenge dose of *Schistosoma bovis*.. *Research in Veterinary Science* **58**, 56-60.
- Lucas, S., R. Musallam, J. Bain *et al* (1980) The pathological effects of immunosuppression of *Schistosoma mansoni*-infected mice, with particular reference to survival and hepatotoxicity after thymectomy and treatment with antithymocyte serum, and treatment with hydrocortisone acetate. *Transactions of Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene* **74**, 633-643.
- Majid, A. A., H. O. Bushara, A. M. Saad *et al.* (1980) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine : III. Field Testing of an Irradiated *Schistosoma bovis* Vaccine . *American Journal of Medicine and Hygiene* **29**, 452-455.
- Mountford, A. P., A. Fisher, and R. A. Wilson (1994) The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*.. *Parasite Immunology* **16**, 521-527.
- Murare, H. M. and M. J. Doenhoff (1987) Parasitological observations of *Schistosoma bovis* in normal and T-cell deprived mice. *Parasitology* **59**, 507-516.
- Murare 20., H. M., A. Agnew, M. Baltz, S. B. Lucas *et al.* (1987) The response to *Schistosoma bovis* in normal and T-cell deprived mice. *Parasitology* **95**, 517-530.
- Omer-Ali P. O., S. R. Smithers, Q. Bickle *et al* (1988) Analysis of the anti-*S. mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. *Journal of Immunology* **140**, 3273-3279.
- Pitchford, R. J. (1977) A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* Weinland, 1858 acquired naturally in Africa and the Middle East. *Journal Helminthology* **51**, 229-252.
- Poulain-Godefroy, O., S. Gaubert, S. Lafitte *et al* (1996) Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : stimulatory role of egg antigens. *Infection and Immunity* **64**, 763-768.

- Sher, A., R. L. Coffman, S. Hieny *et al* (1990) Ablation of eosinophils and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of Immunology* **145**, 3911-3916.
- Smythies, L. E., R. M. Pemberton, P. S. Coulson *et al* (1992) T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **148**, 1512-1518.
- Trottein, F., C. Godin, R.J. Pierce *et al* (1992) Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione-S-transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **54**, 63:72.
- Velupillai, P. and D. A. Harn (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 18-22.
- Wilson, R. A (1993) Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Current Opinion in Immunology* **5**, 538-547.

Legends to figures

Figure n°1 Evaluation of antibody profiles to *S. bovis* antigens in OF1 mice infected with 160 cercariae. Data represent the OD (492nm) at an optimal dilution of 1/200 for IgG isotypes and 1/400 for IgM. Data correspond to the values recorded from a pool of sera of 8 animals (means of duplicate analysis).

Figure n°2 Evaluation of antibody profiles to *S. bovis* antigens in BALB/c mice infected with 160 cercariae. Data represent the OD (492nm) at an optimal dilution of 1/200 for IgG isotypes and 1/400 for IgM. Data correspond to the values recorded from a pool of sera of 8 animals (means of duplicate analysis).

Figure n°3 Kinetic study of specific IgE antibodies to *S. bovis* antigens in OF1 and BALB/c mice exposed to 160 cercariae. Data represent the OD (492nm) at an optimal dilution of 1/10. Data correspond to the values recorded from a pool of sera of 8 animals (means of duplicate analysis).

Figure n°4 Cytokine production by spleen cells from *S. bovis* infected BALB/c mice. Cells were stimulated with SWAP (50µg/ml), SEA (50µg/ml) or 28GST (50µg/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Cytokine production was evaluated in culture supernatants. Means are of two duplicate experiments with supernatants from 8 animal pool.

Figure n°5 IL-10 production by spleen cells from *S. bovis* infected BALB/c mice. Cells were stimulated with SWAP (50µg/ml), SEA (50µg/ml) or 28GST (50µg/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Means are of two duplicate experiments with supernatants from 8 animal pool.

Table I - Parasitic parameters : Worm recoveries and tissue egg counts obtained in OF/1 mice infected with 160 *S. bovis* cercariae and perfused at days 30, 60, 80

DAY 30

	Immature Worms	Tissue eggs
1	23	0
2	14	0
3	32	0
4	19	0
5	8	0
6	23	0
7	20	0
8	43	0
M ± SD	22.8±10.8	

DAY 60

	Male worms	Female worms	Total worms	Liver eggs/g	Liver eggs/g/f	intestine eggs/g	Intestine eggs/g/f
1	11	1	12	340	340	0	0
2	45	0	45	0	0	0	0
3	11	8	19	7802	975	3961	495
4	12	4	16	5114	1279	1498	374
5	6	1	7	1472	1472	230	230
6	10	4	14	6341	1585	2837	709
7	11	8	19	8762	1095	3241	405
8	10	2	12	3795	1898	275	137
M ± SD	14.5±12.5	3.5±3.12	18.0±11.6	4203.3±3366.9	1080.5±637.2	1505.3±1625.2	293.7±248.7

DAY 80

	Male worms	Female worms	Total worms	Liver eggs/g	Liver eggs/g/f	Intestine eggs/g	Intestine eggs/g/f
1	18	2	20	3892	1976	278	140
2	8	1	9	4551	4551	38	38
3	7	1	8	9504	9504	1684	1684
4	17	0	17	3275	**	70	**
5	33	1	34	1791	1791	194	194
6	13	0	13	1770	**	46	**
7	28	1	29	3593	3593	947	947
8	8	0	8	0	0	0	0
M ± SD	16.5±9.7	0.75±0.71	17.25±9.9	3547.1±2815.9	2673.1±3246.4	407.1±601.1	375.3±616.9

a Values correspond to the means of 8 infected animals ± SD

* Dead

** No possible determination

Table II - Parasitic parameters : Worm recoveries and tissue egg counts obtained in BALB/c mice infected with 160 *S. bovis* cercariae and perfused at days 30, 60, 80

DAY 30		
	Immature worms	Tissue eggs
1	16	0
2	18	0
3	73	0
4	27	0
5	16	0
6	48	0
7	53	0
8	22	0
M ± SD	34.1±21.3	

DAY 60							
	Male worms	Female worms	Total worms	Liver eggs/g	Liver eggs/g/f	Intestine eggs/g	Intestine eggs/g/f
1	30	1	31	549	549	7	7
2	32	2	34	4127	2063	802	401
3	19	1	20	4000	4000	513	513
4	23	4	27	7297	1824	2677	669
5	35	11	46	18390	1672	7297	663
6	11	2	13	2962	1481	719	359
7	16	11	27	16419	1493	5381	489
8	12	12	24	15933	1328	6347	529
M ±SD	22.3±9.3	5.5±4.9	27.75±9.8	9785.2±7360.6	1801.2±993.5	2967.9±2942.5	453.7±211.0

DAY 80

	Male worms	Female worms	Total worms	Liver eggs/g	Liver eggs/g/f	Intestine eggs/g	Intestine eggs/g/f
1	32	2	34	13405	6703	2229	1115
2	6	2	8	12117	6059	1776	888
3	*	*	*	*	*	*	*
4	9	0	9	4648	**	3478	**
5	35	0	35	4403	**	583	**
6	8	1	9	9073	9073	966	966
7	33	0	33	2087	**	222	**
8	41	1	42	3125	3125	507	507
M ±SD	23.4±15.0	0.85±0.9	24.3±14.9	6979.7±4526.4	6240.0±2447.8	1394.0±1168.1	869.0±259.1

a Values correspond to the means of 8 infected animals ± SD

* Dead

** No possible determination

Figure 1

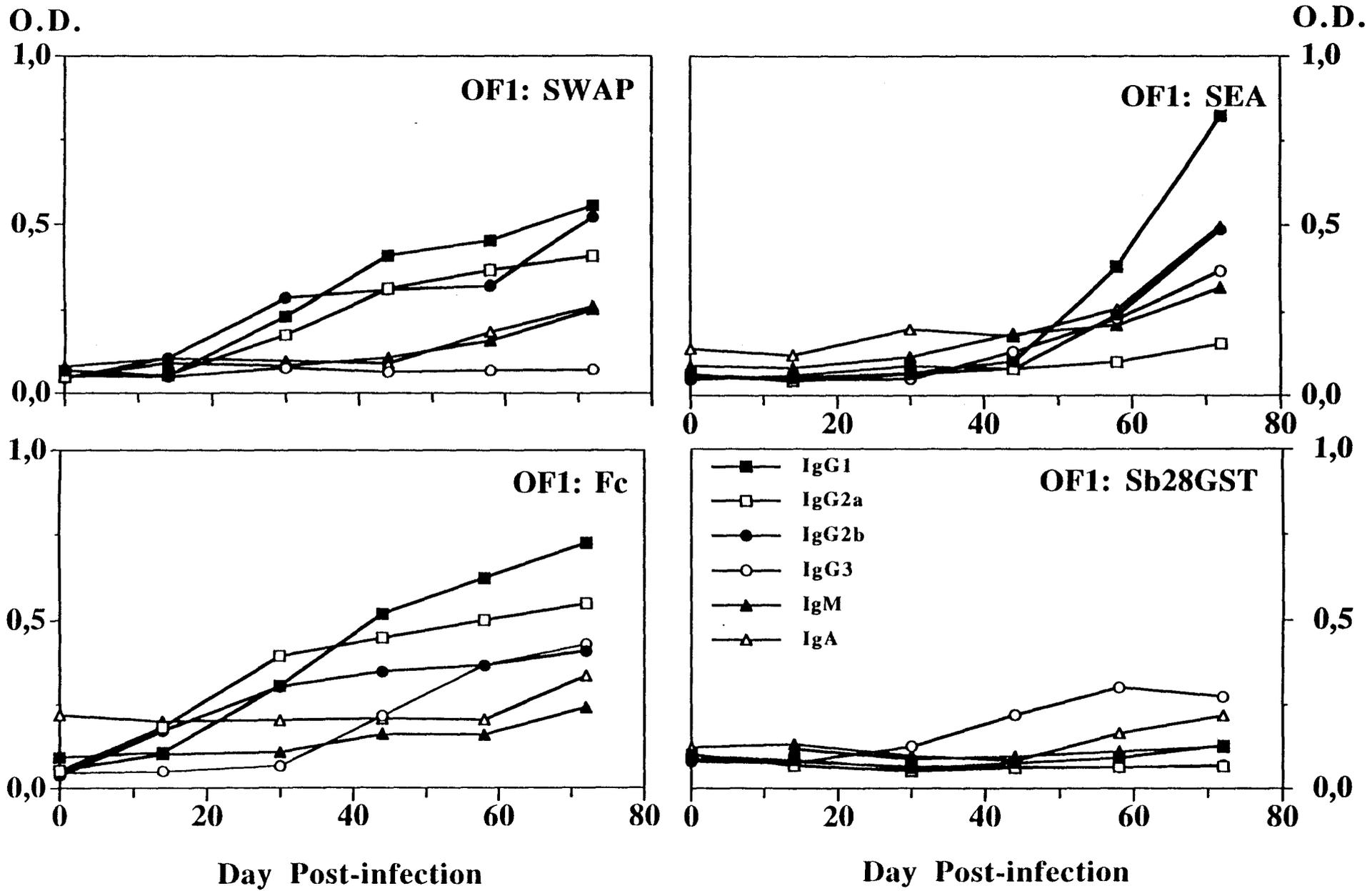
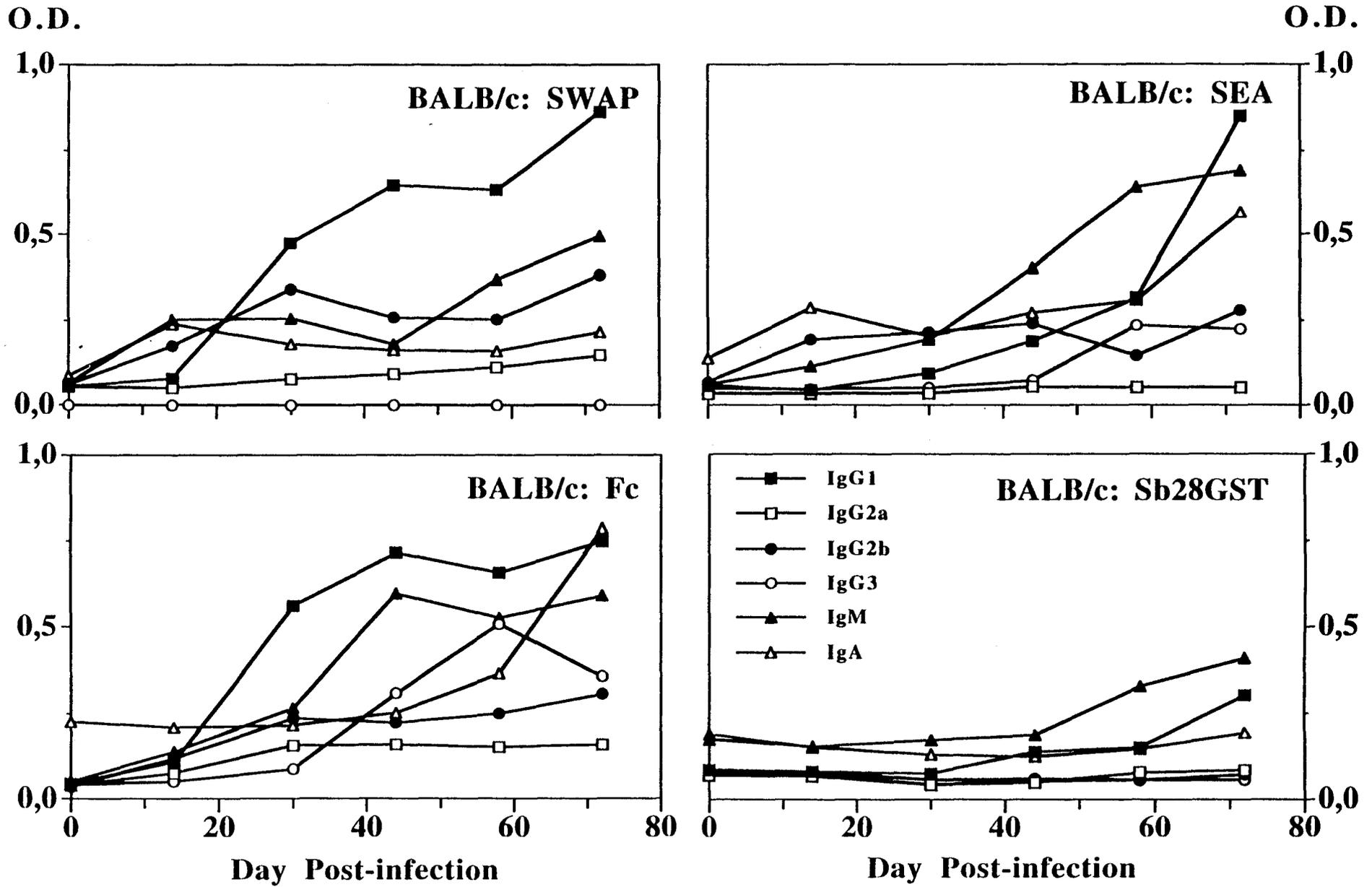


Figure 2



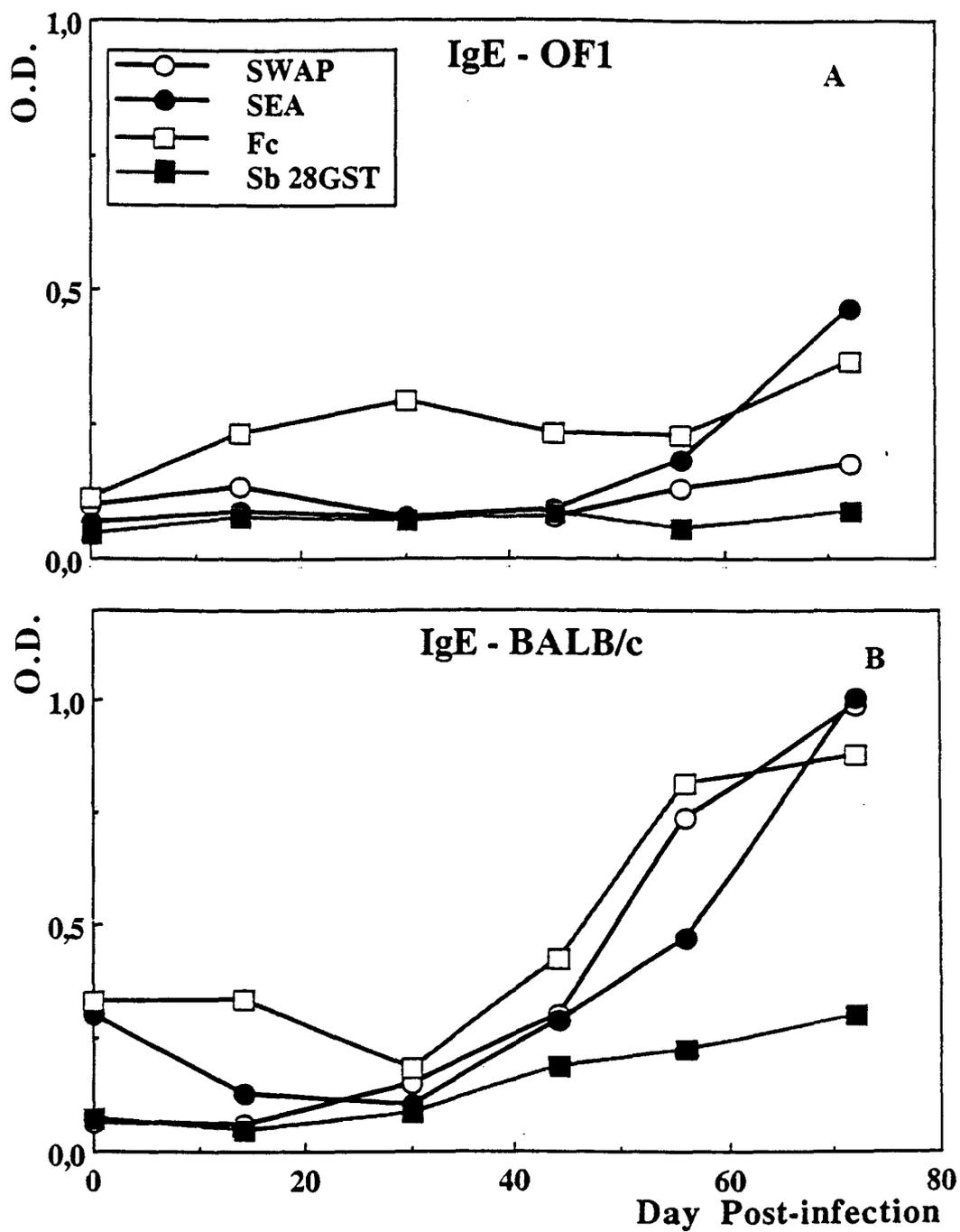


Figure 3

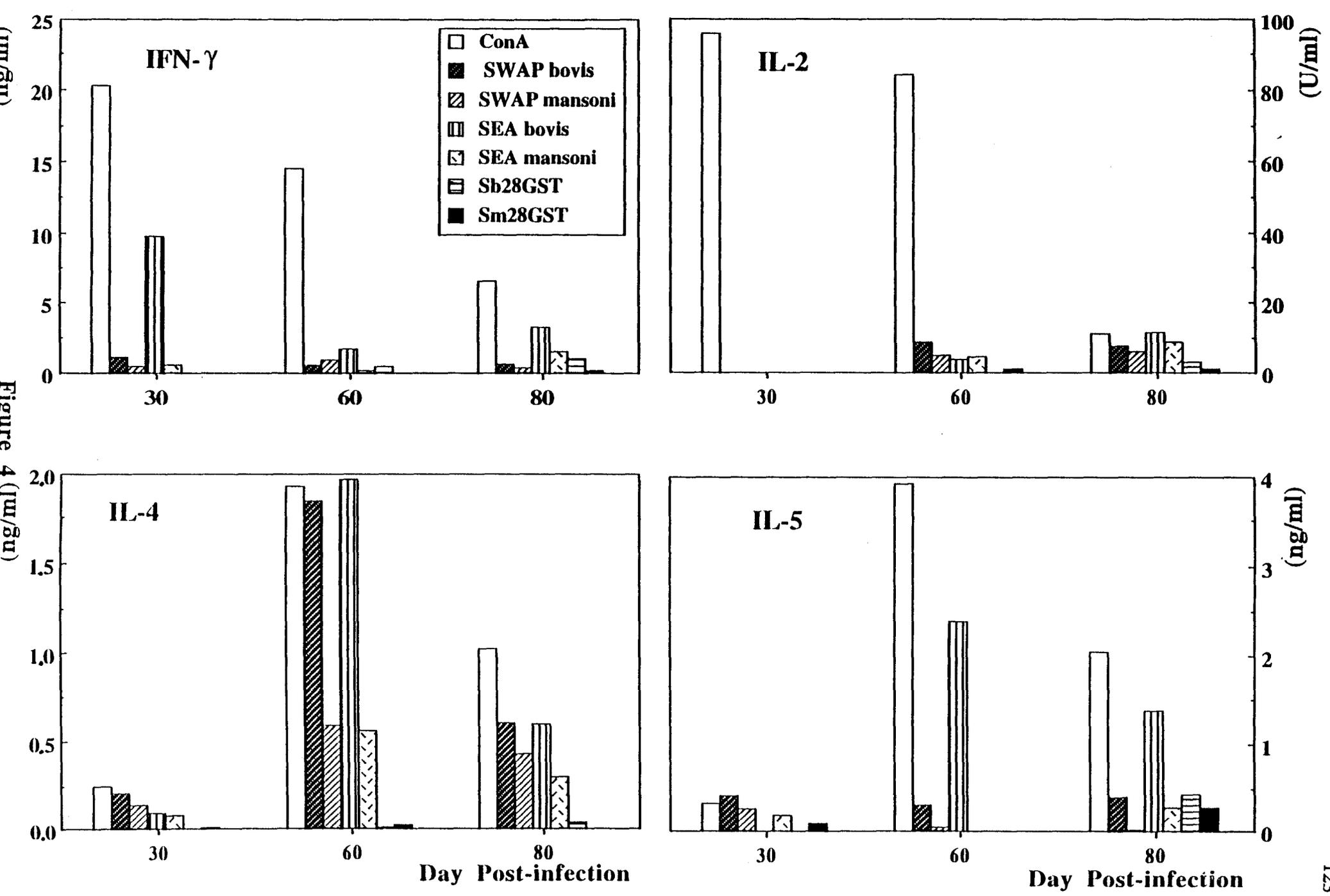


Figure 4 (μg/μl)

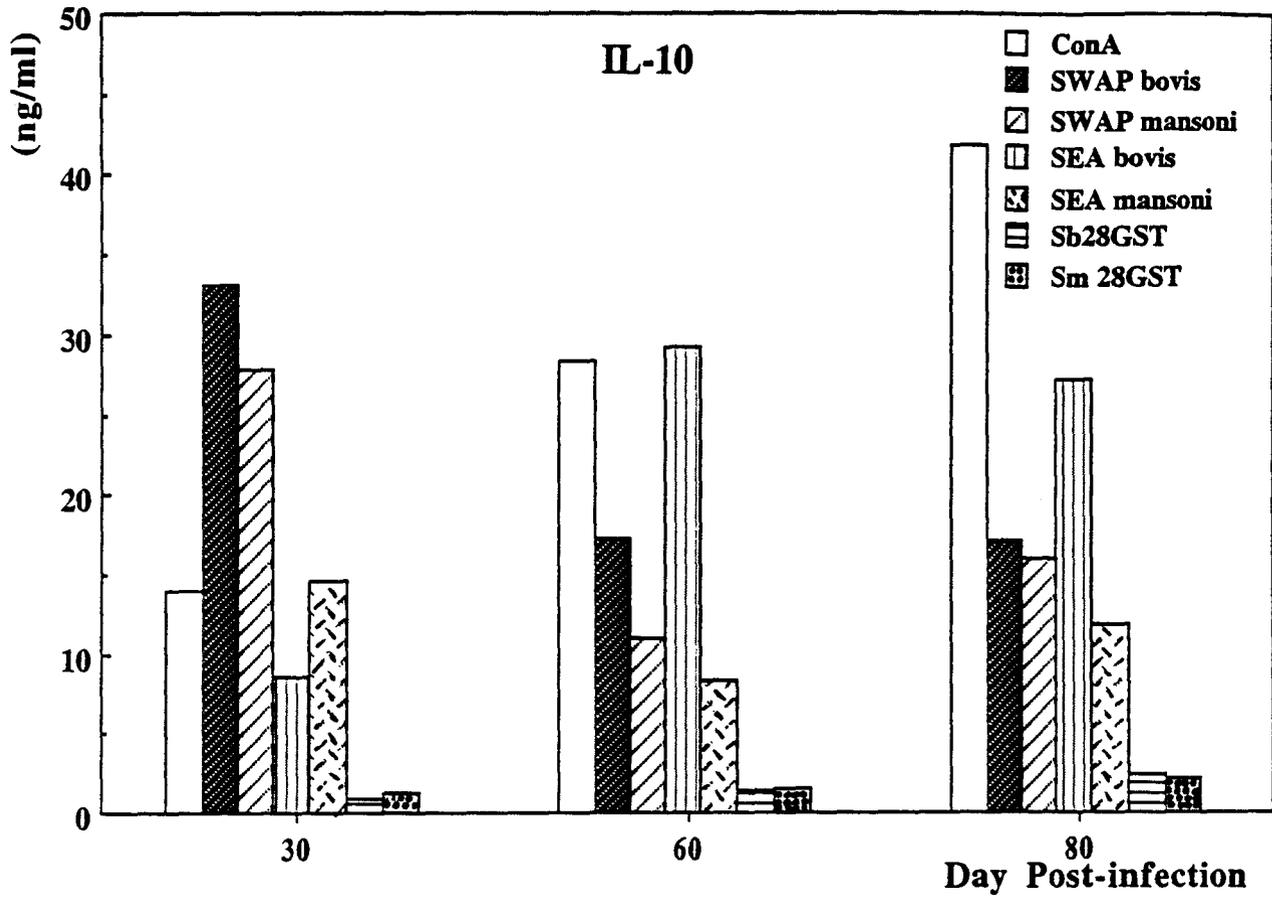


Figure 5

ARTICLE 2

Dans l'hôte naturel, peu d'études cinétiques ont été consacrées, au cours des infections naturelles ou expérimentales, à l'évaluation des mécanismes d'attrition immune précédemment décrits. Cependant, certains auteurs ont bien fait référence à une chute de la charge parasitaire et à une réduction de la fécondité, par rapport au nombre d'oeufs excrétés, à des périodes précises de l'infection.

D'autre part, plusieurs observations sur le terrain ont montré l'existence d'une résistance à la réinfection. Celle-ci s'exprime différemment en fonction du type d'infection, naturelle ou expérimentale, au niveau de la charge en vers ou de la fécondité. Ces résultats ne permettent cependant pas d'apporter des conclusions définitives quant au rôle de l'inducteur et de la cible de ces phénomènes (vers adultes/schistosomules), suggérant même l'existence d'autre(s) mécanisme(s) d'action en plus de celui associé au concept de l'immunité concomitante.

L'ensemble de ces données nous a conduit à évaluer l'importance des mécanismes impliqués lors d'une réinfection au moment où l'attrition immune semble la plus marquée.

Ainsi, le deuxième volet de notre étude est consacré à l'analyse des phénomènes liés à l'immunité à la réinfection au cours d'une infection en « phase chronique », dans un système de « résistance spontanée ».

ARTICLE 2

RESISTANCE A LA REINFECTION DANS LE MODELE MURIN INFECTE PAR *Schistosoma bovis* (version non définitive)

Des expériences d'infection/réinfection homologues par des cercaires de *S. bovis* pendant la phase d'attrition immune ont été effectuées dans le modèle murin. L'étude des paramètres parasitologiques associés aux réponses immunes et cellulaires, et la caractérisation des antigènes cibles reconnus dans les différentes phases de l'infection ont été entreprises.

Cette analyse nous a révélé :

- la confirmation de l'existence d'une attrition immune plus importante dans l'infection murine par *S. bovis* (groupe primo-infecté C).
- la démonstration de l'existence d'une immunité à la réinfection, qui s'exprime par l'absence d'installation de l'infection d'épreuve (comparaison entre les groupes primo-infecté/réinfecté (A) et primo-infecté C).
- l'augmentation au cours de l'infection du nombre d'oeufs tissulaires (foie et intestin), suivie d'une stabilisation au niveau du foie et diminution au niveau de l'intestin.
- la diminution de la capacité d'éclosion des oeufs au cours de l'infection et une élévation du nombre d'oeufs morts.
- une réponse isotypique hétérogène contre l'antigène de vers adulte (SWAP) avec une production plus importante d'anticorps IgG1 et une augmentation d'anticorps IgA après le début de la ponte. Aucune différence de production d'anticorps entre le groupe primo-infecté (C) et le groupe primo-infecté/ réinfecté (A) n'a pu être observée.
- une production importante d'anticorps IgG1 et IgA contre les antigènes d'oeufs (SEA). Ainsi qu'une production plus marquée d'IgG2b dans le groupe primo-infecté/réinfecté (A) par rapport au groupe primo-infecté (C).
- une production d'IFN- γ en réponse à la stimulation des splénocytes par l'antigène SEA, chez le groupe primo-infecté (C) et une absence chez le groupe primo-infecté/ réinfecté (A). Aucune production d'IL-2 n'a été enregistrée.

- une forte production d'IL-4 après restimulation par le SWAP et le SEA après l'oviposition, suivie d'une diminution en phase chronique de l'infection. La production d'IL-4 entre le groupe primo-infecté/ réinfecté (A) et primo-infecté (C) ne diffère pas significativement.

- une production d'IL-5 plus importante suite à la stimulation par le SEA. Le groupe primo-infecté/ réinfecté (A) présente une production d'IL-5 plus importante que le groupe primo-infecté (C).

- une production constante d'IL-10 contre les antigènes SWAP et SEA, indifféremment du groupe étudié.

- une reconnaissance différente d'antigènes du SWAP et du SEA, en intensité et en poids moléculaires, observée par la technique de Western blot.

**RESISTANCE TO REINFECTION WITH *SCHISTOSOMA BOVIS*
IN THE MOUSE**

**Alexandra VIANA DA COSTA*¹, Josette FONTAINE¹, Sophia LAFITTE¹,
Antonio SEIXAS², Maria de Lourdes SAMPAIO SILVA², André CAPRON¹ &
Jean-Marie GRZYCH¹.**

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

² Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, Laboratorio de Parasitologia, 16, R. Sao Luis, Porto Portugal.

running title : Murine *Schistosoma bovis* infection, reinfection

Keywords *Schistosoma bovis*, infection, immune responses, cytokines

*Corresponding author : Tel .(33) 3 20 87 78 09

Fax (33) 3 20 87 78 88

E mail:A-monica.Vianadacosta@pasteur-lille.fr

INTRODUCTION

The genus *Schistosoma* consists of parasitic flatworms whose definitive habitat is the bloodstream of certain warm-blooded vertebrates. Species, like *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum* are of direct medical importance, affecting the livelihood of millions of humans (Doumange *et al*, 1987). Others, like *S. bovis* and *S. mattheei*, are parasites of cattle causing significant economic losses in many developing countries (Vercruysse & Bont, 1997).

Evidence exist to suggest that under certain conditions humans and experimental animals can acquire varying degrees of immunity to the parasite. Epidemiological studies performed in endemic areas of *S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum* suggest acquired immune resistance to reinfection (Butterworth *et al* 1985, 1994 ; Hagan *et al*, 1985 ; Etard, Audibert & Dabo 1995 ; Wu *et al* 1993) associated with different factors such as, age, sex, exposure to the parasite and intensity of infection. More recently the observation of intrinsic susceptibility/resistance to infection in some individuals, suggests the role of genetic factors in human resistance to *S. mansoni* (Abel *et al* 1991). This resistance is proposed to be associated with immune and cellular specific responses (Khalife *et al* 1986,1989 ; Grzych *et al* 1993 ; Coussinier-Paris & Dessain 1995 ; Roberts *et al* 1993).

Resistance to reinfection in experimental murine schistosomiasis was also reported in many studies (Doenhoff *et al* 1978). This immunity being to some extent dependent on the size of the challenge infection, mouse strain and hepato-portal dynamics (Pons *et al* 1989), perfusion time after infection (Coelho, Mello & Pollom 1995) as well as being partly correlated with the hepatic pathology caused by the schistosomes of the primary infection (Wilson, Coulson & McHugh, 1983). This immunity is essentially characterized by a reduction in the worm burden, but the immune and cellular mechanisms implicated are not well known.

Less attention has been given to the immunology of resistance in *S. bovis* infection. Nevertheless, in natural hosts, like cattle and goats, mechanisms of acquired resistance to *S. bovis* were described both in natural and experimental infections (Bushara *et al* 1980, 1983 ;

Monrad *et al* 1990 ; Johansen *et al* 1997). The parameters affected are the impairment of worm fecundity, by reducing fecal egg count and/or limiting worm burden.

Homologous and heterologous protection to *S. bovis* has also been described in sheep, rhesus monkeys and mice (Monrad *et al* 1981 ; Amin *et al* 1968, 1969 ; Massoud & Nelson 1972).

A particular characteristic of *S. bovis* experimental murine infection is that adult worms appear to be more vulnerable to immune attrition than *S. mansoni* or *S. japonicum* worms, but the mechanisms involved remain unknown and do not exclude the participation of immune and cellular factors. This raises questions concerning the implication of the immune response in the induction of protection towards reinfection and the involvement of humoral and/or cellular components and the antigens recognized.

In this paper, we carried out two homologous infection / reinfection experiments with *S. bovis* cercariae during the phase of immune attrition. The protection was evaluated in terms of worm burden and tissue egg numbers. The specific antigens recognized in infection/reinfection phases were analyzed by immunoblotting. The magnitude of resistance to reinfection in the *S. bovis*/ mouse system could facilitate identification of any immunological effector mechanisms involved.

MATERIALS AND METHODS

Host animals and parasites

The Salamanca strain (Spain) of *S. bovis* was maintained in *Bulinus truncatus* snails as intermediate hosts and golden hamsters as definitive hosts (Porto laboratory). For experimental infections, cercariae were used within 1h after collection from 35 day infected snails incubated 30 minutes at 37°C and then exposed to light and to a temperature of 30°C for 1h. Female BALB/c mice, 6 to 8 week old at the beginning of the experiment, were purchased from Iffa Credo (l'Arbresle, France).

Infection design

Animals were exposed percutaneously to 160 *S. bovis* cercariae in the first (Infection) and second exposures (Reinfection). The animals were allocated to five groups (A-E) for Experiment 1 and 2 as indicated in the Table I. Infected mice were bled at different periods during experiments.

Worm recovery and tissue sampling

Animals were sacrificed at different periods of the infection by injection of pentobarbital solution as indicated in Table I. The intensity of the infection was assessed by total perfusion to determine worm burden. Tissue egg loads were evaluated after alkali digestion of livers and intestines in 4% KOH solution, incubated for 16 h at 37°C. Aliquots of the final suspension were counted under the microscope.

Antigens

Soluble worm adult proteins (SWAP bovis) were prepared from adult worms washed in phosphate buffered saline (PBS), homogenized with an Ultra-turrax (Janke et Kundel, IKA Labortechnik) for 1 min, disrupted by a 5 min sonication (Labsonic U., B. Braun), and centrifuged for 20 min at 10,000 g.

Soluble egg antigens (SEA bovis) were extracted from homogenized eggs isolated from the livers of 55-day infected hamsters. Briefly, frozen eggs were disrupted by 10 passages through an X-press (A.B. Biox, Jarfalla, Sweden) and the soluble fraction was collected after centrifugation for 15 min at 10,000 g. *S. mansoni* SWAP and SEA antigens were prepared as described for *S. bovis* antigens.

The recombinant *S. bovis* glutathione-S-transferase (rSb28GST) was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strain TGY 73.4 containing the plasmid pTG8887 and the recombinant *S. mansoni* 28GST (rSm28GST) was expressed in *Escherichia coli* strain TGE901 containing the plasmid pTG54 (Trottein *et al.* 1992). Recombinant Sb28GST and Sm28GST proteins were purified by passage through a glutathione-Sepharose column with, respectively 98 and 95 % purity.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates (Nunc, Intermed S.A., Denmark) were incubated overnight at 4°C with a 5µg/ml solution of either SWAP bovis, SEA bovis or rSb28GST antigen diluted in sodium carbonate buffer (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.6 ; 100 µl per well). After two washes with PBS-0.1% Tween 20, plates were saturated for 1 h with 0.5% gelatin-PBS solution (200µl/well). The amounts of specific mouse antibody bound to each antigen preparation were measured using the appropriate anti-mouse Ig isotype specific reagent, diluted in PBS-0.1% Tween 20 and performed as described elsewhere (Viana da Costa *et al.*, 1997). Mouse sera were tested at a dilution of 1:400 for total IgM, IgG isotypes and IgA and at a dilution of 1:10 for IgE assays in PBS-0,1% Tween 20 buffer and incubated overnight at 4°C. Assays were developed for 30 min at 37°C using O-phenylenediamine (1mg/ml, Sigma) (100µl/well) and reactions were stopped with HCl 2N (100µl/well). Colour development was measured spectrophotometrically at 492 nm (Titertek Multiskan^R Mcc 1340, Labsystems). Values correspond to the mean of duplicate assays.

Cytokine production and assays

Spleens were removed from infected mice, and cell suspensions were prepared as previously described (Grzych *et al.* 1991). Briefly, spleens were forced through fine wire mesh and splenic erythrocytes were lysed by osmotic treatment (170mM Tris-buffered saline, 155mM ammonium chloride solution) followed by three washes in RPMI 1640. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion and 10⁷ cells were resuspended in 1 ml of culture medium. One milliliter of cell suspension was incubated alone or in the presence of SWAP bovis (50µg/ml), SWAP mansoni (50µg/ml) or SEA bovis (50µg/ml), SEA mansoni (50µg/ml) or rSb28GST (50µg/ml), rSm28GST (50µg/ml) antigens or concanavalin A (5µg/ml, Seromed) in 24-well

plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected after 24 h for IL-2 and IL-4 measurements and after 72 h for IFN γ , IL-5 and IL-10 measurements. Cytokine production was evaluated by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific monoclonal antibodies (mAb) purchased from PharMingen (San Diego, CA.). For IFN- γ detection, purified anti-IFN- γ mAb R4-6A2 was used in combination with the biotinylated anti-IFN- γ mAb XMG1-2. Purified anti-IL-4 mAb and biotinylated anti-IL-4 mAb were derived from clones BV4-1D11 and BVD6-24G2, respectively. Purified anti-IL-5 mAb and biotinylated anti-IL-5 mAb were purified from clones TRFK5 and TRFK4, respectively. Purified anti-IL-2 mAb and biotinylated anti-IL-2 mAb were obtained from clones JES6-1A12 and JES6-5H4, respectively. Purified anti-IL-10 mAb and biotinylated anti-IL-10 mAb were obtained from clones JESS-2A5 and SXC-1(B), respectively. Recombinant mouse IL-4 (rIL-4), rIL-5 and rIL-10 were from PharMingen, rIFN- γ and rIL-2 were purchased from Genzyme (Cambridge, U.K.)

Cytokine detection was performed as described elsewhere (Viana da Costa *et al*, 1997). Cytokine concentrations were calculated by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. Values were ranged between 0.1 to 10 ng/ml for IL-5, IL-10 and IFN- γ , between 1.56 to 100U/ml for IL-2 and between 20 to 1250 pg/ml for IL-4.

Electrophoresis and Western Blot.

Schistosome GSTs were fractionated on 13% SDS-PAGE under reducing conditions (Laemmli, 1970). After transfer to nitrocellulose sheets (Towbin *et al*, 1979), strips were incubated 1 h with PBS / 5% non-fat dried milk. They were then incubated overnight at 4°C with undiluted culture supernatants or ascitic fluids (1:1000). Detection of Ab binding was performed with anti-mouse IgG, sheep-HRP (1:500) in PBS / 5% non-fat dried milk and 4-chloro-1-naphthol as substrate (Sigma) by standard methods. Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to Garrels (Garrels, 1979).

Statistics analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test and Mann-Whitney test. A value of $p < 0.05$ was considered as significant. Resistance was expressed as the percent of reduction in number of adult worm attributable to the challenge control group (D) in the infected/challenge group (A)

$$\% \text{ Reduction} = \frac{D - (A - C)}{D} \times 100$$

RESULTS

Protection against reinfection

Table II summarize the data obtained from two challenge experiments performed, respectively, at day 94 (Exp.1) and day 77 (Exp.2) in mice previously exposed to a primo-infection with *S. bovis*. Table III and IV detail individual results obtained from Exp.1 and Exp.2, respectively.

Mice having received an initial infection developed a strong resistance to reinfection, as indicated by the reduction of 65 and 100% on worm load, when the challenge infection was administered at day 94 (Exp.1) or day 77 (Exp.2) after the primary infection, respectively. However, in both Exp.1 and Exp.2, comparison between Groups A (reinfected group) and D (challenge control group) clearly demonstrated that the second infection did not established itself. Groups D displayed 17.5% (Exp.1) and 33.5% (Exp.2) worm recovery, which indicated the installation of the challenge infection, absent in animals from group A (reinfected). Residual worms were sometimes detected in chronic phase of the infection in group C (Exp.2-day 127).

In Exp.1, we observed a significant difference on total and female worm burden, between group A (day 146) and group D (day 52) ($p < 0.035$; $p < 0.020$) ; between group B (day 94) and group C (day 146) ($p < 0.040$; $p < 0.035$). No differences were observed between group A and C. In Exp.2, the analysis of the same parameters indicated a significant difference between group A (day 127) and group D (day 50) ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$), excepted between group B and C and group A and C.

These data also indicated a reduction on the worm burden during the time course of the infections, confirming the phenomenon of immune attrition described in *S. bovis* murine infection (Viana da Costa *et al.*, 1998).

Since the female worm population decreases during *S. bovis* infection, it was difficult to considered the number of eggs per female, so for a most accurate statistic analysis we considered the total number of eggs/g liver or g/intestine and the total tissue egg (liver + intestine) number.

In Exp.1, when the total tissue egg number was compared between group A (reinfected) and C (primo-infected) and between group A (reinfected) and D (challenge control) no significant differences were observed. Similar results were obtained in Exp.2, excepted that a significant difference was found between group A (reinfected) and group D (challenge control) with $p < 0.0012$. This analysis indicated that the egg load found in reinfected animals corresponded to the eggs layed during primo-infection, as the challenge infection didn't established itself. During *S. bovis* early phase infection, egg distribution indicated a major trapping in the liver when compared to the intestine. In chronic infection, egg load remained constant in the liver and decreased in the intestine, probably related to fecal egg excretion. This is supported by the

significant difference found in total intestine egg number ($p < 0.0025$) and total intestine/g number ($p < 0.005$) between group B and group C and between group A and group C ($p < 0.043$; $p < 0.007$), respectively. Differences were not significant between these groups in Exp.2 (early challenge period). These results are synthesized in Figure 1 (Exp.1) and Figure 2 (Exp.2).

Specific antibody response to *S. bovis* antigens

Specific antibody response was analyzed only in Exp. 2 in pooled sera. The production of specific antibodies to SWAP and SEA bovis antigens was evaluated at days 50 ; 77 and 127 of infection in Exp. 2 . Results summarized in Figure 3 indicated a polyisotypic response against SWAP bovis for all groups (A,B,C,D) with a predominant signal for IgG1. During the time course of the infection we recorded an augmentation of IgM and IgA isotypes against SWAP bovis. Furthermore, antibodies detected against SEA bovis were predominantly of IgG1, IgG2b and IgA isotypes. The major difference in antibody response concern the anti-SEA IgG2b level, which was enhanced in group A (reinfected) in comparison to group C (primo-infected).

Specific IgE antibody responses against SWAP and SEA bovis were observed (Figure 4), the signal increased with the duration of the infection. Group C (primo-infected) showed a stronger signal in comparison to group A (reinfected).

Cytokine production

In vitro cytokine production was analyzed at different time points in Exp.2 on pooled spleen cells after stimulation with Con A or parasite antigens (Figures 5, 6 and 7). No significant production of IL-2 was detected after antigen stimulation, while IFN γ production was recorded for group C (primo-infected) after SWAP and SEA bovis stimulation, which was absent in group A (reinfected). A stronger IL-5 production in response to SEA bovis was recorded in group A (reinfected) in comparison to group C (primo-infected). No major differences were noticed for IL-4 and IL-10 production between reinfected and primo-infected animals.

Analysis of parasite antigens (SWAP and SEA) recognized by infected/reinfected mice sera

The target antigens of the humoral immune response were studied by Western immunoblotting in adult worms (SWAP) and egg (SEA) antigens. The pooled sera were shown to react with all life-cycle stages tested (Figure 8). Under reducing conditions, the main differences between reinfected animals (A) and primo-infected (C) were identified for antigens of a molecular weight ranged between 45-65 kDa and 70-75 kDa.

DISCUSSION

In our experiments, we demonstrate that a primary infection with *S. bovis* induced a strong resistance to reinfection. Protection ranged between 65 to 100% was observed in the reinfected animals (Group A in Exp. 1 and Exp.2) based on adults worm counts.

The challenges were performed around week 13 for Exp. 1 and week 11 for Exp.2., periods during which immune attrition seemed more pronounced. This schedule allowed to observe a protection against reinfection, expressed by the absence of worms from the challenge infection. This suggests the implication of an immunity related with the concept of « concomitant immunity », where the first infection induces a protective response against the reinfection stage, the schistosomula. Protection towards reinfection has been described in murine infection by *S. mansoni* and *S. japonicum* (Doenhoff *et al*, 1978 ; Long *et al*, 1978 ; Garcia *et al*, 1983). The involvement of a leaky hepatic portal system in "concomitant immunity" has also been reported (Wilson *et al*, 1983). In our experiments no hepatic morphologic changes were found in our model, suggesting that this hypothesis can be ruled out.

During the time course of these infections we confirmed the natural elimination of *S. bovis* worms (male and female), most pronounced between 8-10 week infection. (Viana da Costa *et al*, 1998). This phenomenon called immune attrition was demonstrated previously by other studies (Agnew *et al*, 1993), but the mechanisms implicated are not well known.

It seems interesting to point out that between 11-13week of infection, a highest heterogeneity in worm recovery from infected animals was observed. This might be related to the efficiency of the immune response and/or with the high level of egg deposition.

In parallel, evaluation of tissue egg load during *S. bovis* infection indicated an increase in egg number at the early phase of the infection. Eggs were mainly sequestered in the liver rather than in the small intestine. During the chronic phase, the decrease recorded in the egg load was more pronounced in intestine and was mainly due to the worm loss, reduction in worm fecundity and fecal egg excretion. In the chronic phase of infection, *in vitro* analysis of egg morphology indicated a decrease in mature eggs and hatching capacity, associated to an increase in dead eggs (data not shown).

The kinetic analysis of isotype antibody responses to SWAP and SEA antigens showed a polyisotypic response, with a major permanent production of IgG1 accompanied by a strong IgA response after egg deposition. When compared to primo-infected animals, an intense IgG2b response was recorded to SEA bovis antigen in twice infected animals.

Both infected and reinfected animals displayed an IgE antibody response to SWAP and SEA antigens, but no association could be established between this isotype and immunity to reinfection. Conversely to previously described observations in human and some experimental studies. (Hagan *et al*, 1991 ; Rihet *et al*, 1991 ; Dunne *et al*, 1992 ; Demeure *et al*, 1993 ; Capron *et al*, 1975).

The major differences in cytokine production between infected and reinfected animals concerned IFN- γ and IL-5 production. The SWAP and SEA antigen induced IFN- γ production observed in infected animals was absent in reinfected animals. A seemingly inverse production was recorded between these two groups for IL-5 after SEA stimulation.

Data from Roberts *et al* (1993) indicated an association between the levels of IL-5 secreted in response to *S. mansoni* antigen with resistance to reinfection in human schistosomes in Kenya. In this study they also observed, on an individual basis, a inverse relationship of the amounts of IL-2 and/or IFN- γ with IL-5 detected in antigen stimulated splenocyte cultures. Moreover, studies performed in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae of *S. mansoni* and challenge with normal parasites produced abundant IFN- γ (and IL-3) from bronchoalveolar lavage cells (BAL) and from lymph node cells (LN) stimulated by larval antigen (Smithies *et al*, 1992 ; Mountford *et al*, 1992). These authors suggest that T-cells (memory/effector cells) are recruited into the lungs, and correspond to a resident effector population which can be rapidly stimulated by the arrival of challenge parasites. So, in our future investigations it might be of interest to study BAL and NL population cytokine production in order to elucidate the absence of IFN- γ production from spleen cells of reinfected animals, and it possible enhancement in local lung cells.

The participation of humoral and/or cellular components in the expression of the installation of immunity to reinfection is still difficult to define. In our studies, differences in specific IgG2b antibodies to SEA but also IL-5 production after SEA stimulation in reinfected mice strongly suggest their participation in the installation of the resistance and further emphasize the potent role of some SEA components. This hypothesis is supported by the demonstration of the absence of immunity to reinfection in mice previously infected by a unisexual (non-egg-producing) *S. mansoni* infections (Dean *et al*, 1978 ; Bickle *et al*, 1979).

Interestingly, in our studies sera from infected/reinfected mice exhibited a different pattern of recognition by immunoblotting analysis on SEA preparation. This discrepancies mainly involving antigens located between 45-65kDa and 70-75kDa that might bring a molecular support to our observations. This particular aspect is now under investigation.

REFERENCES

- Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Sousa, A. E. & A. Dessein (1991) Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 959-970.
- Agnew, A., Murare, H. M., & M. J. Doenhoff (1993) Immune attrition of adult schistosomes. *Parasite Immunol.* 15, 361-271.
- Amin, M. B. A., Nelson, G. S. & M. F. A. Saoud (1968) Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. II. Heterologous schistosome immunity in rhesus monkeys. *Bulletin of W.H.O.* 38,19-27.
- Bickle, Q. D., Bain, J. M., McGregor, A. & M. Doenhoff (1979) Factors affecting the acquisition of resistance against *S. mansoni* in the mouse. III. The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance to reinfection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 37.
- Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Prentice, J. H., Richardson, B. A., Arap Siogok, T. K., Sturrock, R. F. & D. W. Taylor (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 393-408.
- Butterworth, A. E., Curry, A. J., Dunne, D. W., Fulford, A. J., Kimani, G., Kariuki, H. C., Klumpp, R., Koech, D., Mbugua, G., Oulma, J. H. & al (1994) Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Trop. Geogr. Med.* 104, 197-208.
- Bushara H. O., Majid, A. A., Saad, A. M., Hussein, M. F., Taylor, M. G., Dargie, J. D., Marshall, T. F. & G. S. Nelson (1980) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. II. Experimental demonstration of naturally acquired resistance to *S. bovis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 442-451.
- Bushara H. O., Gameel A. A., Majid, B. Y. A., Khitma, I., Haroun, E. M., Karib, E. A., Hussein, M. F. & M. G. Taylor (1983) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. VI. Demonstration of resistance to *S. bovis* challenge after a single exposure to normal cercariae or to transplanted adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1375-1380.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. & H. Bazin (1975) Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* 253, 274-275.
- Coelho, P. M., Mello, R. T. & T. E. Pollom (1995) *Schistosoma mansoni* : reinfections and concomitant immunity in mice. Importance of perfusion time after challenge infection for evaluation of immunoprotection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 507-509.
- Couissinier-Paris and A. J. Dessein (1995) Schistosoma specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *Eur. J. Immunol.* 25, 2295-2302.
- Dean, D. A., Minard, P., Stirewalt, M.A., Vannier, W. E. & K. D. Murrel (1978) Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. 27, 951-956.
- Demeure, C. E., Rihet, P., Abel, L., Ouattara, M., Bourgois, A. & A. J. Dessein (1993) Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans : influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 168, 1000-1011.

- Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Long, E., Bain, J. & A. McGregor (1978) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. I. Demonstration of resistance to reinfection using a model system that involves perfusion of mice within three weeks of challenge. *J. helminthol.* 52, 173-186.
- Doumenge JP *et al* (1987) Atlas de la répartition mondial des schistosomiases. Talense, CCGET-CNRS, Geneva : OMS.
- Dunne, D.W., Butterworth, A. E. , Fulford, A. J. C. , Kariuki, H. C. , Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. & R. F. Sturrock (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni : association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22, 1483-1488.
- Etard, J.F., Audibert, M. & A. Dabo (1995) Age-acquired resistance and predisposition to reinfection with *Schistosoma haematobium* after treatment with praziquantel in Mali. *Am J Trop Med Hyg.* 52(6): 549-558.
- Garcia, E. J., Mitchell, G. F., Tiu, W. U., Tapales, F. P. & C. A. Valdez (1983) resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in the mouse. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 14, 133-139.
- Grzych, J. M., Grezel, D., Xu, C. B., Neyrinck, J. L., Capron, M., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. & A. Capron (1993) IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 150, 527-535.
- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. & B. M. Greenwood (1985) Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.* 7, 625-632.
- Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunn, D., Simpson, A. J.G. & H. A. Wilkins (1991) Human, IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349, 243-245
- Johansen, M. V., Monrad, J., Christensen, N. O. & R. Lindberg (1997) The impact of primary *Schistosoma bovis* infection on a subsequent challenge infection in goats. *J. Parasitol.* 83, 242-246.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. & J. Ouma (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164, 1626-1640.
- Khalife, J., Dunne, D., Richardson, B. A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A. & A. E. Butterworth (1989) Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 142, 4422-4427.
- Long, E., Doenhoff, M. & J. Bain (1978) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. 2. The time at which resistance to reinfection develops. *J. Helminthol.* 52, 187-191.
- Massoud, J. & G. S. Nelson (1972) Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. 6. Observations on cross-immunity to *Ornithobilharzia turkestanicum*, *Schistosoma bovis*, *S. mansoni* and *S. haematobium* in mice, sheep and cattle in Iran. *Bulletin OMS* 47, 591-600.
- Monrad, J., Christensen, N. O., Nansen, P. & F. Frandsen (1981) Resistance to *Fasciola hepatica* in sheep harbouring primary *Schistosoma bovis* infections. *J. Helminthol.* 55, 261-271.

- Monrad, J., Christensen, N. O. & P. Nansen (1990) Acquired resistance in goats following a single primary *Schistosoma bovis* infection. *Acta Trop.* 48, 69-77.
- Mountford, A. P., Coulson, P. S., Pemberton, R. M., Smithies, L. E. & R. A. Wilson (1992) The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology* 75, 250-256.
- Pons, H. A., Morgan, J. S., Hutchinson, M. L., Rojkind, M., Groszmann, R. J. & M. J. Stadecker (1989) Resistance to reinfection in experimental murine schistosomiasis : role of porto-hepatic hemodynamics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 189-197.
- Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A. & A. J. Dessein (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21, 2679-2684.
- Roberts, M., Butterworth, A. E., Kimagi, G., Kamau, T., Fulford, A. J., Dunne, D. W., Ouma, J. H. & R. F. Sturrock (1993) Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immunity.* 61, 4984-4993.
- Smythies, L. E., Pemberton, R. M., Coulson, P. S., Mountford, A. P. & R. A. Wilson (1992) T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunology* 148, 1512-1518.
- Vercruysse J. & Y. Bont (1997) The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitology Today* 13, 254-260.
- Viana da Costa, A., Gaubert, S., Fontaine, J., Lafitte, S., Seixas, A., Sampaio Silva, M. L., Capron, A. & J. M. Grzych. (1998) Murine *Schistosoma bovis* infection : analysis of parasitic and immune parameters. *Parasite Immunology* (in publication).
- Wilson, R. A., Coulson, P. S. & S. M. McHugh (1983) A significant part of the "concomitant immunity" of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunol.* 5, 595-601.
- Wu Z, Bu K, Yuan L, Yang G, Zhu J & Liu Q (1993) Factors contributing to reinfection with schistosomiasis japonica after treatment in the lake region of China. *Acta Trop.* 1; 54(2): 83-88.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 Representative graph of the parasitic parameters (worm recoveries and egg loads) of Experiment 1. Group A -day 146 ; group B-day 94 ; group C-day 146 and group D-day 52.

Figure 2 Representative graph of the parasitic parameters (worm recoveries and egg loads) of Experiment 2. Group A -day 127 ; group B-day 77 ; group C-day 127 and group D-day 50.

Figure 3 Evaluation of antibody profiles to *S. bovis* antigens (SWAP and SEA) in BALB/c mice infected with 160 cercariae of *S. bovis*. Groups A (reinfected), B, C (primo-infected) and D (challenge control). Data represent the OD (492nm) at an optimal dilution of 1/200 for IgG isotypes and 1/400 for IgM. Data correspond to the values recorded from a pool of animal sera (means of duplicate analysis).

Figure 4 Specific IgE antibodies to *S. bovis* antigens (SWAP and SEA) in BALB/c mice exposed to 160 cercariae. Groups A (reinfected), B, C (primo infected) and D (challenge control). Data represent the OD (492nm) at an optimal dilution of 1/10. Data correspond to the values recorded from a pool of animal sera (means of duplicate analysis).

Figure 5 IL-2 and IFN- γ production by spleen cells from *S. bovis* infected and reinfected BALB/c mice. Groups A (reinfected), B, C (primo infected) and D (challenge control). Cells were stimulated with SWAP (50 μ g/ml), SEA (50 μ g/ml) or 28GST (50 μ g/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Cytokine production was evaluated in culture supernatants. Means are of two duplicate experiments with supernatants from animal pool.

Figure 6 IL-4 and IL-5 production by spleen cells from *S. bovis* infected and reinfected BALB/c mice. Groups A (reinfected), B, C (primo infected) and D (challenge control). BALB/c mice. Cells were stimulated with SWAP (50µg/ml), SEA (50µg/ml) or 28GST (50µg/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Cytokine production was evaluated in culture supernatants. Means are of two duplicate experiments with supernatants from animal pool.

Figure 7 IL-10 production by spleen cells from *S. bovis* infected and reinfected BALB/c mice. Groups A (reinfected), B, C (primo infected) and D (challenge control). Cells were stimulated with SWAP (50µg/ml), SEA (50µg/ml) or 28GST (50µg/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Means are of two duplicate experiments with supernatants from animal pool.

Figure 8 Immunoblotting of SWAP and SEA antigens with pooled sera (impair panel number -SWAP ; pair panel number SEA). Lane 1, group A-SWAP ; Lane 2, group A-SEA ; Lane 3 , group B-SWAP ; Lane 4, group B-SEA ; Lane 5, group C-SWAP ; Lane 6, group C-SEA ; Lane 7, group D-SWAP ; Lane 8, group D-SEA ; Lane 9, control sera-SWAP ; Lane 10, control sera-SEA.

Table I - Numbers of animals in the groups A-E (Exp.1 and Exp. 2) and the schedules of infection with *S. bovis* cercariae.

Groups	Number of animals	1° Exposure (Infection)	"Challenge" (Reinfection)	Perfusion
EXP.1				
A1	3	Day 0	Day 94	Day 146
B1	10	Day 0	-	Day 94
C1	5	Day 0	-	Day 146
D1	7	-	Day 94	Day 52 (146-94)
E1	5	Unexposed controls		
EXP.2				
A2	12	Day 0	Day 77	Day 127
B2	9	Day 0	-	Day 77
C2	8	Day 0	-	Day 127
D2	10	-	Day 77	Day 50 (127-77)
E2	5	Unexposed controls		

Table II - Parasitic Parameters : worm recoveries and tissue egg counts in BALB/c infected mice. Groups A, B, C and D

M±SD	Total worms	Male worms	Female worms	Liver Total eggs	Intestine Total eggs	Total Tissue Eggs
EXP.1						
A	9.6	6.7	3.0	16000	2743	18743
	15.0	10.7	4.4	5751	3783	9519
B	7.6	4.9	2.7	18304	11184	29488
	8.8	6.1	3.1	6795	7352	13629
C	0	0	0	14896	3632	18528
	0	0	0	4196	3914	7398
D	28.0	18.4	9.6	15423	4116	19539
	12.2	9.6	3.7	7876	3726	10955
EXP. 2						
A	1.2	0.41	0.75	78213	9500	84863
	2.6	0.99	1.60	24837	12541	28306
B	4.3	2.4	2.0	63604	9809	73302
	5.9	3.4	2.4	25695	6587	29345
C	1.63	0.88	0.75	63390	9180	72320
	4.2	2.1	2.1	24408	12799	36220
D	53.7	34.0	19.7	52552	6332	58684
	10.9	8.6	5.1	17604	3751	20648

Table III - Parasitic parameters : individual worm recoveries and tissue egg counts - Experiment 1

Group A									
N°mice	Total worms	Male worms	Female worms	Liver Total eggs	Liver eggs/g	Intestine Total eggs	Intestine eggs/g	Total Tissue Eggs	
A1	0	0	0	12720	7482	1030	673	13750	
A2	2	1	1	22640	10481	7080	3540	29720	
A4	27	19	8	12640	5772	120	86	12760	
M±SD	9.6	6.7	3.0	16000	7912	2743	1433	18743	
	15.0	10.7	4.4	5751	2384	3783	1848	9519	
Group B									
B2	25	15	10	22640	10198	23280	11412	45920	
B3	10	5	5	30560	14148	24120	11766	54680	
B4	6	3	3	21120	10613	11280	7622	32400	
B6	0	0	0	13200	6000	4560	2141	17760	
B9	3	2	1	25280	11286	15520	7760	40800	
B10	21	17	4	15360	5774	5920	3462	21280	
B11	2	1	1	19040	10519	7000	8046	26040	
B12	0	0	0	8000	4188	5680	4773	13680	
B13	2	1	1	11680	6021	5920	5382	17600	
B14	7	5	2	16160	9028	8560	7509	24720	
M±SD	7.6	4.9	2.7	18304	8777	11184	6987	29488	
	8.8	6.1	3.1	6795	3144	7352	3131	13629	

Table III - Parasitic parameters : individual worm recoveries and tissue egg counts - Experiment 1

Group C									
	Total worms	Male worms	Female worms	Liver Total eggs	Liver eggs/g	Intestine Total eggs	Intestine eggs/g	Total Tissue Eggs	
C1	0	0	0	19360	12410	7520	5151	26880	
C6	0	0	0	11200	6788	390	394	11590	
C7	0	0	0	9760	5422	830	477	10590	
C8	0	0	0	16400	9880	8280	4358	24680	
C11	0	0	0	17760	9600	1140	538	18900	
M±SD	0	0	0	14896	8820	3632	2184	18528	
	0	0	0	4196	2752	3914	2364	7398	
Group D									
D1	52	39	13	22720	8000	8320	5584	31040	
D2	14	11	3	5320	2095	370	200	5690	
D3	18	12	6	3920	1941	0	0	3920	
D4	28	15	13	17600	6848	9200	5860	26800	
D6	24	14	10	15520	5006	1400	993	16920	
D7	31	20	11	23360	8684	4200	2121	27560	
D8	29	18	11	19520	7839	5320	3244	24840	
M±SD	28.0	18.4	9.6	15423	5773	4116	2571	19539	
	12.2	9.6	3.7	7876	2818	3726	2424	109555	

Table IV - Parasitic parameters : individual worm recoveries and tissue egg counts - Experiment 2

Group A								
	Total worms	Male worms	Female worms	Liver Total eggs	Liver eggs/g	Intestine Total eggs	Intestine eggs/g	Total Tissue eggs
A1	0	0	0	60640	30472	4160	1865	64800
A2	0	0	0	52160	27893	5480	3262	57640
A3	1	0	1	94560	53124	14120	6477	108680
A4	0	0	0	75520	35623	1120	619	76640
A5	0	0	0	80960	46529	2580	1234	83540
A6	0	0	0	35360	18041	500	239	35860
A7	8	3	5	86880	56052	32160	14105	119040
A8	0	0	0	63840	35077	3880	1893	67720
A9	0	0	0	84320	38857	1500	658	85820
A10	0	0	0	84320	52049	3240	1851	87560
A11	0	0	0	135520	77440	5320	2545	140840
A12	5	2	3	84480	43102	5740	3037	90220
M±SD	1.2	0.41	0.75	78213	42855	9500	3149	84863
	2.6	0.99	1.60	24837	15654	12541	3828	28306
Group B								
B1	2	1	1	27360	12493	3260	1801	30620
B2	12	6	6	35200	16449	15480	8746	50680
B3	0	0	0	62240	25404	6200	2884	68440
B4	0	0	0	34080	15925	4780	2685	38840
B5	2	1	1	78840	34713	4860	2325	83700
B6	0	0	1	85760	37287	10040	4827	958000
B7	1	1	0	70560	32819	4060	1990	74620
B8	16	10	6	79040	28534	18240	6400	97280
B9	6	3	3	99360	44757	20360	9130	119720
M±SD	4.3	2.4	2.0	63604	27598	9809	4532	73302
	5.9	3.4	2.4	25695	10958	6587	2902	29345

Table IV - Parasitic parameters : individual worm recoveries and tissue egg counts - Experiment 2

Group C								
	Total worms	Male worms	Female worms	Liver Total eggs	Liver eggs/g	Intestine Total eggs	Intestine eggs/g	Total Tissue Eggs
C1	12	6	6	80800	34978	29480	11935	110280
C2	0	0	0	54560	26877	1260	846	55820
C3	0	0	0	30240	13745	220	129	30460
C4	0	0	0	65920	35826	7560	3533	73480
C5	0	0	0	73760	33376	3120	13333	76880
C6	1	1	0	40960	20687	680	366	41640
C7	0	0	0	50400	26667	1440	661	51840
C8	0	0	0	108480	49534	29680	11372	138160
M±SD	1.63	0.88	0.75	63390	30211	9180	3772	72320
	4.2	2.1	2.1	24408	10844	12799	4979	36220
Group D								
D1	46	28	18	38560	13577	5880	3161	44440
D2	44	26	18	50240	17690	5520	3345	55760
D3	69	52	17	43680	14756	2360	1210	46040
D4	62	40	22	52480	16660	11040	6691	63520
D5	59	32	27	90080	30536	10160	5347	100240
D6	37	22	15	34400	13130	1920	946	36320
D7	69	39	30	68800	23562	12480	5622	81280
D8	45	30	15	35840	12986	3680	1897	39520
D9	52	33	19	65920	21403	6880	3389	72800
D10	54	38	16	43520	15111	3400	1692	46920
M±SD	53.7	34.0	19.7	52552	17941	6332	3328	58684
	10.9	8.6	5.1	17604	5665	3751	1987	20648

Experiment 1

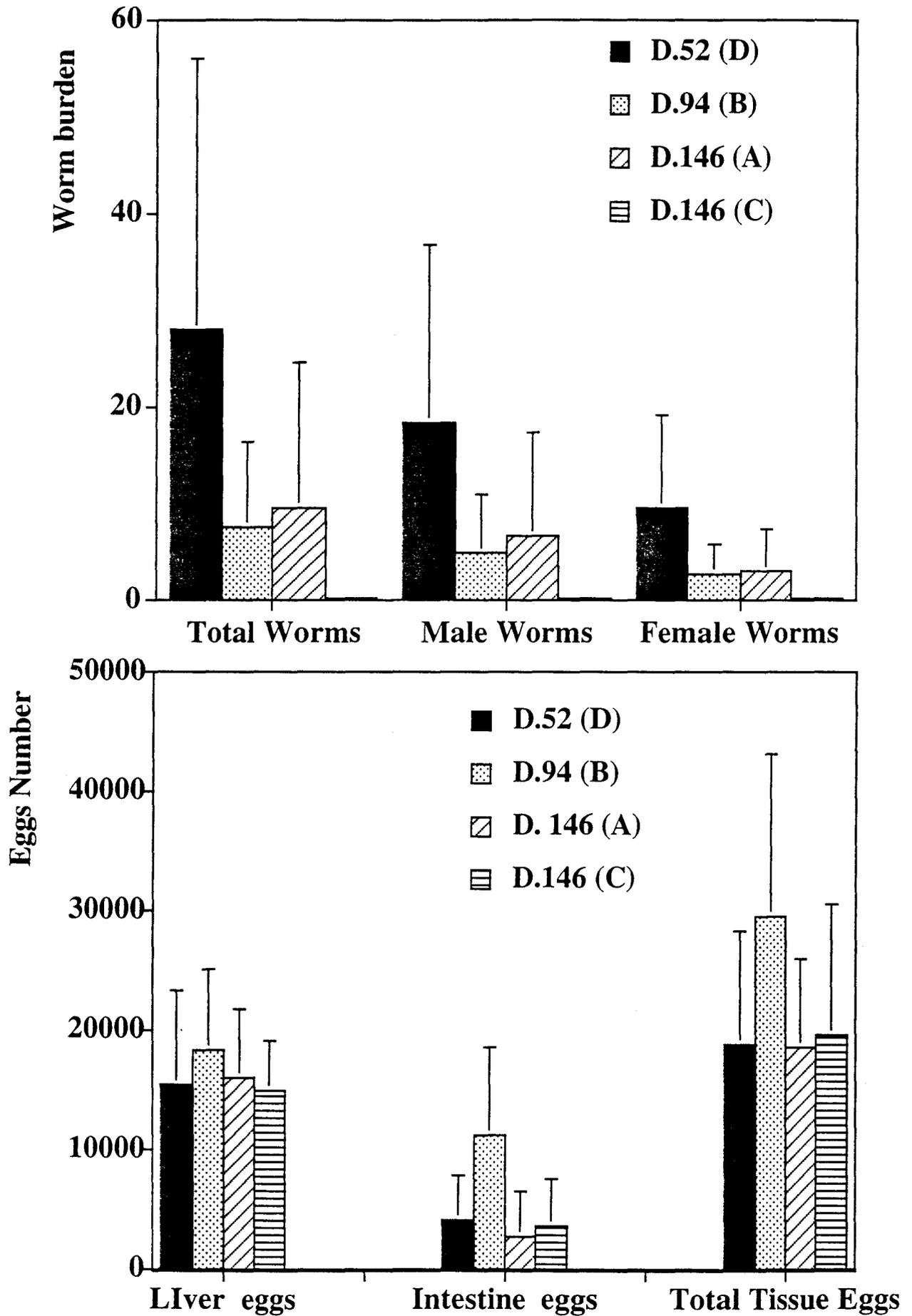


Figure 1

Experiment 2

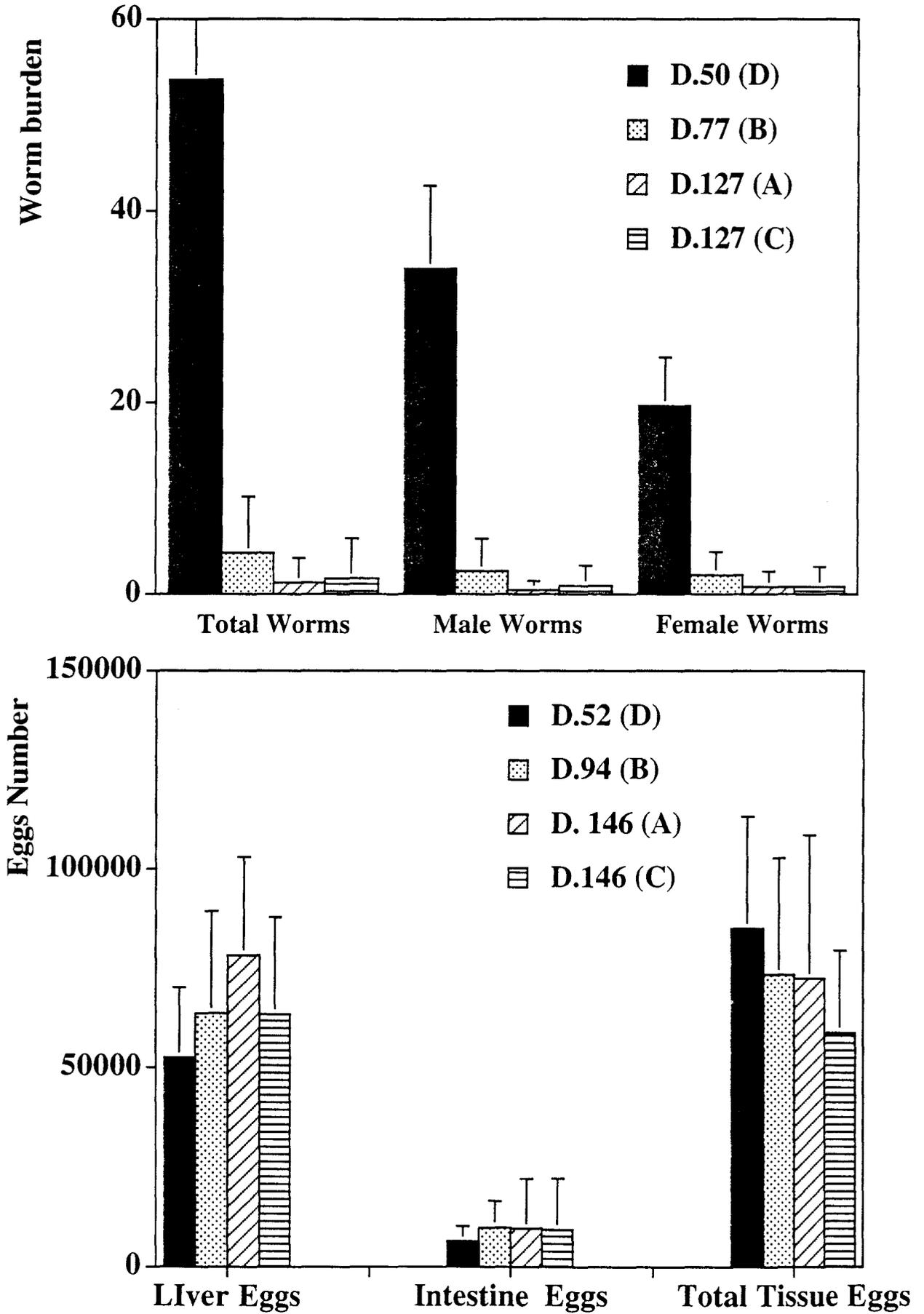
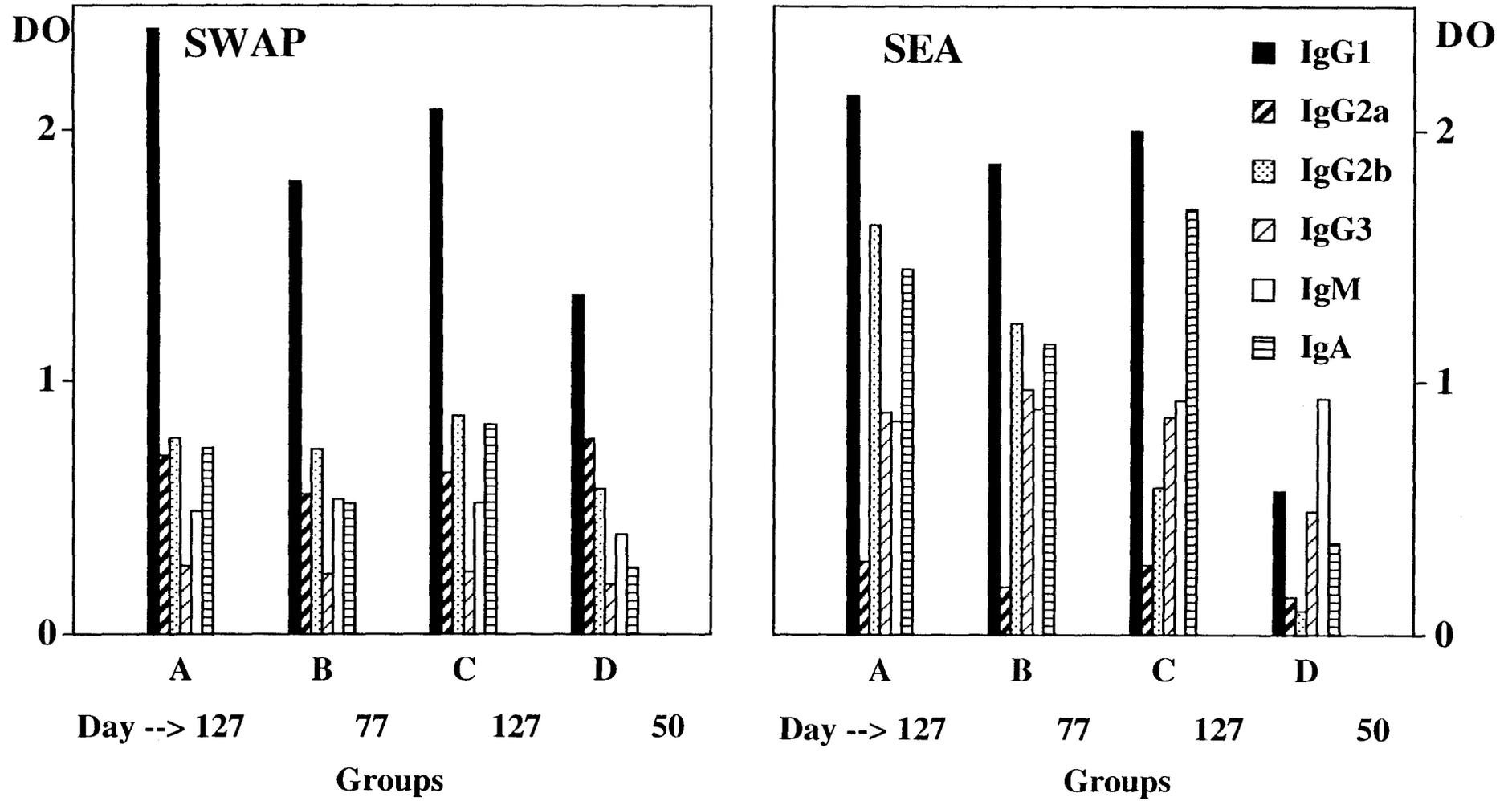


Figure 2

Experiment 2

Figure 3



Experiment 2 : IgE response

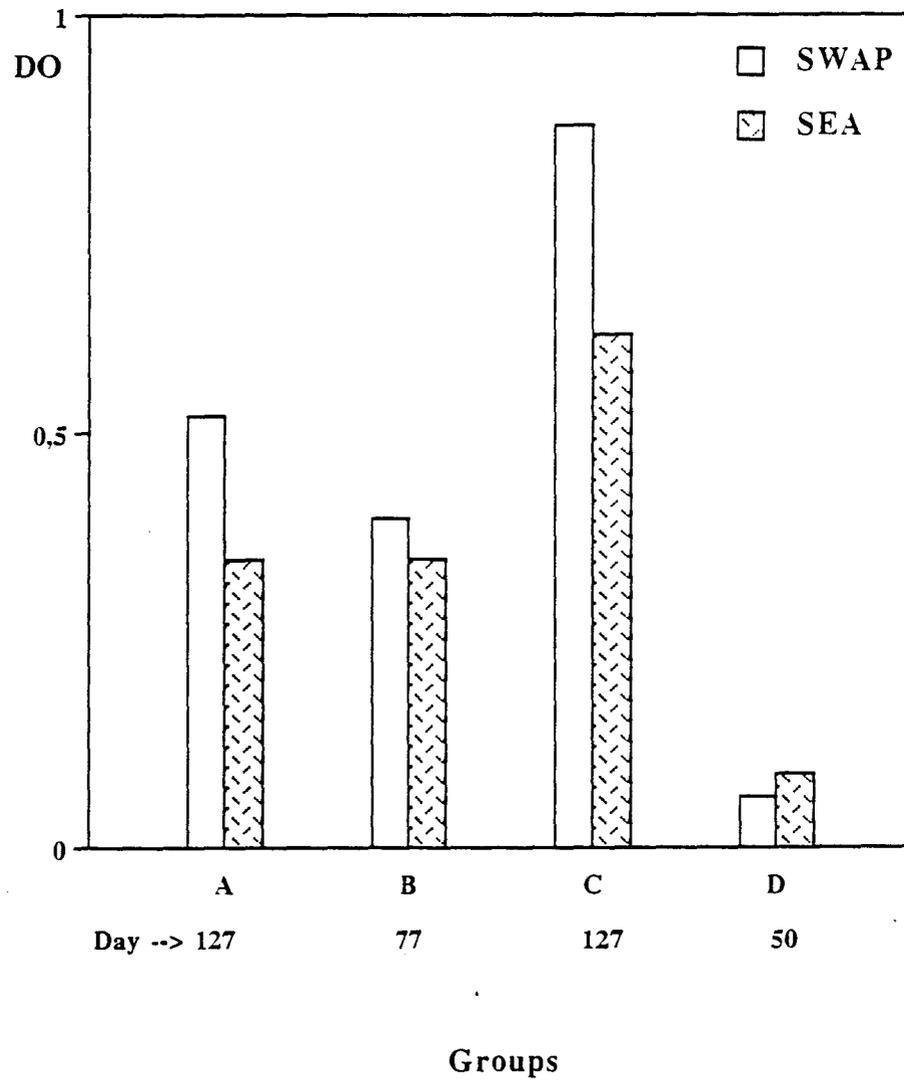
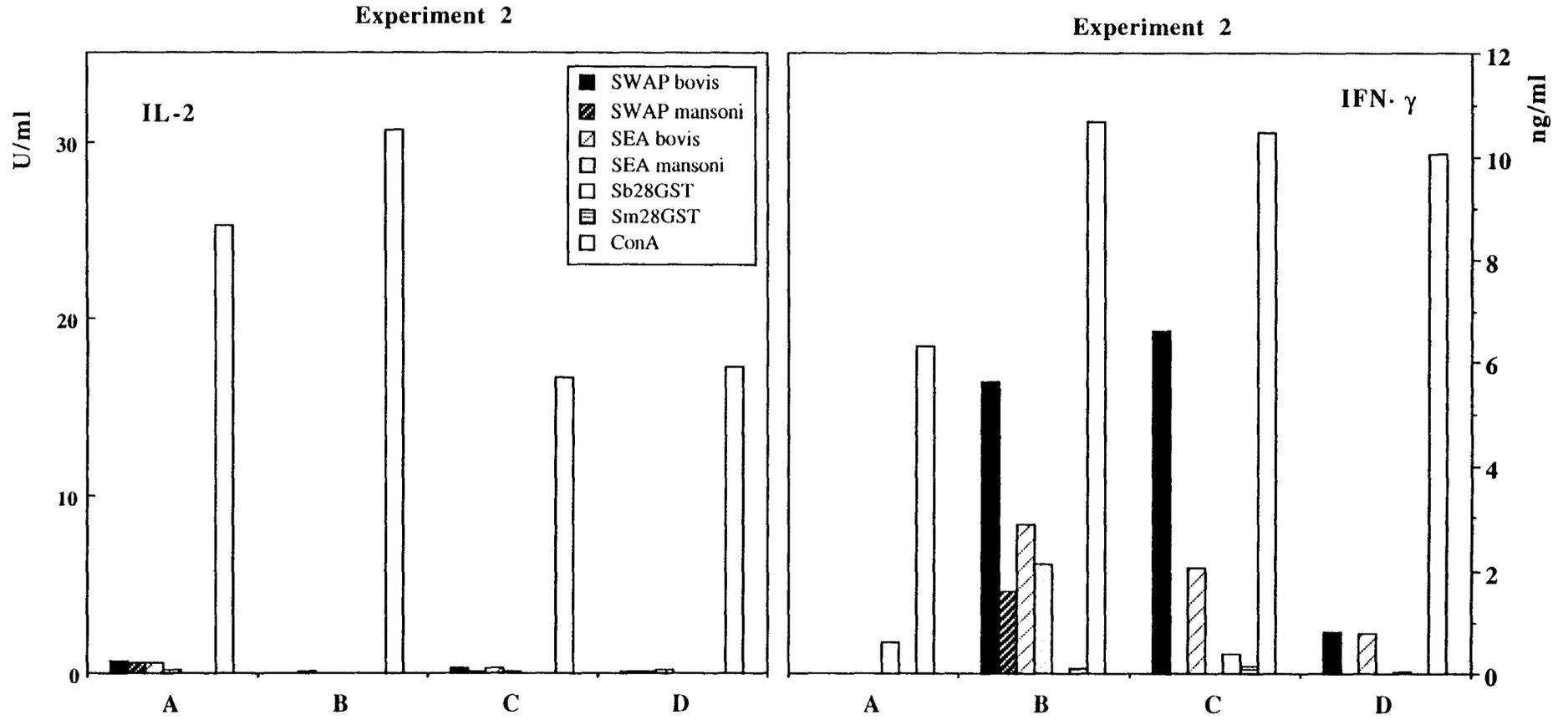


Figure 4

Figure 5



Experiment 2

Experiment 2

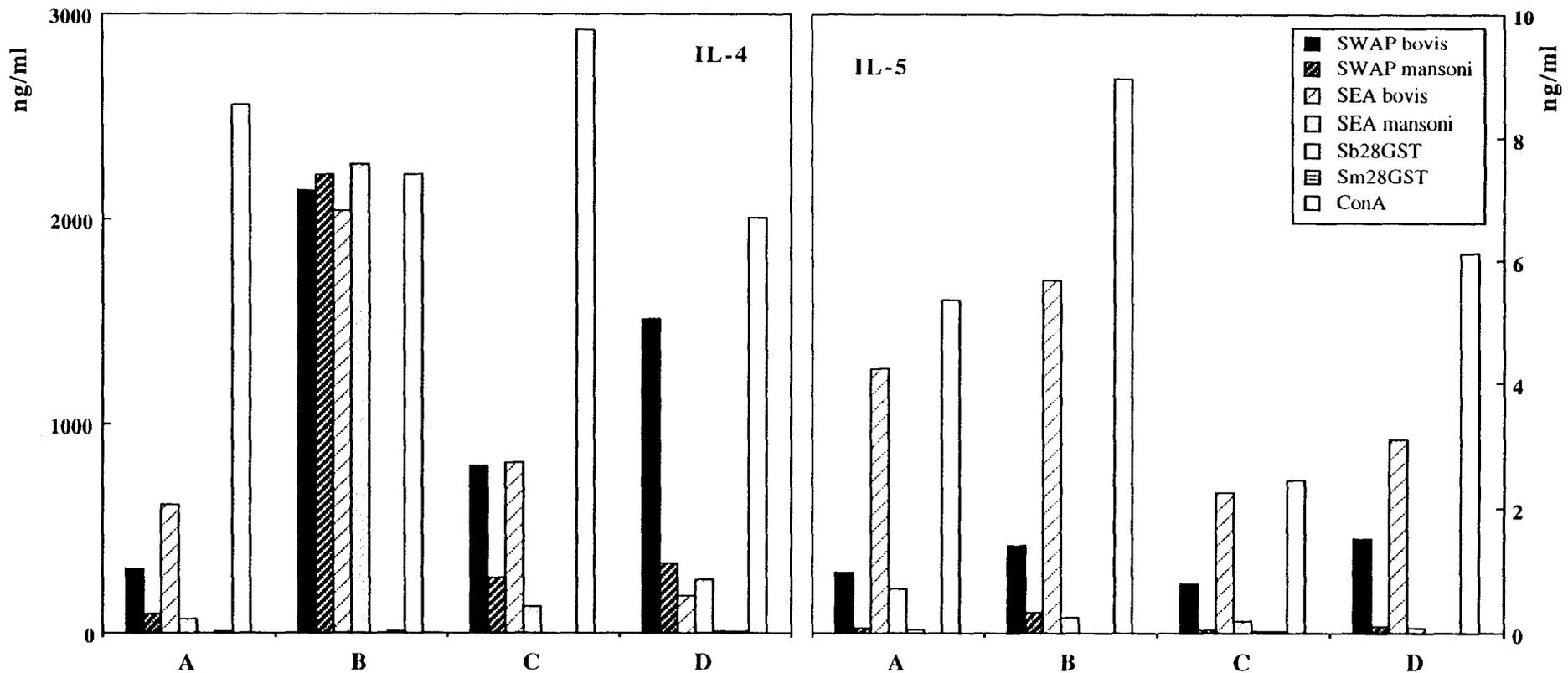


Figure 6

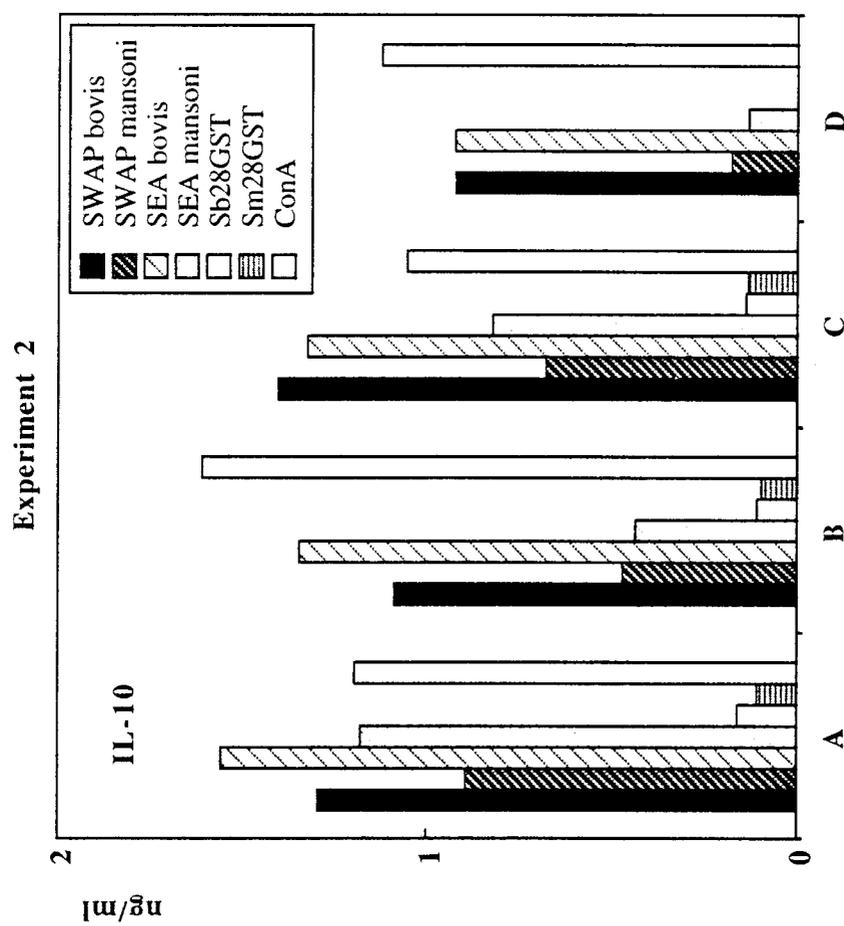


Figure 7

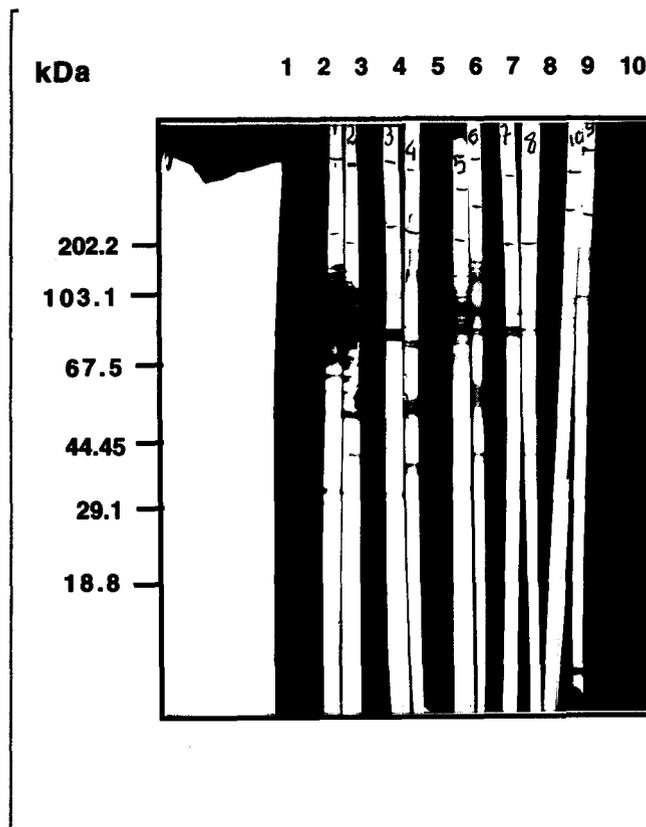


Figure 8

ARTICLE 3

Dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre l'infection par les schistosomes, les GST présentent un intérêt particulier.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre I de ce mémoire (11.6), de nombreux travaux ont démontré dans différents modèles animaux le pouvoir protecteur de l'antigène *S. mansoni* 28GST en terme de réduction de la charge parasitaire, de diminution conséquente de la production d'oeufs accompagnée d'une réduction de la viabilité des oeufs.

Des travaux similaires réalisés avec l'antigène *S. bovis* 28GST, chez l'hôte naturel, ont également permis de relier les phénomènes de protection avec la réduction de la charge parasitaire et/ou la diminution de la fécondité des vers, en fonction du modèle animal et du protocole d'immunisation appliqué.

Ces études apportent de nouvelles perspectives dans le contrôle de la pathologie et de la transmission de la schistosomiase. Cependant, les mécanismes responsables de ces phénomènes et l'association entre les effets anti-fécondité observés et l'inhibition ou non des propriétés enzymatiques de l'antigène Sb 28GST restent incompris.

Afin de répondre à cette question, deux approches ont été entreprises au cours de nos travaux dans le modèle murin :

- l'immunisation par l'antigène rSb 28GST suivie d'une infection homologue (*S. bovis*) ou hétérologue (*S. mansoni*).

- l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-rSb28GST afin de comprendre les mécanismes liés aux phénomènes de l'anti-fécondité et de l'anti-viabilité, plus prononcés dans l'infection par *S. bovis*.

Les principaux objectifs consistent à :

- 1) Evaluer au cours d'expériences d'immunisation par la rSb 28GST, suivie d'une infection d'épreuve homologue ou hétérologue, ses effets *in vivo* sur la charge en vers, la fécondité et la viabilité des oeufs et l'élucidation des mécanismes d'action associés à l'activité

enzymatique GST de la molécule. Les réponses humorale et cellulaire induites par cette immunisation ont été aussi étudiées.

2) A partir des anticorps monoclonaux (AcMc) produits contre l'antigène rSb 28GST, nous avons cherché à :

- analyser *in vitro* la capacité de ces anticorps monoclonaux à inhiber l'activité enzymatique des 28GSTs (*S. bovis*, *S. mansoni*, *S. haematobium*) et à apprécier leurs fonctions biologiques *in vivo*, après transfert passif à l'aide de plusieurs paramètres : parasitologiques (charge parasitaire, nombre d'oeufs totaux dans le foie et l'intestin) et évaluation du potentiel d'éclosion (viabilité des oeufs).

- identifier sur la Sb 28GST les épitopes linéaires (structure primaire) reconnus par chaque anticorps monoclonal, dans le but d'établir une association entre l'épitope reconnu, le site actif de la molécule et les effets biologiques induits.

ARTICLE 3

LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA GLUTATHION S-TRANSFERASE DE 28kDa DE *Schistosoma bovis* AFFECTENT LA VIABILITE DES OEUFS DU SCHISTOSOME :

Relation avec l'activité GST

L'immunisation par la rSb 28GST, dans le modèle BALB/c, suivie d'une infection d'épreuve homologue par *S. bovis* ou hétérologue par *S. mansoni*, a induit une protection qui se traduit par une réduction de la maturité et de la viabilité des oeufs dans les deux espèces. Ce protocole d'immunisation suscite un profil de type Th2 : production d'anticorps spécifiques d'isotype IgG1 et IgG2b et une production prédominante des cytokines IL-4 et IL-5 par les cellules spléniques.

Parallèlement, des anticorps monoclonaux anti-rSb 28GST ont été produits et sélectionnés : deux AcMc d'isotypes respectifs IgG2a et IgG1, capables d'inhiber l'activité enzymatique de la Sb 28GST et un AcMc, d'isotype IgG1, incapable de bloquer l'activité GST. Lors d'expériences de transfert passif chez des souris BALB/c, ces 3 AcMc ont montré un effet très intense sur la viabilité des oeufs, par une réduction significative (28-54%) de leur capacité à éclore ainsi qu'une augmentation du nombre d'oeufs immatures, la protection étant variable au niveau de la charge vermineuse.

La synthèse de décapeptides (par PeptidScan) de la Sb 28GST a permis d'identifier les épitopes reconnus par ces AcMc : certaines séquences d'acides aminés sont spécifiques d'un AcMc ; leur capacité à inhiber l'activité GST suggère une liaison au site actif ou à des régions proches du site, n'excluant pas une participation de la structure tridimensionnelle de la molécule. Aucune association entre épitope linéaire, site actif et expression de la protection n'a pu être établie.

Ces travaux soulèvent des questions concernant l'expression de l'immunité anti-fécondité et anti-viabilité dans la schistosomiase expérimentale, démontrant cet antigène comme une des cibles de ces effets, soit en rendant les oeufs plus vulnérables à la réponse immune soit en intervenant sur la physiologie du parasite.

Antibodies to *Schistosoma bovis* 28 kDa Glutathione S-transferase affect schistosome egg viability : Relationship with GST activity ¹

**Alexandra VIANA DA COSTA*², Sophie GAUBERT*, Sophia LAFITTE*,
Josette FONTAINE*, Marc BOSSUS[†], Hélène GRAS-MASSE[†], André
CAPRON* & Jean-Marie GRZYCH*.**

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

[†] Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, France.

running title : Sb28GST antibodies and schistosome egg viability

² Corresponding author : Tel .(33) 3 20 87 78 09

Fax (33) 3 20 87 78 88

E mail:A-monica.Vianadacosta@pasteur-lille.fr

¹These investigations received financial support from the European Economic Community - Fellowship Grant contract ERBCHBICT 941496. This work was also supported by the Institut Pasteur de Lille, IFR n°17, Unité INSERM U-167.

ABSTRACT

BALB/c mice immunized with *Schistosoma bovis* 28kDa glutathione S-transferase (rSb 28GST) displayed a reduction in egg maturation and egg viability when exposed to homologous *Schistosoma bovis* or heterologous *Schistosoma mansoni* infection. Inhibition of GST enzymatic activity *in vitro* by immunized mouse sera was not associated with worm burden reduction. The analysis of the immune response showed the production of IgG1, IgG2b specific Abs and predominant production of IL-4 and IL-5 by spleen cells, indicating a Th2 response.

In parallel, mAbs against rSb 28GST were produced from immunized BALB/C mice. Three mAbs were selected : Sb4-50 (IgG2a) and Sb4-56 (IgG1) which inhibited Sb 28GST activity and Sb4-10 (IgG1) which did not. When passively transferred into BALB/c mice, clear effects on egg viability, notably a significant reduction in egg hatching and an increase in immature eggs, were observed. Effects on worm burdens were, however, variable and no clearcut association between the inhibition of enzyme activity and anti-fecundity or anti-viability activities was recorded. The use of overlapping peptides covering the entire amino acid sequence of Sb 28GST, allowed us to define the linear epitopes recognized by the anti-Sb 28GST mAbs. Some epitopes were shown to be specific and recognized by a particular mAb, the capacity of which to inhibit GST activity suggested binding to the active site or to neighboring regions. There was no association between the mAb response to a linear peptide epitope and the protection induced.

Both rSb 28GST immunization and Sb28 GST mAbs passive transfer induced a marked effect upon egg maturation and egg hatching, suggesting the involvement of similar mechanisms of action during *S. bovis* and *S. mansoni* infections.

INTRODUCTION

Widely distributed in the plant and animal kingdoms (1), glutathione S-transferases (GST : EC 2.5.1.18) represent a family of isoenzymes involved in the detoxification of xenobiotics and endogenous substances. All eukaryotic species possess multiple cytosolic and membrane-bound GST isoenzymes, each of which displays distinct catalytic as well as noncatalytic binding properties.

GSTs have been identified in various helminths where they may represent major detoxification enzymes (2,3), in *Schistosoma mansoni* the major 28 kDa form represents 2-4% of the total soluble proteins (4).

The immunoprotective properties of the native 28 kDa GST (5,6) led us to clone, sequence and express *S. mansoni* 28 kDa GST (rSm 28GST) (7,8) in both *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* (9).

The rSm 28GST molecule induces a significant degree of protection after immunization in permissive hosts such as hamsters, mice and baboons or in semi-permissive host rat (6,10). The protection is essentially expressed by a reduction in the worm burden (6) and/or by the impairment of parasite fertility (11). Studies with rat mAbs indicated an association between the inhibition of GST enzymatic activity by the Abs and effects on fertility and egg viability but not with the reduction of worm burden (12). The mapping of the major epitopes of Sm 28GST led to the demonstration of the major role played by N- and C- terminal domains in the expression of enzymatic activity. Immunization with the corresponding synthetic peptides was followed by 70% decrease in parasite fecundity and egg viability (13). In this context, the C- terminal epitope (a.a. 190-211) appears of particular interest for optimization of an anti-parasite fecundity vaccine. In parallel, an immunodominant epitope associated with protection against challenge in experimental models and acquired resistance in human populations has been identified. The immunization with an octameric construction of the corresponding peptide (a.a. 115-131) has led to significant degree of protection in rats (14).

The 26 kDa GST from *Schistosoma japonicum* (reSjc 26GST) is also capable of inducing significant degrees of immunity in experimental by infected mice and pigs. Immunization with

this Ag induced a low, but significant, level of protection in terms of reduction of worm burden against challenge infection, together with a pronounced reduction in the number of eggs in the livers and spleens of immunized animals (15,16).

In our laboratory, the cloning of the GST from *Schistosoma bovis* (rSb 28GST) (17) has allowed studies in several natural hosts. First immunization experiments in cattle with native Sb 28GST showed a strong reduction in egg production and tissue egg count, but no significant reduction in adult worm burden after *S. bovis* challenge (18). In later experiments, immunization of goats with rSb 28GST affected the worm burden but not fecundity after challenge (20). Furthermore, work from De Bont *et al.* (19) has demonstrated the capacity of rSb28GST to protect cattle against *S. mattheei* infection. After a massive single experimental challenge in calves no protection was observed, while natural infections, lighter in intensity, revealed a 50% reduction in the worm burden, an 89% reduction in faecal egg counts and a 93% reduction in miracidial counts.

These results, while indicating the potential of rSb 28GST as a vaccine towards veterinary schistosomiasis also illustrate major differences in the effects of immunization between distinct animal species. Nevertheless, these approaches indicate the possibility that a cross-specific anti-fecundity vaccine might be developed due to the phylogenetic conservation of the protein in schistosomes.

Despite the promising results recorded with schistosome GST in immunoprophylaxis, many questions concerning the mechanisms underlying the expression of immunity still remain unclear. Schistosomes with terminal spine eggs seem to be more vulnerable to anti-fecundity and anti-viability mechanisms (20,21,22), and their analysis is essential to a better comprehension of parasite biology and host immune response.

In this paper, we carried out immunization experiments in mice using purified *S. bovis* r28GST followed by an homologous or heterologous infection with *S. bovis* or *S. mansoni*, respectively, to determine the *in vivo* effect of this molecule on worm burden, worm fecundity and egg viability and to elucidate the mechanisms of action. We also analyzed immune and cellular responses during the time course of these experiments. This study was completed by passive transfer experiments in BALB/c mice of rSb 28GST specific mAbs. It included *in vivo*

analysis of the biological functions of these mAbs during *S. bovis* infection, together with an *in vitro* study of their capacity to inhibit the enzymatic activity of different 28GSTs and the identification of linear peptide epitopes on Sb 28GST.

MATERIALS AND METHODS

Host animals and parasites.

The Salamanca strain (Spain) of *S. bovis* was maintained in *Bulinus truncatus* snails as intermediate hosts and golden hamsters as definitive hosts (Porto laboratory). The guadeloupean strain of *S. mansoni* was maintained in *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts, bred in mineral water (Société des Eaux de Volvic, France). For immunization and passive transfer experiments, female BALB/c mice, 6 to 8 weeks old, were purchased from Iffa Credo (L'Abresle, France).

Infection protocols.

Animals were exposed percutaneously to 160 *S. bovis* cercariae or to 60 *S. mansoni* cercariae on day 0. Infected mice were bled from the retroorbital sinus at different times.

Antigens.

Recombinant *S. bovis* and *S. haematobium* 28GSTs were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strain TGY 73.4 containing the plasmids pTG8887 and pTG8889, respectively (17). The recombinant *S. mansoni* 28GST (rSm28GST) was expressed in *Escherichia coli* strain TGE901 containing the plasmid pTG54 (17). Recombinant Sb28GST, Sm28GST and Sh28GST proteins were purified by passage through a glutathione-Sepharose column with, respectively 98, 95 and 95 % purity. Soluble egg antigens of *S. bovis* (SEA bovis) were extracted from homogenized eggs isolated from livers of 55-day infected hamsters. Briefly, frozen eggs were disrupted by 10 passages through an X-press (A.B. Biox, Jarfalla, Sweden) and the soluble fraction was collected after centrifugation for 15 min at 10,000 g. Soluble egg antigens of *S. mansoni* (SEA mansoni) were extracted from homogenized eggs isolated from

livers of 46-day *S. mansoni* infected hamsters and prepared similarly.

Immunization regime .

Groups of ten mice were immunized s.c. with 1) 50µg of rSb 28GST in a equal volume of CFA (Difco, Detroit, MI) (Day -22) ; 2) 50µg of rSb 28GST in a equal volume of IFA (Difco, Detroit, MI) (Day -10) ; 3) boosted i.v. with 10µg of rSb 28GST at Day -3. Infection was performed at Day 0 with *S. bovis* cercariae for Experiment I (Sb28GST/*S. bovis*) and with *S. mansoni* cercariae for Experiment II (Sb28GST/*S. mansoni*). Total perfusion was performed at day 48 for the immunized group, the adjuvant control group and non-immunized infected animals (experimental control). The percentage of protection was calculated as follows : % (C-T) : C x 100 where C= mean worm recovery from control group (immunized adj.) and T= mean worm recovery from immunized rSb28GST group.

Worm recovery and tissue sampling.

Animals were sacrificed at day 48 after infection for Exp.1 and Exp.2. For passive transfer experiments animals were sacrificed at day 47 or day 55 post-infection. The intensity of the infection was assessed by total perfusion to determine the worm burden. Tissue egg loads were evaluated after alkali digestion of livers and intestines in a 4% KOH solution, incubated for 16 h at 37°C. Aliquots of the final suspension were counted under a light microscope.

Production and characterization of mAbs.

BALB/c mice were immunized s.c. with 10µg of rSb28GST in a equal volume of CFA, injected 3 weeks later with 10µg Ag in IFA, and boosted i.v. with 10µg of rSb 28GST 4 days before fusion. The spleen cells were fused with SP2/O mouse myeloma cells. Hybridoma cell supernatants were screened for the presence of specific Abs by ELISA and Western blot. MAbs were produced in BALB/c mice by the induction of ascitic fluid.

ELISA.

ELISA was performed in 96-well microtiter plates (Nunc, Intermed S.A., Denmark). Ags (rSb28GST and SEA bovis) were coated at 5µg/ml (100µl/well) in sodium carbonate buffer (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃ (pH 9.6)) overnight at 4°C, and plates were saturated with 0.5% gelatine in PBS for 60 min. Plates were then incubated with diluted sera or culture cell supernatants overnight at 4°C. The binding of specific mouse Ab to Ags was measured using the appropriate anti-mouse total IgG, sheep-HRP (1:20000 Sanofi-Diagnostic Pasteur, France). Assays were developed for 30 min at 37°C using O-phenylenediamine (1mg/ml, Sigma) (100µl/well), the reactions were stopped with HCl 2N (100µl/well) and OD measured at 492 nm (Titertek Multiskan[®]Mcc /340, Labsystems).

Sera from immunized mice were tested for Sb 28GST Abs at a dilution of 1: 1000, except for IgM, IgG3 and IgA assays where they were diluted respectively at 1:250, 1:250 and 1: 50 in PBS/0.1% Tween 20 buffer and incubated overnight at 4°C and ELISA performed as described above. For SEA Abs detection, immunized mouse sera were diluted at 1:250, except for the IgA assay (1: 50).

For Ig isotypes, the amounts of specific mouse Ab bound to Ag preparations (rSb28GST and SEA bovis) were measured using the appropriate anti-mouse Ig isotype specific reagent, diluted in PBS/0.1% Tween 20 as follows : IgM, goat-horseradish peroxidase (HRP) conjugate, anti-mouse IgM (used at 1:8000, Clonotyping System -Southern Biotechnology Associates Inc., USA) ; IgG1, goat anti-mouse IgG1 HRP (1: 10000, SBA Inc.); IgG2a, goat anti-mouse IgG2a-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgG2b, goat anti-mouse IgG2b-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgG3, goat-anti-mouse IgG3-HRP (1:10000, SBA Inc.); IgA, goat anti-mouse IgA biotin (1:5000, Sigma) with streptavidin-peroxidase conjugate (1:2000, Amersham, France). Sera from immunized animals or undiluted culture cell supernatants were incubated overnight at 4°C and ELISA performed as described above.

Cytokine production and assays

Spleens were removed from infected mice and cell suspensions were prepared as previously described (23). Cells suspensions were incubated alone or in the presence of SEA bovis

(50µg/ml), SEA mansoni (50µg/ml), rSb28GST (50µg/ml) and rSm28GST (50µg/ml) antigens or Con A (5µg/ml, Seromed) in 24-well plates at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected after 24 h for IL-2 and IL-4 measurements and after 72 h for IFN γ , IL-5 and IL-10 measurements. Cytokine production was evaluated by a two-site ELISA with specific mAbs purchased from PharMingen (San Diego, CA). For IFN- γ detection, purified anti-IFN- γ mAb R4-6A2 was used in combination with the biotinylated anti-IFN- γ mAb XMG1-2. Purified anti-IL-4 mAb and biotinylated anti-IL-4 mAb were derived from clones BV4-1D11 and BVD6-24G2, respectively. Purified anti-IL-5 mAb and biotinylated anti-IL-5 mAb were purified from clones TRFK5 and TRFK4, respectively. Purified anti-IL-2 mAb and biotinylated anti-IL-2 mAb were obtained from clones JES6-1A12 and JES6-5H4, respectively. Purified anti-IL-10 mAb and biotinylated anti-IL-10 mAb were obtained from clones JESS-2A5 and SXC-1(B), respectively. Recombinant mouse IL-4 (rIL-4), rIL-5 and rIL-10 were from PharMingen, rIFN- γ and rIL-2 were purchased from Genzyme (Cambridge, U.K.)

Cytokine detection was performed as described elsewhere (24). Cytokine concentrations were calculated by reference to standard curves constructed with known amounts of recombinant purified cytokines diluted in culture medium. Values were ranged between 0.1 to 10 ng/ml for IL-5, IL-10 and IFN- γ , between 1.56 to 100U/ml for IL-2 and between 20 and 1250 pg/ml for IL-4.

Electrophoresis and Western Blot.

Schistosome GSTs were fractionated on 13% SDS-PAGE under reducing conditions (25). After transfer to nitrocellulose sheets (26), strips were incubated 1 h with PBS / 5% non-fat dried milk. They were then incubated overnight at 4°C with undiluted culture supernatants or ascitic fluids (1:1000). Detection of Ab binding was performed with anti-mouse IgG, sheep-HRP (1:500) in PBS / 5% non-fat dried milk and 4-chloro-1-naphthol as substrate (Sigma) by standard methods. Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to Garrels (27).

GST inhibition test .

The GST catalyzed reaction was carried out according to Habig *et al* (28) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) as substrate. Recombinant 28GST of *S. bovis*, *S. mansoni* and *S. haematobium* (0.1µg) were incubated with 44 µl of mAbs ascitic fluids or irrelevant SP2/O ascitic fluid, for 1h at 37°C and for another 4 h at 4°C. After incubation, the enzymatic reaction, run out in 96-well-flat-bottomed standard ELISA plates, was performed with 200 µl potassium phosphate buffer (50mM, pH 6.5) with 5mM GSH and 1mM CDNB. The absorbance was measured at 340 nm in a Spectrophotometer (Titertek Multiskan MS, Labsystems) every 30 s for 2 min. GST inhibition data correspond to the mean of 8 assays. The % of inhibition was calculated by comparison to an assay in which Ab was replaced by SP2/O ascitic fluid. Values above 50% were considered as positive.

Epitope scanning (PEPSCAN).

Peptides used in all assays were synthesized as described by Geysen *et al* (29) on polyethylene pins on which polymers of polyacrylic acid had been formed by irradiation (Non-Cleavable Peptides Kit Chiron Mimotopes, Australia). Polyethylene pins and F-moc L-aminoacids (NovaBiochem.) were used for synthesis according to the manufacturer's instructions. The N-terminals of all peptides were acetylated. All overlapping decapeptides, initiated at every third amino acid, were based on the amino acid sequence of the 28GST *S. bovis* protein. The ability of our mAbs to bind to these peptides was tested using the standard ELISA protocol (29). Briefly, mAbs were incubated with the peptide bound to the pins overnight at 4°C, the pins were washed and incubated with peroxidase conjugated anti-mouse antibody, washed again, and incubated in peroxidase substrate (ABTS-2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6) diammonium salt crystals)(Sigma). Colour development was measured at « dual wavelength » 405-492 nm (Titertek Multiskan MS, Labsystems). ODs corresponding to bound mAb are expressed with the nonspecific background contributed by SP2O ascitic fluid subtracted.

Passive transfer experiments.

S. bovis infected BALB/c mice received i.v. via the tail vein, ascitic fluids (300µl containing 750-1000 µg Ab heat-treated by incubation at 56°C for 30 minutes) in either one injection at day 35 (Protocol I - experiments 3 ; 4 ; 5 ; 6) or day 30 (Protocol II - experiment 7) or two injections (2x300µl) at days 30 and 40 (Protocol III - experiment 8). Control mice received SP2/O ascitic fluid. Whole body perfusion was carried out at day 47 (Protocol I and II) or at day 55 (Protocol III) post-infection. The percentage of protection conferred was calculated as follows : % (C-T) : C x 100 where C= mean worm recovery in SP2/O treated group and T= mean worm recovery in mAb treated group.

Egg hatching assay.

Schistosome eggs were collected from infected mice on the day of perfusion and prepared as described by Xu *et al* (12). About 200 eggs (approximately 50% mature eggs) were distributed in a 24-well plate and left to hatch at 30°C for 90 min., the volume of each well being adjusted to 1.5ml with calcium-free water. Egg hatching was stopped with 100µl of a 1% (v/v) Lugol solution. Living eggs (mature and immature), non-living eggs and empty egg-shells (corresponds to hatched miracidia) were then counted under a phase contrast microscope.

Hatching assays were performed individually and calculated as follows :

$$\% \text{ Maturation} = ((\text{Mature egg number} + \text{Egg shell number}) : \text{Total egg number}) \times 100$$

$$\% \text{ Hatching} = \text{Egg shell number} : (\text{Mature egg number} + \text{Egg shell number}) \times 100$$

Statistics

The data were presented as means ± SD. The significance of the results was calculated by Student's t-test and the Z-test (for hatching experiments) and p<0.05 was considered significant.

RESULTS

Protection against a challenge infection

Table I summarizes studies performed in mice immunized with rSb28GST and challenged with *S. bovis* or *S. mansoni* cercariae. In both homologous (Exp.1) and heterologous (Exp.2) experiments no significant protection in terms of worm burden and liver and intestinal eggs per gram per female (eggs/g/f) loads was recorded. Even if a reduction in total worm burden (Exp.1) and in the number of tissue eggs/g/f (Exp.2) was observed, this was not significant. No differences were found in the numbers of male and female worms between immunized and control groups.

It is important to notice that a major trapping of eggs was observed in the liver when compared to the intestine in *S. bovis* infection, but the opposite was the case in *S. mansoni* infection.

Impairment of egg viability

The analysis of egg viability was performed on individual samples and is summarized for Exp.1 (Sb28GST/*S. bovis*) and Exp.2 (Sb28GST/*S. mansoni*) in Table II.

In Exp.1, a reduction in egg maturation (10%) and in egg hatching (21%) was recorded between the Sb28GST/*S. bovis* group and Adj./*S. bovis* control group ($p < 0.01$). A significant difference was observed between the Sb28GST/*S. bovis* and Infected-*S. bovis* groups, but not between Adj./*S. bovis* and Infected-*S. bovis* groups.

In Exp.2, a reduction in egg maturation (9%) and in egg hatching (25%) was recorded between the Sb28GST/*S. mansoni* group and Adj./*S. mansoni* control group ($p < 0.01$). A significant difference was observed between the Sb28GST/*S. mansoni* and Infected-*S. mansoni* groups, but not between the Adj./*S. mansoni* and Infected-*S. mansoni* groups. It is interesting to point out that the proportion of egg maturation was greater during infection by *S. mansoni* than by *S. bovis*.

Specific Ab responses to Sb 28GST and SEA bovis antigens

Immunization with rSb 28GST resulted in a polyisotypic Ab response against this antigen (strong signal for IgG1, IgG2b and IgG2a ; later IgM and IgG3) in both homologous (Exp.1 - Sb28GST/*S. bovis*) and heterologous (Exp.2 -Sb28GST/ *S. mansoni*) experiments (Fig.1A). Weak signals (O.D. below 0.30) were detected against Sb 28GST Ag from the Adj./*S. bovis* , Infected-*S. bovis.*, Adj./*S. mansoni* and Infected-*S. mansoni* groups (data not shown).

Our immunization protocol induced an intense anti Sb28GST Ab response, the main component of which was IgG1, which was boosted after both homologous or heterologous infections (Fig.1A).

The Ab response to SEA bovis Ag (Fig.1B) was heterogeneous, and mainly of the IgM isotype in all groups (Exp.1 and Exp.2). Immunization with Sb28GST induced a precocious IgG1 production after infection in Sb28GST/*S. bovis* and Sb28GST/*S. mansoni* groups, in comparison with the control group (Adj.) or the infected group (data not shown).

Cytokine production

Figures 2 and 3 summarize the analysis of the *in vitro* cytokine production of spleen cells stimulated with ConA or parasite antigens at the end of the experiments (day 48 after challenge). No significant production of IL-2 and IFN γ was observed after parasite Ag stimulation in either homologous or heterologous experiments. Low amounts of IL-2 and IFN γ were sometimes detected in response to a specific parasite antigen stimulation.

The main cytokines produced were IL-4 and IL-5. IL-4 production, elicited with all parasite antigens, was markedly higher in homologous infections when compared to a heterologous challenge. IL-5 production was observed after GSTs Ag stimulation in both Exp.1 and Exp.2 and was produced specifically after SEA bovis Ag stimulation only after an homologous challenge (Sb28GST/*S. bovis*). A significant level of IL-10 production was observed only after SEA bovis stimulation in Exp.1 (data not shown).

mAb characterization and capacity to inhibit GST.

More than 150 supernatants obtained from two fusion experiments were tested by ELISA and 11 were selected as positive. Table III summarizes the characterization of 3 mAbs produced against rSb 28GST Ag. All mAbs were specific for rSb 28GST, and cross-reacted with rSh 28GST in ELISA and on Western blots. Sb4-50 mAb (IgG2a) gave no cross-reaction with rSm 28GST in ELISA or on Western blots. MAb Sb4-56 (IgG1) fail to detect rSm 28GST on Western blots.

The capacity of mAbs to inhibit GST enzymatic activity *in vitro* was studied. *S. bovis*, *S. mansoni* and *S. haematobium* r28GSTs were used as enzymes and exhibited similar specific catalytic activities. Figure 4 represents the percentage of inhibition of these activities induced by our mAbs (ascitic fluids). The analysis shows that mAb Sb4-10 did not inhibit enzymatic activity of any of the 3 GSTs. MAb Sb4-56 inhibited enzymatic activity of all 3 GSTs between 92-96%, suggesting the recognition of amino acids implicated in the active site. This mAb recognized the 3 GSTs in ELISA, but only Sb28GST and Sh28GST on Western blots. MAb Sb4-50 inhibited rSb 28GST activity by 80%, suggesting the recognition of amino acids implicated in the active site. Both rSb 28GST and rSh 28GST were recognized in ELISA and Western blot test by this mAb, but not rSm 28GST.

Our *in vitro* conditions permitted the inhibition of GST enzymatic activity in a dose dependent manner (data not shown). Irrelevant ascitic fluids (of the same isotypes) were tested and were not able to block GST enzymatic activity (data not shown). Differences in the recognition of the GSTs in ELISA and Western blots in relation to enzymatic activity suggests that the 3D structure of the proteins is important in the binding of the mAbs.

Epitope mapping.

In order to define the epitope specificity of our mAbs, the multiple peptide synthesis technique (PEPSCAN) analysis developed by Geysen *et al* was undertaken (31). Our mAbs were tested for reactivity against all possible overlapping decapeptides (initiated at every third amino acid) corresponding to amino acid residues 1-211 of the amino acid sequence of rSb 28GST.

MAb Sb4-50 showed a broad of reactivity with a large number of decapeptides which indicates that for this mAb, this technical approach was inappropriate for the detection of the specific epitope. Nevertheless there were 2 moderate responses to amino acid sequences 52-61 (RLPAVKITDN) and 202-211 (YLS-DRAATPF) (Fig 5). Overall, this result suggests that this mAb recognizes a conformational epitope of the protein. The Sb4-56 mAb also showed a broad reactivity, with 2 major responses, decapeptides corresponding to amino acid sequences 169-178 (HVTDL-DKEFL) and 202-211 (YLS-DRAATPF) (Fig 5). The mAb Sb4-10 showed reactivity only with 1 decapeptide corresponding to the amino acid sequence 58-67 (ITDNHGHVKW) (Fig 5). Ascitic fluid from SP2/O showed no reactivity with any of the decapeptides synthesized.

Passive transfer experiments.

The protective role of rSb 28GST mAbs was investigated *in vivo* by passive transfer experiments. Results from Protocol I (i.v. injection at day 35 and perfusion at day 47 after infection - Experiments 3, 4, 5 and 6) are summarized in Table IV and results from Protocol II (i.v injection at day 30 and perfusion at day 47 after infection - Experiment 7) and Protocol III (i.v. injection at days 30 and 40 ; perfusion at day 55 post-infection - Experiment 8) are shown in Table V.

MAb Sb4-50 (which inhibits Sb28GST activity) induced a reduction in worm burden by 41% ($p < 0.03$) and in female burden by 51% ($p < 0.02$) (Exp.5). In the other experiments with this mAb no protection was observed, except in Exp.8 where a slight reduction on worm burden was observed but which was not significant. Mab Sb4-10 (which does not inhibit GST activity) induced a reduction in female worm burden by 37% ($p < 0.05$) in Exp.5. Slight reductions in worm burden were observed, 25% (Exp.2) and 24% (Exp.5) but were not statistically significant. MAb Sb4-56 (which inhibits GST activity) was not tested in Protocol II and III but in Protocol I produced no effects on parasitological parameters.

No effects were recorded for any of the mAbs on the number of eggs/g/f in liver and intestine (Table IV and V), even though a tendency towards a reduction was sometimes observed.

Before injection of the mAbs no response against Sb 28GST was observed in the mouse sera, whereas, as expected after i.v. injection, high levels of anti-Sb 28GST Abs were observed (data not shown).

Impairment of egg viability by anti-Sb 28GST mAbs.

The analysis of egg viability was performed with individual samples from Exp.4 and 6 (Protocol I), Exp.7 (Protocol II) and Exp.8 (Protocol III). Hatching tests using schistosome eggs recovered from passively transferred mice revealed that egg viability was markedly affected whatever the timing of mAb treatment. A significant reduction in the hatching level was recorded as well as a reduction in egg maturation with some exceptions, as indicated in Fig. 6, where the percentages of reduction are also summarized. A reduction of egg hatching ranging between 28-34% was obtained for mAb Sb4-50, according to the protocol used. The reduction in egg maturation was less marked, between 14 and 20%.

For Sb4-10 mAb a reduction in egg hatching ranging between 35-54% and in egg maturation between 11 and 15% was observed, for the different protocols. MAb Sb4-56 was only tested in Protocol I (Exp.6) where a 19% reduction in egg viability was recorded. All the reductions were statistically significant ($p < 0.01$).

DISCUSSION

Immunization of mice with rSb 28GST did not induce consistent protective immunity against schistosome infection in terms of a reduction in worm burden but led to a significant reduction in egg hatching. This was observed after both homologous and heterologous challenge infections with *S. bovis* cercariae and *S. mansoni* cercariae suggesting the involvement of similar mechanisms of action and /or immune targets.

Immunization with rSb 28GST resulted in a reduction of 21% in egg hatching in the *S. bovis* infected group and a reduction of 25% in *S. mansoni* infected animals, when compared to control groups. The proportion of egg maturation was also affected but to a lesser extent (Table II).

To determine whether or not the induction of inhibitory anti-GST Abs in immunized animals correlated with the effects observed, the ability of sera from the various groups to block GST activity *in vitro* was assessed. The results (data not shown) indicated that, sera from Sb 28GST immunized animals inhibited Sb 28GST activity, but there was no direct association between the inhibition by sera of GST enzymatic activity *in vitro* and worm burden reduction. This suggests that induction of GST-inhibitory Abs in mice does not implicate a protection against infection. This was also described in vaccination by GST in *Fasciola hepatica* infection in sheep (30).

In immunization/ cross challenge experiments, B- and T-cell responses were studied and were very similar. The B-cell response against rSb 28GST, presented a predominant IgG1 Ab response, that was boosted after homologous or heterologous challenges. The T-cell response mainly showed a production of IL-4 and IL-5, accompanied by negligible levels of IL-2 and IFN γ . Similar humoral and cellular responses elicited by this immunization protocol might be relevant in a cross-protection system, since both *S. bovis* and *S. mansoni* infections present the same Th2 profile after egg laying.

Previous work, using the mouse model, has shown the effect of anti-Sm 28GST mAb on parasite egg production and egg viability and revealed a relationship between the anti-fecundity effect observed with the inhibition of enzyme activity by the mAb. Indeed, an IgM mAb able to block Sm 28GST activity induced *in vivo* and *in vitro* a significant protection toward challenge together with a reduction in egg laying and egg viability. In contrast, another IgM mAb devoid of inhibitory activity conferred protection by reducing the worm burden, but had no effect on egg production and egg viability (12).

Passive transfer experiments with our rSb 28GST mAbs led to different observations : mAb Sb4-50 (IgG2a), selected for its ability to block Sb 28GST activity induced *in vivo* a slight, but significant, reduction in the total and female worm burdens. In contrast, Sb4-56 (IgG1) also shown to block the 3 GST activities, displayed no protective activity. MAb Sb4-10, which was not able to block Sb 28GST activity, also demonstrated a relatively low but significant level of protection *in vivo* in terms of a reduction in female worm burden. In these experiments no effect was observed upon egg production. Although a reduction in worm burden was recorded with these mAbs, no clearcut association was observed between their capacity to inhibit GST

enzyme activity and anti-fecundity or anti-viability effects. Three passive transfer protocols were used to « target » parasite biology (i.v. day 35 - before egg laying ; i.v. day 30 - immature worms ; i.v. days 30 and 40 - double action + boost), however results were inconclusive. The lack of impairment in egg production might be due to the short duration of infection and/or to the delayed action of Abs. Such an effect has been already observed in patas monkeys vaccinated with Sm 28GST and experimentally infected with *S. haematobium* (31). The authors recorded the maximum differences between vaccinated and control animals at 42 weeks post-infection, whereas similar levels of faecal egg excretion at 12 weeks post-infection were observed.

As was the case in immunization experiments with rSb 28GST, the main effect of anti-Sb 28GST mAbs was directed toward egg viability. A marked reduction in egg hatching, between 28% to 54% was observed, which was again independent of the capacity of the mAb to inhibit Sb 28GST activity (Fig 6). Differences were sometimes recorded in levels of egg maturation between the control infected group and the SP2O/control group, for which no explanation was found.

These reductions in egg maturation and egg hatching induced either by immunization with Sb 28GST or by passive transfer of anti-Sb28GST mAbs, raises questions concerning anti-fecundity and anti-viability immunity in experimental schistosomiasis. Such a decrease in mature eggs (relative to immature eggs) could result from either inhibition of embryonation or accelerated inactivation of mature eggs or both. Anti-GST Abs may render the eggs more vulnerable to immune attack or interfere with metabolic pathways of the miracidium, which alters its hatching efficiency.

In parallel, preliminary immuno-histochemical localization studies of Sb 28GST Ag in different developmental stages of the parasite showed that our mAbs recognized different structures (parenchyma, dorsal tubercles) in *S. bovis* adult worms, with a different immunoreactive intensity (data not shown). Thus, the variations observed in our protection experiments may be related to the heterogeneous and dynamic expression of the 28GST. Data published by Liu *et al* (32) support this idea, since they described a fluctuation in Sm 28GST

expression in genital organs, which was abundant in the undifferentiated or immature cells rather than in mature oocytes, and also differences between individual worms.

Thus although 28GST is a highly abundant molecule, variations in its expression complicates the expression of immune effector mechanisms directed against this target.

Peptide mapping of Sm 28GST enabled the identification of a number of major epitopes (11,15), in particular, the peptide a.a 115-131 that contains both T and B cell epitopes and the major role played by the N- (a.a 10-43) and C- (a.a.190-211) terminal domains in the expression of the enzymatic activity (13,14). We applied the PEPSCAN method in order to define the linear epitopes recognized by our mAbs. For mAbs Sb4-10 and Sb4-56 linear epitopes were identified by this method, but less definitively for Sb4-50, suggesting that the latter might recognize a conformational epitope. These mAbs display different affinities for Sb28GST linear sequences and some epitopes were shown to be specific for a particular mAb. The capacity of the mAbs to inhibit GST activity suggests binding to the active site of the enzyme or to neighboring regions. By peptide analyses, association between the recognition of specific epitopes, the active site and induced protection was not established.

Although it seems difficult to explain the different capacity of mAbs to block GST activities (for instance between Sb4-50 and Sb4-56), with regard to their antigenic specificity, several parameters might explain the discrepancy, such as the Ab isotype, the protein presentation (soluble/adsorbed), or the fact that Ab-GST binding might modify the 3D structure of the molecule.

Glutathione (GSH) participates directly or indirectly in many vital biochemical process, including the synthesis of protein and DNA, transportation, enzyme activity, sugar and lipid metabolic pathways, and the protection of cells (33). Recent studies suggest that GSH may have an essential role in schistosome detoxification and resistance mechanisms against chemotherapeutic drugs, including niridazole and oltipraz (34,35). The importance of this molecule in the metabolism of the schistosome, has been reported by the influence of schistosome worm pairing on the level of GSH in male worms (36,37) and the regulation of a schistosome hemoglobin-degrading protease by GSH activation (38).

Several studies on human, rat and mouse GST demonstrated the implication of hormones on GST regulation. Recent experiments revealed that sex-hormones may regulate expression of murine GST isoenzymes (39) and that GSTs are expressed in a sex-dependent manner in adult rat liver where they are regulated by multiple pituitary-dependent hormones through pretranslational mechanisms (40). Sm 28GST was suggested to be regulated during early parasite-host contact and juvenile parasite development, by the transactivating effect of Jun/Fos in coordination with other nuclear factors, rather than by xenobiotic-dependent mechanisms (41). The possible regulation of schistosome GST expression by hormones, similar to that already described in other systems, requires study.

In conclusion, it appears that immunization of mice by rSb 28GST primarily targets worm fertility (egg maturation and egg viability), with a variable action upon the worm burden. These observations were supported by Sb 28GST mAb passive transfer experiments, in which the egg viability effect was marked. The induction of Abs against GST is not always sufficient to elicit worm loss and protection is not always associated with the inhibition of GST enzymatic activity. Nevertheless, the mechanism(s) of anti-fecundity and anti-viability immunity and their regulation require further study. It remains to determine whether anti-Sb 28GST Abs act directly by blocking GST functions or regulate the Ab-Ag balance, or, indirectly, cause perturbation(s) in parasite physiology (including miracidium metabolism) and endocrinological balance. This kind of approach (immunization/ cross challenge infection) supports a vaccine-based strategy where schistosome GST may contribute to alleviating pathology and to impairing parasite transmission.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Claudie Verwaerde and Dr Raymond Pierce for their helpful discussions, and Jean-Loup Neyrinck for statistics studies.

We also would like thank to Dr M. Sampaio Silva of Instituto Nacional de Saude -Dr Ricardo Jorge, Lab. Parasitologia , Porto-Portugal, together with A. Seixas, A. Silva and M. Lurdes Delgado for maintaining the *S. bovis* life cycle.

REFERENCES

1. Mannervik, B. 1985. Isoenzymes of glutathione transferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 57 : 357.
2. Brophy, P. M. and J. Barret. 1990. Glutathione transferase in Helminths (review article). *Parasitology* 100 : 345.
3. Brophy, P. M. and D. I. Pritchard. 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferases : an update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Exp. Parasitol.* 79 : 89.
4. O'Leary, K. and J. W. Tracy. 1988. Purification of three cytosolic glutathione S-transferases from adult *S. mansoni*. *Arch. Biochem. Biophys.* 264 : 1.
5. Balloul, J. M., R. J. Pierce, J. M. Grzych and A. Capron. 1985. *In vitro* synthesis of a 28-kilodalton antigen present on the surface of the schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17 : 105.
6. Balloul, J. M., J. M. Grzych, R. J. Pierce and A. Capron. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138 : 3448.
7. Balloul, J. M., P. Sondermeyer, D. Dreyer, M. Capron, J. M. Grzych, R. J. Pierce, D. Carvalho, J. P. Lecocq and A. Capron. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature, London.* 326 : 149.
8. Pierce, R. J., J. Khalife, D. L. Williams, R. Kanno, F. Trottein, T. Lepresle, J. Sabatier, T. Achstetter and A. Capron. 1994. *S. mansoni* : characterization of sequence variants of the 28-kDa glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 79 : 81.
9. Loison, G., A. Vidal, A. Findeli, C. Roitsch, J. M. Balloul and Y. Lemoine. 1989. High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5 : 497.
10. Wolowczuk, I., C. Auriault, H. Gras-Masse, C. Vendeville, J. M. Balloul, A. Tartar and A. Capron. 1989. Protective immunity in mice vaccinated with the *S. mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.* 142 : 1342.

11. Boulanger, D., G. D. F. Reid, R. F. Sturrock, I. Wolowczuk, J. M. Balloul, D. Grezel, R. J. Pierce, M. F. Otieno, S. Guerret, J. A. Grimaud, A. E. Butterworth and A. Capron. 1991. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm 28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* 13 : 473.
- 12 Xu, C. B., C. Verwaerde, J. M. Grzych, J. Fontaine and A. Capron. 1991. A monoclonal antibody blocking the *S. mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase activity reduces female worm fecundity and egg viability. *Eur. J. Immunol.* 21 : 1801.
13. Xu, C., C. Verwaerde, H. Gras-Masse, J. Fontaine, M. Bossus, F. Trottein, I. Wolowczuk, A. Tartar and A. Capron. 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa Glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. *J. Immunol.* 150 : 940.
14. Wolowczuk, I., C. Auriault, M. Bossus, D. Boulanger, H. Gras-Masse, C. Mazingue, R. J. Pierce, D. Grezel, G. D. Reid, A. Tartar and A. Capron. 1991. Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* 28GST antigen in rat, mouse, and monkey. *J. Immunol.* 146 : 1987.
15. Liu, S., G. Song, Y. Xu, Y. Wen and D. P. Mc Manus. 1995. Immunization of mice with recombinant Sjc 26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 13 : 603.
16. Liu, S., G. Song, Y. Xu, Y. Wen and D. P. Mc Manus. 1995. Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *S. japonicum* 26kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* 17 : 335.
17. Trottein, F., C. Godin, R. J. Pierce, B. Sellin, M. G. Taylor, I. Gorillot, M. Sampaio Silva, J. P. Lecocq and A. Capron. 1992. Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54 : 63.
18. Bushara, H. O, M. E. N. Bashir, K. H. E. Malik, M. M. Mukhtar, F. Trottein, A. Capron and M. G. Taylor. 1993. Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or Keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol.* 15 : 383.

19. Boulanger, D., F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, D. Couret, R. J. Pierce, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, J. P. Lecocq, B. Sellin and A. Capron. 1994. Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* 16 : 399.
20. De Bont, J., J. Vercruyse, J. M. Grzych, P. F. M. Meeus and A. Capron. 1997. Potential of a recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. *Parasitology* 115 : 249.
21. De Bont, J., J. Vercruyse and M. Massuku. 1996. Variations in *Schistosoma mattheei* egg morphology and viability according to age of infection in cattle. *J. Helminthology.* 70 : 265.
22. Agnew, A., A. J. C. Fulford, M. T. Mwanje, K. Gachuhi, V. Gutschmann, F. W. Krijger, R. F. Sturrock, B. J. Vennervald, J. H. Ouma, A. E. Butterworth, and A. M. Deelder. 1996. Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55 : 338.
23. Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, and A. Sher. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146: 1322.
24. Poulain-Godefroy, O., S. Gaubert, S. Lafitte, A. Capron, and J. M. Grzych. 1996. Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : stimulatory role of egg antigens. *Infection and Immunity* 64 : 763.
25. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680.
26. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350.
27. Garrels, J. I. 1979. Two-dimensionnal gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesis by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.* 254 : 7961.
28. Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 : 7130.

29. Geysen, H. M., S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick and P. G. Schoofs. 1987. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods.* 102 : 259.
30. Morrison, G. A., Colin, T., Sexton, J. L., Bowen, F., Wicker, J., Friedel, T. and W. Spithill. 1996. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* 17 : 1603.
31. Boulanger, D., Warter, A., F. Trottein, F. Mauny, P. Bremond, Audibert, F., D. Couret, S. Kadri, C. Godin, E. Sellin, R. J. Pierce J. P. Lecocq, B. Sellin and A. Capron. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immunol.* 17 : 361.
32. Liu, J. L., J. Fontaine, A. Capron and J. M. Grzych. 1996. Ultrastructural localization of Sm 28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology.* 113 : 377.
33. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Ann.Rev.Biochem.* 52 : 711
34. Tracy, J. W., B. A. Catto and L. T. Webster. 1983. Reductive metabolism of niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. Correlation with covalent drug binding to parasite macromolecules. *Mol. Pharmacol.* 24 : 291.
35. Morrison, D. D., D. P. Thompson, D. R. Semeyn and J. L. Bennett. 1987. Acute effects of Oltipraz on adult *S. mansoni* and its antagonism *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 36 : 1169.
36. Siegel, D. A. and J. W. Tracy. 1988. Effect of pairing *in vitro* on the glutathione level of male *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 74 : 524.
37. Siegel, D. A. and J. W. Tracy. 1989. *Schistosoma mansoni* : Influence of the female parasite on glutathione biosynthesis in the male. *Exp. Parasitol.* 69 : 116.
38. Chappel, C. L., M. H. Dresden and D. W. Walters. 1987. Glutathione activation of a cysteine proteinase from *S. mansoni*. *Biochem. Biophys. Acta* 913 : 335.
39. Awasthi, S., S. S. Singhal, S. K. Srivastava and Y. C. Awasthi. 1993. Purification and characterization of glutathione S-transferase of murine ovary and testis. *Arch. Biochem. Biophys.* 301 : 143.
40. Srivastava, P. K. and D. J. Waxman. 1993. Sex-dependent expression and growth hormone regulation of class alpha and class mu glutathione S-transferase mRNAs in adult rat liver. *Biochem. J.* 294 : 159.

41. Serra, E., K. Zemzoumi and C. Dissous. 1997. Deletion analysis of the *S. mansoni* 28kDa GST gene promotor. Functionality of a proximal AP-1 site. Eur. J. Biochem. 248 : 113.

FOOTNOTES

¹These investigations received financial support from the European Economic Community - Fellowship Grant contract ERBCHICT 941496. This work was also supported by the Institut Pasteur de Lille, IFR n°17, Unité INSERM U-167.

² Corresponding author : Tel .(33) 3 20 87 78 09

Fax (33) 3 20 87 78 88

E mail:A-monica.Vianadacosta@pasteur-lille.fr

TABLES

Table I - Effects of rSb 28GST immunization on BALB/c mice challenged with *S. bovis* or *S. mansoni* cercariae.

- a) Results are presented as a mean \pm SD. Animals were immunized with 50 μ g of rSb 28GST + FCA (s.c.), followed by boosts with 50 μ g rSb 28GST + IFA (s.c.) 14 days later and 10 μ g rSb 28GST + saline (i.v.) 7 days later. The adjuvant control group was subjected to the same immunization schedule except that rSb 28GST was replaced by PBS. Five days after the second boost, groups of mice were exposed to 160 *S. bovis* cercariae (Exp.1) or to 60 *S. mansoni* cercariae (Exp.2).
- b) Whole body perfusion was carried out 48 days after the challenge. Adult worm burdens and egg numbers in liver and intestine were compared.
- c) Percentages of protection and p values were calculated by comparing the number of total worms recovered in immunized groups (rSb28GST/*S.bovis* and in rSb28GST/*S.mansoni*) to that obtained in the control groups (Adj.*S. bovis* and Adj./*S. mansoni*). NS-not significant.

Table II - Effects of rSb 28GST immunization upon egg maturation and egg hatching after challenge with *S. bovis* or *S. mansoni*.

- a) Results are presented as means \pm SD. Experiments were performed individually and correspond to those described in Table I. *S. bovis* liver eggs were collected at day 48 after the challenge.
- b) Hatching tests were performed with 200 eggs, in a 1.5ml calcium-free water, at 30°C for 90 min. Maturation and hatching percentages were calculated according to the formula :
- % Maturation = ((Mature egg number+ Egg shell number) : Total egg number) x 100
- % Hatching = Egg shell number : (Mature egg number + Egg shell number) x 100

c) Percentage reduction of egg maturation and egg hatching were calculated by reference to control groups (Adj./*S. bovis* and Adj./*S. mansoni*) and are indicated (probability values $p < 0.01$).

Table III - Characterization of mAbs specificity.

a) mAbs obtained by fusion of SP2/O and splenocytes of BALB/c mice immunized twice s.c. with 10 µg rSb 28GST at 3 weeks interval and boosted i.v. with 10µg Ag. Undiluted culture cell supernatants were screened by ELISA and Western blotting.

b) Ab binding to *S. bovis*, *S. mansoni*, *S. haematobium* r28GST. (-) negative ; (+) positive.

Table IV - Effect of mAbs passive transfer on a challenge infection.

a) BALB/c mice were infected with 160 *S. bovis* cercariae and injected i.v. with ascitic fluids (SP2/O, Sb4-50, Sb4-10 and Sb4-56 mAbs - 300µl containing 750-1000 µg Ab) at day 35 post-infection : Protocol I (Exp. 3, 4, 5, 6)

b) Whole body perfusion was carried out 47 days after infection. Data correspond to the mean \pm SD (female worms).

c) The percentage of protection and p values were calculated by comparing the number of worms recovered in mice treated with mAb to the number of worms obtained in SP2/O control groups.

d) NS - not significant.

Table V - Effect of mAbs passive transfert on a challenge infection.

a) BALB/c mice were infected with 160 *S. bovis* cercariae and injected i.v. with ascitic fluids (SP2/O, Sb4-50 and Sb4-10 mAbs - 300µl containing 750-1000 µg Ab) at different times after infection, Protocol II (Exp.7) : 30 days after infection and Protocol III (Exp.8) : 2 i.v. injections, at day 30 and 40 post-infection.

- b) Whole body perfusion was carried out 47 days after infection (Protocol II) or 55 days after infection (Protocol III). Worms were counted. Data correspond to the mean \pm SD.
- c) The percentage of protection and p values were calculated by comparing the number of worms recovered in mice treated with mAb to the number of worms obtained in SP2/O control groups.
- d) NS - not significant.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. A- Ab isotype responses to rSb 28GST Ag determined by ELISA. Mice were bled at day -15 and at days 11, 33 and 48 after challenge. Data correspond to the mean values of duplicate analyses recorded from each group (pooled sera of 10 animals). OD at 492nm. Groups : Sb28GST/*S. bovis* and Sb28GST/*S. mansoni*. Sera were diluted at 1:1000, except for IgM (1:250), IgG3 (1:250) and IgA (1:50). **B-** Ab isotype responses to SEA bovis Ag by ELISA. Mice were bled at day -15 and at days 11, 33 and 48 after challenge. Data correspond to the mean values of duplicate analysis recorded from each group (pooled sera of 10 animals). OD at 492nm. Groups : Sb28GST/*S. bovis* ; Adj/*S. bovis* ; Sb28GST/*S. mansoni* ; Adj/*S. mansoni*. Sera were diluted at 1:250, except for IgA (1:50).

Figure 2. IL-2 and IFN- γ production by spleen cells from Exp.1 (homologous challenge) and Exp.2 (heterologous challenge). Cells were stimulated with SEA (50 μ g/ml) or rSb 28GST (50 μ g/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Cytokine production was evaluated in culture supernatants. Data correspond to the mean values of duplicate analyses.

Figure 3. IL-4 and IL-5 production by spleen cells from Exp.1 (homologous challenge) and Exp.2 (heterologous challenge). Cells were stimulated with SEA (50 μ g/ml) or rSb 28GST (50 μ g/ml) of *S. bovis* and *S. mansoni* antigens. Cytokine production was evaluated in culture supernatants. Data correspond to the mean values of duplicate analyses.

Figure 4. Inhibition of GST enzymatic activity by anti-Sb 28GST mAbs ascitic fluids. 0.1 μ g of 28GSTs (*S. bovis*, *S. mansoni*, *S. haematobium*) were incubated with 44 μ l of mAbs or SP2/O ascitic fluids and the enzyme assay performed with 200 μ l buffer (potassium phosphate, 50mM, pH 6.5) with 5mM GSH and 1mM CDNB. The percentage of inhibition is calculated by comparison to SP2/O ascitic fluid and values above 50% are considered as positive. The enzymatic activity of the 3 GSTs was similar.

Figure 5. Sequence alignment of the 28kDa glutathione S-transferase polypeptides of *S. bovis*. A set of overlapping decapeptides, initiating at every third residue were synthesized from the sequence of Sb28GST.

Reactivity of mAbs to rSb 28GST on the overlapping peptides is denoted by a double thin line (Sb4-50) ; closed box (Sb4-10) and a black line (Sb4-56).

a) Graphs represent reactivity of each mAb to Sb28GST on the overlapping decapeptides. Ascitic fluids (mAbs and SP2/O) were diluted at 1:1000. ODs corresponding to the Ab binding are expressed as OD minus the background binding of SP2/O ascitic fluid.

Figure 6. Impairment in maturation and hatching capacity of eggs recovered from *S. bovis* infected mice passively transferred with anti-Sb28GST mAbs.

a) The percentage of hatching reduction was calculated by comparison with SP2/O treated animals (* p< 0.01). Maturation and hatching percentages are calculated according to the formula :

$$\% \text{ Maturation} = ((\text{Mature egg number} + \text{Egg shell number}) : \text{Total egg number}) \times 100$$

$$\% \text{ Hatching} = \text{Egg shell number} : (\text{Mature egg number} + \text{Egg shell number}) \times 100$$

NS- not significant

TABLES and FIGURES

Table I-Effects of rSb 28GST immunization on BALB/c mice challenged with *S. bovis* or *S. mansoni* cercariae

EXP. 1		Sb28GST/ <i>S. bovis</i>			Adj./ <i>S. bovis</i>			Infected <i>S. bovis</i>		
N° mice n=10	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	
M	52.1	760.8	66.0	55.3	721.8	51.00	43.6	956.0	37.7	
SD	7.64	147.3	37.69	11.84	95.75	41.34	11.72	142.5	18.47	

EXP. 2		Sb28GST/ <i>S. mansoni</i>			Adj./ <i>S. mansoni</i>			Infected <i>S. mansoni</i>		
N° mice n=10	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	Worm burden	N°liver eggs/g/f	N°intestin eggs/g/f	
M	39.25	543.62	1095.3	33.8	616.5	1181.3	37.2	686.9	1302.0	
SD	4.65	127.17	213.20	6.86	156.46	131.65	8.23	105.8	178.2	

Table II-Effects of rSb 28GST immunization upon egg maturation and egg hatching after challenge with *S. bovis* or *S. mansoni*

EXP. 1	Sb28GST / <i>S. bovis</i>		Adj./ <i>S. bovis</i>		Infected <i>S. bovis</i>	
	% Maturation	% Hatching	% Maturation	% Hatching	% Maturation	% Hatching
M ± SD	48.28±5.45	43.44±5.59	53.58±4.20	54.81±3.35	55.42±3.30	53.46±3.73
% REDUCTION p<0.01	10%	21%				
EXP. 2	Sb28GST / <i>S. mansoni</i>		Adj./ <i>S. mansoni</i>		Infected <i>S. mansoni</i>	
	% Maturation	% Hatching	% Maturation	% Hatching	% Maturation	% Hatching
M ± SD	71.1±4.90	47.5±6.93	77.75±5.48	63.25±6.72	82.76±6.97	63.18±3.78
% REDUCTION p<0.01	9%	25%				

Table III-Characterization of mAbs specificity

mAb anti- Sb 28GST a)	Isotype	Specificity (ELISA) b)			Western blot b)		
		Sb28GST	Sm28GST	Sh28GST	Sb28GST	Sm28GST	Sh28GST
Sb4-50	G2a	+	-	+	+	-	+
Sb4-10	G1	+	+	+	+	+	+
Sb4-56	G1	+	+	+	+	-	+

Table IV-Effect of mAbs passive transfer on infection parameters (Protocol I)

Protocol I							
Exp. N°	mAb injected a)	Worm burden b)	Female burden b)	Liver eggs/g/f	Intestine eggs/g/f	% Protection c)	p value d)
3 M±SD n=7	Infected	46.2±10.1	13.2±4.6	1074±192	86±38		
	SP2/O	41.4±10.0	10.7±3.7	1102±273	48±33		
	Sb4-50	44.0±7.4	11.3±5.2	969±295	76±75	0	NS
	Sb4-10	39.3±12.0	9.85±1.9	1218±182	72±49	0	NS
4 M±SD n=7	Infected	41.4±8.2	15.4±6.9	862±89	112±39		
	SP2/O	43.0±11.8	15.3±6.5	834±153	74±51		
	Sb4-50	46.4±14.0	17.4±5.2	860±342	139±56	0	NS
	Sb4-10	32.1±14.7	13.7±9.6	735±26	108±26	25% (10%)	NS
5 M±SD n=7 (n=6)	Infected	42.8±11.3	15.2±3.6	938±186	119±71		
	SP2/O	48.1±20.3	17.5±8.7	1155±283	113±56		
	Sb4-50	28.6±10.9	8.5±4.6	1090±423	19±13	41 (51%female)	< 0.03(<0.02)
	Sb4-10	36.6±7.3	11.0±4.0	1035±266	78±41	24 (37% female)	NS (<0.05)
6 M±SD n=7	Infected	47.1±22.0	13.4±3.2	762±181	45±26		
	SP2/O	38.0±13.4	14.0±6.3	751±230	84±53		
	Sb4-56	51.3±18.3	14.7±8.2	877±118	93±54	0	NS



Table V-Effect of mAbs passive transfer on infection parameters (Protocol I and II)

Protocol II							
Exp. N ^o	mAb injected a)	Worm burden b)	Female burden b)	Liver eggs/g/f	Intestine eggs/g/f	% Protection c)	p value d)
7	Infected	47.2±8.6	16.8±4.5	1046±371	90±54		
M±SD n=7	SP2/O	33.8±12.3	11.0±6.6	1544±859	104±58		
	Sb4-50	43.2±7.6	14.9±4.4	967±213	118±106	0	NS
	Sb4-10	44.3±12.7	14.3±3.5	1166±208	95±35	0	NS
Protocol III							
Exp. N ^o							
8	Infected	33.0±14.1	12.1±4.3	2054±1155	463±253		
M±SD n=7	SP2/O	41.7±18.0	15.4±7.0	1580±491	408±165		
	Sb4-50	34.8±18.9	14.0±7.7	2015±853	467±207	17%	NS
(n=6)	Sb4-10	37.1±15.4	13.5±5.6	2432±1164	541±358	11%	NS

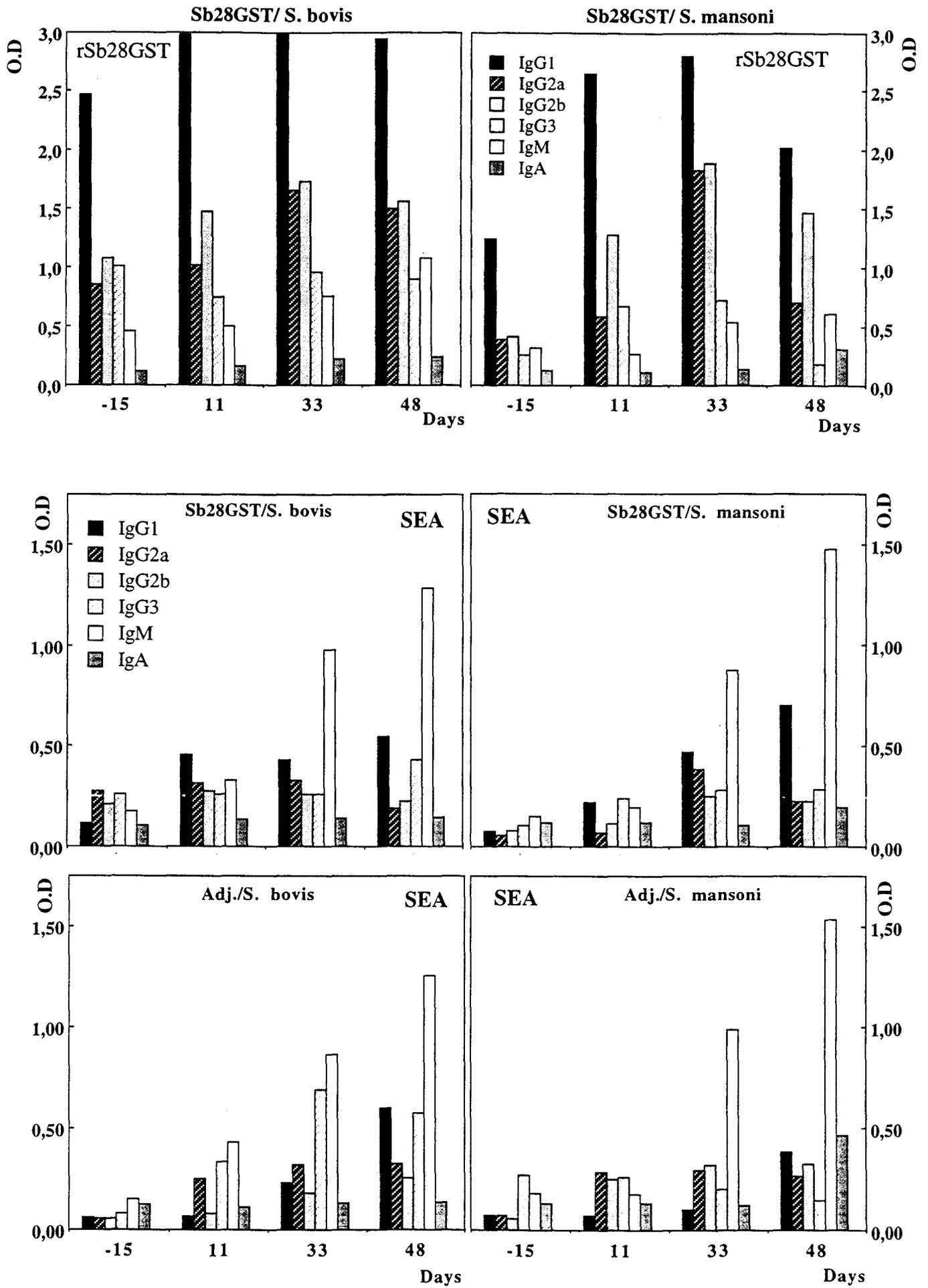


Figure 1

Figure 2

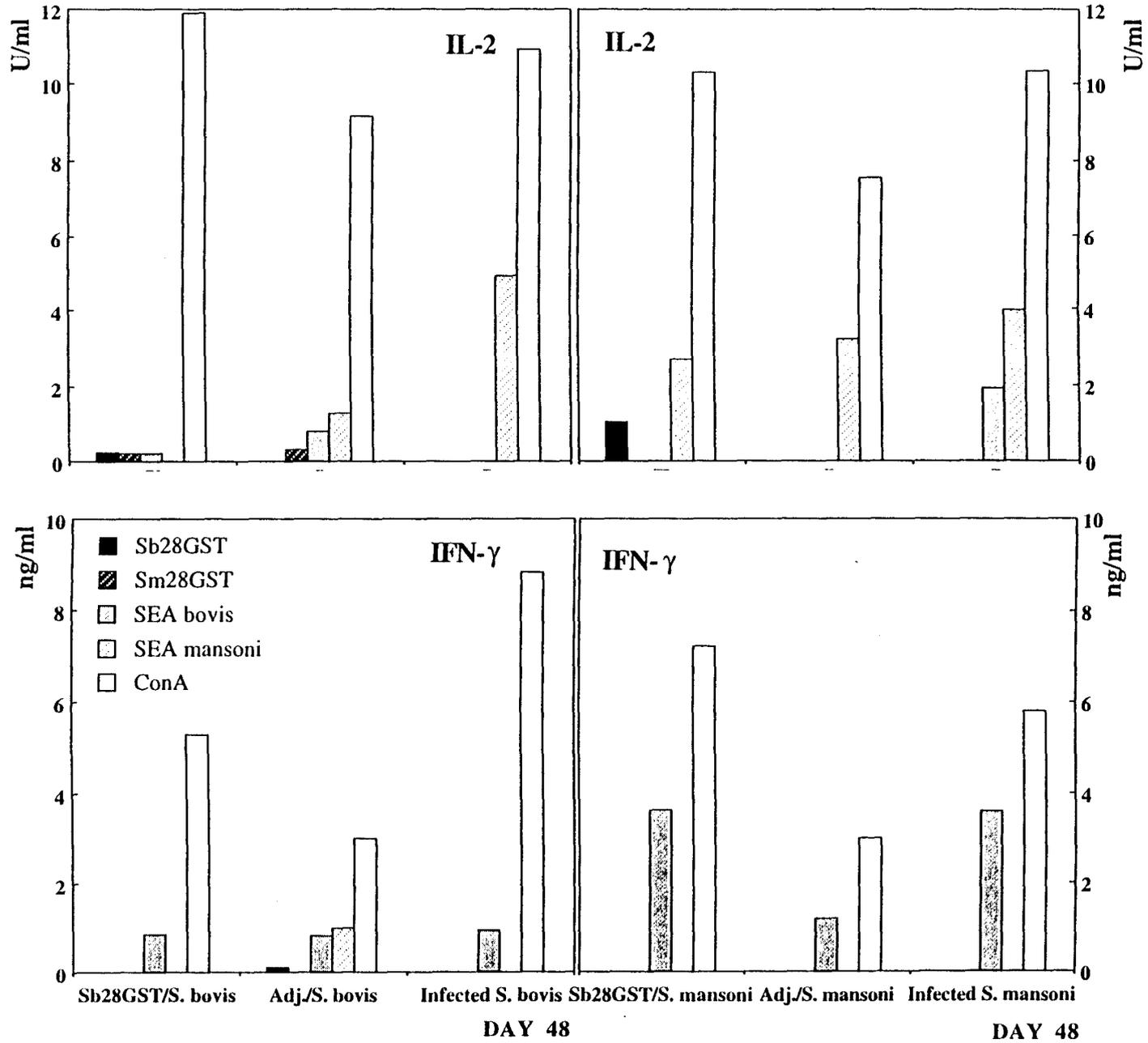
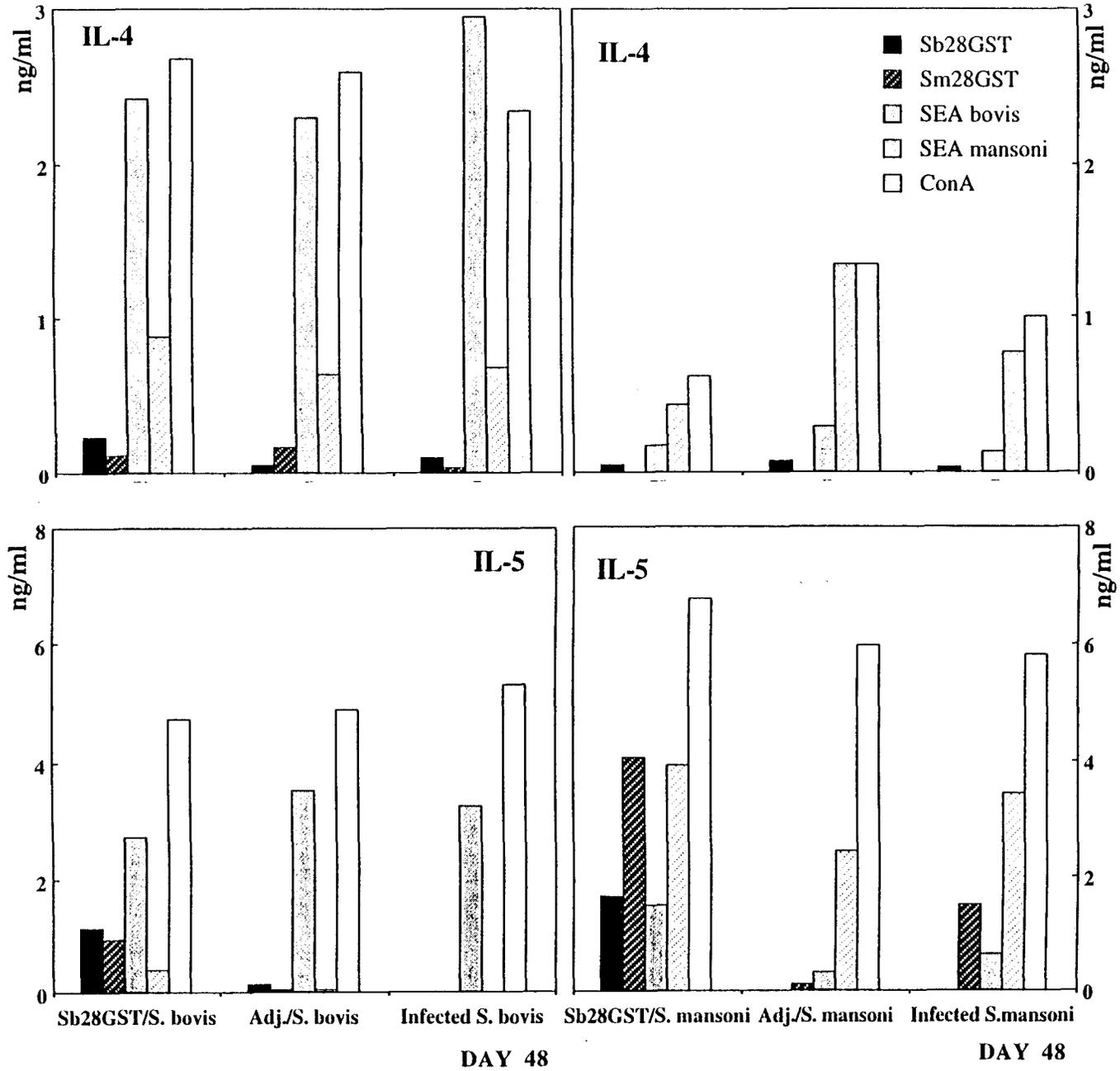


Figure 3



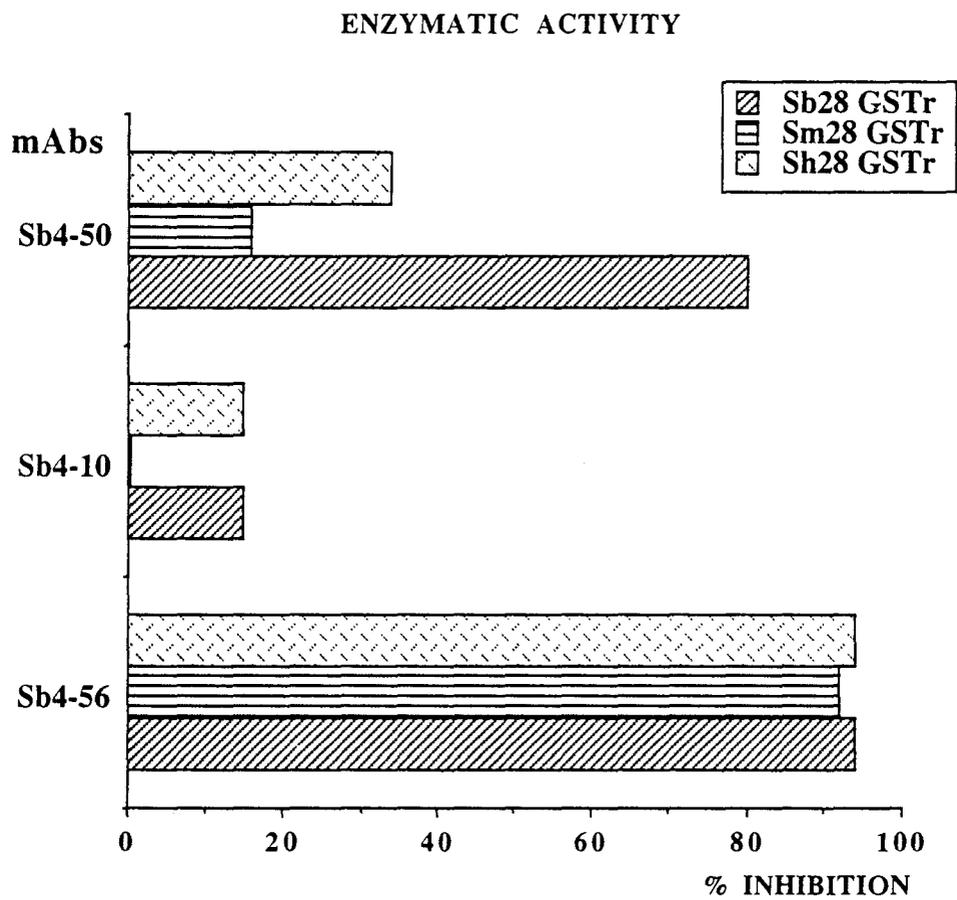


Figure 4

Sb28GSTM TGDHIKVIYFN GRGRAESIRMTLVAAGVNYEDERISFQDWPKIK 45
PTIPGGRLPAVKITDNHGHVKWMLLES LAIARYMAKKHHMMGETDE 90
EYYNVEKLIQVEDLEHEYHKTLMKPEEEKQKITKEILNGKVPVL 135
LDIICESLKASTGKLA VGDKVTLADLVLI AVIDHVTDL DKEFLTG 180
KYPEIHKHRENLLASSPRLAKYLS DRAATPF 211

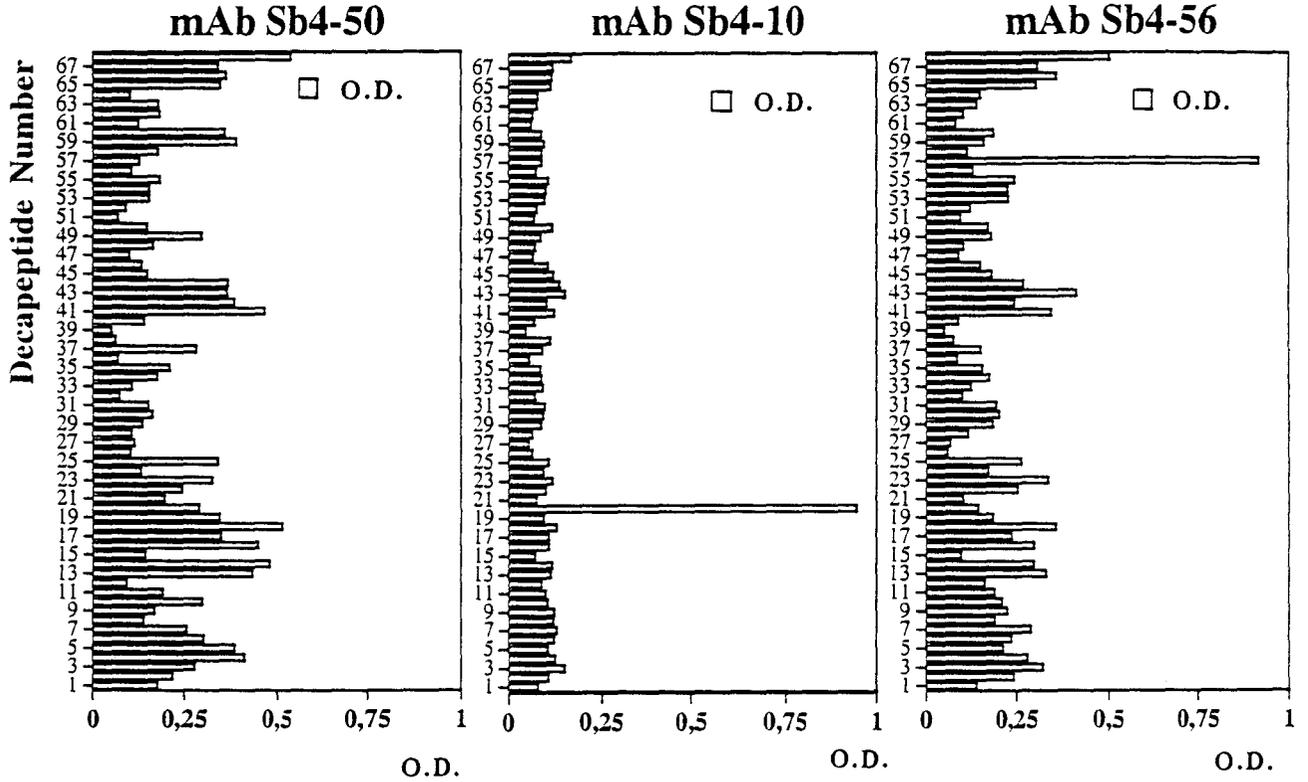


Figure 5

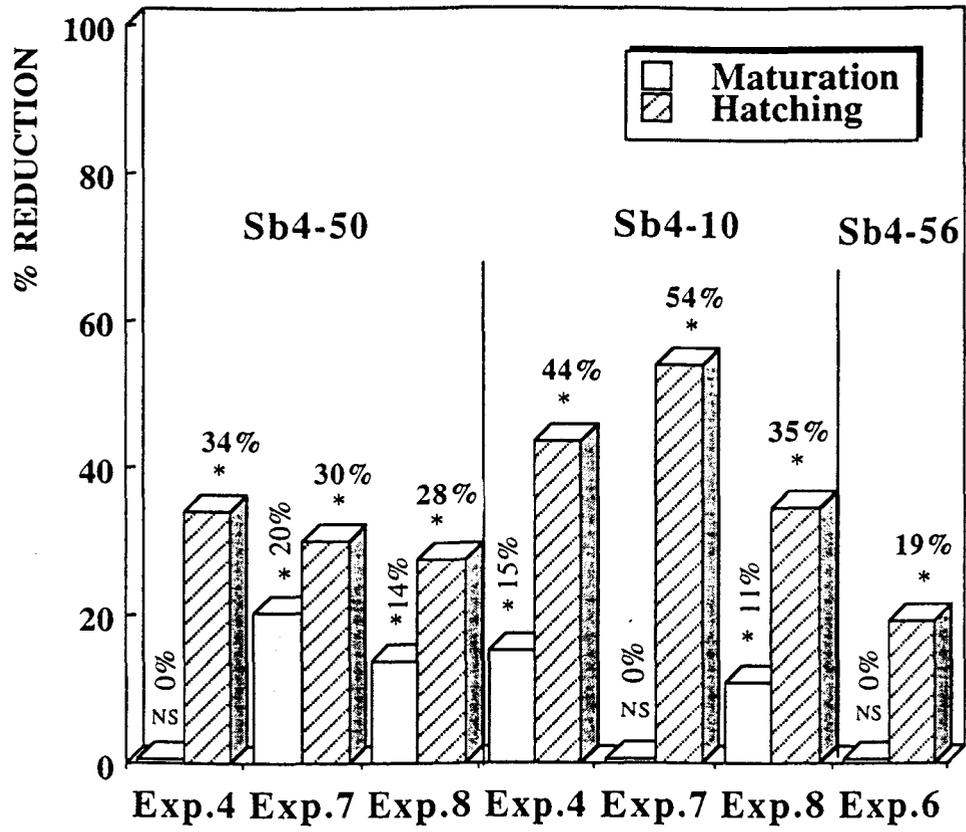


Figure 6

DISCUSSION

DISCUSSION ET PERSPECTIVES :

Les études que nous avons développées dans le modèle d'infection expérimental murin par *Schistosoma bovis*, couplées à l'analyse des propriétés biologiques de sondes monoclonales spécifiques de l'antigène Sb 28GST nous ont permis d'apporter un éclairage nouveau sur les différents aspects jusqu'ici méconnus des paramètres de cette infection et de la biologie de ce parasite.

Cette approche combinée est à l'origine des observations suivantes :

A - La définition des paramètres de l'infection par *S. bovis*.

B - Les caractéristiques de la réponse humorale et cellulaire.

C - L'existence d'une immunité à la réinfection

D - L'antigène Sb 28GST est une cible des mécanismes de l'anti-viabilité des oeufs

E - Une analyse entre la structure primaire de la molécule (Sb 28GST) , le site actif et sa fonction biologique

A - La définition des paramètres de l'infection par *S. bovis*

La première question posée à laquelle nous nous devons de répondre était : Comment se développe l'infection par *S. bovis* dans le modèle murin ?

Nos premiers travaux d'infection par *S. bovis* dans le modèle murin ont constitué en la mise au point du protocole d'infection de façon à récupérer un nombre de vers suffisant pour les différentes évaluations parasitologiques, sans provoquer une mortalité précoce des animaux. Ces expériences ont été réalisées dans les souches de souris OF1 (non-syngéniques) et BALB/c (syngéniques) et nous avons observé que les deux souches étaient susceptibles à l'infection de façon comparable.

Au cours de l'infection murine par *S. bovis* (souche OF/1 et BALB/c), nous observons une élimination de la charge en vers au cours du temps. D'autre part, le nombre d'oeufs tissulaires augmente progressivement, les oeufs se localisant d'abord dans le foie et se redistribuant ensuite au niveau de l'intestin.

L'élimination naturelle des vers adultes, a également été décrite par Agnew *et al* (1993), chez des souris CBA/ca et elle est appelée attrition immune. Jusqu'à présent, ce phénomène n'a pas été rapporté dans l'infection murine par *S. mansoni* et *S. japonicum*, mais il a été décrit dans les infections murines et humaines par *S. haematobium* (Agnew *et al*, 1993, 1996).

Ces résultats suggèrent que l'attrition immune ne dépend pas de la souche de souris, mais serait plutôt liée aux caractéristiques des schistosomes du même complexe, comme *S. bovis* et *S. haematobium*.

D'autre part, nous avons observé une réduction préférentielle significative de 79% et de 85% des vers femelles, respectivement pour les souris OF1 et BALB/c.

Ce résultat pourrait constituer une explication pour les mécanismes d'anti-fécondité décrits dans l'infection par *S. bovis*. Il faut noter que ce phénomène n'a été observé que sur une période longue d'infection. Dans d'autres expériences d'infection de longue durée, l'élimination est significative aussi bien pour les vers femelles que pour les vers mâles. Il faut souligner que la période de récolte des vers était différente (J60-J80 ; J77-J94), et que ceci peut être d'une

importance majeure sur l'expression de ce phénomène. Les données de la littérature concernant l'infection murine indiquent une élimination de la charge en vers au cours de l'infection. Cependant, ces résultats ne font pas toujours référence à la perte préférentielle des vers femelles.

Les mécanismes liés à la susceptibilité des vers adultes de *S. bovis* n'ont pas été clarifiés. Le ver est-il la cible du système immunitaire uniquement ou d'autres phénomènes interviennent-ils ? Les modifications anatomiques, l'hypertension portale et les changements vasculaires engendrés par les vers, mais en grande partie par les oeufs pondus sont des facteurs à prendre en compte lors d'évaluation des mécanismes impliqués dans l'attrition immune.

Afin d'élucider ces mécanismes, nous proposons des études cinétiques parallèles d'infections à court et long terme, mono et bisexuées. Ces expériences devraient apporter des informations sur les cibles de ces phénomènes, en tenant compte des implications morphologiques, métaboliques et physiologiques dans ce type d'expériences.

Pendant l'infection murine par *S. bovis*, la plupart des oeufs tissulaires se localisent dans le foie, ceci traduisant une faible migration des couples de schistosomes en direction des capillaires mésentériques. Cette caractéristique, contrairement à l'infection dans l'hôte naturel, où la plupart des oeufs se trouve au niveau intestinal, suppose une adaptation de ce parasite chez la souris. Ce phénomène a aussi été rapporté par les expériences d'infection par *S. haematobium*, bilharziose humaine uro-génitale ; la localisation des oeufs se fait différemment, en fonction du modèle expérimental, chez la souris au niveau du foie (Cheever, 1983), mais chez les primates, cette répartition varie considérablement en fonction de la durée d'infection (Cheever, 1977, 1974 ; Kuntz, 1975). L'ensemble de ces informations soulignent l'importance des particularités liées aux schistosomes à éperon terminal dans leur adaptation aux hôtes vertébrés expérimentaux.

L'excrétion fécale apparaît comme un paramètre d'importance majeure dans l'infection de l'hôte naturel par *S. bovis*. Elle est considérée comme un élément indicateur du stade de l'infection et, est une des cibles la plus susceptible aux mécanismes de résistance à la réinfection. Cependant, dans l'infection murine, l'excrétion fécale est trop faible et tardive, entre

jour 60-70 post-infection, pour permettre son évaluation. Cette observation doit être liée à la localisation préférentielle des vers au niveau hépatique.

B - Les caractéristiques de la réponse humorale et cellulaire.

Nous travaux constituent la première étude de la réponse isotypique et cellulaire au cours de l'infection par *S. bovis*.

Nous observons une réponse spécifique vis-à-vis des antigènes SWAP et SEA d'isotypes IgG1, IgM, IgA et IgE plus intense à partir de l'oviposition. Les cytokines produites par les cellules spléniques de souris infectées sont surtout l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10, associées à une très faible production d'IL-2 et d'IFN- γ après oviposition. L'association entre la production d'IL-4 et IL-5 et l'induction d'anticorps IgG1 et IgA révèlent une réponse de type Th2.

Ces observations sont en accord avec les descriptions de la littérature concernant l'infection par *S. mansoni* (Gryzch *et al*, 1991 ; Pearce *et al*, 1991 ; Sher *et al*, 1991; Moutford *et al*, 1994 ; Poulain *et al*, 1996). De façon très schématique, dans la schistosomiase à *S. mansoni*, avant la ponte, la réponse immune (induite par les schistosomes) est de type Th1 (production majeure d'IL-2 et INF- γ), après la ponte cette réponse diminue en raison de l'apparition d'une réponse immune anti-oeuf de type Th2 (production majeure d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10). L'IL-10 serait la cytokine responsable de la décroissance de la réponse Th1 anti-schistosome. La réponse Th2 anti-oeuf diminue graduellement, parallèlement à la diminution des symptômes immunopathologiques.

Dans notre modèle, l'IL-10 est produite en début d'infection (jour 30). Le rôle associé à l'IL-10 dans la polarisation vers la réponse Th2 dû à la présence du sucre Lewis ^X est observé bien avant la présence des oeufs dans l'infection par *S. bovis* contrairement aux observations dans l'infection par *S. mansoni*.

L'induction et la modulation de la réponse inflammatoire dirigée contre les oeufs, aspect majeur de la pathologie dans cette parasitose, est sous le contrôle de différentes populations cellulaires, le rôle majeur étant joué par les lymphocytes T CD4 (Th1 et Th2) et CD8 (Mathew,

1986). Les cytokines produites au niveau de la peau, comme l'IL-7 et au niveau du foie, comme l'IFN- γ semblent également influencer le développement de l'immunité contre *S. mansoni* (Auriault *et al*, 1996).

Les différences observés dans l'apparition des cytokines produites entre l'infection par *S. bovis* et *S. mansoni*, nous incitent à analyser, dans notre modèle, les mécanismes de modulation et régulation de la réponse T cellulaire. Ceci pourrait être envisagé par des expériences d'injection de cytokines et d'anticorps anti-cytokines, l'utilisation des souris SCID et Knock-out est de proposer différents réseaux modulateurs et régulateurs importants dans cette parasitose, ainsi que dans la formation du granulome. Le schéma suivant illustre la complexité de ces réseaux et des différentes interactions possibles, en ce qui concerne la production parallèle des différentes cytokines et son auto-régulation.

Dans le contexte des caractéristiques immunopathologiques différentes de l'hépatotoxicité induite par les oeufs dans l'infection par *S. bovis* et *S. mansoni* (Byram *et al*, 1979 ; Lucas *et al*, 1980 ; Murare *et al*, 1987) il serait intéressant d'analyser la dynamique des différentes populations cellulaires et d'évaluer les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines produites par les cellules du granulome dans notre modèle d'étude.

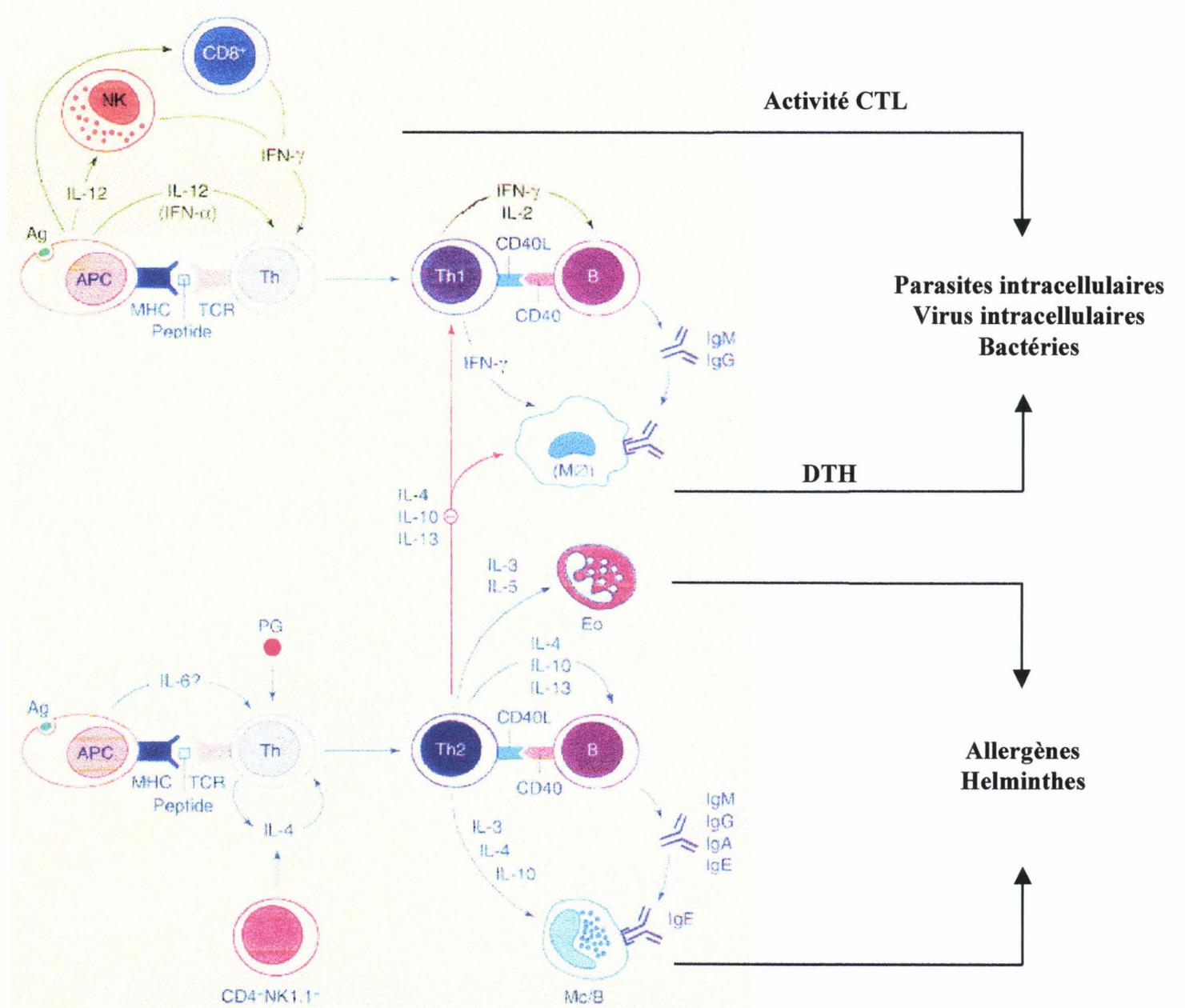
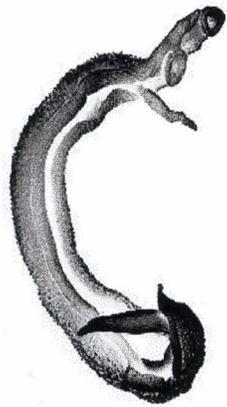
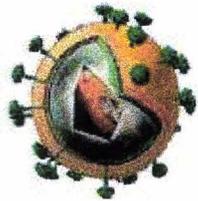


Figure 4 : Le Paradigme Th1/Th2 Profil des cytokines induites en réponse à différents pathogènes

(d'après Sergio Romagnani, Immunology Today, 1997)

C - L'existence d'une immunité à la réinfection.

Un autre objectif de notre étude concerne les caractéristiques parasitaires et immunologiques au cours d'une réinfection homologue par *S. bovis*.

Les études réalisées sur le terrain démontrent bien l'existence d'une résistance à la réinfection, qui se manifeste essentiellement par la réduction de la fécondité des vers, que ce soit en zone d'endémie ou après un challenge massif (Majid *et al*, 1980 ; Bushara *et al*, 1980, 1983c). Les mécanismes impliqués dans cette protection ne sont pas complètement élucidés, mais ils semblent être dépendants des facteurs sériques (Bushara *et al* 1983c, 1994).

Toutefois, aucune analyse de l'incidence de l'attrition immune n'a été réalisée dans le système de réinfection. De ce fait, nous avons entrepris des expériences de réinfection, au moment où l'attrition immune semble la plus marquée.

Dans nos conditions expérimentales, les animaux réinfectés ne présentaient pas de vers, ou très peu. A nouveau, l'élimination naturelle des vers au cours de l'infection a été observée, affectant significativement dans ce cas, les vers femelles et mâles.

Le nombre d'oeufs tissulaires n'a pas été affecté de façon significative par rapport aux animaux contrôles. De plus, en phase chronique d'infection, une augmentation du nombre d'oeufs morts est observée, associée à une diminution de leur capacité à éclore. Cette réduction du pourcentage d'éclosion des oeufs est probablement associée à la réponse immune.

Ces expériences permettent d'observer une résistance à la réinfection. Elle s'exprime par l'absence d'installation de l'infection d'épreuve, suggérant l'implication d'une immunité protectrice liée au concept de l'immunité concomitante, où l'infection primaire installée induirait une réponse immune protectrice contre le stade de réinfection, le schistosomule. Les résultats obtenus dans notre expérience peuvent même suggérer que cette immunité n'implique pas forcément la présence des vers, étant donné que, lors de la réinfection certains animaux ne présentaient plus de vers adultes et exprimaient, cependant, une immunité protectrice contre la réinfection. Le stimulus antigénique serait maintenu et serait peut-être lié à la présence des oeufs. La réinfection amplifierait la réponse immune.

Cette hypothèse est confortée par les travaux de Dean *et al* (1978) et Bickle *et al* (1979) qui décrivent l'absence d'immunité à la réinfection lors d'une primo-infection en absence d'oeufs. Les oeufs déposés au niveau du foie et subséquemment le granulome formé pourraient être des facteurs responsables de l'induction de l'immunité à la réinfection.

Le système de infection/ réinfection murine par *S. mansoni* a été largement étudié, ces travaux ont bien démontré différents niveaux de protection contre l'infection d'épreuve. Ces différences ont pu être associées, entre autre, à la dose de cercaires utilisée (Long *et al*, 1978), à la souche de souris (Colley et Freeman, 1980), au moment de la réinfection et de la perfusion (Long *et al*, 1978 ; Doenhoff *et al*, 1978 ; Coelho *et al*, 1995), mais elles soulignent aussi l'importance possible de la pathologie hépatique dans l'hémodynamique porto-hépatique (McHugh *et al*, 1987 ; Pons *et al*, 1989).

Contrairement à notre attente, aucune association directe n'a pu être établie avec la présence ou à l'absence d'un isotype particulier, la production de cytokines spécifiques d'antigènes parasitaires et l'immunité à la réinfection.

Quelques différences ont cependant été enregistrées, notamment, entre le groupe infecté et le groupe réinfecté en ce qui concerne la réponse IgG2b anti-SEA et la production de IL-5 (stimulés par l'antigène SEA) prédominantes chez les animaux réinfectés. De plus, nous avons pu observé une absence de production de IFN γ induite par l'antigène SWAP dans le groupe réinfecté, mais assez importante dans le groupe contrôle (primo-infecté). Ce dernier résultat semble intéressant à exploiter étant donné le rôle important de cette cytokine au niveau pulmonaire lors de l'analyse de l'infection en phase précoce (pulmonaire) (James *et al*, 1990).

D'autre part, par Western blot sur des extraits totaux de vers adultes et d'oeufs les sérums d'animaux infectés et réinfectés reconnaissent des antigènes de poids moléculaires différents. Ces antigènes se localisent entre 45-65kDa et 70-75kDa.

Ces résultats obtenus par des pools de sérums, nécessitent une étude au niveau individuel pour mieux saisir ces différences.

D - L'antigène Sb 28GST est une cible des mécanismes de l'anti-viabilité des oeufs

Notre laboratoire s'est largement intéressé à une molécule de 28 kDa présentant une activité glutathion S-transférase (GST). Elle est capable d'induire sous forme native ou recombinante une protection contre l'infection par les différentes espèces de schistosomes, dans différents modèles animaux, qui se traduit essentiellement par la réduction de la charge en vers et/ou une diminution de la fécondité du parasite (Balloul *et al*, 1985, 1987a,b,c ; Bushara *et al*, 1993 ; Boulanger *et al*, 1994 ; De Bont *et al*, 1997). Cette protection a été observée dans des systèmes homologues et hétérologues d'infection (Balloul *et al*, 1987a ; Wolowczuk *et al*, 1989 ; Boulanger *et al*, 1991a).

L'intérêt reconnu de cette molécule et ses potentialités vaccinales nous ont conduit à l'étude dans le modèle murin de son pouvoir protecteur.

Dans nos conditions expérimentales, un effet très marqué sur la viabilité des oeufs, en réduisant leur maturation et leur capacité d'éclosion, est observé lors de l'immunisation par la rSb 28GST dans le système d'infection homologue (*S. bovis*) et hétérologue (*S. mansoni*).

Les effets protecteurs ne s'expriment ni au niveau d'une réduction de la charge parasitaire, ni sur le nombre d'oeufs tissulaires. Bien que, les sérums d'immunisation soient capables d'inhiber l'activité Sb 28GST, aucune association n'a été établie entre les phénomènes biologiques observés et l'activité GST.

De plus, l'utilisation d'un modèle d'infection hétérologue exclut les caractéristiques d'espèce et souligne l'intervention de mécanismes d'actions identiques sur les oeufs.

Ces résultats suggèrent la participation de cette molécule (GST) dans des mécanismes similaires et/ou comme une cible commune d'action dans l'infection par *S. bovis* et *S. mansoni*.

Quelle serait l'implication des GST dans ces effets ?

Quelques hypothèses sont proposées. Les GST pourraient agir à 3 niveaux :

---> Par une action directe sur le miracidium contenu dans l'oeuf : elle atteindrait l'oeuf dans les tissus. La pénétration d'anticorps à l'intérieur de l'oeuf, a été déjà démontrée dans le cas des IgG et des IgA (Hirata *et al*, 1986). D'autre part, une IgM monoclonale, capable d'inhiber l'activité enzymatique de la Sm 28GST, est également capable d'inhiber l'éclosion d'oeufs normaux maintenus *in vitro* (Xu *et al*, 1991). Bien que classiquement les protéases miracidiales soient incriminées dans le processus de rupture de la coquille (Xu et Dresden, 1986), il n'est pas exclu que les GST puissent intervenir dans un phénomène beaucoup plus complexe.

---> Par une diminution des capacités de réponse aux antigènes de l'oeuf de l'hôte immunisé : L'analyse de la teneur en Sm 28GST montre une différence entre les stades parasitaires : elle apparait maximale chez le vers adulte, minimale dans l'oeuf. Ainsi, un mécanisme immun basé sur une réponse anti-28GST aurait la possibilité d'exercer une influence plus importante sur un organisme à priori moins armé en GST.

---> Par une action sur le vers femelle (ou sur le couple) résultant en une altération qualitative de sa production d'oeufs : elle repose sur une diminution de l'expression des antigènes miracidiaux, supposant une altération des capacités physiologiques de l'embryon dès sa sortie de l'utérus de la femelle. Bien qu'il soit difficile d'en apporter une preuve formelle *in vivo*, cette hypothèse paraît séduisante car elle permettrait d'expliquer la plupart des effets observés. Elle est étayée par la démonstration d'un effet dirigé contre l'aptitude à l'embryonnement des oeufs pondus chez la souris infestée par *S. japonicum*, après immunisation répétée par des oeufs immatures de la même espèce (Garcia *et al*, 1987). Ces auteurs avaient constaté un pourcentage très élevé d'oeufs morts ou immatures dans les tissus hépatiques et intestinaux des animaux sensibilisés. Ils n'apportaient cependant pas de preuve définitive de la cible précise du mécanisme immun.

D'autre part, une neutralisation directe des fonctions GST peut aboutir à une réduction significative des capacités de ponte. Une perturbation de la physiologie du couple pourrait résulter en une altération des fonctions de reproduction du parasite.

Les GST jouent-elles un rôle dans la formation de l'oeuf ? Les nombreuses fonctions de transformations et de transports identifiées chez les GST de mammifères (Ketterer *et al*, 1989) peuvent laisser supposer qu'elles interviennent également dans le circuit complexe aboutissant à la production d'un oeuf viable (Clough, 1981).

Cette participation est supportée par les observations d'immunohistochimie et la microscopie électronique (Porchet *et al*, 1994 ; Liu *et al*, 1996), la Sm 28GST a été identifiée au niveau du tégument, dans le parenchyme, les organes génitaux de vers mâles et femelles ainsi que dans l'épithélium de l'oesophage.

D'autre part, dans l'ovaire le nombre de cellules qui exprime la Sm 28GST diminue de la région antérieure, contenant des oocytes immatures, vers la région intermédiaire pour disparaître complètement dans la région postérieure, contenant des oocytes matures. Il est intéressant de noter que dans les oocytes matures peu d'antigène est détecté, alors que dans le cas de l'oocyte fertilisé et contenu dans l'oeuf, l'expression de cette molécule est augmentée, surtout au niveau du noyau. L'ensemble de ces observations suggère que l'expression de la Sm 28GST peut être liée à la prolifération cellulaire et / ou à la synthèse protéique et sa localisation sur la coque de l'oeuf indique la participation possible de cet antigène dans la formation de l'oeuf. Cette localisation particulière au niveau des organes reproducteurs supporte la possible intervention des GST dans les phénomènes d'embryogénèse.

Les mécanismes impliqués dans l'éclosion des oeufs ne sont pas encore très bien définis, on suggère une action physique qui serait à l'origine de la rupture de la coquille de l'oeuf (Kusel, 1970 ; Smyth and Halton, 1983). D'autres observations suggèrent l'implication d'une activité mécanique du miracidium (Samuelson *et al*, 1984) ou l'implication d'enzymes comme, la leucine aminopeptidase (Xu et Dresden, 1986).

Jusqu'à présent, aucune association entre les mécanismes impliqués dans l'éclosion et les GST n'a été décrite dans la littérature.

E - Une analyse entre la structure primaire de la molécule (Sb 28GST) , le site actif et sa fonction biologique

Cette approche a été envisagée par l'intermédiaire de l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-rSb 28GST afin de comprendre les mécanismes liés aux phénomènes de l'anti-fécondité et de l'anti-viabilité, en association avec l'activité enzymatique GST.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons défini 3 protocoles de transfert passif des AcMc après l'infection. Les différents temps d'injection (décrits en détail dans l'article 3) devraient permettre de cibler : à jour 35, les vers adultes avant la ponte, à jour 30, les vers en cours de maturation ; à jour 30 + jour 40, les vers immatures et le début de l'oviposition.

Le transfert passif d'anticorps monoclonaux contre la rSb 28GST nous montre qu'indépendamment de leur capacité ou non à inhiber l'activité enzymatique de la Sb 28GST, des taux importants de réduction de la maturation et de la viabilité des oeufs sont trouvés. L'implication des AcMc dans la réduction de la charge parasitaire et dans le nombre d'oeufs tissulaires produits n'est pas vérifiée dans tous les expériences, indépendamment du temps d'injection.

D'autre part, différentes tentatives *in vitro* ont été entreprises, dans le but de clarifier ces mécanismes. Des expériences d'incubation des différents anticorps monoclonaux avec des vers adultes ou des oeufs récupérés de foies infectés n'ont pu être interprétées. Par ces expériences, nous voulions vérifier une action des AcMc sur la production d'oeufs par les femelles ou une action sur la capacité d'éclosion des oeufs après quelques jours de maturation. De même, des expériences d'incubation des anticorps anti-Sb28GST (monoclonaux et polyclonaux) sur des miracidiums vivants issus d'oeufs provenant du foie, n'ont pas donné de résultats concluants.

Ces observations soulèvent une nouvelle question : existerait-il une association entre l'effet biologique d'inhibition de la viabilité des oeufs et la reconnaissance d'un même ou d'un épitope différent de la Sb 28GST ?

La synthèse de décapeptides (par la technique de PeptidScan) de la Sb 28GST a permis d'identifier les épitopes reconnus par les AcMc anti-Sb 28GST.

Deux AcMc ayant la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la Sb 28GST, reconnaissent différentes séquences d'acides aminés de la Sb 28GST. L'un, d'isotype IgG2a reconnaît de façon modérée 2 séquences linéaires, a.a 52-61 et a.a 202-211. L'autre, d'isotype IgG1 reconnaît plus fortement les séquences linéaires de la protéine, a.a 169-178 et a.a 202-211. Le troisième AcMc, d'isotype IgG1 est incapable d'inhiber l'activité catalytique GST et reconnaît la séquence a.a 58-67. La capacité de ces AcMc à inhiber l'activité catalytique de la GST suggère une liaison au site actif ou des régions proches du site.

Ces résultats nous permettent de suggérer que la partie C-terminale (a.a 190-211) de la protéine peut être impliquée dans la site enzymatique de la Sb 28GST. D'autre part, la difficulté à reconnaître certaines séquences linéaires peut suggérer l'existence d'un épitope conformationnel et donc la participation de la structure tridimensionnelle.

Aucune association entre les épitopes linéaires reconnus, le site actif de la GST et l'expression de la protection n'a pu être établie.

Ces résultats semblent dans notre première analyse contradictoires à ceux décrits précédemment par Xu *et al* (1991, 1993) qui suggèrent une association entre l'inhibition de l'activité enzymatique et les mécanismes *in vivo* et *in vitro* d'anti-fécondité. Ces auteurs suggèrent que les parties N-(10-43) et C-(190-211) terminales de la molécule seraient impliquées dans le site enzymatique de la Sm 28GST.

Cependant, quelques divergences existent entre ces deux études :

- soit au niveau de la différence d'isotypie de l'anticorps, qui peut se traduire par une différence d'affinité pour la protéine,
- soit par l'existence d'Ac qui pourrait reconnaître certains épitopes hors du site enzymatique, et modifier la conformation de la molécule (plus ouvert / plus fermé) et qui serait à l'origine de l'inhibition de sa fonction enzymatique,
- soit liées aux différences de conditions expérimentales dans les différentes approches techniques utilisées pour cette démonstration.

Une étude plus approfondie des régions N- et C- terminales de la Sb 28GST serait à envisager. Les épitopes N- et C- terminaux de Sm 28GST, Sh 28GST et de Sb 28GST étant

conservés (Trottein *et al*, 1992a,b), il semble donc intéressant d'utiliser des constructions peptidiques pour mieux appréhender ces phénomènes.

En conclusion, si l'ensemble des travaux que nous avons présenté dans ce mémoire a permis d'analyser en fonction des composantes de la réponse immunitaire l'évolution des paramètres parasitologiques de l'infection murine par *Schistosoma bovis*, il soulève cependant des interrogations sur la pertinence de ce modèle expérimental par rapport à l'installation de l'immunité dans l'hôte naturel de ce parasite.

Bien qu'imparfait, le modèle murin apparaît néanmoins comme un outil précieux pour la compréhension et la dissection fine des mécanismes humoraux et cellulaires impliqués dans le développement de l'immunité ainsi que pour l'évaluation des propriétés de candidats vaccins.

ANNEXE TECHNIQUE

1. Le parasite

La souche de Salamanca de *S.bovis* fournie par le Professeur M.Sampaio Silva (INSA, Lab. Parasitologie Porto, Portugal) est maintenue dans ce laboratoire par passages successifs sur les mollusques *Bullinus truncatus* et le hamster doré. Les parasites adultes sont récoltés par perfusion systémique de hamsters infestés depuis 55 jours.

2. L'infestation expérimentale et la perfusion totale

Les souris anesthésiées au pentobarbital sodique sont infectées par passage transcutané de 160 furcocercaires de *S. bovis* à travers l'abdomen rasé. A la fin de l'expérimentation, les souris ayant reçu une dose létale d'anesthésique sont perfusées, après section de la veine mésentérique, en injectant par l'aorte le liquide de perfusion (NaCl 0,9%, héparine 1%).

3. Evaluation de la charge parasitaire

3.1. Comptage des vers

Les vers récoltés par perfusion totale sont comptés sous loupe binoculaire, après qu'ils aient sédimentés. Les vers males, femelles et immatures sont quantifiés à chaque expérimentation.

3.2. Comptage des oeufs tissulaires

L'intestin et le foie de chaque souris sont prélevés et pesés. Le foie est digéré dans la potasse à 4% une nuit, à 37°C. Les oeufs sont alors comptés sous le microscope dans une fraction aliquote de la suspension. Leur nombre est rapporté pour chaque souris par gramme de tissu, et par gramme de tissu par femelle.

4. Test d'éclosion

Pour connaître la proportion d'oeufs matures, immatures et morts, les organes sont broyés à l'Ultraturrax dans du tampon Hanks Wallace, toutes les étapes sont réalisées à 4°C afin d'éviter l'éclosion lors de la préparation. Les échantillons sont lavés 3 fois dans le tampon afin d'éliminer le maximum d'impuretés et de débris. Une fraction aliquote (environ 200 oeufs, approximativement 50% d'oeufs matures) est prélevée, diluée dans de l'eau de Volvic (Société des eaux de Volvic, Volvic, France) et exposée à la lumière et à la chaleur (30°C) pendant 90 minutes. Le processus d'éclosion est arrêté par addition de lugol à 1% qui colore les oeufs en brun. Les oeufs matures, immatures, morts et les coques sont comptabilisés.

Le pourcentage de maturation est calculé selon le rapport :

$$\% \text{ maturation} = \frac{\text{nombre d'oeufs matures} + \text{nombre de coques}}{\text{nombre total d'oeufs}} \times 100$$

Le pourcentage d'éclosion est calculé selon le rapport :

$$\% \text{ éclosion} = \frac{\text{nombre de coques}}{\text{nombre d'oeufs matures et de coques}} \times 100$$

5. L'antigène Sb28 GST

L'ADNc de *S.bovis* a été inséré dans *Escherichia coli* (Y1090). Les clones exprimant la Sb28 GST ont été sélectionnés par les anticorps anti-Sm28 GST grâce à l'existence des réactions croisées entre la Sm28 GST et la Sb28 GST. Les clones positifs ont été sous-clonés et

multipliés pour la préparation d'ADN phagique. L'expression de la protéine a été réalisée dans la levure *S. cerevisiae* (TGY73,4) contenant le plasmide pTG8887 (Trangène SA, Strasbourg, France) (Trotteinet *al.*, 1992b). La purification de la protéine recombinante a été réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion-agarose.

6. Les anticorps monoclonaux anti-Sb 28GST

La production de sondes monoclonales spécifiques de rSb28 GST a été réalisée dans un modèle d'hybridation homologue souris X souris utilisant la souche myélomateuse non sécrétante SP2O et des splénocytes de souris immunisées par l'antigène Sb 28GST recombinant. Les hybrides sécréteurs ont été sélectionnés sur la base d'une double méthode de criblage utilisant les techniques d'ELISA et de Western blot.

7. Technique d'immuno-électrotransfert

Cette technique a été utilisée pour cribler d'une part les anticorps monoclonaux dirigés contre l'Ag rSb 28GST et d'autre part pour analyser la réactivité des sérums des animaux infectés et/ou réinfectés, vis à vis des extraits totaux de vers adultes ou d'oeufs.

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

Les électrophorèses ont été réalisées en conditions dénaturantes (SDS) et réductrices (β -mercaptoéthanol) : la rSb 28GST, les extraits totaux de vers adultes (SWAP) et d'oeufs (SEA) de *S. bovis* ont été repris dans un tampon Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8 ou 8,9 contenant 3% de SDS, 10% de glycérol, 0,05% de bleu de Bromophénol. Les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 3 min, puis déposées sur un gel de concentration (gel de polyacrylamide à 5%, tampon Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%) coulé sur un gel de séparation (gel de polyacrylamide homogène à 13%, tampon Tris-HCl pH 8,9, SDS 0,1%). Après la migration, les bandes protéiques ont été colorées au bleu de Coomassie 0,85 g dans un mélange méthanol / acide acétique / eau, (500 / 100 / 500 en volume) et le gel a été décoloré avec un mélange éthanol / acide acétique / eau (20 / 8 / 72 en volume).

7.2. Immunoélectrotransfert : Western-blot

Les protéines des extraits totaux de SWAP ou de SEA séparées par SDS-PAGE ou l'antigène rSb 28GST sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (0,43 mm; Ceralabo) pendant une nuit à 45 Volts dans un tampon Tris 20 mM, glycine 150 mM, méthanol 20%. La membrane de nitrocellulose a été ensuite saturée avec du lait écrémé à 5% dans du PBS-Tween 0,05% durant 1 h.

7.2.1. Criblage des anticorps monoclonaux anti-Sb 28 GST

Le criblage des anticorps monoclonaux anti-Sb 28 GST a été réalisé en incubant, durant 1 nuit à 4 °C, la membrane de nitrocellulose avec les anticorps monoclonaux sous différentes formes (surnageants de culture, ascites). La révélation des complexes immuns se fait grâce à un anticorps marqué à la peroxydase dirigé contre les immunoglobulines de souris. L'activité peroxydasique a été détectée par l'addition de PBS contenant du 4-chloro-naphthol (60 mg dans 20% de méthanol) et 1% de H₂O₂.

7.2.2. Détection des protéines parasitaires antigéniques

La réactivité des sérums de souris infectées et/ou réinfectées vis à vis du SWAP et du SEA a été analysée en incubant la membrane de nitrocellulose avec les sérums des différents

animaux pendant une nuit à 4°C. La révélation est identique à celle utilisée pour le criblage des anticorps monoclonaux anti-Sb 28 GST.

8. Technique d'inhibition enzymatique

Les échantillons (sérum, anticorps monoclonaux) (44 µl) ont été incubés avec 0,1 µg de GST recombinantes de schistosome à tester (Sm 28GST, Sb 28GST ou Sh 28GST diluées dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 6,5) 1 h à 37 °C puis 4 h à 4 °C. Les échantillons ont été ensuite déposés dans des plaques d'ELISA (NUNC, InterMed, Danemark) (41 µl/puits contenant 0,1 µg de GST). L'activité résiduelle de la GST dans chaque préparation a été évaluée en présence de substrat constitué de chloro-1, dinitro-2-4 benzène (C.D.N.B.) (1 mM) et de glutathion réduit (GSH) (1 mM) dans un volume de 200 µl de tampon phosphate. La lecture a été effectuée par un lecteur de plaque. La densité optique (D.O.) a été évaluée à 340 nm toutes les 15 secondes pendant 2 min. L'augmentation des D.O. a été exprimée par la valeur de la pente (mD.O./min). Le bruit de fond a été soustrait par rapport à chaque échantillon traité dans les mêmes conditions mais sans enzyme. Le pourcentage d'inhibition a été défini par rapport à des préparations d'enzymes incubées dans les mêmes conditions soit en présence de tampon, soit en présence de sérums irrelevantes (sain) ou d'ascite SP2O.

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

$$Q = \frac{\text{pente du sérum à tester}}{\text{moyenne des 5 pentes de sérums témoins}}$$

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

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abel, L., Demenais, F., Prata, A., Sousa, A. E. & A. Dessein** (1991) Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 959-970.
- Agnew, A., Fulford, A. J. C., Mwanje, M. T., Gachuhi, K., Gutschmann, V., Krijger, F. W., Sturrock, R. F., Vennervald, B. J., Ouma, J. H., Butterworth, A. E. & A. M. Deelder.** 1996. Age-dependent reduction of schistosome fecundity in *Schistosoma haematobium* but not *Schistosoma mansoni* infections in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 338-343.
- Agnew, A., Murare, H. M., & M. J. Doenhoff** (1993) Immune attrition of adult schistosomes. *Parasite Immunol.* 15, 361-271.
- Agnew, A., Murare, H. M. & M. J. Doenhoff** (1989) Specific cross-protection between *Schistosoma bovis* and *S. haematobium* induced by highly irradiated infections in mice. *Parasite Immunol.* 11, 341-349.
- Agnew, A., Murare, H. M. & M. J. Doenhoff** (1993) Immune attrition of adult schistosomes. *Parasite Immunol.* 15, 261-271.
- Amin, M. B. A. & G. S. Nelson** (1969) Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. III. Further observations on heterologous immunity in mice. *Bulletin of W.H.O.* 41, 225-232.
- Amin, M. B. A., Nelson, G. S. & M. F. A. Saoud** (1968) Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. II. Heterologous schistosome immunity in rhesus monkeys. *Bulletin of W.H.O.* 38, 19-27.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. & J. H. McKerrow** (1992) Tumor necrosis factor restores granulomas and induces parasite egg laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356, 604-607.
- Amory Soisson, L. M., Masterson, C. P., Tom, T. D., McNally, M. T., Lowell, G. H. & M. Strand** (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62 kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* 149, 3612-3620.
- Andrade, Z. A. & P. A. De Brito** (1982) Curative chemotherapy and resistance to reinfection in murine schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 116-121.
- Andrews, P.** (1981) Preclinical data of Praziquantel. A summary of the efficacy of PZQ against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. *Arzneim. Forsch. Drug Research* 31, 538-541.
- Auriault, C., Pancré, V., Wolowczuk, I., Asseman, C., Ferru, I. & C. Verwaerde** (1996) Cellular immune response and pathology in schistosomiasis. *Parasite* 3, 199-208.
- 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. A. Capron** (1990) Antibody response of *Schistosoma mansoni* - infected human subjects to the recombinant P28 glutathione S-transferase and to a synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1918-1924.
- Auriault, C., Joseph, M., Tartar, A. & A. Capron** (1983a) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human IgG. *FEBS Letters* 153, 11-15.

Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J. P. & A. Capron (1981) Interaction between macrophages and *S. mansoni* schistosomula : role of IgG peptides and aggregates on the modulation of β -glucuronidase release and the cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* 62, 15-27.

Awasthi, S., S. S. Singhal, S. K. Srivastava & Y. C. Awasthi. 1993. Purification and characterization of glutathione S-transferase of murine ovary and testis. *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 143-150.

B

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

Balloul, J. M., Grzych, J. M., Pierce, R. J. & A. Capron (1987a) A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma* 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., Carvalho, D., Lecocq, J. P. & A. Capron (1987b) Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326, 149-153.

Balloul, J. M., Boulanger, D., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Carvalho, D., Lecocq, J. P. & A. Capron (1987c) Vaccination of baboons with a P28 antigen of *S. mansoni* expressed in *E. coli*. In : molecular paradigms for the readication of helminth parasites. A.J.MacInnis, ed, Alan R. Liss, NY, pp 77-84.

Basch, P. F. (1990) Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol. Today* 6, 160-163.

Basch, P. F. & N. Basch (1984) Intergeneric reproductive stimulation and parthenogenesis in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 89, 369-376.

Below, S., Kampee, L. & A. Mueller (1987) Reaction of *Rhabditis oxycerca* after long-term exposure to aldicarb and oxamyl. II. Enzyme changes in nematocidal resistance. *Nematologica* 33, 298-309.

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

Bickle, Q. D., Taylor, M. G., James, E. R., Nelson, G. S., Hussein, M. F., &rews, B. J., Dobinson, A. R. & T. F. Marshall (1979) Further observations on immunization of sheep against *S. mansoni* and *S. bovis* using irradiation-attenuated schistosomula of homologous and heterologous species. *Parasitology* 78, 185-193.

Bickle, Q. D., Bain, J. M., McGregor, A. & M. Doenhoff (1979) Factors affecting the acquisition of resistance against *S. mansoni* in the mouse. III. The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance to reinfection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 37.

Boulanger, D., Reid, G. D., Sturrock, I., Woloczuk, I., Balloul, J. M., Grezel, D., Pierce, R. J., Otieno, M. F., Guerret, S., Grimaud, J. A., Butterworth, A. E. & A. Capron (1991a) Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm 28GST affects both worm

viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol. 13, 473-490.

- Boulanger, D.** (1991b) Schistosomiasis humaines Africaines : évaluation chez l'animal du pouvoir vaccinal d'une glutathion S-transferase exprimée par le schistosome. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille, 1991.
- Boulanger, D., Trottein, F., Mauny, F., Bremond, P., Couret, D., Pierce, R. J., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Lecocq, J. P., Sellin B. & A. Capron** (1994) Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. Parasite Immunol. 16,399-406.
- 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. & A. Capron** (1995) Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. Parasite Immunol. 17, 361-369.
- Boyand, E. & L.F. Chasseaud** (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. Adv. Enzymol. 32, 173-219.
- Brophy, P. M.** (1988) The role of glutathione S-transferase in Cestodes. PhD Thesis, University College of Wales, Aberystwyth.
- Brophy, P. M. & J. Barrett** (1990a) Glutathione S-transferase in helminths. Parasitology 100, 345-349.
- Brophy, P. M. & J. Barret** (1990b) Blocking factors and the purification of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta*. Parasitology 100, 137-142.
- Brophy, P. M. & J. Barrett** (1990c) Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in Helminths. Mol. Biochem. Parasitol. 42, 205-212.
- Brophy, P. M., Crowley, P. & D. I. Pritchard** (1994) Parasitic helminth glutathione S-transferases : An update on their potential as targets for immune and chemotherapy. Exp. Parasitol. 79, 89-96.
- Brumpt E.** (1930) Cycle évolutif de *Schistosoma bovis*. Infection naturelle en Corse et infection expérimentale de *Bulinus contortus*. Ann.Parasitol. 8, 17-50.
- Bushara, H. O., Hussein, M. F., Saad, A. M., Taylor, M. G., Dargie, J. D., Marshall, T. F.C. & G. S. Nelson** (1978) Immunization of calves against *Schistosoma bovis* using irradiated cercariae or schistosomula of *S. bovis*. Parasitology 77, 303-311.
- Bushara H. O., Majid, A. A., Saad, A. M., Hussein, M. F., Taylor, M. G., Dargie, J. D., Marshall, T. F. & G. S. Nelson** (1980) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. II. Experimental demonstration of naturally acquired resistance to *S. bovis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 442-451.
- Bushara H. O., Hussein, M. F., Majid, M. A., Musa B. E. H. & M. G. Taylor** (1982) Effects of PZQ and metrifonate on *S. bovis* infections in Sudanese cattle. Research in Veterinary Science. 33, 125-126.
- Bushara H. O., Hussein, M. F., Majid, A. A., Musa B. E. H. & M. G. Taylor** (1983a) Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. IV. Preliminary observations on the mechanism of naturally acquired resistance. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 1065-1070.

- Bushara H. O., Majid, B. Y. A., Majid, A. A., Khitma, I., Gameel A. A., Karib, E. A., Hussein, M. F. & M. G. Taylor (1983b)** Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. V. The effect of PZQ therapy on naturally acquired resistance to *S. bovis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1370-1374.
- Bushara H. O., Gameel A. A., Majid, B. Y. A., Khitma, I., Haroun, E. M., Karib, E. A., Hussein, M. F. & M. G. Taylor (1983c)** Observations on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. VI. Demonstration of resistance to *S. bovis* challenge after a single exposure to normal cercariae or to transplanted adult worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1375-1380.
- Bushara, H. O., Bashir, M. E. N., Malik, K. H. E., Mukhtar, M. M., Trottein, F., Capron, A. & M. G. Taylor (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.
- Bushara, H. O., Omer, O. H., Malik, K. H. E. & M. G. Taylor (1994)** The effect of multiple transfers of immune serum on maturing *Schistosoma bovis* infections in calves. *Parasitol. Res.* 80, 198-202.
- Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., Kimani, G., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J. H., Prentice, J. H., Richardson, B. A., Arap Siongok, T. K., Sturrock, R. F. & D. W. Taylor (1985)** Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 393-408.
- Butterworth, A. E., Bensted-Smith, R., Capron, M., Capron, A., Dalton, P.R., Dunne, D. W., Grzych, J. M., Kariuki, H. C., Khalife, J., Koech, D. Mugambi, M., Ouma, J. H., Arap Siongok, T. K. & R. F. Sturrock (1987)** Immunity in human schistosomiasis : prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology* 94, 281-300.
- Butterworth, A. E. (1992)** Vaccines against schistosomiasis : where do we stand ? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 1-2.
- Buttner, A. (1950)** Curieux cas d'hérmaphroditisme chez une souche Africaine de *Schistosoma mansoni*. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences.* 230, 1420-1422.
- Byram, J. E. & F. Von Lichtenberg (1977)** Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 207-214.
- Byram, J. E, Doenhoff, M. J., Musallam, R., Brinck, L. H. & F. Von Lichtenberg (1979)** *Schistosoma mansoni* infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administering homologous chronic infection serum. II. Pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 274-285.

C

- Callahan, H. L., Crouch, R. K. & E. R. James (1988)** Helminth anti-oxidant enzymes : a protective mechanism against host oxidants. *Parasitology Today* 4, 218-225.
- Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M. & H. Bazin (1975)** Specific IgE antibodies in immune response adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* 253, 274-275.

- Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. & A. Capron (1981)** Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rats eosinophils. *J. Immunol.* 126, 1764-1768.
- Capron, M. & A. Capron (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. & A. E. Butterworth (1987)** Immunity to schistosomes : progress toward vaccine. *Science* 238, 1065-1072.
- Capron, A., J. M. Balloul, D. Grezel, J. M. Grzych, I. Wolowczuk, C. Auriault, D. Boulanger, M. Capron & R. J. Pierce. (1990)** Progress towards vaccine against schistosomiasis. In *molecular aspects of Immune Response and Infectious Disease* (ed. H. Kiyono, E. Jirillo, C. Desimone) Raven Press, Ltd, New York, pp 183-181.
- Chandiwana, S. K., Christensen, N. O & F. Frandsen (1987)** Seasonal patterns in the transmission of *Schistosoma haematobium*, *S. mattheei* and *S. mansoni* in the highveld region of Zimbabwe. *Acta Tropica* 44, 433-444.
- Chappell, C. L. & M. H. Dresden (1986)** *Schistosoma mansoni* : proteinase activity of "hemoglobinase" from digestive tract of adult worms. *Exp. Parasitol.* 61, 160-167.
- Charmot, G. & J. M. Amat-Roze (1993)** Les Bilharzioses. *Rev. Prat. (Paris)* 43, 401-467.
- Charrier-Ferrara, S., Caillol, D. & V. Goudot-Crozel (1992)** Complete sequence of *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 329-334.
- Cheever A. W. & L. A. Anderson (1971)** Rate of destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in the tissues of mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 62-68.
- Cheever A. W. & R. H. Duwall (1974)** Single and repeated infections of grivet monkeys with *Schistosoma mansoni* : parasitological and pathological observations over a 31 month period. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 884-894.
- Cheever, A. W., Torky, A. H. & M. Shirbiney (1975)** The relation of worm burden to passage of *Schistosoma haematobium* eggs in the urine of infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 284-288.
- Cheever A. W., Kamel, I. A., Elwi, A. M., Mosimann, J. E. & R. Danner (1977)** *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections in Egypt. II. Quantitative parasitological findings at necropsy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 702-716.
- Cheever A. W., Duvall, R. H. & T. A. Hallack (1983)** Hepatic fibrosis in *Schistosoma haematobium*-infected mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 673-679.
- Cherfas, J. (1991)** New hope for vaccine against schistosomiasis. *Science* 251, 630-631.
- Chien, K. & S. T. Lia (1960)** A note on hermaphroditism of female *Schistosoma japonicum*. *Acta. Zoo. Sinica (Pekin).* 12, 9.
- Colley, D. G. & G. L. Jr Freeman (1980)** Differences in adult *Schistosoma mansoni* worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice. I. CBA/J & C57BL/6 mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1279-1285.
- Christensen, N. O., Nydal, R., Frandsen, F., Sirag, S. B. & P. Nansen (1981)** Further studies on resistance to *Fasciola hepatica* and *Echinostoma revolutum* in mice infected with *Schistosoma* sp. *Zeitschrift fur Parazitenkunde* 65, 293-298.

- Christensen, N. O., Mutani, A., & F. Frandsen (1983)** A review of the biology and transmission ecology of African bovine species of the genus *Schistosoma*. *Z. Parasitenkd.* 69, 551-570.
- Clegg, J. A., Smithers, S. R. & R. J. Terry (1971)** Concomitant immunity and host antigens associated with schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 1, 43.
- Clough, E. R. (1981)** Morphology of reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J. Parasitol.* 67, 535-539.
- Coelho, P. M., Mello, R. T. & T. E. Pollom (1995)** *Schistosoma mansoni* : reinfections and concomitant immunity in mice. Importance of perfusion time after challenge infection for evaluation of immunoprotection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 507-509.
- Coon, M. J. & A. D. N. Vaz (1988)** Role of cytochrome P-450 in hydrocarbon formation from xenobiotic and lipid hydroperoxide. *Prog. Clin. Biol. Res.* 274, 497-507.
- Couissinier-Paris & A. J. Dessein (1995)** *Schistosoma* specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. *Eur. J. Immunol.* 25, 2295-2302.

D

- Damian, R. T. (1987)** Molecular mimicry revisited. *Parasitol. Today* 3, 263-266.
- Damonneville, M., Wietzerbin, J., Pancré, V., Joseph, M., Delanoye, A., Capron, A. & C. Auriault (1988)** Recombinant Tumor Necrosis Factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J. Immunol.* 140, 3962-3965.
- Danielson, U. H. & B. Minnervik (1985)** Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione S-transferase from the rat. *Biochem. J.* 231, 263-267.
- Danielson, U. H., Esterbauer, H. & B. Mannervik (1987)** Structure-activity relationship of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferase. *J. Biochem.* 247, 707-713.
- Dargie, J. D. (1980)** The pathogenesis of *Schistosoma bovis* infection in Sudanese cattle. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 560-562.
- Dean, D. A., Minard, P., Stirewalt, M.A., Vannier, W. E. & K. D. Murrel (1978)** Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. 27, 951-956.
- De Bont, J., Vercruyse, J., Sabbe, F., Southgate, V. R. & D. Rollinson (1995a)** *Schistosoma mattheei* infections in cattle : changes associated with season and age. *Vet. Parasitol.* 57, 299-307.
- De Bont, J., Vercruyse, J., Sabbe, F. & M. T. Ysebaert (1995b)** Observations on worm population dynamics in calves naturally infected with *Schistosoma mattheei*. *Parasitology* 111, 485-491.
- De Bont, J., Vercruyse, J., Grzych, J. M., Meeus, P. F. M. & A. Capron (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.

- Demeure, C. E., Rihet, P., Abel, L., Ouattara, M., Bourgois, A. & A. J. Dessein (1993)** Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans : influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 168, 1000-1011.
- Dessain, J. P. (1977)** Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 7, 624-629.
- Dessein, A., Rihet, P., Demeure, C., Couissinier, P., Bacellar, O., Carvalho, E. M., Kohlstaedt, S., Dessein, H., Souza, A., Prata, A., Goudot, V., Bourgois, A. & L. Abel (1992)** Facteurs génétiques et immunologiques déterminant la résistance à la bilharziose en région d'endémie. *Med. Sci.* 8, 108.
- Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Long, E., Bain, J. & A. McGregor (1978)** Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. I. Demonstration of resistance to reinfection using a model system that involves perfusion of mice within three weeks of challenge. *J. Helminthol.* 52, 173-186.
- Doenhoff, M. J., Pearson, S., Dunne, D. W., Bickle, Q., Lucas, S., Bain, J., Mussallam, R. & O. Hassounah (1981)** Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections : stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 41-53.
- Dohn, D. R., Quebbeman, A. J., Borch, R. F. & M. W. Anders (1985)** Enzymatic reaction of chlorotrifluoroethene with glutathione : 19F NMR evidence for stereochemical control of reaction. *Biochemistry* 24, 5137-5143.
- Doutch, P. G. & L. L. Buchanan (1978)** Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. *Xenobiotica* 8, 171-176.
- Duffus, W. P., Preston, J. M. & C. H. Staak (1975)** Initial fractionation of adult *Schistosoma bovis* antigen for diagnosis of infection in cattle. *J. Helminthol.* 49, 1-7.
- Dunne, D. W., Lucas, S., Bickle, Q., Pearson, S., Madgwick, L., Bain, J. & M. J. Doenhoff (1981)** Identification and partial purification of an antigen (w1) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 54-71.
- Dunne, D. W., Hassounah, O., Mussallam, R., Lucas, S., Pepys, M. B., Baltz, M. & M. J. Doenhoff (1983)** Mechanisms of *Schistosoma mansoni* egg excretion : Parasitological observations in immunosuppressed mice reconstituted with immune serum. *Parasite Immunol.* 5, 47-60.
- Dunne, D. W., Grabowska, A. M., Fulford, A. J. C., Butterworth, A. E., Sturrock, R. F., Koech, D. & J. H. Ouma (1988)** Human antibody responses to *Schistosoma mansoni* : the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *Eur. J. Immunol.* 18, 123-131.
- Dunne, D.W., Butterworth, A. E. , Fulford, A. J. C. , Kariuki, H. C. , Langley, J. G., Ouma, J. H., Capron, A., Pierce, R. & R. F. Sturrock (1992)** Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni : association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* 22, 1483-1488.
- Duvaux-Miret, O., Baratte, B., Dissous, C. & A. Capron (1991)** Molecular cloning and sequencing of the α -tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 337-340.

E

- El Sanhoury**, A. A., Haroun, E. M., Gamell, A. A. & H. O. Bushara (1997) Protective effect of irradiated metacercariae of *Fasciola hepatica* and irradiated cercariae of *Schistosoma bovis* against fascioliasis in goats . Tropical Animal Health and Production 19, 245-249.
- El Sherbeini**, M., Ramadan, W., Bostian, K. A. & P. M. Knopf (1991) Cloning and sequence analysis of the *Schistosoma mansoni* membrane glycoprotein antigen Gp22. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 83-98.
- Euzeby**, J. (1970) Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine. Vigot Frères.
- Eveland**, L. K., Hsu, S. Y. L. & H. F. Hsu (1969) Cross-immunity of *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni* and *S. bovis* in rhesus monkeys. J. Parasitol. 55, 279-288.

F

- Fallon**, P. G. & M. J. Doenhoff (1994) Drug-resistant schistosomiasis : resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51, 83-88.
- Finken**, M., Sobek, A., Symmons, P., & W. Kunz (1994) Characterization of the complete protein disulfide isomerase gene of *Schistosoma mansoni* and identification of the tissues of its expression. Mol. Biochem. Parasitol. 640, 135-144.

G

- Galtz**, J. F. C. & G. J. Van der Vusse (1990) Cellular fatty acide-binding proteins : current, concepts and futur directions. Mol. Cell Biochem. 98, 237-251.
- Garcia**, E. G., Mitchell G. F., Rivera, P. T., Levardome, R. R., Almonte, R. E. & W. U. Tiu (1987) evidence for anti-embryonation immunity and egg destruction in mice sensitized with immature eggs of *Schistosoma japonicum*. Asian P. J. Allergy and Immunology 140, 4245-4251.
- Gianinni**, A. L., Cariade, E. C., Martin-Bragan, V. M. & F. D. Rumjanek (1995) F-10 nuclear binding proteins of *Schistosoma mansoni* : structural and functional features. Parasitology 110, 155-161.
- Grezel**, D., Capron, M., Grzych, J. M., Fontaine, J., Lecocq, J. P. & A. Capron (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm 28GST recombinant antigen : effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. Eur. J. Immunol. 23, 454-460.
- Grzych**, J. M., Capron, M., Bazin, H. & A. Capron (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal antibody anti-*S. mansoni* antibodies. J. Immunol. 129, 2739-2744.

- Grzych, J. M., Capron, M., Dissous, C. & A. Capron (1984)** Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133, 998-1004.
- Grzych, J. M., Pearce, E. J., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, A., Heiny, S., Lewis, F. A. & A. Sher (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. & A. Capron (1993)** IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 150, 527-535.

H

- Hagan, P., Wilkins, H. A., Blumenthal, U. J., Hayes, R. J. & B. M. Greenwood (1985)** Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.* 7, 625-632.
- Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunn, D., Simpson, A. J.G. & H. A. Wilkins (1991)** Human, IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349, 243-245.
- Harn, D. A., Mitsuyama, M., Huguenel, E. D. & J. R. David (1985)** *Schistosoma mansoni* : detection by monoclonal antibody of a 22,000- dalton surface membrane antigen which may be blocked by host molecules on lung stage parasites. *J. Immunol.* 135, 2115-2120.
- Harn, D. A., Oligino, L. D., Ko, A. L. D. Stein (1987)** Candidate Epitopes for Vaccination against *Schistosoma mansoni*. N. Y. : Liss, A. R.
- Harn, D. A., Gu, W., Oligino, L. D., Mitsuyama, M., Gebremichael, A. & D. Ritcher (1992)** A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 148, 562-567.
- Harrison, R. A., Bickle, Q. & M. J. Doenhoff (1982)** Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology* 84, 93-110.
- Henkle, K. J., Cook, G. A., Foster, L., Engman, D. M. Bobek, L. A., Cain, G. D. & G. E. Donelson (1990a)** The gene family encoding eggshell proteins of *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. parasitol.* 42, 69-82.
- Henkle, K. J., Davern, K. M., Wright, M. D., Ramos, A. J. & G. F. Mitchell (1990b)** Comparison of the cloned genes of the 26- and 28- kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 23-24.
- Hirata, M., Hieda, T. & H. Tsutsumi (1986)** Immunoglobulins inside *Schistosoma japonicum* eggs from livers of mice. *J. Parasitol.* 72, 578-582.
- Holy, J. M., O'Leary, K., Oaks, J. A. & J. W. Tracy (1989)** Immunocytochemical localization of the major glutathione S-transferase in adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 75, 181-190.
- Horemans, A. M. C., Tielens, A. G. M. & S. G. Van Der Bergh (1991)** The transition from an aerobic to an anaerobic energy metabolism in transforming *Schistosoma mansoni* cercariae occurs exclusively in the head. *Parasitology* 102, 259-265.

- Horemans, A. M. C., Tielens, A. G. M. & S. G. Van Der Bergh (1992)** The reversible effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomula. *Parasitology* 51, 73-80.
- Howell, M. J. Board, P. G. & J. C. Boray (1988)** Glutathione S-transferase in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74, 715-718.
- Hsu, S.Y.L., Hsu, H. F., Chu, K. Y., Tsai, C. T. & L. K. Eveland (1966)** Immunization against *S. haematobium* in rhesus monkeys by administration of cercariae of *Schistosoma bovis*. *Z. Trop. und Parasitologie* 17, 407-412.
- Hussein, M. F. (1971)** The pathology of experimental schistosomiasis in calves. *Research in Veterinary Science.* 12, 246-252.
- Hussein, M. F. (1976a)** The pathology of experimental *Schistosoma bovis* infection in sheeps. *J. Helminth* 50, 235-241.
- Hussein, M.F. & H. O. Bushara (1976b)** Investigations on the development of an irradiated vaccine for animal schistosomiasis . « Nuclear Techniques in Animal Production and health» pp 421-431. Vienna : International Atomic Energy Agency.

I

- Imbert-Establet D. (1982)** Infestation naturelle de rats sauvages par *Schistosoma mansoni* en Guadeloupe : donnés quantitatives sur le développement et la fertilité du parasite. *Ann. Parasitol.* 57, 553-585.

J

- Jaffe, J. J. & R. A. Lambert (1986)** Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 199-206.
- James, E. R., Dobinson, A. R., Lucas S. B., Andrews, B. J., Bickle, Q. D., Taylor, M. G. & P. J. Ham (1985)** Protection of sheep against *Schistosoma bovis* using cryopreserved radiation-attenuated schistosomula. *J. Helminth.* 59, 51-55.
- James, S. L. & A. Sher (1990)** Cell-mediated immune response to schistosomiasis. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 155(21), 21-23.
- Johansen, M. V., Fillie, Y., Monrad, J., Christensen, N.O. & A. Deelder (1996a)** Experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. Circulating antigen and antibody responses to egg and adult worm antigens during infection and following treatment with praziquantel. *Parasitology* 113, 367-375.
- Johansen, M. V., Monrad, J. & N. O. Christensen (1996b)** Effects of praziquantel on experimental *Schistosoma bovis* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 62, 83-91.
- Johansen, M. V., Monrad, J., Christensen, N. O. & R. Lindberg (1996c)** Experimental *Schistosoma bovis* infection in goats : pathological consequences of praziquantel treatment. *J. Comp. Pathol.* 115, 1-11.

- Johansen, M. V., Monrad, J., Christensen, N. O. & R. Lindberg (1997)** The impact of primary *Schistosoma bovis* infection on a subsequent challenge infection in goats. *J. Parasitol.* 83, 242-246.
- Jordan, P., Von Lichtenberg, F. & K. D. Goatly (1967)** Experimental schistosomiasis in primates in Tanzania. Preliminary observations on the susceptibility of baboon *Papio anubis* to *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 37, 393-403.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. & P. Viens (1983)** A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 810-811.

K

- KaiKaus, R. M., Bass, N. M. & R. K. Ockner (1990)** Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* 46(6), 617-630.
- Kassuku, A. A., Nansen, P. & N. O. Christensen (1985)** A comparison of the efficiency of the percutaneous and per-oral routes of infection in caprine *Schistosoma bovis* infections. *J. Helminth.* 59, 23-28.
- Kassuku, A. A., Christensen, N. O., Monrad, J., Nansen, P. & J. Knudsen (1986)** Epidemiological studies on *Schistosoma bovis* in Iringa Region, Tanzania. *Acta Tropica.* 43, 153-163.
- Kawalek, J. C., Rew, R. S. & J. Heavner (1984)** Glutathione S-transferase, a possible drug metabolizing, in *Haemonchus contortus* : comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* 14, 173-175.
- Ketterer, B., Tan, K. H., Meyer, D. J. & B. Coles (1987)** In : glutathione S-transferase and Carcinogenesis (Mantle, T. J., Pickett, C. B. and J. D. Hayes eds) pp 149-163. Taylor and Francis, London.
- Ketterer, B. (1988a)** Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16, 957-973.
- Ketterer, B., Meyer, D. J. & A. G. Clark (1988b)** Soluble glutathione transferase isoenzymes. In : Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance (Sies, H. and Ketterer, B., eds) pp.73-135. Academic Press, London.
- Ketterer, B. & D. J. Meyer (1989)** Glutathione transferases : a possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat Res.* 214, 33-40.
- Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. & J. Ouma (1986)** Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164, 1626-1640.
- Khalife, J., Dunne, D., Richardson, B. A., Mazza, G., Thorne, K. J. I., Capron, A. & A. E. Butterworth (1989)** Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 142, 4422-4427.
- Khalife, J., Godin, C. & A. Capron (1995)** Transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* calreticulin : possible role of AP-1. *Parasitology* 111, 469-475.

- Klinkert, M. Q., Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A., & E. Beck (1989)** Primary structures of Sm 31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 113-122.
- Kuntz, R. E., Cheever, A. W., Myres, B. J., Young, S. W. & J. A. Moore (1975)** Calcification of the bladder and papillary tumors of the bladder and ureters in gibbons infected by *S. haematobium* (Iran). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69, 494-502.
- Kusel, J. P. (1970)** Studies on the structure and hatching of the eggs of *S. mansoni*. *Parasitology* 60, 79-88.

L

- Landsperger, W. J., Stirewalt, M. A. & M. H. Dresden (1982)** Purification and properties of a proteolytic enzyme from de cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. J.* 201, 137-146.
- Lawrence, J. A. (1973a)** *Schistosoma mattheei* in cattle : the host-parasite relationship. *Research in Veterinary Science* 14, 400-402.
- Lawrence J. A. (1973b)** *Schistosoma mattheei* in cattle : variations in parasite egg production. *Res. Veter. Sci.* 14, 402-404.
- Lawrence, J. D. (1973c)** The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 59, 60-63.
- Lawrence, J. A. (1978)** Bovine schistosomiasis in Southern Africa. *Helminth. Abstracts.* 47, 261-270.
- Lengy, J. (1962)** Studies on *Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876) in Israel. I. larval stages from egg to cercariae. *Bulletin Research Council, Israel* 10E, 1-36.
- Levy-Holtzman, R. & I. Schechter (1995)** Activity of the promoter of hsp70 gene of the parasite helminth *Schistosoma mansoni* in the mammalian CHO cell-line. *Biochem. Biophys.* 1263, 96-98.
- Lindberg, R., Johansen, M. V., Monrad, J., Christensen, N. O. & P. Nansen (1997)** Experimental *Schistosoma bovis* infection in goats : the inflammatory response in the small intestine and liver in various phases of infection and reinfection. *J. Parasitol.* 83, 454-459.
- Liu, J. L., Fontaine, J., Capron, A. & J. M. Grzych (1996)** Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology* 113, 377-391.
- Liu, S., G. Song, Y. Xu, Y. Wen & D. P. Mc Manus (1995a)** Immunization of mice with recombinant Sjc 26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 13, 603-607.
- Liu, S., G. Song, Y. Xu, Y. Wen & D. P. Mc Manus (1995b)** Anti-fecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *S. japonicum* 26kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunol.* 17, 335-340.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul J. M. & Y. Lemoine. 1989.** High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5 : 497.

Long, E., Doenhoff, M. & J. Bain (1978) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. 2. The time at which resistance to reinfection develops. *J. Helminthol.* 52, 187-191.

Lucas, S., Mussallam, R., Bain, J., Hassounah, O., Bickle, Q. & M. J. Doenhoff (1980) The pathological effects of immunosuppression of *Schistosoma mansoni*-infected mice, with particular reference to survival and hepatotoxicity after thymectomy and treatment with antithymocyte serum, and treatment with hydrocortisone acetate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74, 633-643.

M

Majid, A. A., Marshall, T. F. C., Hussein, M. F., Bushara, H.O., Taylor, M. G., Nelson, G. S. & J. D. Dargie (1980) Observation on cattle schistosomiasis in the Sudan, a study in comparative medicine. I. Epizootiological observation on *Schistosoma bovis* in the White Nile province. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 435-441.

Majid, A. A., Hussein, M. F. & M. G. Taylor (1983) Age specific prevalence and intensity of *S. bovis* infection in sudanese desert sheep in the White Nile Province. *Research in Veterinary Science* 35, 120-121.

Malek E. A. (1969) Studies on schistosomiasis in the Sudan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63, 501-513.

Mangold, B. L. & D. A. Dean (1986) Passive transfert with serum and IgG antibodies of irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J. Immunol.* 136, 2644-2647.

Mannervik, B.(1985) Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enz. Rel. Mol. Biol.* 57, 357-417.

Massoud, J. & G. S. Nelson (1972) Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. 6. Observations on cross-immunity to *Ornithobilharzia turkestanicum*, *Schistosoma bovis*, *S. mansoni* and *S. haematobium* in mice, sheep and cattle in Iran. *Bulletin OMS* 47,591-600.

Massoud J. (1973) Parasitological and pathological observations on *Schistosoma bovis* in calves, sheeps and goats in Iran. *J.Helminthol.* 47, 155-164.

Mathew, R. C. & D. L. Boros (1986) Anti L3T4 antibody treatment supresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin 2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immunity.* 54, 820-826.

Mazingue, C., Camus, D., Dessaint, J. P., Capron, M. & A. Capron (1980) *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immun.* 63, 178-189.

McCauley, E. H., Tayeb, A. & A. A. Majid (1983) Owner survey of schistosomiasis mortality in Sudanese cattle. *Tropical Animal Health and Production* 15, 227-233.

McCauley, E. H., Tayeb, A. & A. A. Majid (1984) Economic evaluation of the production impact of bovine schistosomiasis and vaccination in the Sudan. *Preventive Veterinary Medicine.* 2, 735-754.

- McHugh, S. M., Coulson, P. S. & R. A. Wilson** (1987) The relationship between pathology and resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in mice : a casual mechanism of resistance in chronic infections. *Parasitology* 94, 81-91.
- McLaren, D. J.** (1980) *Schistosoma mansoni* : the parasite surface in relation to host immunity. John Wiley, Chichester.
- McNair, A., Dissous, C., Duvaux-Miret, O. & A. Capron** (1993) Cloning and characterization of the gene encoding the 28kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene* 124, 245-249.
- McTigue, M. A., Williams, D. R. & J. A. Tainer** (1995) Crystal structure of a schistosomal drug and vaccine target : glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246, 21-27.
- Meyer, F., Meyer, H. & E. Bueding** (1970) Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat worms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochim. Biophys. Acta.* 210, 256-266.
- Miller, K. L., Smithers, S. R. & A. Sher** (1981) The response of mice immune to *Schistosoma mansoni* to a challenge infection which bypasses the skin : evidence for two mechanisms of immunity. *Parasite Immunol.* 3, 25-31.
- Mitchell, G. F.** (1989) Glutathione S-transferase : potential components of anti-schistosome vaccine ? *Parasitology Today* 5, 34-37.
- Moloney, N. A., Hinchcliffe, P. & G. Webbe** (1987) Loss of resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice after treatment with praziquantel. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 247-254.
- Monrad, J., Christensen, N. O., Nansen, P. & F. Frandsen** (1981) Resistance to *Fasciola hepatica* in sheep harbouring primary *Schistosoma bovis* infections. *J. Helminthol.* 55, 261-271.
- Monrad, J., Christensen, N. O., Nansen, P. & F. Frandsen** (1982) Clinical pathology of *S. bovis* infection in sheep. *Research in Veterinary Science.* 33, 382-383.
- Monrad, J., Christensen, N. O. & P. Nansen** (1990) Acquired resistance in goats following a single primary *Schistosoma bovis* infection. *Acta Trop.* 48, 69-77.
- Mountford, A. P., Fisher, A. & R. A. Wilson** (1994) The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni*. *P. Immunol.* 16, 521-527.
- Moore D. V. & J. H. S&ground** (1956) The relative egg production capacity of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5, 831-840.
- Morello, A., Repetto, Y. & A. Atias** (1982) Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 449-452.
- Morgenstern, R. & J. W. DePierce** (1988) Membrane-bound glutathione transferases. In : *Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H. and Ketterer, B., eds) pp.73-135. Academic Press, London.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G. & M. Q. Klinkert** (1991) A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 8447-8454.

- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & R. L. Coffman (1986)** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
- Murare, H. M. & M. J. Doenhoff (1987a)** Parasitological observations of *Schistosoma bovis* in normal and T-cell deprived mice. *Parasitology* 95, 507-516.
- Murare, H. M., Agnew, A., Baltz, M., Lucas, S. B. & M. J. Doenhoff (1987b)** The response to *Schistosoma bovis* in normal and T-cell deprived mice. *Parasitology* 95, 517-530.
- Musto, H., Rodriguez-Maseda, H., Alvares, F. & J. Tort (1994)** Possible implications of CpG avoidance in the flatworm *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Evol.* 38, 36-40.

N

- Nadler, S. A. (1987)** Genetic variability in endoparasitic helminths. *Parasitol. Today.* 3, 154-155.
- Nare, B., Smith, J. M. & R. K. Prichard (1990)** *Schistosoma mansoni* : levels of antioxydants and resistance to oxydants increase during development. *Exp. Parasitol.* 70, 389-397.
- Ndhlovu, P., Cadman, H., Vennervald, B. J., Christensen, N. O., Chidimu, M. & S. K. Chandiwana (1996)** Age-related antibody profiles in *Schistosoma haematobium* infections in a rural community in Zimbabwe. *Parasite Immunol.* 18, 181-192.
- Nelson, G. S., Amin, M. B. A., Saoud, M. F. A. & C. Teesdale (1968)** Studies on heterologous immunity in schistosomiasis. 1. Heterologous schistosome immunity in mice. *Bulletin of W.H.O.* 38, 9-17.
- Neumann, S., Ziu, E., Lanter, F. & I. Schechter (1995)** Cloning and sequencing of an hsp 70 gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 357-360.
- Noiva, R. & W. J. Lennarz (1992)** Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 3553-3556.

O

- O'Leary, K. A. & J. W. Tracy (1988)** Purification of three cytosolic glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Arc. Biochem. Bioph.* 264, 1-12.
- O'Leary, K. A. & J. W. Tracy (1991)** *Schistosoma mansoni* : glutathion S-transferase catalyzes detoxification of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 72, 355-361.
- Ockner, R. K. (1990)** Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol. Cell Biochem.* 98, 3-9.
- Oswald, R. M., Caspar, P., Jankovic, D., Wynn, T. A., Pearce, E. J. & A. Sher (1994)** IL-12 inhibits Th2 cytokine responses induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 153, 1707-1713.

Ottesen, E. A., Hiatt, R. A., Cheever, A. W., Sotomayor, Z. R. & F. A. Neva (1978) The acquisition and loss of antigenic-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. *Clin. Exp. Immunol.* 33, 37-47.

P

Pancré, V., Monté, D., Delanoye, A., Capron, A. & C. Auriault (1990) Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur. Cytokine Net.* 1, 15.

Pancré V., Woloczuk, I., Guerret, S., Copin, M. C., Delanoye, A., Capron, A. & C. Auriault (1994a) Protective effect of rSm 28GST-specific T cells in schistosomiasis : role of gamma interferon. *Infect. Immunity* 62, 3723-3730.

Pancré V., Woloczuk, I., Bossus, M., Grass-Masse, H., Guerret, S., Delanoye, A., Capron, A. & C. Auriault (1994b) Evaluation of the effect of Sm 28GST-derived peptides in murine hepatosplenic schistosomiasis : interest of the lipopeptidic form of the C-terminal peptide. *Mol. Immunol.* 31, 1247-1256.

Papadopoulos, A., Brophy, P. M., Crowley, P., Ferguson, M. & J. Barret (1989) Glutathione transferase in the free-living nematode *Panagrellus redivivus*. *FEBS. Lett.* 253, 76-78.

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

Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. & A. Sher (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.

Pedras-Vasconcelos, J. A. & E. J. Pearce (1996) Type 1 CD8⁺ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 157, 3046-3053.

Peeters, R. A. & J. H. Veerkamp (1989) Does fatty acid-binding protein play a role in fatty acid transport ? *Mol. Cell Biochem.* 88, 45-49.

Pemberton, K. D. & J. Barret (1989) The detoxification of xenobiotics compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda : Filaroïdea). *Int. J. Parasitol.* 72, 401-409.

Pickett, C. B. & A. Y. H. Lu (1988) The structure, genetics and regulation of soluble glutathione S-transferase. In : *Glutathione conjugation: its Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H. and Ketterer, B., eds) pp.137-156. Academic Press, London.

Pierce, R. J. & A. Capron (1994a) Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. In : *modern Vaccinology*. Ed. E. Kurstak, Plenum Medical, N.Y. pp357-380.

Pierce, R. J., Khalife, J., Williams, D. L., Kanno, R., Trottein, F., LePresle, T., Sabatier, J., Achstetter, T. & A. Capron (1994b) *Schistosoma mansoni* : characterization of sequence variations of the 28kDa glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 79, 81-84.

- Pino-Heiss, S., Brown, M. & J. H. McKerrow (1985)** *S. mansoni* : degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Exp. Parasitology* 59, 217-221.
- Pitchford, R. J. & P. S. Visser (1982)** *Schistosoma mattheei* Veglia & Le Roux 1929, egg output from cattle in a highly endemic area in the Eastern transvaal. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 49, 233-235.
- Pons, H. A., Morgan, J. S., Hutchinson, M. L., Rojkind, M., Groszmann, R. J. & M. J. Stadecker (1989)** Resistance to reinfection in experimental murine schistosomiasis : role of porto-hepatic hemodynamics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 189-197.
- Porchet, E., McNair, A., Caron, A., Kusnierz, J. P., Zemzoumi, K. & A. Capron (1994)** Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase. *Parasitology* 109, 565-572.
- Poulain, O., Gaubert, S., Lafitte, S., Capron, A. & J. M. Grzych (1996)** Immunoglobulin A response in murine schistosomiasis : stimulatory role of egg antigens. *Infection and immunity* 64, 763-768.
- Precious, W. Y & J. Barrett (1989)** The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. *Biophys. Acta.* 992, 215-222.
- Preston J. M. & W. P. Duffus (1975)** Diagnosis of *Schistosoma bovis* infection in cattle by an indirect haemagglutination test. *J. Helminthol.* 49, 9-17.
- Pyerin, W., Taniguchi, H., Horn, F., Oesch, F., Amerlizad, Z., Friedberg, T. & C. R. Wolf (1987)** Isoenzyme-specific phosphorylation of cytochromes P-450 and other drug metabolizing enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 885-892.

R

- Reddy, C. C., Tu, C. D., Burgess, J. R., HO, C. H., Scholz, R. W. & E. J. Massaro (1988)** Evidence for the occurrence of selenium-independant glutathione peroxydase activity in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 970-978.
- Reis, M. G., Davis, R. E., Singh, H., Skelly, P. J. & C. B. Shoemaker (1993)** Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme, triose phosphate isomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 235-242.
- Reynolds, S. R., Shoemaker, C. B. & D. A. Harn (1992)** T & B cell epitope mapping of Sm23, an integral membrane protein of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 149, 3995-4001.
- Rihet, P., Demeure, C. E., Bourgois, A., Prata, A. & A. J. Dessein (1991)** Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21, 2679-2684.
- Rihet, P., Demeure, C. E., Dessein, A. J. & A. Bourgois (1992)** Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4 revealed a new methodology in subjects from a *Schistosoma mansoni* endemic area. *Eur. J. Immunol.* 22, 2063-2070.
- Roberts, M., Butterworth, A. E., Kimagi, G., Kamau, T., Fulford, A. J., Dunne, D. W., Ouma, J. H. & R. F. Sturrock (1993)** Immunity after treatment of human schistosomiasis : association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect. Immunity.* 61, 4984-4993.

- Roche, C., Williams, D. L., Khalife, J., Le Presle, T., Capron, A. & R. J. Pierce (1994)** Cloning and characterization of the gene encoding the *Schistosoma mansoni* glutathione peroxydase. *Gene* 138, 149-152.
- Rodriguez-Osorio, M., Gomez-Garcia, V., Rojas-Gonzalez, J., Ramajo-Martin, V. & M.Y. Manga-Gonzalez (1993)** Resistance to *Schistosoma bovis* in sheep induced by an experimental *Fasciola hepatica* infection. *J.Parasitol.* 79, 223-225.
- Roffi, J. & J. M. Lemasson (1981)** Utilisation d'un antigène hétérologue (*Schistosoma bovis*) pour le diagnostic immunoenzymatique de la bilharziose urinaire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 74, 532-545.

S

- Saad, A. M., Hussein, M.F., Dargie, J. D., Taylor, M. G. & G. S. Nelson (1980)** *Schistosoma bovis* in calves. The development and clinical pathology of primary infections. *Research in Veterinary Science.* 12, 105-111.
- Saad, A. M., Hussein, M.F., Dargie, J. D., Taylor, M. G. & G. S. Nelson (1984)** The pathogenesis of experimental *S. bovis* infection in Sudanese sheep and goats. *J. Comp. Pathol.* 94, 371-385.
- Sampaio Silva, M. L., Avelino, I. C. & A. Seixas (1990)** Maintenance in laboratory of *Schistosoma bovis* strain from salamanca. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 8, 301.
- Samuelson, J. C., Quinn, J. J. & J. P. Caulfield (1984)** Hatching chemokinesis, and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 70, 321-331.
- Schwetz J. (1956)** Some new comparative investigations on three *Physopsis* borne schistosomes : *Schistosoma haematobium*, *S. bovis* and *S. interlacatum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 5, 1071-1085.
- Serra, E., Zemzoumi, K., Trolet, J., Capron, A. & C. Dissous (1996)** Study of the Proximal Promoter of the 28kDa Glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni*. Analysis of Three Functional CCAAT Boxes . *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 69-80.
- Serra, E., Zemzoumi, K. & C. Dissous (1997)** Deletion analysis of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase gene promoter. Functionality of a proximal AP-1 site. *Eur. J. Biochem.* 248, 113-119.
- Sexton, J. L., A. R. Milner, M. Panaccio, J. Waddington, G. Wijffels, D. Chandler, C. Thompson, L. Wilson, T. W. Spithill, G. F. Mitchell & N. J. Campbell. (1990)** Glutathione S-transferase : novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheeps. *J. Immunol.* 145, 3905-3910.
- Sher, A., James, S. L., Correia-Oliveira, R., Hieny, S. E. Pearce (1989)** Schistosomes vaccines : current progress and future prospects. *Parasitology* 98, 61-68.
- Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. & T. R. Mosmann (1991)** Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.* 147, 2713-2716.
- Short, R. B. (1983)** Sex and single schistosome. *J. Parasitol.* 69, 4-22.

- Shuxian**, L., Yongkang, H., Guangchen, S., Xing-song, L., Yuxin, X. & D. P. McManus (1997) Anti-fecundity immunity to *Schistosoma japonicum* induced in Chinese water buffaloes (*Bos buffelus*) after vaccination with recombinant 26 kDa glutathione S-transferase (reSjc26GST) *Vet. Parasitol.* 69, 39-47.
- Simpson**, A. J., Sher, A. & T. F. McCuthan (1982) The genome of *Schistosoma mansoni* : isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 125-137.
- Simurda**, M. C., Van Keulen, H., Rekosh, D. M. & P. T. Lo Verde (1988) *Schistosoma mansoni* : Identification and analysis of mRNA and a gene encoding superoxyde dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* 67, 73-84.
- Sirag**, S. B., Christensen, N. O., Nansen, P., Monrad, J. & F. Frandsen (1981) Resistance to *Fasciola hepatica* in calves harbouring primary patent *Schistosoma bovis* infections. *J. Helminthol.* 55, 63-70.
- Smith**, J. D. & D. W. Halton (1983) The physiology of trematodes. Cambridge university Press, 446.
- Smith**, D. B., Davern, K. M., Board, P. G., Tiu, W. U., Garcia, E. G. & G. F. Mitchell (1986) Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8703-8707.
- Smithers**, S. R. & R. J. Terry (1969) Immunity in schistosomiasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 160, 826.
- Smythies**, L. E., Pembert, R. M., Coulson, P.S., Montford, A. P. & A. Wilson (1992) T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 148, 1512-1518.
- Southgate**, V. R. & R. J. Knowles (1975) Observations on *Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876). *J. Nat. Hist.* 9, 273-314.
- Srivastava**, P. K. & D. J. Waxman (1993) Sex-dependent expression and growth hormone regulation of class alpha and class mu glutathione S-transferase mRNAs in adult rat liver. *Biochem. J.* 294, 159-165.
- Stirewalt**, M. A., Kuntz, R. E. & A. S. Evans (1974) *Schistosoma mansoni* : cercariae to schistosomula. *Adv. Parasitol.* 12, 115-125.

T

- Taylor**, J. B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J.M., Southan, C., Sonthan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Capron, A. & B. Ketterer (1988) The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7, 465-472.
- Taylor**, M. G., Nelson, G. S., Smith, M. & B. J. Andrews (1973a) Comparison of the infectivity and pathogenicity of six species of african schistosomes and their hybrids. 1. Mice and hamsters. *J. Helminthol.* 47, 439-453.

- Taylor, M. G., Nelson, G. S., Smith, M. & B. J. Andrews (1973b)** Comparasion of the infectivity and pathogenicity of six species of African schistosomes and their hybrids- 2-Baboons. *J. Helminthol.* 47, 455-485.
- Taylor M. G. (1975)** Towards the development of a live vaccine for schistosomiasis in « Nuclear Techniques in Helminthology Research » pp 165-173. Vienna : International Atomic Energy Agency.
- Taylor, M. G., James, E. R., Nelson, G. S., Bickle, Q. D. & G. S. Webbe (1976)** Immunization of sheep against *Schistosoma mattheei* using either irradiated cercariae or irradiated schistosomula. *J. Helminthol.* 50, 1-9.
- Taylor, M. G., James, E. R., Bickle, Q. D., Hussein, M. F., Andrews, B. J., Dobinson, A. R. & G. S. Nelson (1979)** Immunization of sheep against *Schistosoma bovis* using an irradiated schistosomular vaccine. *J. Helminth.* 53, 1-5.
- Tee, L. B., Gilmore, K. S., Meyer, D. J., Ketzzerer, B., Vandenberghe, Y. & G. C. Yeoh (1992)** Expression of glutathione S-transferase during rat liver development. *Biochem. J.* 15, 209-218.
- Tendler, M., Brito, C. A., Vilar, M. M., Serra-Freire, N., Diogo, C. M., Almeida, M. S., Delbem, A. C. B., Da Silva, J. F., Savino, W., Garrat, R. C., Katz, N. & A. J. G. Simpson (1996)** A *Schistosom mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 269-273.
- Tielens, A. G., Van Oordt, B. E. & S. G. Van der Bergh (1989)** Carbohydrate metabolism in adult schistosomes of different strains and species. *Int. J. Parasitol.* 19, 447-449.
- Tielens, A. G. M. (1994)** Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today* 10, 346-352.
- Torpier, G., Capron, M. & A. Capron (1977)** Structural changes of the tegument membrane complex in relation to developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Ultrastruct. Res.* 61, 309-324.
- Torpier, G., Capron, A. & MA. Ouassi (1979)** Recepteur of IgG (Fc) and human β 2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Nature* 278, 447-449.
- Touassem, R. (1984)** Recherche sur la Biologie et la Transmission de *Schistosoma bovis* (Sonsino,1875) Blanchard, 1895 : polymorphisme -Relations Parasite-Vecteur-Développement intramolluscal. Thèse de Doctorat -Université des Sciences et Techniques du Languedoc -Academie de Montpellier.
- Trottein, F. (1992a)** Contribution à l'étude moléculaire des Glutathion S-transferases dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille, 1992.
- Trottein, F., C. Godin, R. J. Pierce, B. Sellin, M. G. Taylor, I. Gorillot, M. Sampaio Silva, J. P. Lecocq & A. Capron (1992b)** Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 63-72.
- Tu, C. P. D., Weiss, M. J., Li & N. C. C. Reddy (1983)** Tissue-specific expression of the rat glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 258, 4659-4662.

V

- Van de Waa**, E. A., Campbell, C. K., O'Leary, K. A. & J. W. Tracy (1993) Induction of *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase by xenobiotics. *Archs. Biochem. Biophys.* 303, 15-21.
- Van Wyk**, J. A., Bartsch, R. C., Van Rensburg, L. T., Heitmann, L. P. & P. J. Goosen (1974) Studies on schistosomiasis. VI. A field outbreak of bilharzia in cattle. *J. Veterinary Research.* 41, 39-49.
- Verwaerde**, C., Auriault, C., Damonville, M., Neyrinck, J. L., Vendeville, C. & A. Capron (1986) Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scan. J. Immunol.* 24, 509-516.
- Vilipillai**, P. & D. A. Harn (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin-10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice : A mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 18-22.
- Villanueva**, P. F., Harris, T. S., Ricklan, D. E. & M. J. Stadecker (1993) Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 151, 3192-3198.

W

- Webbe**, G. (1965) Transmission of bilharziasis. 2. Production of cercariae. *Bulletin WHO.* 33, 155-162.
- Weston**, K., Yochem, J. & I. Greewald (1989) A *Caenorhabditis elegans* cDna that encodes a product resembling the rat glutathione S-transferase P subunit. *Nucl.Ac.Res.* 17, 2138.
- Williams**, D. L., Pierce, R. J., Cookson, E. & A. Capron (1992) Molecular cloning of glutathione peroxydase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 127-130.
- Wilson**, R. A., Coulson, P. S. & S. M. McHugh (1983) A significant part of the « concomitant immunity » of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Parasite Immunol.* 5, 595-601.
- Wolowczuk**, I., Auriault, C., Gras-Masse, H., Vendeville, C., Balloul, J. M., Tartar, A. & A. Capron (1989) Protective immunity in mice vaccinated with the *S. mansoni* P-28-1 antigen. *J. Immunol.* 142, 1342-1350.
- Wolowczuk**, I., Auriault, C., Bossus, M., Boulanger, D., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Pierce, R. J., Grezel, D., Reid, G. D., Tartar, A. & A. Capron (1991a) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm 28GST antigen in rat, mouse, and monkey. *J. Immunol.* 146, 1987-1995.
- Wolowczuk**, I. (1991b) Détermination et analyse des épitopes T fonctionnels de l'antigène protecteur Sm 28GST du parasite trématode *Schistosoma mansoni*. Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé. Université de Lille I.
- Wright**, A. C., Southgate, V. R. & R. J. Knowles (1972) What is *Schistosoma intercalatum*, Fisher, 1934. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66, 28-64.

Wynn, T. A., Cheever, A. W., Jankovic, D., Pointdexter, R. W., Caspar, P., Lewis, F. A. & A. Sher (1995) An IL-12 based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature* 376, 1987-1995.

X

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

Xu, C., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A. & A. Capron (1993) *Schistosoma mansoni* 28-kDa Glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. *J. Immunol.* 150, 940-949.

Xu, Y.Z. & M. H. Desdren (1986) Leucine aminopeptidase and hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Parasitol.* 72, 507-511.

Y

Yagi, A. I., Younis, S. A., Haroun, E. M., Gameel, A. A., Bushara, H. O. & M. G. Taylor (1986) Studies on heterologous resistance between *Schistosoma bovis* and *Fasciola gigantica* in Sudanese cattle. *J. Helminthol.* 60,55-59.

Yamaguti, S. (1971) Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Publishing Co, Vol 1/2, 1074-1796.

Z

Zwingenberger, K., Ritcher, J., Siqueira Vergetti, J. G. & H. Feldmeier (1990) Praziquantel in the treatment of hepatosplenic schistosomiasis : biochemical disease markers indicate deceleration of fibrogenesis and diminution of portal flow obstruction. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 252-256.

Mistigri.....

....Y'a les routes qui sont belles
et peu importe où elles nous mènent.....

*....At this point of my life although I've mostly walked
in the shadows I'm still searching for the light...*

Tracy Chapman

