

N° d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

U.F.R. DE BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Discipline : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement par

Olivier ROYE



Rôle de l'Interleukine-7 dans l'Infection par le Parasite  
*Schistosoma mansoni* : Nouvelles Perspectives dans les Relations  
Hôte - Parasite Initiées dans la Peau.

Soutenue le 2 décembre 1999 devant la commission d'examen :

Professeur Geneviève SPIK, Président

Docteur Michel DEMARCHEZ, Rapporteur

Docteur James DI SANTO, Rapporteur

Professeur Claude COMBES, Examinateur

Docteur Claude AURIAULT, Examinateur

Docteur Isabelle WOLOWCZUK, Directeur de thèse

**A mes Parents**, je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde tendresse.

**A Virginie**, chaque instant à tes cotés a le goût du Bonheur, la saveur de la Paix et la douceur des Fleurs. Merci à Toi, Mon Ame Sœur d'être qui tu es.

**A Julian**, le plus merveilleux Cadeau de ma Vie.

**Madame le Professeur Geneviève SPIK**

*Je suis très honoré que vous ayez accepté de présider ce jury. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.*

**Monsieur le Docteur Michel DEMARCHEZ**

*Vous avez accepté avec beaucoup de sympathie d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie très sincèrement de cet honneur. Je tiens tout particulièrement à vous témoigner ma gratitude pour le très chaleureux accueil que vous m'avez réservé dans votre entreprise, j'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous et les membres du Département Drug Discovery.*

**Monsieur le Docteur James DI SANTO**

*Je vous remercie d'apporter un regard critique sur ce travail et de l'intérêt que vous portez à ma thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma très sincère reconnaissance.*

**Monsieur le Professeur Claude COMBES**

*Votre participation à ce jury est un très grand honneur. Votre vision tout à fait originale des relations hôte-parasite m'a beaucoup enrichi. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma très haute considération.*

**Monsieur le Docteur Claude AURIAULT**

*Je te suis très reconnaissant de m'avoir chaleureusement accueilli au sein de ton laboratoire, de m'avoir soutenu et fait confiance dans tous mes projets. Tu as toujours apporté des critiques constructives à mon travail et accompagné à des moments déterminants de ma thèse. Que cette thèse soit l'expression de ma sincère reconnaissance et de toute mon estime.*

## **Mademoiselle Isabelle WOLOWCZUK**

*Je te remercie d'avoir encadré mes travaux depuis mon arrivée dans le laboratoire. J'ai énormément appris à ton contact. Parce que ta dynamique de recherche est exemplaire, aboutie, ouvrant toujours des perspectives passionnantes et empreinte d'une remarquable inspiration, je suis fier d'avoir appris ce métier à tes cotés. Je te remercie pour ta disponibilité de chaque instant, pour ta confiance et tes précieux conseils. Ces années passées à explorer et à observer le comportement de notre parasite préféré furent fascinantes, parfois déconcertantes et souvent délirantes (parce qu'il y en a eu des délires et des dessins surréalistes à mourir de rire...). Je suis très heureux de te témoigner aujourd'hui toute ma reconnaissance et surtout toute mon amitié.*

## MERCI A :

*Mes Parents*, pour leur soutien, leur confiance et leur amour.

*Virginie, ma femme* pour m'avoir accompagné, soutenu et encouragé.

*Jean-Pierre Kusnierz* (dit JPK) et à *Marc Loyens* (dit Marco) ces deux grands « microscopistes », pour m'avoir permis d'entrer dans les coulisses de votre art.

*Lucette Meunier*, la reine de l'histologie qui maniait le microtome à merveille, pour vos précieux conseils.

*Brigitte Quatenens*, pionnière de la cytométrie qui partagea tous ses secrets en la matière, Je suis sûr que tu es tombée dedans quand tu étais petite.

*Jean-Marc Merchez*, disponible à tout moment et dévoué à une seule et unique cause : « développer les photos avant même que nous ne les ayons tirées et surtout les rendre plus jolies que nous l'espérions ».

*Tous les membres de ce club très ouvert que l'on nomma UMR 8527*, parce que dans cette unité, trois principes ont toujours régné : entraide, disponibilité et festivité. Ne changez rien...

*Emile Fleurbaix et Marc Bouquerel et au personnel de l'animalerie* pour les bons soins apportés aux animaux.

*Suzanne Van Wingene, Anita Caron et Michèle Courtois*, les bienfaitrices du cycle schistosome de l'Institut Pasteur de Lille.

*Nadirah Delhem et Jean-Pierre Decavel*; que de longues, très longues journées passées à greffer ces fameux lambeaux de peaux humaines, mais aussi à chanter (surtout Nadirah) et à rigoler (surtout Jean-Pierre, qui ne s'est d'ailleurs jamais trompé dans ces estimations... Quel

talent!). Et oui, la greffe c'était magique et le soir quand on quittait les lieux, tout avait changé, il faisait nuit et l'on entendait presque le souffle des souris qui se réveillaient peu à peu. C'était magique...

*L'Institut Pasteur de Lille et la Région Nord-Pas-de-Calais* qui m'ont financé pendant les trois années de ma thèse.

*Tous ceux* qui ont croisé mon chemin et contribué à ce travail.

## PUBLICATIONS

Isabelle WOLOWCZUK, Myriam DELACRE, Olivier ROYE, Sandra L. GIANNINI and Claude AURIAULT. **IL-7 in the skin of *Schistosoma mansoni* infected mice is associated with a decrease in Interferon- $\gamma$  production and leads to a clinical aggravation of the disease.** 1997. Immunology. V.91 p35-44.

Olivier ROYE, Myriam DELACRE, Ifor R. WILLIAMS, Claude AURIAULT and Isabelle WOLOWCZUK. **Cutaneous interleukin-7 transgenic mice display a propitious environment to *Schistosoma mansoni* infection.** 1999. Soumis à Parasite Immunology.

Olivier ROYE, Nadirah DELHEM, François TROTTEIN, Franck REMOUE, Sophie NUTTEN, Jean-Pierre DECAVEL, Myriam DELACRE, Véronique MARTINOT, Jean-Yves CESBRON, Claude AURIAULT and Isabelle WOLOWCZUK. **Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human percutaneous *Schistosoma mansoni* infection.** 1998. The Journal of Immunology. V. 161 p4161-4168.

Isabelle WOLOWCZUK, Sophie NUTTEN, Olivier ROYE, Myriam DELACRE, Monique CAPRON, Richard M. MURRAY, François TROTTEIN and Claude AURIAULT. **Infection of mice lacking interleukin-7 reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*.** 1999. Infection and Immunity, 67, 8, 4183-4190.

Isabelle WOLOWCZUK, Olivier ROYE, Sophie NUTTEN, Myriam DELACRE, François TROTTEIN and Claude AURIAULT. **Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host.** 1999. Microbes and infection, 1, 545-551.

Isabelle FERRU, Olivier ROYE, Myriam DELACRE, Claude AURIAULT and Isabelle WOLOWCZUK. **Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni* : Demonstration of the participation of B cells in granuloma modulation.** 1998. Scandinavian Journal of Immunology. V.48 p233-240.

## **TABLE DES MATIERES**

## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>2</b>
<b>RESUME</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>11</b>
<b>- INTRODUCTION -</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>LA PEAU : UN ORGANE DE L'IMMUNITE</b>	<b>15</b>
<b>I - GENERALITES</b>	<b>15</b>
<b>II - ORGANISATION DU TISSU CUTANE, LE SYSTEME TEGUMENTAIRE EN QUESTION</b>	<b>17</b>
1 - L'épiderme	17
2 - Le derme	18
<b>III - ORGANISATION DU SIS ET DESCRIPTION DES CELLULES IMMUNES CUTANÉES</b>	<b>18</b>
1 - Les kératinocytes	21
1.1 - Le kératinocyte en tant que cellule accessoire de la réaction antigénique	21
1.1.1 - Expression de molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité	21
1.1.2 - Expression de molécules d'adhésion	22

1.1.3 - Le kératinocyte est-il réellement une cellule accessoire?	<b>22</b>
1.2 - Le kératinocyte, les cytokines et leur récepteur	<b>23</b>
2 - Les cellules de Langerhans	<b>26</b>
2.1 - Origine et différenciation	<b>28</b>
2.2 - Migration et maturation phénotypique et fonctionnelle	<b>30</b>
3 - Les lymphocytes T	<b>32</b>
3.1 - Les sous-populations lymphocytaires	<b>32</b>
3.2 - Les cellules T dendritiques et épidermiques	<b>33</b>
4 - Les cellules endothéliales microvasculaires	<b>34</b>
5 - Les terminaisons nerveuses cutanées et leur rôle imunomodulateur.	<b>35</b>

## **CHAPITRE II**

### **L'INTERLEUKINE-7**

<b>I - GENERALITES</b>	<b>36</b>
<b>II - CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES DE L'INTERLEUKINE-7 ET DE SON RECEPTEUR</b>	<b>37</b>
1 - Analyse structurale de l'IL-7 recombinante	<b>37</b>
2 - Le gène de l'IL-7 et sa transcription	<b>37</b>
3 - Le récepteur de l'IL-7	<b>41</b>
3.1 - Distribution cellulaire	<b>41</b>
3.2 - Modulation de l'expression membranaire et forme soluble	<b>41</b>

3.3 - Structure et caractéristiques	<b>42</b>
3.4 - Transduction du signal	<b>43</b>
<b>III - SOURCES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE-7</b>	<b>49</b>
1 - Sources	<b>49</b>
2 – Activités biologiques	<b>49</b>
2.1 - Rôle de l'IL-7 dans le développement et la différenciation des cellules de la lignée lymphoïde	<b>49</b>
2.2 - Rôle de l'IL-7 sur le développement et la fonction des cellules de la lignée myéloïde	<b>51</b>
2.3 - Rôle de l'IL-7 sur la croissance et la fonction des cellules T matures périphériques	<b>52</b>
2.4 - Rôle de l'IL-7 sur les cellules à activité cytotoxique	<b>53</b>
2.5 - L'activité de l'IL-7 <i>in vivo</i>	<b>54</b>

## **CHAPITRE III**

### **L'INTERLEUKINE-7 DANS LE CONTEXTE CUTANE**

<b>I - GENERALITES</b>	<b>56</b>
<b>II - INTERLEUKINE-7, KERATINOCYTES ET DETC</b>	<b>56</b>
1 - Régulation de l'expression du gène de l'IL-7 par l'IFN- $\gamma$	<b>57</b>
2 - L'IL-7 est un médiateur de la communication entre les kératinocytes et les lymphocytes T épidermiques	<b>58</b>
2.1 - L'IL-7 produite par les kératinocytes favorise la croissance des DETC	<b>58</b>
2.2 - L'IL-7 maintient les DETC en survie en empêchant la mort par apoptose	<b>58</b>
2.3 - Les UVB régulent de façon négative l'expression des ARN messagers de l'IL-7 par les kératinocytes	<b>59</b>

<b>III – PATHOLOGIE CUTANÉE : ROLE DE L'IL-7</b>	<b>61</b>
1 – Lymphomes cutanés T épidermotropes et souris transgéniques	61
1.1 – Lymphomes cutanés T épidermotropes	61
A - Le syndrome de Sézary	61
B - Le mycosis fongoïde	62
1.2 – Les souris transgéniques pour l'IL-7	63
2 – Pathologies infectieuses cutanées	65
2.1 - La lèpre	65
2.2 - La leishmaniose cutanée	67

## CHAPITRE IV

<b>LE PARASITE SCHISTOSOMA MANSONI</b>	<b>69</b>
<b>I - Le cycle de vie du parasite <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>69</b>
<b>II - Réponse immune développée à l'encontre du schistosomule</b>	<b>71</b>
<b>III - Réponse immune développée à l'encontre des œufs</b>	<b>72</b>
1 - Phase d'induction	73
2 - Persistance du granulome	74
<b>IV- Le séjour cutané du parasite ou le premier contact avec l'hôte</b>	<b>76</b>

**- RESULTATS -****78****ARTICLE 1****79**

Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$  production and leads to an aggravation of the disease.

**I - OBJECTIFS****80****II - RESULTATS****80****III - CONCLUSION****82****ARTICLE 2****93**

Cutaneous interleukin-7 transgenic mice display a propitious environment to *Schistosoma mansoni* infection.

**I - OBJECTIFS****94****II - RESULTATS****94****III - CONCLUSION****96**

<b>ARTICLE 3</b>	<b>134</b>
Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human <i>Schistosoma mansoni</i> percutaneous infection.	
<b>I - OBJECTIFS</b>	<b>135</b>
<b>1 - Généralités</b>	<b>135</b>
<b>2 - Description du modèle</b>	<b>135</b>
<b>II - RESULTATS</b>	<b>138</b>
<b>III - CONCLUSION</b>	<b>139</b>
<b>ARTICLE 4</b>	<b>149</b>
Infection of mice lacking of interleukin-7 reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite <i>Schistosoma mansoni</i> .	
<b>I - OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU MODELE</b>	<b>150</b>
<b>II - RESULTATS</b>	<b>151</b>
<b>III - CONCLUSION</b>	<b>152</b>
<b>ANALYSE COMPAREE DES DIFFERENTS MODELES UTILISES DANS LE CADRE DE L'ETUDE DU ROLE DE L'IL-7 DANS L'INFECTION PAR SCHISTOSOMES</b>	<b>162</b>

**- DISCUSSION -**

**165**

**DISCUSSION** **165**

**REVUE GENERALE** **177**

Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host.

**PUBLICATION ANNEXE** **186**

Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni* : Demonstration of the participation of B cells in granuloma formation.

**BIBLIOGRAPHIE** **196**

## RESUME

Le parasite *Schistosoma mansoni* infecte son hôte définitif par un passage transcutané obligatoire. La peau constitue ainsi le premier organe avec lequel il entre en contact et où auront lieu les étapes précoce de son développement. Le tissu cutané est actuellement considéré comme un organe immunologiquement compétent; il est donc susceptible de jouer un rôle important dans l'initiation de la réponse immunitaire dirigée contre le schistosome. Dans un premier temps, nous nous sommes donc particulièrement intéressés à l'étape cutanée de l'infection. Nos résultats montrent qu'une production d'Interleukine-7, spécifique de la pénétration transcutanée du schistosome, a lieu dans la peau d'une façon rapide et durable. De manière surprenante, l'injection intradermique d'Interleukine-7, préalablement à l'infection, favorise le développement du parasite et aboutit à une aggravation de la pathologie. De même, l'étude d'un modèle de souris transgéniques pour le gène de l'Interleukine-7, dont l'expression constitutive a lieu principalement dans la peau, permet de confirmer le rôle de cette cytokine dans la maturation du parasite. De plus, la réalisation de greffes de peau humaine sur des souris immunodéficientes, ensuite infectées, étend nos observations réalisées chez la souris au modèle de l'infection humaine. Enfin, l'infection de souris ne produisant pas l'Interleukine-7 permet de montrer qu'en l'absence de cette cytokine, le parasite ne se développe pas normalement. On observe en effet, un nanisme parasitaire important associé à un manque de maturité des vers femelles adultes. L'unique autre cas de schistosomes nains étant celui obtenu chez des souris hypothyroïdiennes, nos résultats soulèvent la question d'une relation éventuelle entre interleukine-7 et hormones thyroïdiennes dans le cadre de l'infection par ce parasite. Enfin, le nanisme observé chez les souris déficientes en interleukine-7 pourrait être rapproché du phénomène de diapause, forme de latence du parasite, ce qui apporterait un éclairage nouveau sur les relations entre le schistosome et l'hôte vertébré.

Ainsi, les événements cutanés précoce (à savoir la production d'interleukine-7) joueraient un rôle essentiel sur la migration, la maturation, le développement et donc sur l'adaptation du parasite *Schistosoma mansoni*.

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

La peau est un tissu tout à fait particulier présentant de multiples fonctions. Elle possède des propriétés physiques et physiologiques mais aussi psychologiques et sociales de première importance. La peau constitue une barrière contre l'eau et les composés hydrosolubles, un organe de défense et de protection contre les trauma mécaniques, les microorganismes pathogènes et un rempart contre les rayons solaires. Récemment il est devenu incontestable qu'au sein de ce tissu, l'immunité s'est développée en un système spécifique et spécialisé. De nombreux types cellulaires participent à la réponse immune cutanée et communiquent par l'intermédiaire de différents médiateurs et notamment par les cytokines. Ces molécules interviennent en particulier dans les processus d'inflammation, d'activation et de recrutement cellulaire. L'une d'entre-elles, l'interleukine (IL)-7, a fait l'objet de nombreuses études. Tout d'abord décrite comme une cytokine intervenant dans la lymphopoïèse, ses activités dans la peau en tant que facteur de croissance et de maturation pour les lymphocytes T en font une cytokine d'intérêt majeur dans ce tissu.

Le but premier de nos études concernait les caractéristiques de l'immunité cutanée dans le modèle d'infection par le parasite *Schistosoma mansoni* et notamment les mécanismes d'induction et d'orientation précoce de la réponse immune. En effet, ce parasite utilise un site d'infection spécifique tout à fait particulier, la peau. Chez la souris la première phase effectrice de la réponse dirigée contre les larves parasitaires a lieu au sein du poumon, elle constituerait une étape importante dans la destruction des parasites. Elle est principalement médiée par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteurs d'interféron (IFN)- $\gamma$ . Les conditions de l'induction de cette réponse de type Th1 sont encore très mal connues. On suppose que l'initiation a lieu dans les ganglions périphériques drainant le site d'infection et peut-être dès la pénétration du parasite, dans le tissu cutané.

Les travaux présentés ici ont permis de mettre en évidence la synthèse de l'IL-7 dans la peau lors de cette infection. Ensuite l'utilisation de différents modèles a permis de

déterminer plus précisément le rôle de cette cytokine. Une augmentation du niveau d'IL-7 présente cutané a été réalisée soit par injection, soit par l'utilisation de souris transgéniques pour l'IL-7 à expression constitutive restreinte à l'épiderme. La relevance des résultats obtenus chez la souris a été étudiée chez l'homme grâce à la mise en place de greffes de lambeaux cutanés humains sur des souris immunodéficientes. Enfin, un modèle de souris déficientes pour le gène de l'IL-7 a permis de définir les modalités de l'infection en l'absence de cette cytokine. Enfin, l'ensemble de ces résultats montre de manière très intéressante que la production d'IL-7 par l'hôte infecté n'est pas dirigée contre le parasite mais bien au contraire que la présence de cette cytokine est indispensable à son développement. Ce travail permet de décrire certains aspects fascinants de la relation entre le parasite et son hôte vertébré et de caractériser l'implication d'une cytokine majeure de l'immunité : l'IL-7.

# INTRODUCTION

## CHAPITRE I

### LA PEAU : UN ORGANE DE L'IMMUNITE

#### I - GENERALITES

La peau constitue l'interface entre le milieu interne et l'environnement. Cet organe possède un rôle protecteur au regard des différentes sources d'agression mécanique, physique et biologique. C'est également un organe récepteur participant au sens du toucher et producteur de nombreux métabolites. Chez l'homme sa surface et son poids atteignent en moyenne 2 m<sup>2</sup> et 1/3 du poids total d'un adulte respectivement; ceci définit la peau comme l'organe le plus étendu et le plus lourd en dehors de l'épithélium pulmonaire. L'épithélium cutané empêche la perte des fluides organiques et présente de remarquables facultés de cicatrisation et de réparation. D'un point de vue biochimique la peau peut produire des substances variées telles que la sueur et le sébum qui agissent en tant qu'agents protecteurs. L'épiderme qui constitue la partie la plus superficielle de la peau est en perpétuel auto-renouvellement. La pigmentation de la peau fait intervenir le système mélanocytaire et protège ce tissu des rayons ultraviolets. Les vaisseaux sanguins et les glandes sébacées jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de thermorégulation. Ces caractéristiques restent vraies pour la majeure partie des mammifères. La peau constitue avec les muqueuses la première barrière de défense immune engagée dans la protection du soi, d'où l'importance de sa réactivité aux diverses agressions.

De nombreux modèles ont été proposés afin de préciser le rôle particulier de la peau dans les processus immunologiques. Par ordre chronologique, on note : les tissus lymphoïdes associés à la peau (SALT) (Streilein JW, 1978; Streilein JW, 1983), le système immun de la peau (SIS) (Bos JD, 1986; Bos JD, 1987), le système immun fonctionnel associé à la peau (CAFIS) (Das PK, 1988), l'unité microvasculaire dermique (DMU) (Sontheimer RD, 1989) et le système immun dermique (DIS) (Nickoloff BJ, 1993a). Seul le SIS définit par J.D. Bos (Bos JD, 1986) parvient à englober la quasi totalité des effecteurs impliqués et couvre le plus largement possible les éléments humoraux et cellulaires associés à la réponse immune cutanée.

Au delà de ce concept, certains auteurs définissent la peau comme un organe immunitaire (Shimada S, 1988) et si l'on associe au SIS, les ganglions drainant la peau qui participent à la mise en place de l'immunité cutanée cette notion d'organe devient acceptable.

Beaucoup de propriétés anatomiques, biochimiques et fonctionnelles sont partagées par la peau (et plus particulièrement l'épiderme) et par un organe lymphoïde primaire, le thymus. Cette similarité est confirmée par l'étude du développement de l'épiderme et du thymus chez la souris. En effet des souris privées de thymus de manière congénitale portent le nom « nude » de fait de l'absence totale de poils. Les gènes impliqués dans le développement normal de la peau et du thymus semblent être identiques ou du moins très liés puisque ces phénotypes n'ont jamais pu être séparés en dépit de l'élevage intensif de ces animaux (Edelson RL, 1985). De plus, de nombreux antigènes sont exprimés en commun par l'épithélium thymique et par l'épiderme (Didierjean L, 1980; Viac J, 1982). Des similitudes fonctionnelles entre la peau et le thymus ont aussi été rapportées : la production de thymopoïetine (un facteur thymique) par des cultures de cellules épidermiques (Chu AC, 1983) et la capacité de surnageants de kératinocytes à induire la différenciation de cellules de moelle osseuse vers des précurseurs de la lignée T exprimant la terminale désoxynucléotidyle transférase (Rubenfeld MR, 1981). Les thymocytes et les cellules de Langerhans (LC) expriment des marqueurs de surface en commun (Yonish RE, 1984). Enfin le tissu cutané est aussi considéré comme un site extra-thymique de maturation et de sélection des lymphocytes T, puisque des phénomènes de tolérance néonatale peuvent y être induits (Alferink J, 1998). Par ailleurs certaines sous populations de lymphocytes T présentes dans la peau dérivent directement de la moelle osseuse par un mécanisme indépendant du thymus (Shiohara T, 1993). Ces différentes caractéristiques restent néanmoins encore trop anecdotiques et nécessitent certains approfondissements.

Au regard de ces diverses données, le complexe peau - ganglions drainant associés tend à être considéré aujourd'hui comme un « organe » immunologiquement compétent à part entière, dotée de défenses innées et capable de mettre en place une réponse immune adaptée. Bien plus qu'une simple barrière, le tissu cutané est un partenaire majeur et primordial qui intervient au premier plan dans la défense de l'organisme.

## **II - ORGANISATION DU TISSU CUTANE, LE SYSTEME TEGUMENTAIRE EN QUESTION (PLANCHE 1)**

La peau encore appelée tégument, est formée de deux types de tissus distincts, l'épiderme et le derme, solidement soudés l'un à l'autre le long d'une ligne plus ou moins ondulée nommée jonction dermo-épidermique ou lame basale. Le tissu sous-cutané, qui se trouve juste au dessous de la peau, est appelé hypoderme, il est constitué de tissu conjonctif lâche et de tissus adipeux. Il relie la peau aux structures sous-jacentes et renforce sa mobilité. En raison de sa composition graisseuse, il est également en mesure d'absorber les chocs et d'isoler les tissus plus profonds de l'organisme en les protégeant contre les pertes de chaleur. Enfin l'hypoderme ne fait pas véritablement partie de la peau, mais il est en interaction fonctionnelle avec elle puisqu'il lui permet d'assurer certaines de ses fonctions protectrices.

### **1 - L'épiderme**

L'épiderme est formé d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé qui se compose de cinq couches distinctes chez l'homme et de deux à trois couches chez la souris. Bien que l'épaisseur de l'épiderme varie d'une zone du corps à une autre pour des raisons de frictions, d'usure ou de mobilité, sa constitution reste similaire. Il en est de même pour la souris, animal étudié au laboratoire, dont l'épiderme, quoique plus fin, est très proche de l'épiderme humain d'une manière générale. Une des remarquables particularités de l'épiderme est son perpétuel renouvellement. En effet les kératinocytes, qui représentent 90 à 95% des cellules épidermiques, sont organisés en strates et proviennent de cellules situées dans la partie profonde de l'épiderme qui se divisent presque continuellement par mitose. A mesure que les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau, ils entament un processus de différenciation terminale qui aboutit à la formation du stratum cornéum, une zone de protection chimique et mécanique. Cette fonction de barrière est principalement assurée par l'enveloppe cornée, une structure polymérique très résistante, constituée de protéines et de lipides. Celle-ci est d'abord formée juste sous la membrane cellulaire puis disposée à la surface des cellules cornées mortes. Chez l'homme l'épiderme est totalement renouvelé tous les 35 à 45 jours. Ce mécanisme est placé sous la dépendance d'une protéine dénommée facteur de croissance épidermique (EGF) produite par les kératinocytes eux-mêmes (Hudson LG, 1998).

Dans les couches profondes de l'épiderme se trouvent les mélanocytes, cellules productrices de mélanine qui sera absorbée par les kératinocytes. Les granules de mélanine s'accumulent sur la face superficielle du noyau et forment ainsi un bouclier pigmentaire qui protège le noyau, plus particulièrement l'ADN, des effets dévastateurs des rayons ultraviolets solaires. Les cellules de Merkel se trouvent en petit nombre à la jonction dermo-épidermique. Elles sont reliées à la terminaison nerveuse d'une fibre sensitive en forme de disque. Cette structure joue le rôle de récepteur sensoriel du toucher.

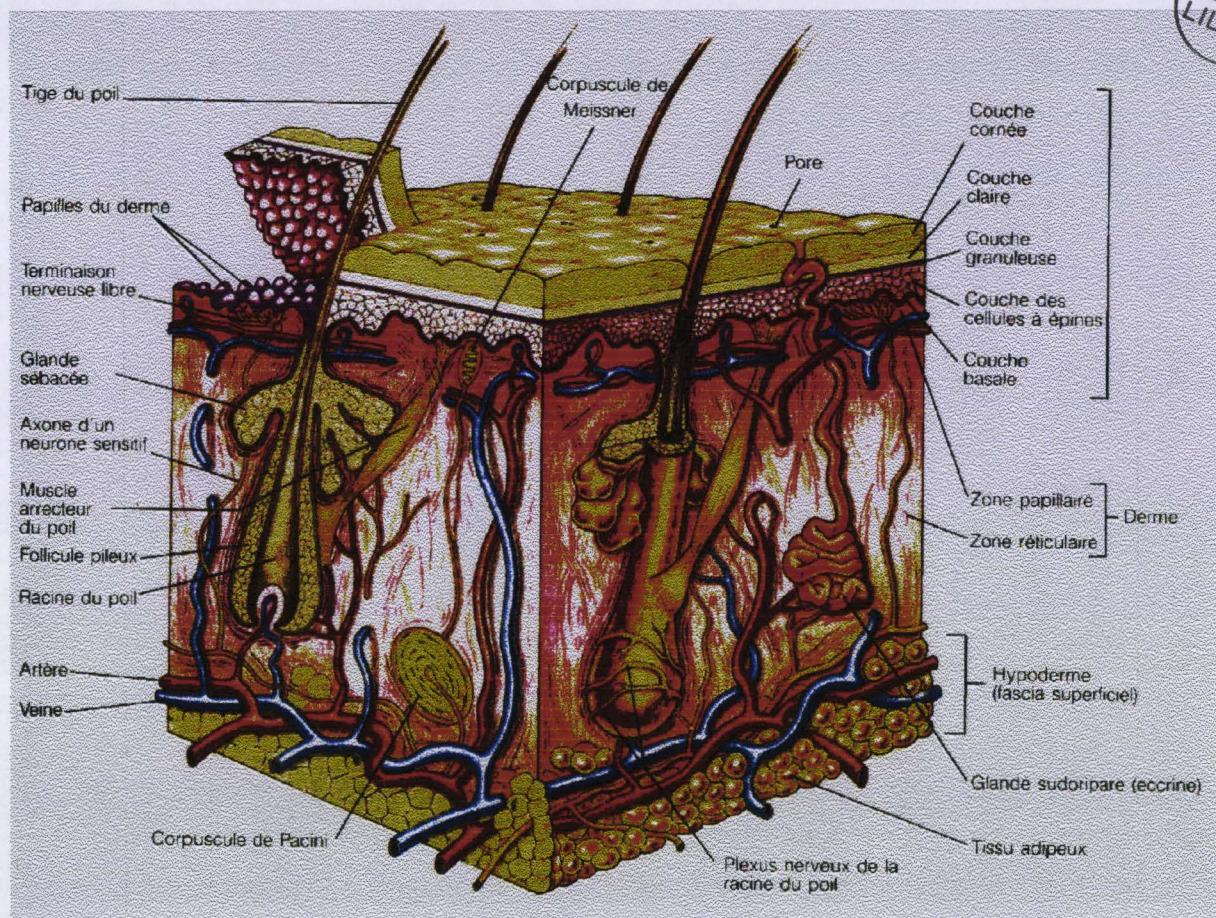
## 2 - Le derme

Seconde couche de la peau, le derme est constitué d'une épaisseur de tissu conjonctif à la fois résistant et flexible. On y retrouve des fibroblastes, des macrophages et des mastocytes. Sa matrice gélatineuse est imprégnée d'une grande quantité de collagène, d'élastine et de réticuline. Le derme est riche en fibres nerveuses, en vaisseaux sanguins et en vaisseaux lymphatiques. La majeure partie des follicules pileux et des glandes sébacées et sudoripares résident dans le derme, même si elles proviennent de l'épiderme embryonnaire. De même que pour l'épiderme, l'épaisseur du derme varie selon la région du corps, l'individu et l'espèce. Il est à noter que le nombre de follicules pileux est bien entendu largement plus élevé chez la souris et qu'ils sont parfois localisés jusque dans l'hypoderme. De plus les glandes sudoripares sont absentes chez la plupart des animaux à fourrure. Le principal rôle du derme est de contribuer à la résistance, à l'élasticité et l'hydratation de la peau.

## III - ORGANISATION DU SIS ET DESCRIPTION DES CELLULES IMMUNES CUTANÉES

Par un simple inventaire qualitatif, il apparaît qu'environ la moitié des cellules de la peau est liée à, ou joue un rôle dans l'immunité du tégument (**tableau 1**); le détail des constituants cellulaires et humoraux du système immun de la peau ou SIS définit par Bos (Bos JD, 1986) est présenté dans le **tableau 2**. De récents travaux ont montré que certaines fibres nerveuses seraient impliquées de manière importante dans l'immunité cutanée (Streilein JW, 1999). D'autres types cellulaires ont un rôle prépondérant dans l'immunité spécifique, c'est le cas notamment des kératinocytes, des cellules de Langerhans (ou cellules dendritiques présentatrices d'antigènes) et des lymphocytes T.

BU  
LILLE I



### Planche 1

#### Structure de la peau humaine

Vue tridimensionnelle de la peau humaine et des tissus sous-cutanés. (l'épiderme a été soulevé dans le coin supérieur gauche pour montrer les papilles dermiques), d'après Marieb (Marieb EN, 1993).

### *Tableau 1*

---

#### **Types cellulaires présents dans la peau humaine normale**

<b>Associés à la réponse immune</b>	<b>Non associés à la réponse immune</b>
Kératinocytes	Cellules de Merkel
Cellules de Langerhans	Cellules musculaires lisses
Lymphocytes T	Fibroblastes/fibrocytes/myofibroblastes
Cellules endothéliales vasculaires	Péricytes
Cellules endothéliales lymphatiques	Cellules glandulaires eccrines
Macrophages tissulaires	Cellules glandulaires apocrines
Monocytes	Sébocytes
Cellules dendritiques tissulaires	Cellules de Schwann
Mastocytes	
Nerfs à terminaison cutanée (Streilein JW, 1999)	
Mélanocytes	

### *Tableau 2*

---

#### **Constituants cellulaires et humoraux du SIS**

<b>Constituants cellulaires</b>	<b>Constituants humoraux</b>
Kératinocytes	Peptides antimicrobiens
Cellules de Langerhans	Complément et protéines régulatrices
Monocytes/ Macrophages tissulaires	Immunoglobulines
Granulocytes	Cytokines/neuropeptides
Mastocytes	Fibrinolysine
Cellules endothéliales vasculaires/lymphatiques	Eicosanoïdes/prostaglandines
Lymphocytes T	Radicaux libres

---

D'après Bos (Bos JD, 1997).

Chaque type cellulaire œuvre en partenariat direct avec d'autres et l'ensemble contribue à la mise en place de la réponse immune cutanée. Intéressons nous à présent de manière plus précise à chacun des acteurs du SIS et à la dynamique de l'immunité cutanée.

## 1 - Les kératinocytes

Le kératinocyte qui constitue le composant épidermique de croissance de la peau, fait l'objet d'un intérêt considérable en raison de deux découvertes importantes. La première fut la démonstration de la capacité des kératinocytes à exprimer des molécules HLA-DR du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Ceci montrant la participation possible du kératinocyte en tant que cellule accessoire à la réponse allogénique et spécifique d'antigène, en collaboration avec les lymphocytes T. La seconde découverte majeure concerne la possibilité de synthèse par les kératinocytes de nombreuses cytokines capables d'agir sur les lymphocytes T et donc d'influencer la réponse immunitaire.

### 1.1 - Le kératinocyte en tant que cellule accessoire de la réaction antigénique

#### 1.1.1 - Expression de molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Les molécules de classe II du CMH jouent un rôle central dans les réponses immunes (Lechler RI, 1988). Chez l'homme, on dénombre 3 loci codant pour des molécules du CMH de classe II: HLA-DR, DQ, DP. Par contre la souris ne possède que deux loci: I-A et I-E. Ces molécules de classe II sont formées par l'association non-covalente de deux polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$ . Au cours du processus d'apprétement, l'antigène est dégradé en petits fragments présentant un agrétope, site de liaison à la molécule de classe II du CMH et un épitope, site de reconnaissance par le récepteur T de la cellule T spécifique de l'antigène (Castellino F, 1997). Cette étape de reconnaissance n'est pas suffisante et la réponse de la cellule T est alors dépendante d'un second signal apporté par la cellule accessoire, par le biais de cytokines et de facteurs de costimulation tel que BB-1 (ligand du CD28) (Nickoloff BJ, 1993b) présents à la surface des kératinocytes.

Lampert *et al.* furent les premiers à mettre en évidence l'expression de molécules HLA-DR à la surface des kératinocytes dans des expériences de rejet de greffe (Lampert IA, 1981). Depuis, l'expression de HLA-DR par les kératinocytes a pu être observée dans le cas

de dermatoses associées à un infiltrat lymphocytaire cutané tels que l'eczéma, le lupus érythémateux ou encore le lichen plan. Par contre elle est absente dans le cas du pemphigoïde bulleux et du pemphigus vulgaire (Lampert IA, 1984). L'expression des molécules de classe II par les kératinocytes semble donc être inductible. D'ailleurs, l'IFN- $\gamma$ , une cytokine produite par les lymphocytes T, est responsable de l'induction de manière directe de l'expression de molécules HLA-DR par les kératinocytes humains et murins (Basham TY, 1985).

La présence d'HLA-DQ à la surface des kératinocytes a pu être observée au cours d'une étude de dermatite de contact allergique et irritante. Mais seuls certains patients présentaient cette caractéristique. Dans cette même étude, l'expression d'HLA-DP fut observée uniquement dans la dermatite allergique Gawkrodger DJ, 1987. Depuis HLA-DQ et DP ont été mis en évidence dans des pathologies notamment tumorales (Niedecken H, 1988). L'IFN- $\gamma$  est aussi impliqué dans l'induction de l'expression de ces molécules *in vitro* (Kerr LA, 1990) et *in vivo* (Barker JN, 1990).

### **1.1.2 - Expression de molécules d'adhésion**

Après activation appropriée, les kératinocytes expriment donc des molécules du CMH de classe II; leur reconnaissance par les lymphocytes T spécifiques est donc possible. Néanmoins la cooptation de ces deux types cellulaires nécessite des molécules d'adhésion. Celles-ci sont exprimées par les kératinocytes, et des ligands déterminés existent à la surface des lymphocytes et d'autres cellules migratrices issues du sang périphérique. Ainsi, l'IFN- $\gamma$  (Nickoloff BJ, 1988), le tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  et l'IL-17 (Albanesi C, 1999) induisent l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) à la surface des kératinocytes. ICAM-1 sert de ligand spécifique à une molécule appelée, antigène associé à la fonction du lymphocyte-1 (LFA-1), une protéine de surface exprimée sur les leucocytes (Caughman SW, 1992) et en particulier sur les lymphocytes.

### **1.1.3 - Le kératinocyte est-il réellement une cellule accessoire?**

Bien que les kératinocytes possèdent certaines caractéristiques des cellules accessoires, leur activité en tant que cellule présentatrice d'antigène reste très discutée, peu d'auteurs ayant pu réellement la mettre en évidence (Goodman RE, 1994). L'inefficacité, plus

souvent observée, de cette fonction présentatrice pourrait être liée à une incapacité à dégrader et à apprêter correctement l'antigène. Par ailleurs des cytokines régulatrices telles que l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1-Ra) (Kang K, 1996) ou encore la prostaglandine E2 (PGE2) (Pentland AP, 1987) capables d'inhiber la réponse des cellules T sont produites par le kératinocyte. Ceci indique que l'absence de présentation efficace ne signifie pas obligatoirement une absence de fonction mais peut-être la présence de facteurs suppresseurs. Ces mécanismes sont actuellement supposés intervenir dans la tolérance du soi (Nickoloff BJ, 1994b). Néanmoins, le kératinocyte doit probablement jouer le rôle de cellule accessoire dans certaines conditions précises qui restent à déterminer.

## 1.2 - Le kératinocyte, les cytokines et leur récepteur

La communication paracrine, autocrine et parfois endocrine entre les cellules du système immunitaire se fait par le biais des cytokines. Ces glycoprotéines sont caractérisées par leur activité redondante et pléïotope. Elles forment un réseau de communication très complexe avec des boucles de rétro-actions positives et/ou négatives qui permet un contrôle précis de la réponse immune par les différents partenaires immuns mis en jeu.

Les kératinocytes non activés produisent peu de cytokines. Cette sécrétion est cependant nettement favorisée à la suite d'une activation par des antigènes microbiens, des promoteurs tumoraux ou une irradiation par les rayons ultraviolets. La plupart de ces cytokines affecte les propriétés effectrices des lymphocytes, des cellules de Langerhans, des macrophages, des cellules dendritiques, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Le kératinocyte est particulièrement sensible aux modifications de l'environnement cutané et même une simple rupture de la barrière lipidique de la peau peut être à l'origine de la production de cytokines (Nickoloff BJ, 1994a). Le kératinocyte répondra aussi à la présence de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par d'autres cellules. Le **tableau 3** regroupe les cytokines produites par les kératinocytes identifiées à ce jour. Les cytokines à leur tour modulent notamment la croissance des kératinocytes et leur production d'autres cytokines. Le **tableau 4** présente les récepteurs exprimés sur ces cellules, d'autres, bien que supposés présents, n'ont pas encore pu être mis en évidence.

**Tableau 3** D'après Williams (Williams IR, 1996)

**Les cytokines produites par les kératinocytes**

**1 - Cytokines inflammatoires**

IL-1 $\alpha$

IL-1 $\beta$

TNF- $\alpha$

**2 - C-X-C chimiokines**

IL-8

Gro- $\alpha$ , Gro- $\beta$  et Gro- $\gamma$

MIP 2- $\alpha$ , MIP-2 $\beta$ , IP-10

**3 - C-C chimiokines**

MCP-1

**4 - Cytokines régulatrices de l'immunité humorale versus immunité cellulaire**

IL-10, IL-12

**5 - Cytokines favorisant la croissance des lymphocytes T**

IL-7, IL-15

**6 - Cytokines à activité Colony Stimulating Factor (CSF)**

GM-CSF

IL-6

Stem Cell Factor (SCF)/c-kit ligand

M-SCF

IL-3 (chez la souris)

**7 - Cytokines à activité Growth Factor pour les cellules non leucocytaires**

TGF- $\alpha$

Amphiréguline

HB-EGF

NDF/héréguline,PDGF

Basic FGF (FGF2), VEGF, NGF

**8 - Cytokines immunosuppressives ou antagonistes**

IL-1Ra

TGF- $\beta$ , IL-10

**Tableau 4** D'après Williams (Williams IR, 1996)

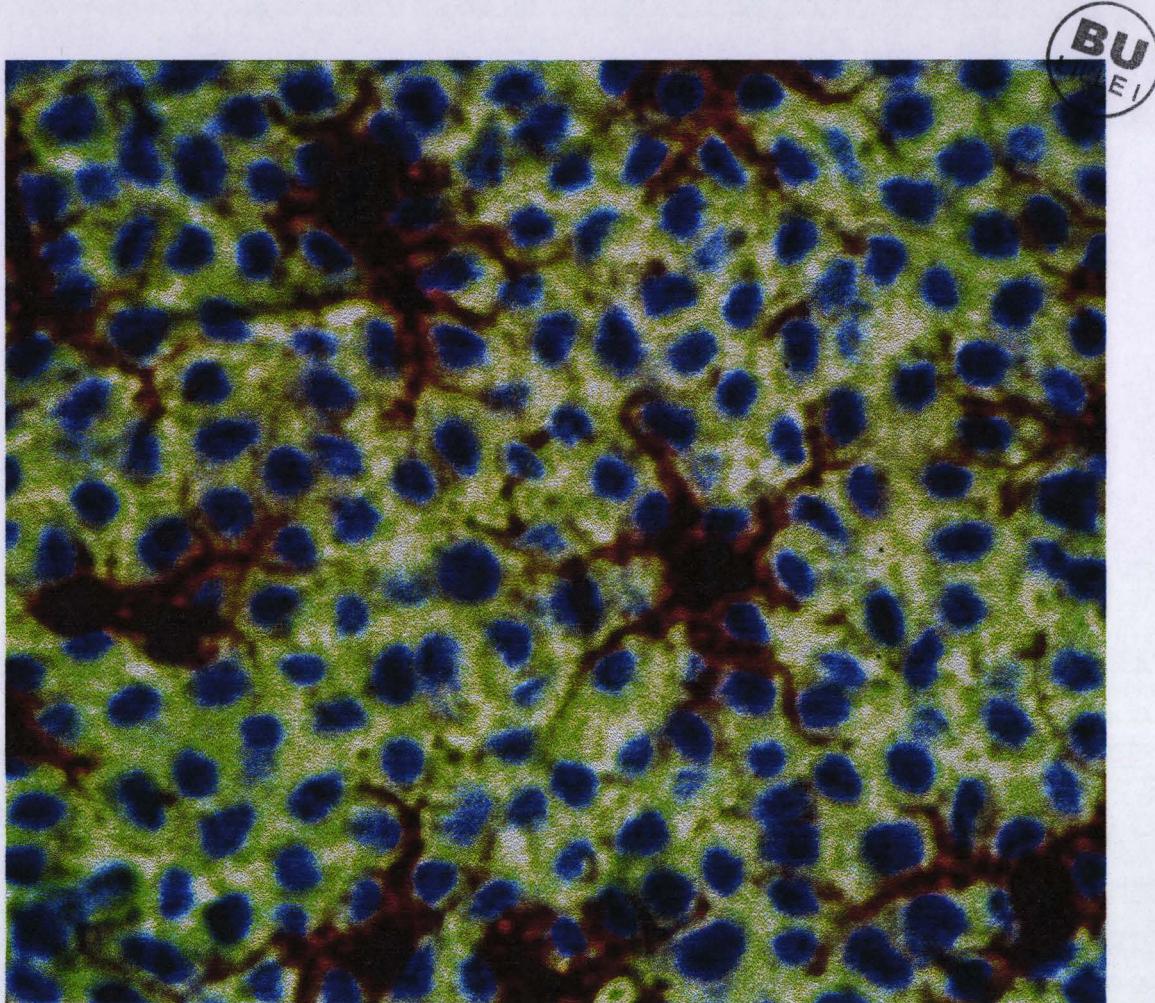
**Les récepteurs des cytokines exprimés par les kératinocytes et la réponse consécutive à l'engagement du récepteur**

Type de récepteur ( R ) de cytokines	Effet de l'engagement du récepteur sur les kératinocytes
R IL-1 de type I	Relargage secondaire de cytokines
R IL-1 de type II	Récepteur « inactif » pas de transduction du signal
R p55 TNF	Relargage de cytokines secondaires Induction de l'expression d'ICAM-1 Inhibition de la croissance
R IFN- $\alpha/\beta$	Inhibition de la croissance
R INF- $\gamma$	Inhibition de la croissance Régulation positive du CMH de classe II Induction de la production d'IP10 Induction de la kératine 17 Induction de l'expression d'ICAM-1
R TGF- $\beta$	Inhibition de la croissance Induction des kératines 6 et 16 Induction de la production de VEGF
R IL-4	Induction de la production d'IL-6
R IL-13	Induction de la production d'IL-6
R EGF (ErbB-1)	Croissance en réponse à tout ligand de la famille EGF Induction de la production de VEGF Induction des kératines 6 et 16
R NDF (ErbB-2 et ErbB-3)	Croissance en réponse aux isoformes du NDF- $\beta$
R KGF	Croissance en réponse au KGF (FGF-7) Ce récepteur lie aussi le FGF acide (FGF-1)
R IGF-1	IGF-1 peut fonctionner comme cofacteur pour la croissance des kératinocytes.
R IL-6	Croissance
R NGF	Croissance en présence de NGF

L'IL-7, une des cytokines produites par les kératinocytes a fait l'objet d'un grand intérêt de notre part au cours des travaux présentés ici, une étude détaillée de cette cytokine fera l'objet des Chapitres II et III.

## 2 - Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) furent décrites pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 (Langerhans P, 1868) qui leur attribua à tort une origine nerveuse, du fait de leur morphologie. C'est un siècle plus tard que leur véritable fonction de cellule présentatrice d'antigène fut découverte (Silberberg SI, 1976). On les retrouve dans l'ensemble des épithéliums de revêtement cutané et des épithéliums muqueux (bouche, vagin, rectum, vessie, poumon). Ce sont des cellules phagocytaires qui transportent les antigènes de l'épiderme, *via* la circulation lymphatique, jusqu'aux ganglions drainant la peau où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T auxiliaires (Macatonia SE, 1987). Elles sont d'origine médullaire (Tamaki K, 1980) et appartiennent à la population des cellules dendritiques non-lymphoïdes. Leur demi-vie est plus ou moins longue selon leur localisation (d'au moins 15 jours à plusieurs mois dans l'épiderme et moins de 2 jours dans l'épithélium des voies respiratoires) (Holt PG, 1994). Elles représentent environ 4% de la population des cellules épidermiques (Teunissen MB, 1992) et constituent un véritable réseau de surveillance, on en dénombre en effet de 200 à 700 par mm<sup>2</sup> (Planche 2). Ces cellules possèdent des organites cytoplasmiques spécifiques appelés granules de Birbeck dont l'origine et le rôle sont encore mal connus. Il a été suggéré que ces organites spécifiques étaient impliqués dans le processus d'endocytose médiée par récepteur et même pourraient intervenir dans l'apprêttement des antigènes ainsi internalisés (Bartosik J, 1992; Bucana CD, 1992). Cette hypothèse est contredite puisqu'il apparaît qu'en l'absence de ces granules, la LC reste fonctionnellement active (Mommaas M, 1994).



## Planche 2

### Le réseau des cellules de Langerhans

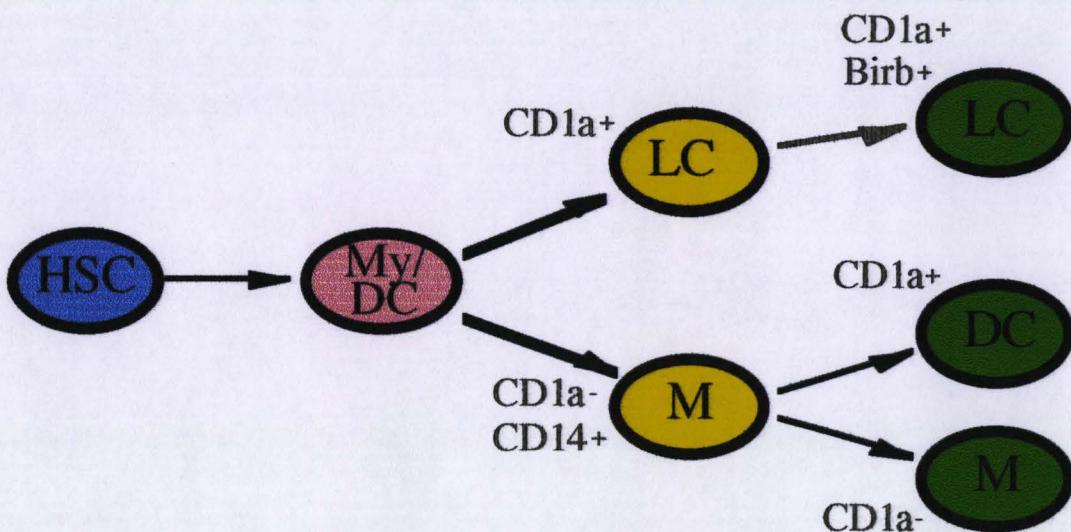
Cellules de Langerhans d'épiderme normal de souris marquées par un anticorps dirigé contre les molécules du CMH de classe II. Mise en évidence de l'organisation en réseau, de l'interconnexion des LC entre elles et de leur interaction avec les kératinocytes par l'intermédiaire de leurs dendrites. D'après Nicolas (Nicolas J-F, 1997).

## 2.1 - Origine et différenciation

L'origine médullaire des LC a été démontrée chez la souris (Katz SI, 1979) puis chez l'homme (Volc PB, 1984). Les LC expriment la molécule CD45 (Stingl G, 1995), marqueur hématopoïétique et peuvent être dérivées *in vitro* à partir de cellules progénitrices hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (Caux C, 1992). Les cellules ainsi obtenues par l'action combinée du GM-CSF et du TNF- $\alpha$ , possèdent les caractéristiques majeures de la population des LC à localisation épidermique : morphologie dendritique, marqueurs de membrane (CD1a, CD4, Molécules de classe II du CMH et des molécules accessoires dont ICAM-1, LFA-3, B7-1, B7-2, absence de CD14, présence de granules de Birbeck et aptitude à capter et à internaliser les antigènes exogènes par la voie de l'endocytose classique par récepteurs. Des cellules dendritiques peuvent également être dérivées des monocytes adhérents du sang périphérique sous l'action du GM-CSF et de l'IL-4 mais leur affiliation aux LC reste à démontrer et semble d'ailleurs peu probable. Les LC épidermiques semblent constituer une (sous)lignée hématopoïétique distincte qui partage des progéniteurs communs avec les monocytes/macrophages (Planche 3).

Récemment des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré un rôle majeur du TGF- $\beta$ 1 dans le développement et la prolifération des LC (Strobl H, 1998). Enfin il a été démontré que les LC étaient capables de s'autorenouveler au sein même de l'épiderme (Czernielewski JM, 1987; Fraissinette Ad, 1988).

Récemment des cellules appartenant à la lignée dendritique ont été identifiées dans le derme (Lenz A, 1993) et bien que les LC aient reçu un plus grand intérêt, les cellules dendritiques dermiques présentent des fonctions très similaires. Elles expriment fortement les molécules du CMH de classe II (Nestle FO, 1995) et possèdent de très bonnes capacités de présentation d'antigène (Nestle FO, 1998) et d'activation des lymphocytes T ([McLellan, 1998 #78]. Enfin certaines d'entre elles contiennent également des granules de Birbeck (Nestle FO, 1995). Leur participation dans le psoriasis a été mise en évidence, elles seraient en effet capables d'entretenir l'activation des lymphocytes T recrutés (Nestle FO, 1994).



*Planche 3*

**Modèle de différenciation des cellules de Langerhans**

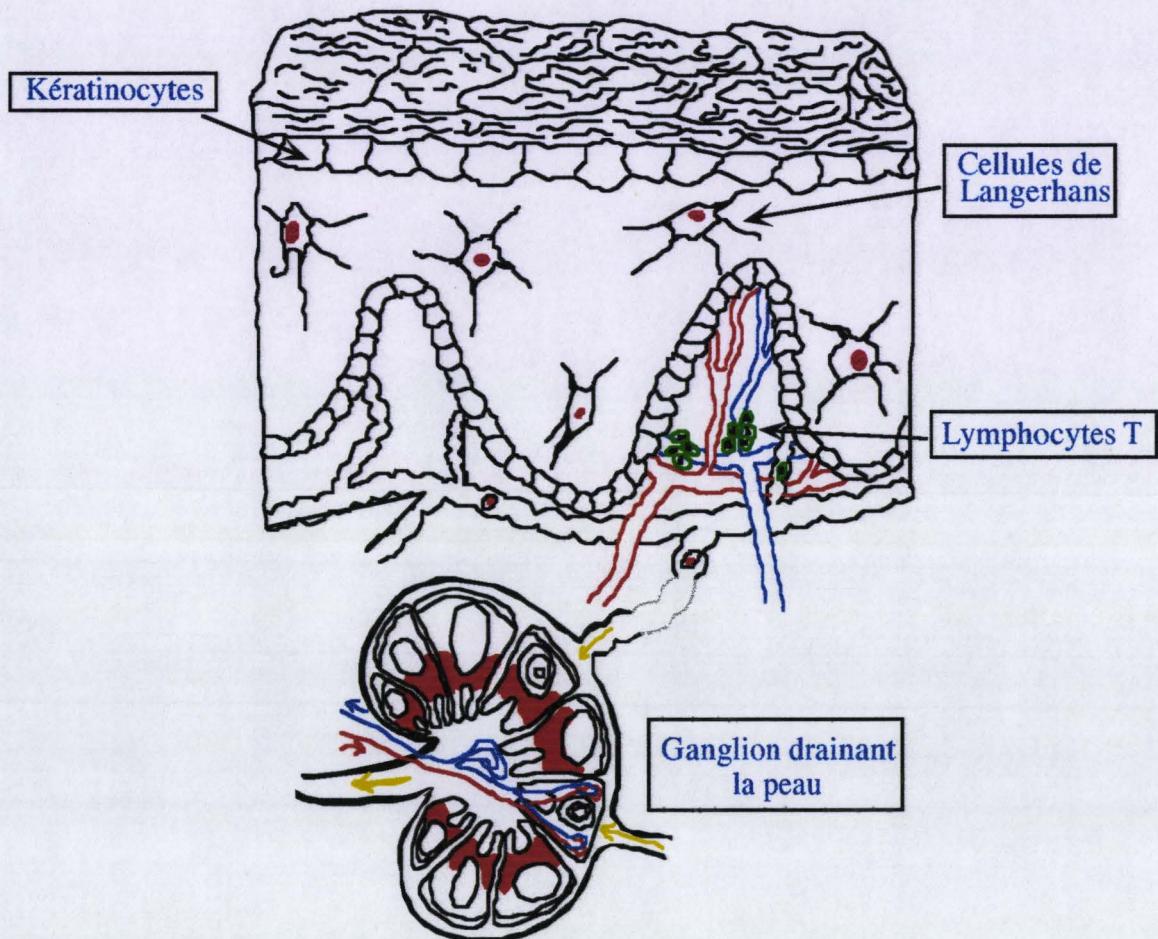
Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en progéniteurs communs myéloïdes (My/DC) puis s'orientent soit vers les cellules de Langerhans (LC) soit vers les monocytes (M). Le développement des cellules de Langerhans et des monocytes est très lié mais la séparation de ces deux types cellulaires a lieu avant le stade monocytes CD14<sup>+</sup>. DC : Cellules dendritiques, Birb<sup>+</sup> : Présence de granules de Birbeck. D'après Strobl (Strobl H, 1998).

## **2.2 - Migration et maturation phénotypique et fonctionnelle**

Les cellules de Langerhans résident donc dans l'épithélium cutané pendant un certain temps avant d'assurer leur fonction de cellule présentatrice d'antigène. Elles captent les antigènes exogènes, puis les apprêtent avant de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles initient une réponse immune spécifique en présentant aux lymphocytes T, les antigènes associés aux molécules du CMH de classe II (Teunissen MB, 1992) (Planche 4). A la différence des lymphocytes B et des monocytes, seules les cellules dendritiques, dont font partie les LC, sont capables d'induire la réponse de cellules T « naïves », c'est à dire non-sensibilisées à un antigène.

L'activation des LC est à l'origine de leur migration, intimement liée à leur maturation fonctionnelle. Ce stimulus peut se produire indirectement sous l'effet de cytokines produites par les kératinocytes environnants (telles que le GM-CSF et le TNF- $\alpha$ ) ou, directement par une boucle autocrine (IL-1 $\beta$ ) (Cumberbatch M, 1997). Le maintien des LC au sein de l'épiderme est assuré en particulier par des interactions de type E-cadhéchine avec les kératinocytes eux-mêmes (Tang A, 1993). L'émigration des LC pourrait être liée à l'induction d'une diminution de l'expression de la E-cadhéchine notamment par le TNF- $\alpha$  (Staquet MJ, 1995a). Ensuite, pour se rendre au ganglion les LC traversent la jonction dermo-épidermique et entrent dans le derme superficiel et les vaisseaux lymphatiques, structures riches en protéines de la matrice extracellulaire. Les interactions avec cette matrice sont principalement médiées par les intégrines  $\beta 1$ . Ces intégrines permettent les contacts avec la laminine, la fibronectine et les collagènes de type I et IV et orientent le mouvement des LC de telle sorte qu'elles ne puissent pas regagner l'épiderme (Staquet MJ, 1995b).

Parallèlement à leur migration, on observe une diminution de l'expression de CD1a et du nombre de granules de Birbeck, associée à une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II (Picut CA, 1987) et de certaines molécules accessoires, telles que ICAM-1, LFA-3 et B-7. Les intégrines sont impliquées dans ces phénomènes mais leurs mécanismes d'action restent à préciser. La migration s'accompagne donc de modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles.



#### Planche 4

#### Représentation schématique de l'association entre la peau et un ganglion drainant

Les cellules de Langerhans pourront quitter l'épiderme après activation et rejoindre la circulation lymphatique dermique, pour finalement gagner les zones T (paracorticales) des ganglions lymphatiques associés.

Les LC qui parviennent dans les vaisseaux lymphatiques afférents sont appelées cellules voilées puis cellules interdigitées dans les ganglions drainant la peau où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T (Hoefsmit EC, 1982). Au cours de leur migration et notamment lorsqu'elles quittent la peau les LC sont accompagnées de lymphocytes T mémoires (Pope M, 1995). Bien qu'admise aujourd'hui, le rôle de cette co-migration n'est pas encore connu. Enfin la synthèse de cytokines produites par les LC activées est régulée différemment, augmentation de MIP-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 (Schreiber S, 1992).

La place des cellules de Langerhans dans la présentation des antigènes est fondamentale. Ces cellules sont présentes sur l'ensemble du revêtement cutané. Leur potentialité en fait le prototype même de la cellule dite présentatrice d'antigènes. C'est au niveau trans-épithélial qu'elles sont amenées à traiter l'information antigénique la plus forte, compte-tenu de la surface de contact avec le milieu extérieur.

### 3 - Les lymphocytes T

La description des populations lymphocytaires présentes dans la peau saine est encore aujourd'hui mal connue. Les lymphocytes B n'ont jamais été observés dans la peau normale, les cellules T constituent la seule population lymphocytaire présente. Cependant le caractère recirculant, recruté ou résident de ces cellules n'est pas encore définitivement établi.

#### 3.1 - Les sous-populations lymphocytaires

Les lymphocytes T de la peau sont localisés pour 90% d'entre-eux le long des veinules post-capillaires du plexus vasculaire des papilles dermiques ou adjacentes aux annexes cutanées. Trois caractéristiques majeures les différencient des lymphocytes T circulants. Premièrement, la majorité de ces cellules sont activées puisqu'elles expriment des molécules de classe II du CMH et le récepteur à l'IL-2. Par ailleurs on trouve une répartition quantitativement équivalente entre une population de cellules CD4 $^{+}$  mémoires (Cd29 $^{+}$ ) et une population de cellules cytotoxiques CD8 $^{+}$ . Enfin de très rares cellules T CD4 $^{+}$  naïves (moins de 5%) sont présentes dans la peau alors que cette sous-population constitue environ 50% des cellules CD4 $^{+}$  du sang périphérique (Bos JD, 1987).

Les cellules T présentes dans l'épiderme portent en majorité le marqueur CD8 $^{+}$  et ne représentent que 10% de la totalité des cellules T cutanées. Leur localisation est limitée aux

couches basales de l'épiderme à proximité des LC. La présence des lymphocytes T dans des tissus spécifiques est dirigée par l'interaction entre des molécules d'adhésion exprimées par les cellules T et leur ligand présent sur l'endothélium vasculaire. Le tropisme cutané des lymphocytes T est médié par l'antigène associé aux lymphocytes cutanés (CLA). CLA est une molécule inducible dont la structure correspond à une glycosylation modifiée de PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (Fuhlbrigge RC, 1997). Le ligand de CLA est la E-sélectine. L'expression de CLA par les lymphocytes T cutanés semble se limiter aux cellules mémoires (Bos JD, 1993). Néanmoins il est aujourd'hui admis que le tropisme cutané des lymphocytes T est dirigé en grande partie par CLA.

Chez l'homme, le récepteur T (TCR) exprimé par les lymphocytes T cutanés est principalement du type  $\alpha/\beta$  (Foster CA, 1990), de rares lymphocytes T porteurs du récepteur de type  $\gamma/\delta$  sont malgré tout présents dans les couches basales de l'épiderme.

### **3.2 - Les cellules T dendritiques et épidermiques**

En ce qui concerne la répartition de l'expression du type de TCR, on observe la situation inverse chez la souris. En effet une population appelée cellules T dendritiques épidermiques (DETC) représentant 0,8 à 2,7% des cellules de l'épiderme a pu être identifiée (Bergstresser PR, 1983). L'existence de cette population chez l'homme n'est pas démontrée mais elle pourrait être assimilée aux lymphocytes T de type  $\gamma\delta$  recrutés dans la peau (Bergstresser PR, 1993). Elle porte le marqueur Thy-1 des lymphocytes immatures et dérive de la moelle osseuse. Contrairement aux cellules de Langerhans, elle n'exprime pas de molécules du CMH de classe II et ne possède pas de granules de Birbeck. Elle diffère également des lymphocytes T matures par l'absence des marqueurs CD5, CD8 et CD4. Enfin, ces lignées expriment un TCR de type  $\gamma\delta$  en majorité composé des chaînes V $\gamma$ 3 et V $\delta$ 1 (Havran WL, 1989a) sans aucune diversité de jonction (Asarnow DM, 1988). La nature monoclonale des DETC implique que ces cellules reconnaissent probablement un nombre limité d'antigènes dans les épithélia kératinisés (Havran WL, 1989b). Les tissus connus pour héberger de telles cellules sont la peau, les intestins, les poumons, l'appareil génital, la langue et les glandes mammaires (Allison JP, 1991). Une majorité des lymphocytes T épidermiques murins sont donc de type  $\gamma\delta$ , ce qui diffère des données humaines.

#### 4 - Les cellules endothéliales microvasculaires

Les veinules postcapillaires constituent un site spécialisé de capture et de sortie des lymphocytes. Un déterminant majeur du comportement des leucocytes à ce niveau consiste en la complémentarité des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales et les leucocytes eux-mêmes. Le tableau 5 résume les principales molécules d'adhésion qui participent à la dynamique d'extravasation des leucocytes au travers des cellules endothéliales. La plupart de ces molécules a une expression induite par des médiateurs inflammatoires tels que des cytokines ou des produits bactériens afin de recruter au moment souhaité des leucocytes particuliers.

**Tableau 5** D'après Williams (Williams IR, 1996).

---

#### Molécules d'adhésion régulant les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales dermiques

---

Molécule endothéiale d'adhésion	Ligands leucocytaires
E-sélectine	Sialyl-Le <sup>x</sup> , CLA, ESL-1
P-sélectine	Sialyl-Le <sup>x</sup> , PSGL-1
ICAM-1	LFA-1, MAC-1
ICAM-2	LFA-1, MAC-1
VCAM-1	VLA-4

Les cellules endothéliales ont aussi la possibilité de jouer un rôle dans la présentation des antigènes. En effet, comme les kératinocytes, les cellules endothéliales expriment des molécules de classe II du CMH après stimulation par l'IFN-γ (Pober JS, 1986). Par contre l'expression de molécules de costimulation qui fourniraient le second signal nécessaire à une activation complète des cellules T n'est pas encore clairement démontrée (Murray AG, 1994; Savage CO, 1991; St LJ, 1993).

La colocalisation commune de lymphocytes T, de mastocytes, de cellules dendritiques dermiques, de monocytes et de macrophages à proximité des veinules post-capillaires dermiques constitue un environnement immun particulier. La proximité de ces types cellulaires et le fait qu'ils aient déjà pénétré le tissu, leur confère une disponibilité rapide sur les lieux de réponse immune cutané.

## **5 -Les terminaisons nerveuses cutanées et leur rôle immunomodulateur.**

De nombreux neurones présents dans la peau sont capables de synthétiser différentes molécules nommées neuropeptides (Eedy DJ, 1993; Lotti T, 1995). Certains neuropeptides influencent les réponses inflammatoires et immunes dans la peau par leur action sur les cellules endothéliales, les leucocytes et les kératinocytes. Les deux neuropeptides les plus décrits pour leurs effets immunorégulateurs sont la substance P et le CGRP (calcitonin gene related peptide). La substance P agit sur les cellules endothéliales en augmentant leur perméabilité et la vasodilatation (Lotti T, 1995). En réponse à la substance P, les mastocytes dégranulent et produisent du TNF- $\alpha$  (Ansel JC, 1993). Les LC sont aussi particulièrement influencées par les neuropeptides et notamment par le CGRP qui interfère avec leur fonction de présentation (Hosoi J, 1993). Il est de plus intéressant d'observer qu'il existe un réseau d'axones non-myélinisés reliant les cellules immunes du derme et de l'épiderme, susceptible de jouer un rôle fonctionnel dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité cutanée (Egan CL, 1998). Enfin les kératinocytes sont capables de produire des neuropeptides tels que l' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) et l'ACTH (adenocorticotropic hormone) (Schauer E, 1994).

Les interactions entre les cellules du système immunitaire cutané sont donc particulièrement complexes. Les partenaires cellulaires, les médiateurs produits (cytokines, neuropeptides, etc) et la fascinante dynamique de fonctionnement de la réponse immune font de la peau, en association avec les ganglions drainant, un organe immunologiquement compétent participant pleinement à la réponse immunitaire de l'organisme.

## CHAPITRE II

### L'INTERLEUKINE-7

#### I - GENERALITES

La découverte et la caractérisation en 1988 de l'interleukine-7 (IL-7) (Goodwin RG, 1989; Namen AE, 1988b) sont nées des recherches portant sur les mécanismes de contrôle mis en jeu dans les premiers stades de différenciation des progéniteurs lymphoïdes au sein des tissus hématopoïétiques (Kincade PW, 1989). L'analyse approfondie du système de culture à long terme de cellules médullaires totales de souris, initialement développé par Whitlock et Witte a permis de montrer que le maintien de la croissance des précurseurs lymphocytaires B dépend de la présence d'une sous-population bien définie : les cellules adhérentes stromales de la moelle osseuse (Goodwin RG, 1989; Hunt P, 1987). Sur la base de ces travaux, Namen et ses collaborateurs ont pu isoler un facteur soluble produit par ces cellules stromales, responsable à lui seul de l'induction de la croissance des précurseurs lymphocytaires B (Goodwin RG, 1989; Namen AE, 1988b). Ce facteur a été purifié et identifié : c'est une glycoprotéine dénommée « lymphopoitin-1 » ou LP-1, formée d'une unique chaîne polypeptidique d'une masse moléculaire de 25 kDa. LP-1 est appelée IL-7 depuis son identification en tant que membre de la famille des cytokines.

A l'image des autres cytokines, l'IL-7 présente un caractère pléiotrope : découverte sur la base de son implication dans l'ontogénèse des lymphocytes B, elle apparaît également jouer un rôle central dans le développement intra-thymique des précurseurs lymphocytaires T ainsi que plus généralement dans le cadre des réponses immunitaires et anti-tumorales.

## II - CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET GENETIQUES DE L'INTERLEUKINE-7 ET DE SON RECEPTEUR

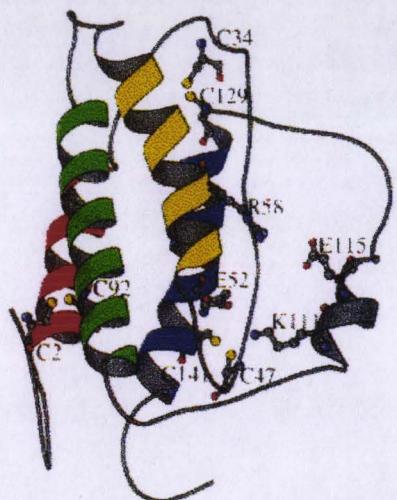
### 1 - Analyse structurale de l'IL-7 recombinante

L'ADN complémentaire obtenu à partir de l'ARN messager synthétisé par une lignée stromale médullaire murine a permis de produire par génie génétique une molécule recombinante d'IL-7 contenant 154 acides aminés (Namen AE, 1988a). L'ensemble des 25 premiers acides aminés situés à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine constitue une région hydrophobe ou "séquence signal" caractéristique des protéines sécrétées. La masse moléculaire théorique de la molécule mature d'IL-7, calculée sur la base de la connaissance de l'ADN complémentaire, est de 14,9 kDa, donc inférieure d'environ 10 kDa à celle de la protéine native purifiée correspondante. Cette différence peut être expliquée au moins en partie par la mise en évidence de 2 sites potentiels de N-glycosylation qui pourraient permettre à la protéine native d'exister sous une forme glycosylée.

Enfin, l'analyse de la séquence du gène de l'IL-7 a permis de vérifier l'existence de 6 résidus cystéines dont la localisation est susceptible de permettre la formation de ponts disulfures intra-caténaires. Récemment une modélisation a pu être élaborée par Kroemer *et al.* (Kroemer RT, 1996a) (**planche 5**). On observe un degré d'homologie de 60% entre les molécules d'IL-7 recombinantes murine et humaine. En particulier, les sites potentiels de N-glycosylation ainsi que les résidus cystéine sont conservés à la fois dans leur nombre et leur localisation (Lupton SD, 1990). Ces données sont en accord avec le fait que sur le plan biologique, il existe une réaction croisée de l'IL-7 entre les deux espèces (Goodwin RG, 1989). Les principales caractéristiques de l'IL-7 humaine et murine sont comparées dans le **tableau 6**.

### 2 - Le gène de l'IL-7 et sa transcription

L'IL-7 humaine est le produit d'un gène unique localisé dans la région proximale du bras long du chromosome 8. Le clonage de l'ADN génomique a permis de révéler un cadre ouvert de lecture, contenant 6 exons distribués sur une longueur totale d'environ 66 kilobases (Lupton SD, 1990). Le fait que le 5<sup>ème</sup> exon soit absent chez la souris explique la différence de masse moléculaire entre les protéines d'IL-7 murine et humaine.



### Planche 5

#### Modélisation tridimensionnelle de l'interleukine-7 humaine

L'interleukine-7 est constituée de quatre hélices  $\alpha$  schématisées en couleur, les trois ponts di-sulfures putatifs sont représentés. D'après Kroemer (Kroemer RT, 1996a).

**Tableau 6** D'après Herbelin (Herbelin A, 1996).**Principales caractéristiques de l'Interleukine-7**

Caractéristiques	IL-7 murine	IL-7 humaine
Localisation chromosomique du gène	?	8q12-13
Exons (nombre)	5	6
Expression génique spontanée	oui	oui
Séquence "peptide signal"	oui (25)*	oui (25)*
Acides aminés (nombre)	129	152
Masse moléculaire théorique (kDa)	14,9	17,4
Masse moléculaire de la forme naturelle (kDa)	25	?
Sites potentiels de N-glycosylation (nombre)	2	2
Résidus cystéines (nombre)	6**	6**
Forme associée à la membrane	?	?

\* nombre d'acides aminés composant la séquence "peptide signal". \*\* la localisation de ces résidus est compatible avec la formation de ponts disulfures intra-caténaires.

On remarque une grande homologie de séquence non seulement au sein des 4 premiers introns et exons mais également dans la région non codée correspondant au promoteur (73% d'identité). Au total, huit sites potentiels d'initiation de la transcription ont pu être localisés à l'intérieur d'une région de 200 paires de bases, située directement en amont du site d'initiation le plus probable. Cette région qui est hautement conservée entre la souris et l'homme apparaît jouer un rôle important puisque la transfection dans des cellules de mammifère COS, tant du gène humain que du gène murin préalablement déleté de cette région, aboutit à une augmentation substantielle du niveau d'expression de la molécule d'IL-7 (Namen AE, 1988a).

De manière intéressante, aucune des séquences classiques de régulation (boîtes TATA et CAAT) connues pour contrôler la synthèse d'ARN messager de nombreuses cytokines dont l'expression génique est de type inductible, n'a pu être identifiée au sein du promoteur des gènes humain et murin codant pour l'IL-7. En fait, comme en témoignent les travaux de Lupton *et al.* (Lupton SD, 1990), le promoteur de l'IL-7 présente une organisation particulière. Ainsi, certains sites de liaison, également retrouvés dans le promoteur de différents gènes connus pour ne pas contenir de séquence de régulation de type boîte TATA ou CAAT, ont pu être mis en évidence dans la région du promoteur du gène de l'IL-7. Cependant, ces zones pourraient ne pas jouer un rôle déterminant dans le contrôle de l'expression du gène de l'IL-7 ; en effet, certains sites ne sont pas présents dans le promoteur humain et plusieurs autres ne sont pas retrouvés dans le gène murin. Finalement, dans la région directement en amont du site d'initiation de la transcription, plusieurs séquences hautement conservées pourraient servir de sites de liaison à une classe de protéines récemment découvertes et nommées "helix-loop-helix DNA-binding proteins" (Lupton SD, 1990). Il reste cependant à tester expérimentalement l'implication de ces séquences particulières dans la régulation transcriptionnelle du gène de l'IL-7. Celle-ci semble en effet relativement complexe puisqu'il faut ajouter à l'organisation des régions d'initiation que nous venons de décrire, la possibilité de synthétiser quatre transcrits de tailles différentes (2.9, 2.6, 1.7 et 1.5 kb) dans certains tissus (dont le thymus), alors qu'on ne détecte que les produits de transcription de 2.9 et 2.6 kb dans le rein (Namen AE, 1988a) et dans l'épithélium intestinal (Madrigal EL, 1997).

Lorsque la protéine est produite et secrétée, son interaction avec le récepteur spécifique exprimé à la surface de types cellulaires définis permet la régulation de diverses fonctions biologiques.

### **3 - Le récepteur de l'IL-7**

#### **3.1 - Distribution cellulaire**

Dans le système murin, l'expression de récepteurs spécifiques de l'IL-7 (IL-7R) a pu être mise en évidence à la surface de l'ensemble des types cellulaires sur lesquels l'IL-7 a été reconnue exercer une action biologique (Park LS, 1990) : il s'agit principalement des lignées pré-lymphocytaires B, mais également de suspensions thymocytaires, ganglionnaires ou spléniques ainsi que de certaines lignées lymphocytaires T qui prolifèrent en réponse à l'IL-7. Inversement, il a pu être vérifié que des lignées cellulaires d'origine lymphocytaire B, présentant des caractéristiques phénotypiques de maturation (lymphome, myélome) ainsi que des suspensions de lymphocytes B matures purifiés sur lesquels l'IL-7 n'exerce aucune activité biologique connue, n'expriment pas de récepteur spécifique de cette cytokine. Enfin et de manière intéressante, un taux d'expression élevé de l'IL-7R a pu également être mis en évidence à la surface de certains types cellulaires d'origine macrophagique et, en particulier, de suspensions de macrophages médullaires, laissant donc supposer que l'IL-7 pourrait agir sur un plus large spectre de cellules qu'initialement décrit et en particulier au sein du compartiment myéloïde.

Dans le système humain, peu de travaux ont été réalisés. On sait que les lymphocytes T circulants fraîchement isolés (Armitage RJ, 1991) ainsi que des cellules lymphoblastiques précurseurs B et T de leucémies aiguës (Touw I, 1990) expriment à leur surface l'IL-7R. Enfin une lignée épithéliale de la muqueuse intestinale exprime aussi le récepteur dans certaines conditions d'activation (Yamada K, 1997).

#### **3.2 - Modulation de l'expression membranaire et forme soluble**

Si de nombreux types cellulaires expriment constitutivement l'IL-7R, peu de données existent à ce jour à propos de la modulation du nombre et/ou de l'affinité de ce récepteur. On note toutefois que le PMA (phorbol myristyl acétate) ainsi que l'IL-7 elle-même induisent une diminution du nombre de récepteurs à la surface de lymphocytes T de phénotype CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Armitage RJ, 1991). Le fait que la maturation des lymphocytes pré-B en lymphocytes B s'accompagne d'une perte de l'expression de l'IL-7R, montre également qu'il existe des mécanismes de régulation de l'expression de ce récepteur.

L'existence d'une forme soluble de l'IL-7R capable de se fixer spécifiquement à l'IL-7 a pu être supposée grâce à la mise en évidence d'ARN messagers spécifiques codant exclusivement pour le domaine extra-membranaire du récepteur et synthétisés par des cellules périphériques mononucléées humaines (Goodwin RG, 1990). Il est aujourd'hui possible d'identifier et de quantifier cette forme soluble dans des surnageants de cultures. On suppose que l'épissage alternatif de l'ARN messager de l'IL-7R aboutissant à la libération de la protéine correspondante dans sa forme soluble pourrait constituer un mécanisme essentiel de la modulation de l'expression membranaire de ce récepteur.

### 3.3 - Structure et caractéristiques

L'IL-7R est constitué d'au moins deux sous-unités; la chaîne  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) et la chaîne  $\gamma$  ( $\gamma c$ ). Les récepteurs des cytokines partagent souvent une sous-unité commune et conservent une sous-unité spécifique propre. Cinq récepteurs de cytokines (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R et IL-15R) possèdent une sous-unité commune : la chaîne  $\gamma$ . Cette particularité est d'ailleurs en partie responsable de la redondance d'activité de ces cytokines. La chaîne  $\gamma$  joue ainsi un rôle fondamental dans le développement lymphoïde et la régulation du système immunitaire (Di Santo JP, 1995).

Des études biochimiques montrent l'existence de trois types de récepteurs, caractérisés par l'affinité de liaison à l'IL-7. Un complexe de composition encore inconnue fixe l'IL-7 avec une faible affinité, un second complexe d'affinité intermédiaire est formé par la chaîne  $\alpha$  seule, enfin une liaison de forte affinité peut-être établie avec l'association des chaînes IL-7R $\alpha$  et  $\gamma c$ . (He YW, 1998). Des études de liaison sur l'IL-7R à partir de cellules stromales ont permis d'identifier un complexe de faible affinité et un second de forte affinité (Kondo M, 1994). Dans les deux cas la nature du récepteur de faible affinité reste inconnue et pourrait donc impliquer un composant supplémentaire. La chaîne  $\alpha$  du récepteur semble être partagée par une autre molécule; le récepteur de la lymphopoïétine du stroma thymique (TSLP) (Friend SL, 1994). Ce facteur de croissance est lui aussi capable d'induire la prolifération et la différenciation des progéniteurs des cellules B.

La chaîne  $\alpha$  ainsi que la chaîne  $\gamma$  appartiennent à la super famille des récepteurs de cytokines. Ces sous-unités sont des glycoprotéines possédant un unique domaine trans-

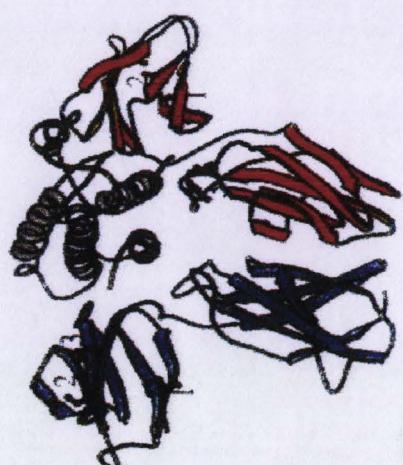
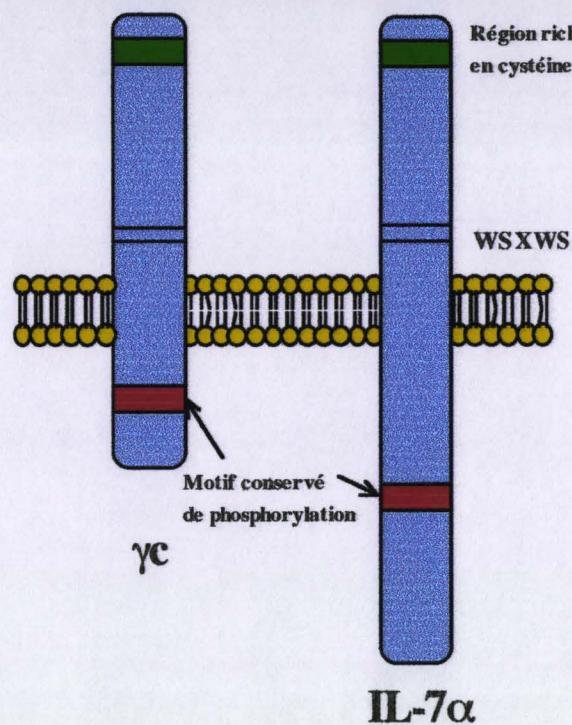
membranaire hydrophobe. Le domaine extracellulaire présente deux régions majeures d'homologie de la famille. Une région localisée dans la partie N-Terminale du domaine extracellulaire contenant 4 résidus cystéines constitue le premier domaine (IL-7R $\alpha$  ne contient que 2 résidus). Sur la base de la structure des récepteurs aux hormones de croissance, on suppose que des ponts disulfures intracaténaires relient le premier et le deuxième résidus cystéine ainsi que le troisième et le quatrième résidus. La seconde région d'homologie possédant une séquence conservée caractéristique, formée d'un motif Trp-Ser-X-Trp-Ser (ou WSXWS) est localisée dans la région extra-membranaire à la frontière de la partie trans-membranaire de la molécule. Ces différents motifs interviennent en particulier dans la conformation tridimensionnelle du récepteur. Enfin des domaines Fibronectin-like ont aussi été identifiés toujours dans la partie extracellulaire, leur fonction n'est pas encore établie. Le domaine cytoplasmique de chaque chaîne intervient dans la signalisation du récepteur. Bien que ne possédant pas d'activité kinase propre, ils sont capables de recruter et d'activer des protéines kinases intracellulaires. La **planche 6** présente d'une part la structure tridimensionnelle du récepteur de l'IL-7 (A) et d'autre part une schématisation des régions décrites plus haut (B). Le **tableau 7** résume les principales caractéristiques de l'IL-7R.

### 3.4 - Transduction du signal

Lorsque l'IL-7 se fixe sur la chaîne  $\alpha$  dite de basse affinité, celle-ci s'associe avec la chaîne  $\gamma c$  et forme ainsi le récepteur dit de haute affinité. Ce processus, qui est indispensable à l'initiation de la réponse de la cellule dépend uniquement de la région extracellulaire du récepteur. La signalisation quant à elle fait intervenir des éléments de la région intracellulaire de  $\gamma c$  et de l'IL-7R $\alpha$ . La signalisation de nombreuses cytokines dont celles partageant la  $\gamma c$  implique des cascades de phosphorylation de résidus tyrosines et fait intervenir des tyrosines kinases appelées JAK (ces mécanismes ont été décrits en détail par Demoulin et al. (Demoulin JB, 1998). La chaîne  $\alpha$  de l'IL-7R active JAK1 alors que la chaîne  $\gamma c$  fait intervenir JAK3. Les interactions entre JAK et les chaînes de récepteurs sont encore mal connues. Des motifs conservés riches en proline appelés Box 1 et Box 2, situés dans la région proximale de la partie intracellulaire du récepteur, sont indispensables à l'activation de JAK. L'activation des JAK résulte de la dimérisation des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  du récepteur sous l'action de l'IL-7 qui

pourrait aboutir à une phosphorylation croisée de JAK1 et JAK3 préalablement fixées sur chaque chaîne.

La réalité de ce modèle est encore à démontrer et l'on pense que JAK3 pourrait être en fait l'initiateur de la cascade de phosphorylation et que JAK1 aurait un rôle amplificateur. Dans ce cas, l'unique rôle de  $\gamma c$  pourrait être de permettre d'amener JAK3 à proximité de JAK1 sur la chaîne  $\alpha$ . Une autre voie de transduction possible à partir de l'IL-7R met en jeu des tyrosines kinases de la famille SRC telles que Lck et Fyn. D'ailleurs l'indépendance de ces deux voies qui pourraient agir de manière séquentielle, n'est pas établie. Suite à l'engagement du récepteur et des kinases décrites ci-dessus, d'autres molécules possédant également des activités kinases sont recrutées et mises en jeu. Les protéines IRS-1 et IRS-2 s'associent à JAK1 et sont phosphorylées ce qui permet d'activer une protéine majeure de la transduction, la kinase 3-phosphatidylinositol (PI-3). Il faut noter qu'une association directe de PI-3 avec l'IL-7R $\alpha$  a été montrée. Enfin l'activation de PI-3 peut aboutir à la mise en jeu de deux sérine/thréonine protéine kinases B ou C qui mettent respectivement en jeu le facteur de transcription CREB et la voie des MAP kinases. Ceux-ci interviennent dans les phénomènes de prolifération. La **planche 7** représente la voie d'activation de PI-3. Une dernière voie parmi celles connues à ce jour fait intervenir des facteurs de transcription appelés STAT. Ils se lient directement aux phosphotyrosines du récepteur et sont phosphorylés à leur tour par JAK, ce qui aboutit à leur dimérisation. Les dimères de STAT migrent jusqu'au noyau et se lient à une séquence palindromique de type TTNCNNAA de l'ADN. L'IL-7R est susceptible d'activer STAT1, STAT3 et STAT5. La **planche 8** résume le modèle de transduction du signal par l'IL-7R.

**A****B**

### *Planche 6*

#### **Modélisation tridimensionnelle du récepteur de l'interleukine-7 humaine**

**A :** La chaîne  $\alpha$  du récepteur est représentée en bleu, la chaîne  $\gamma$  apparaît en rouge et l'IL7 en gris. Les régions extracellulaires se situent à gauche sur le graphe.

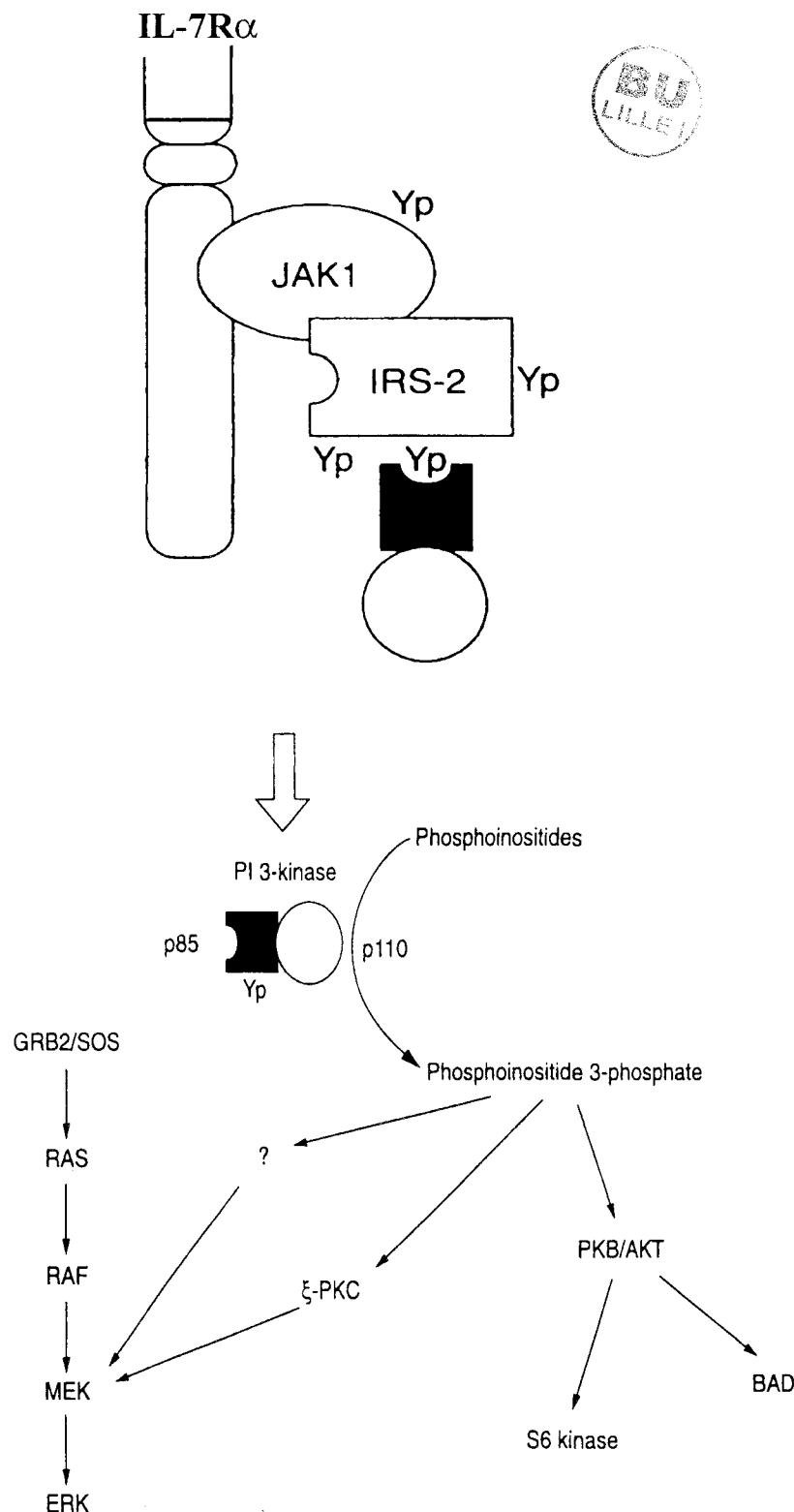
**B :** Schématisation et représentation des domaines du récepteur de l'IL-7.

D'après Kroemer (Kroemer RT, 1996b).

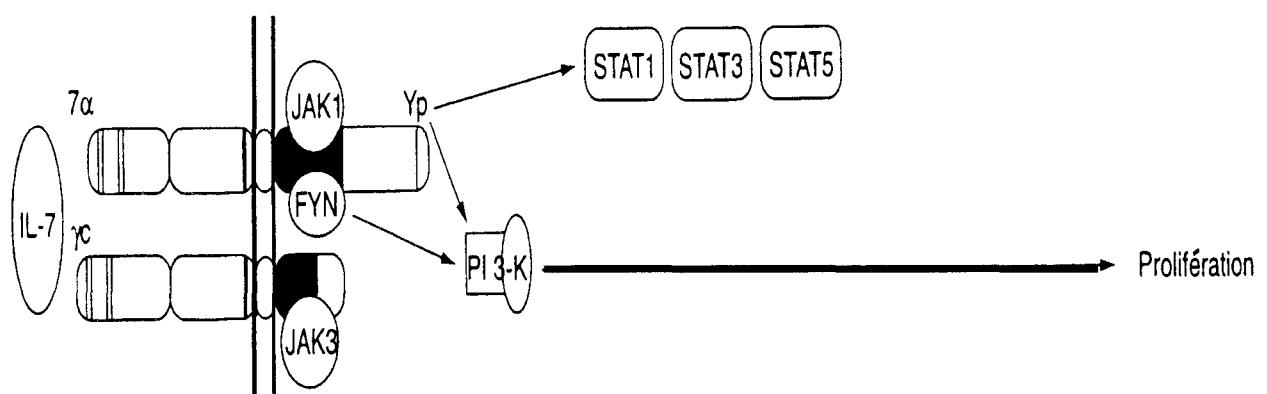
**Tableau 7** Adapté de Herbelin (Herbelin A, 1996).**Principales caractéristiques du récepteur de l'Interleukine-7 murine**

Caractéristiques	IL-7R- $\alpha$
Masse moléculaire théorique (kDa)	49,5
Sites potentiels de N-glycosylation (nombre)	9
Masse moléculaire de la forme naturelle (kDa)	65-75
Affinité ( $M^{-1}$ )	$1.10^8$
Expression	constitutive (inductible?)
Forme soluble	détectable
Appartenance	hématopoïétique #
Particularité	2 cystéines (au lieu de 4)

# super-famille des récepteurs des hématopoïétines (également dénommée super-famille des récepteurs des cytokines)

*Planche 7*

Mécanisme d'activation de la voie PI-3. D'après Demoulin (Demoulin JB, 1998).



### Planche 8

Transduction du signal par le récepteur de l'IL-7. D'après Demoulin (Demoulin JB, 1998).

### **III - SOURCES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE-7**

#### **1 - Sources**

Les cellules stromales de la moelle osseuse furent le premier type cellulaire décrit pour sa capacité à produire de l'IL-7 (Goodwin RG, 1989; Hunt P, 1987). Depuis, on a pu mettre en évidence cette synthèse par de nombreuses autres cellules de types et d'origines très variés. Les épithélia et les endothélia participent notamment à cette production. La présence d'ARNm spécifique de l'IL-7 a été parfois détectée dans certains tissus même si la source cellulaire n'a pas encore pu être identifiée. Le **tableau 8** rassemble toutes les sources cellulaires et tissulaires de l'IL-7 connues à ce jour.

#### **2 – Activités biologiques**

Bien que tout d'abord décrite en tant que facteur capable d'induire la prolifération des progéniteurs des lymphocytes B, l'IL-7 est maintenant reconnue comme cytokine intervenant non seulement dans le développement des lymphocytes B mais aussi dans celui des lymphocytes T. La connaissance de l'activité pléiotrope de l'IL-7 n'a cessé de prendre de l'ampleur ces dernières années. Elle intervient donc au cours des lymphopoïèses B et T, dans la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes T, dans la régulation de la synthèse de certaines cytokines par les monocytes/macrophages et enfin possède des effets immunomodulateurs sur les cellules non-hématopoïétiques.

##### **2.1 - Rôle de l'IL-7 dans le développement et la différenciation des cellules de la lignée lymphoïde**

Le principal effet de l'interleukine-7 sur les cellules de la lignée B est la stimulation de la prolifération des précurseurs précoces des lymphocytes B (Namen AE, 1988b). Les cellules dites pro-B et pré-B prolifèrent en réponse à l'IL-7 et en l'absence de cellule stromale. Les cellules B matures ne prolifèrent pas en réponse à l'IL-7 seule (Park LS, 1990), cependant un effet synergique peut être observé dans des conditions de cultures déterminées (Joshi PC, 1991).

**Tableau 8** Adapté d'après Appasamy  
(Appasamy PM, 1993).

**Types cellulaires et tissus humains capables de produire l'interleukine-7**

Sources	Protéine	ARNm
Cellules stromales de la moelle osseuse	+	+
Macrophages (Candinas D, 1996)	+	+
Plaquettes sanguines (Soslau G, 1997)	?	+
Cellules épithéliales thymiques en culture	+	+
Thymus foetal	+	+
Thymus adulte	?	+
Cellules endothéliales (Roye O, 1998)	+	+
Cellules épithéliales intestinales	+	+
Cellules de Sézary	?	+
Kératinocytes	+	+
Rate	?	+
Reins	?	+
Foie Foetal	?	+
Hépatocytes (Stonans I, 1999)	?	+

? indique que la présence de la protéine de l'IL-7 n'a pas été documentée à ce jour.

Enfin il a pu être conclu que les signaux requis pour la croissance des précurseurs lymphocytaires B et, en particulier, ceux délivrés par l'IL-7 sont strictement dépendants des différents stades d'expression des gènes codant pour les immunoglobulines (notamment la chaîne lourde  $\mu$  et la chaîne légère  $\kappa$ ) (Era T, 1991).

L'IL-7 induit aussi la croissance des thymocytes fœtaux et adultes en culture (Suda T, 1991; Watson JD, 1989). A cet effet proliférateur de l'IL-7 sur les thymocytes fœtaux s'ajoute un rôle différentiateur, notamment en ce qui concerne l'expression des gènes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  du TCR des cellules pré-T de foie fœtal (Appasamy PM, 1992) et le réarrangement V(D)J du gène  $\beta$  du TCR; dans ce cas l'IL-7 contrôlerait l'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 (Muegge K, 1993). Une preuve supplémentaire du rôle crucial de l'IL-7 dans la maturation des lymphocytes T a été apportée par l'utilisation de souris nude transgéniques surexprimant l'IL-7. En effet chez les souris athymiques, le développement des lymphocytes T est empêché par l'absence d'environnement thymique normal. Or les souris nude transgéniques pour l'IL-7 ne présentent plus cette déficience; l'activation et la prolifération des lymphocytes T sont alors rétablies (Rich BE, 1995). Les principales implications de l'IL-7 dans la lymphopoïèse T chez la souris sont les suivantes (Herbelin A, 1996; Namen AE, 1998) :

- ⇒ Maintien en survie et différenciation de la population lymphocytaire T immature appelée « triple négative » CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>.
- ⇒ Rôle de facteur de croissance pour les thymocytes matures CD3<sup>+</sup> dits « doubles négatifs » car n'exprimant ni le marqueur CD4, ni le marqueur CD8 indépendamment de la présence de mitogène et d'autres cytokines.
- ⇒ Développement intra et extrathymique de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Laky K, 1998; Schleussner C, 1991).

## **2.2 - Rôle de l'IL-7 sur le développement et la fonction des cellules de la lignée myéloïde**

Les effets de l'IL-7 ont été étendus aux cellules de la lignée myéloïde. L'IL-7 n'agit pas seule mais en présence d'autres facteurs de croissance et est alors capable d'induire la prolifération de progéniteurs de macrophages et de granulocytes (Fahlman C, 1994; Jacobsen

FW, 1994). Par ailleurs des monocytes humains issus du sang périphérique répondent à l'IL-7 en sécrétant de l'IL-1 $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  et acquièrent des capacités tumoricides renforcées (Alderson MR, 1991). L'expression de la protéine inflammatoire MIP-1 $\beta$  par les monocytes est stimulée par l'IL-7 (Ziegler SF, 1991). Ces études suggèrent un rôle de cette cytokine dans la modulation de la réponse immune inflammatoire et dans l'activité anti-tumorale par l'activation des monocytes périphériques.

### **2.3 - Rôle de l'IL-7 sur la croissance et la fonction des cellules T matures périphériques**

Il est bien établi que l'IL-7 exerce aussi ses actions sur les lymphocytes T matures, non seulement au sein du compartiment thymique, mais également au sein des tissus lymphoïdes périphériques. Ainsi, chez la souris, elle participe à l'expansion *in vitro* des lymphocytes T de la rate et des ganglions (Chazen GD, 1989; Grabstein KH, 1990; Morrissey PJ, 1989). Des résultats équivalents ont été obtenus à partir des lymphocytes T humains circulants (Londei M, 1990). Dans tous les cas, l'IL-7 agit à la fois sur les cellules à action auxiliaire et cytotoxique, de phénotype CD4 $^+$  et CD8 $^+$ . Chez l'homme, il a aussi été proposé que les lymphocytes mémoires de phénotype CD45RO soient meilleurs répondeurs que les lymphocytes naïfs de phénotype CD45RA (Welch PA, 1989).

Deux principaux modes d'action sont attribués à l'IL-7 : cette cytokine agit sur les lymphocytes matures activés en tant que facteur de croissance et également sur les lymphocytes matures au repos mais cette fois-ci en association avec des facteurs stimulant la production d'IL-2.

Différentes molécules de co-stimulation exprimées à la surface des cellules sont impliquées dans le développement de la réponse immune. L'IL-7 est capable de jouer un rôle important dans l'adhésion entre les cellules et donc dans l'activation qui en dépend, par le biais des systèmes de co-stimulation. En effet l'IL-7 induit l'expression de B7/BB1 (ou B7-1) par des cellules T périphériques humaines en culture (Yssel H, 1993), de plus cette cytokine intervient positivement dans les phénomènes d'adhésion impliquant les marqueurs CD2 et CD28 (Costello R, 1993). Enfin l'expression de LFA-3 est aussi augmentée par l'IL-7 à la surface des lymphocytes T (Costello RT, 1999). La viabilité des lymphocytes T activés est renforcée en présence d'IL-7 qui permet le maintien de l'expression de bcl-2 et du CD25

(IL-2R $\alpha$ ), ce qui aboutit à diminuer la mort par apoptose (Hernandez CT, 1995). Enfin, la synthèse du récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23 ou FC $\epsilon$ RII) par les lymphocytes T activés est sous la dépendance de l'IL-7 (Carini C, 1996); cet effet de l'IL-7 est associé à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion LFA-1 et VLA-4 (Fratazzi C, 1996; Fratazzi C, 1997b) et des molécules HLA-DR du CMH de classe II (Fratazzi C, 1997a) par les lymphocytes T CD4 $^{+}$  et CD23 $^{+}$ . En présence d'IL-7 le profil de production de cytokines par ces cellules activées est de type Th2 (Fratazzi C, 1997a). D'autres résultats viennent confirmer cela puisqu'il a été récemment montré que la commutation isotypique vers les isotypes IgE et IgG4 était renforcé par l'IL-7 via la synthèse d'IL-9 et de CD23 soluble (Jeannin P, 1998).

#### **2.4 - Rôle de l'IL-7 sur les cellules à activité cytotoxique**

L'hypothèse d'un rôle central de l'IL-7 dans la réponse immunitaire a pu être élargie en montrant que cette cytokine est active sur les populations cellulaires effectrices des réponses cytotoxique et anti-tumorale. Les lymphocytes T cytotoxiques (Cytotoxic T Lymphocytes - CTL) sont des cellules participant activement aux réponses immunologiques antivirales et antitumorales. La plupart des CTL sont des lymphocytes T qui expriment le marqueur CD8 (CD8 $^{+}$ ) et reconnaissent des peptides antigéniques de petite taille (8 à 12 résidus) liés aux molécules de classe I du CMH (exprimées sur la plupart des cellules mononucléées) et présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Environ 10 % des cellules T cytotoxiques sont CD4 $^{+}$  et leur activité est restreinte aux molécules de classe II. Lorsque les CTL reconnaissent les complexes spécifiques Ag/CMH exprimés à la surface des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales, ils peuvent lyser leur cible et sécréter simultanément un nombre important de cytokines à action paracrine ou autocrine. D'autres cellules cytotoxiques ont la propriété de lyser les cellules de façon non spécifique et indépendamment du CMH. Elles comprennent:

- ⇒ les Natural Killer (NK) présentes normalement dans la rate et dans le sang circulant.
- ⇒ les cellules LAK (Lymphokine Activated Killer).
- ⇒ des populations hétérogènes possédant une activité cytotoxique non spécifique et qui se développent dans les cultures lymphocytaires mixtes.

L'IL-7 favorise la production des lymphocytes T humains du sang périphérique CD8<sup>+</sup> stimulés, (ainsi que leur activité cytotoxique) avec une efficacité similaire à celle de l'IL-2. Cependant, l'activité cytolytique maximale induite par l'IL-7 est retardée par rapport à celle de l'IL-2 et est en partie dépendante de celle-ci (Appasamy PM, 1993).

L'IL-7 est un puissant inducteur *in vitro* de l'activité des CTL, résultant en une activité antitumorale notamment lors de l'injection de ces CTL à des souris présentant un fibrosarcome (Komschlies KL, 1995). Dans ces expériences, l'IL-7 est plus efficace que l'IL-2 et/ou l'IL-4 pour l'induction de CTL *in vitro* chez la souris. De plus, des CTL injectés à des souris peuvent éradiquer des métastases pulmonaires de sarcome induit. Par ailleurs, des études concernant le mélanome malin ont montré l'activité antitumorale de CTL en présence d'IL-7.

Enfin, l'IL-7 favorise la réponse antivirale en augmentant la réponse CTL dirigée contre différents virus (virus influenza, HIV, HSV-1) (Fratazzi C, 1997c; Kos FJ, 1993; Wiryana P, 1997) et optimise de manière dose-dépendante la restimulation de précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de peptides viraux *in vitro* (Lalvani A, 1997).

## 2.5 - L'activité de l'IL-7 *in vivo*

La majeure partie des travaux qui ont permis de déterminer les activités biologiques de l'IL-7 a été réalisée *in vitro*. Néanmoins de nombreuses études *in vivo* dans le modèle murin ont pu confirmer le rôle physiologique essentiel de cette cytokine. L'injection d'IL-7 recombinante ou d'anticorps neutralisants l'IL-7 ou son récepteur ainsi que la génération de souris déficientes (ou knock-out (KO)) ou transgéniques pour l'IL-7 ont contribué à la découverte et à la confirmation des activités de l'IL-7 dans l'organisme.

Le modèle de souris déficientes en IL-7 a permis de démontrer une notion particulièrement importante: la non-redondance de l'IL-7 dans le développement des lignées lymphoïdes murines (Von-Freeden-Jeffry U, 1995). Ces animaux présentent une lymphopénie majeure et une diminution de la cellularité thymique de 99%. L'injection d'IL-7 par voie sous-cutanée chez la souris entraîne quant à elle des effets inverses, puisqu'une augmentation des prélymphocytes B médullaires est observée. Les populations de cellules B se trouvent également augmentées en périphérie, dans la rate et les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont présents en plus grand nombre dans le thymus et la rate

(Komschlies KL, 1995). De plus, l'étude des modèles de souris transgéniques surexprimant le gène de l'IL-7 apporte des résultats très similaires avec expansion des populations de cellules T et B souvent associée au développement de lymphomes (Mertsching E, 1995; Mertsching E, 1996; Mertsching E, 1998; Rich BE, 1993; Uehira M, 1993; Uehira M, 1998; Williams IR, 1997). Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'IL-7R $\alpha$  (Sudo T, 1993) ainsi que la délétion du gène codant cette chaîne (Peschon JJ, 1994) entraîne un blocage précoce dans le développement des lymphocytes T et B. Dans ce dernier modèle, on note une absence de lymphocytes T exprimant un TCR de type  $\gamma\delta$  (He YW, 1996).

## CHAPITRE III

### L'INTERLEUKINE-7 DANS LE CONTEXTE CUTANÉ

#### I - GENERALITES

Au sein du tissu cutané, l'IL-7 doit être considérée comme une molécule d'importance majeure.

Tout d'abord parce que parmi les cellules résidentes, on note au moins deux sources productrices de cette cytokine; les kératinocytes localisés dans l'épiderme et les cellules endothéliales situées dans le derme. La synthèse d'IL-7 peut être constitutive mais aussi inducible suite à un trauma ou à un contact antigénique. Différents types cellulaires cibles sont également présents dans la peau tels que les DETC, les mélanocytes, les lymphocytes T à tropisme cutané et enfin les kératinocytes eux-mêmes. L'étude des souris transgéniques pour l'IL-7 a d'ailleurs beaucoup apporté dans ce domaine.

D'autre part, l'activité en tant que facteur de croissance de l'IL-7 intervient dans la prolifération de cellules malignes à tropisme épidermique telles que les cellules de Sézary (Dalloul A, 1992; Foss FM, 1994). Dans d'autres types de pathologie, l'IL-7 pourrait amplifier les capacités cytotoxiques des cellules T ce qui pourrait être mis à profit notamment dans le traitement du mélanome.

Enfin dans d'autres types de troubles infectieux, l'IL-7 semble intervenir dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire.

#### II - INTERLEUKINE-7, KERATINOCYTES ET DETC

Les kératinocytes murins et humains expriment les ARN messagers de l'IL-7 et produisent la protéine correspondante à un niveau biologiquement significatif (Dalloul A, 1992; Heufler C, 1993). En effet, *in vitro*, des cultures de kératinocytes humains stimulés ou non, expriment de façon constitutive les ARN messagers spécifiques de l'IL-7. Une stimulation

de type PMA pourrait être indispensable pour les kératinocytes de souris (Heufler C, 1993). De plus, la sécrétion de la protéine est détectable dans les surnageants de culture, en faible quantité, mais suffisamment pour exercer une activité biologique. On sait de plus que la production d'IL-7 par la peau humaine est régulée positivement par l'IFN- $\gamma$  (Takashima A, 1995).

### **1 - Régulation de l'expression du gène de l'IL-7 par l'IFN- $\gamma$**

Les caractéristiques du gène de l'IL-7 murin décrites dans le Chapitre II (II. 2) sont assez remarquables et diffèrent des gènes des autres cytokines. Rappelons que les séquences de régulation transcriptionnelle sont encore mal connues et en tout cas non-conventionnelles, avec de nombreux sites potentiels identifiés. Il faut noter l'existence d'un épissage alternatif dont le rôle est encore inconnu (Madrigal EL, 1997). Enfin, le clone original d'ADN complémentaire d'IL-7 contient 8 codons potentiels d'initiation de la traduction dans la région 5' non traduite avec pour conséquence un faible niveau de traduction (Namen AE, 1988a). Il apparaît donc que la production d'IL-7 soit régulée de manière complexe par plusieurs mécanismes, à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel.

La régulation du gène de l'IL-7 a été étudiée à partir de cultures de kératinocytes. Les kératinocytes murins de la lignée PAM 212 expriment de manière constitutive deux principaux ARN messagers de l'IL-7 de 2.9 et 1.7 kb et deux transcrits mineurs de 2.6 et 1.5 kb. Lorsque les cellules sont incubées pendant quelques heures avec de l'IFN- $\gamma$ , les transcrits de 2.6 et 1.5 kb deviennent prédominants alors que l'expression des transcrits de 2.9 et 1.7 kb reste inchangée. L'IFN- $\gamma$  semble favoriser cette conversion par la stimulation d'un élément de réponse situé en amont de la séquence codante (Ariizumi K, 1995). Ces résultats indiquent l'existence d'une boucle de rétro-contrôle positif par laquelle les lymphocytes T résidents dans l'épiderme (DETC), connus pour sécréter de l'IFN- $\gamma$  après stimulation, ainsi que les lymphocytes T de type Th1 (également producteur d'IFN- $\gamma$ ), régulent de façon positive la production de leur propre facteur de croissance (l'IL-7) par les kératinocytes. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin d'évaluer la signification *in vivo* de ces mécanismes.

## 2 - L'IL-7 est un médiateur de la communication entre les kératinocytes et les lymphocytes T épidermiques

Les lymphocytes T dendritiques épidermiques (ou DETC) font partie de la famille des lymphocytes T du tissu épithéial. Ils expriment un récepteur T du type  $\gamma\delta$  (Bergstresser PR, 1983) et possèdent des activités puissantes de cellules tueuses vis-à-vis de cibles tumorales, dont des cellules de mélanome (Kaminski MJ, 1993). A l'image des kératinocytes et des cellules de Langerhans, les DETC sont capables de sécréter diverses cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, l'IL-3, et l'IL-4 (Havran WL, 1989b; Kuziel WA, 1987; Matsue H, 1993c; Schuhmachers G, 1995).

Des études ont montré l'étroite relation fonctionnelle existant entre l'IL-7 et les DETC.

### **2.1 - L'IL-7 produite par les kératinocytes favorise la croissance des DETC**

L'IL-7 produite par les kératinocytes constitue un facteur de croissance pour les DETC *in vitro* (Takashima A, 1995). La prolifération des DETC en réponse à l'IL-7 intervient de manière indépendante de l'IL-2 puisqu'un anticorps monoclonal anti-IL-2 ne l'inhibe pas (Matsue H, 1993a). De plus, la réponse proliférative en présence d'IL-2 est rapide mais transitoire, alors qu'en présence d'IL-7 elle est plutôt lente et continue. La prolifération induite par l'IL-7 est augmentée de façon synergique en présence d'IL-2, d'IL-4 ou de TNF- $\alpha$  (Matsue H, 1993b). Ainsi, l'IL-7 produite par les kératinocytes avoisinants pourrait augmenter les mitoses *in situ* des DETC activées, en réponse à un signal de "stress épidermique".

### **2.2 - L'IL-7 maintient les DETC en survie en empêchant la mort par apoptose**

Lorsque les DETC sont mises en culture en l'absence de facteur de croissance, elles subissent une mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire programmée). Lorsque de l'IL-7 est ajoutée aux cultures de DETC, l'apoptose spontanée n'est plus observée (Matsue H, 1993a). De plus, les corticostéroïdes ne peuvent induire l'apoptose en présence d'IL-7 exogène, indiquant que l'IL-7 prévient l'apoptose induite par des stimuli externes. Ainsi, l'IL-7 produite par les kératinocytes ne favorise pas seulement la prolifération des DETC mais accroît également leur survie. Ce concept pourrait s'appliquer à un mécanisme plus général impliquant

les lymphocytes T  $\gamma\delta$  distribués selon un large éventail de tissus épithéliaux chez la souris et chez l'homme. L'IL-7 produite par un nombre important de cellules pourrait ainsi permettre aux populations lymphocytaire T  $\gamma\delta$  de survivre dans leur tissu non-lymphoïde respectif.

### **2.3 - Les UVB régulent de façon négative l'expression des ARN messagers de l'IL-7 par les kératinocytes**

Les UVB déclenchent l'apoptose des DETC or, celle-ci est prévenue par l'IL-7. Une étude utilisant la lignée kératinocytaire murine PAM 212 a donc testé les capacités des kératinocytes à sécréter de l'IL-7 sous l'effet des UVB. Les résultats montrent que l'expression des ARN messagers de l'IL-7 par ces cellules est presque totalement abolie par une dose relativement basse d'UVB ( $100 \text{ J/m}^2$ ) (Takashima A, 1995). Ce phénomène est unique puisque l'irradiation par les UVB est connue pour augmenter la synthèse de nombreuses cytokines kératinocytaires incluant l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- $\alpha$  (Schwarz T, 1989). De plus, la déplétion *in situ* des DETC par les UVB peut être prévenue de manière significative par une injection locale d'IL-7 recombinante dans les sites de peau irradiée (Takashima A, 1995). Il apparaît ainsi que les UVB induisent une déplétion en DETC par au moins deux mécanismes : le déclenchement de l'apoptose et la régulation négative de la production d'IL-7 kératinocytaire qui, habituellement, prévient l'apoptose.

D'autre part, nous avons vu que l'IFN- $\gamma$  régule de façon positive l'expression des ARNm de l'IL-7, par les kératinocytes, par un mécanisme d'activation transcriptionnelle. Or, cet effet est totalement bloqué si les kératinocytes sont irradiés immédiatement avant la stimulation par l'IFN- $\gamma$  avec une dose d'UVB de  $250 \text{ J/m}^2$  (à titre comparatif, la dose érythémateuse minimale moyenne de la population caucasienne est comprise entre 300 et 1000  $\text{J/m}^2$ ). De plus, cet effet inhibiteur de la lumière ultraviolette sur l'IL-7 est dose dépendante (Aragane Y, 1997).

Ceci permettrait d'expliquer les effets bénéfiques de l'irradiation UVB sur de nombreuses dermatoses dans lesquelles on observe fréquemment une infiltration lymphocytaire T. La **planche 9** représente les principales interactions connues entre les DETC et les kératinocytes.

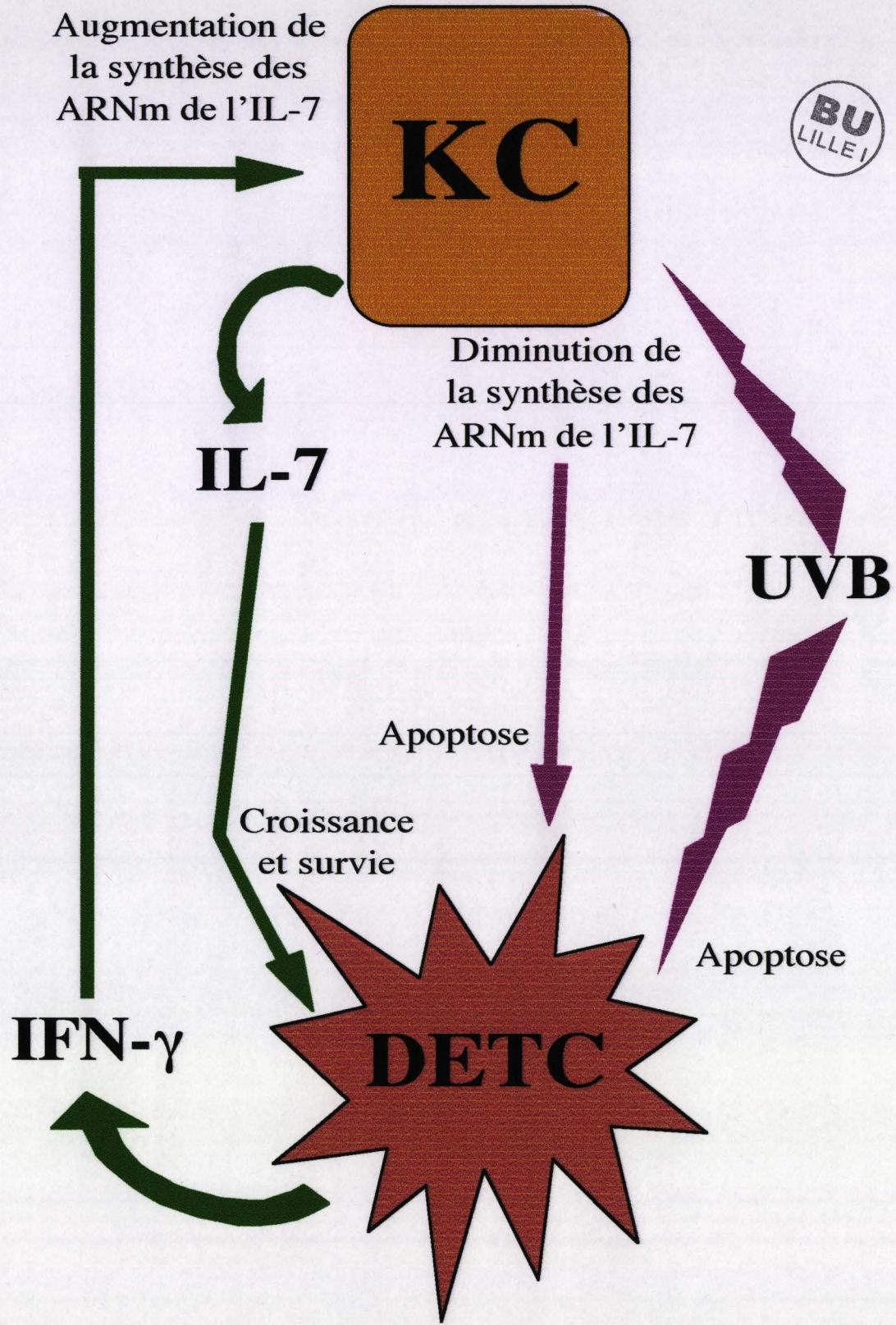


Planche 9

Relation entre les kératinocytes (KC) et les DETC; rôle de l'IL-7

### **III – PATHOLOGIE CUTANÉE : ROLE DE L’IL-7**

L'étude du rôle de l'IL-7 dans les pathologies cutanées malignes, allergiques, à caractères auto-immuns ou encore infectieuses a permis de montrer son implication en tant que facteur de croissance lymphocytaire et aussi en tant que modulateur de l'orientation de la réponse immune. Nous nous intéresserons principalement aux lymphomes cutanés T épidermotropes puis aux maladies infectieuses pour lesquelles l'implication de l'IL-7 est particulièrement importante et bien documentée.

#### **1 – Lymphomes cutanés T épidermotropes et souris transgéniques**

##### **1.1 – Lymphomes cutanés T épidermotropes**

Les lymphomes cutanés épidermotropes à cellules T sont des maladies très rares. Le syndrome de Sézary et le mycosis fongoïde sont les deux formes les plus fréquentes.

##### **A - Le syndrome de Sézary**

Le syndrome de Sézary est un lymphome cutané épidermotrope associant une lymphoadénopathie généralisée et une composante leucémique avec circulation de cellules malignes (cellules de Sézary) à un degré variable d'infiltration cutanée. Les infiltrats cutanés T sont composés de lymphocytes CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur à l'antigène de type  $\alpha\beta$  et le marqueur épidermotrope CLA (Broder S, 1976; Brouet JC, 1973; van Leeuwen AW, 1975). Plus rarement le TCR est de type  $\gamma\delta$ , ce qui est alors corrélé à un plus mauvais pronostic (Munn SE, 1996). Le profil de cytokines exprimées par ces lymphocytes de type Th2 (IL-4, IL-5), s'oppose à l'apparition de cellules cytotoxiques et serait responsable de l'expansion extracutanée rencontrée dans ce type de lymphome (Saed G, 1994).

L'IL-7 est un facteur de croissance connu pour les cellules malignes de leucémie aiguë lymphoblastique (Touw I, 1990). Dalloul *et al* (Dalloul A, 1992) ont montré l'implication de l'IL-7 sur une série de 12 patients atteints de syndrome de Sézary à un stade avancé. En effet, cette cytokine joue un rôle de facteur de croissance *in vitro* pour les cellules de Sézary issues du sang périphérique et induit ainsi une augmentation très significative de leur prolifération. De

plus, le maintien de la croissance de ces cellules *in vitro* est strictement dépendant de l'IL-7 (Thangavelu M, 1997). Par ailleurs, les surnageants de culture kératinocytaire favorisent la croissance de ces lignées de cellules de Sézary, cette action étant complètement bloquée par un Ac monoclonal anti-IL-7. Cela suggère un rôle paracrine de l'IL-7 dans la physiopathologie de lymphomes cutanés à cellules T. Aucune donnée n'a décrit l'implication des cellules endothéliales microvasculaires dermiques dans ce type de lymphome, mais l'on peut supposer que leur potentielle sécrétion d'IL-7 induit une prolifération lymphoblastique dès l'arrivée des cellules dans le tissu cutané, relayée ensuite par les kératinocytes.

Une étude ultérieure concernant 7 patients à un stade avancé de la maladie (Foss FM, 1994) a confirmé le rôle de l'IL-7 en montrant que les ARNm de l'IL-7 sont exprimés par les cellules de Sézary sanguines fraîchement isolées, de même que le récepteur de haute affinité pour l'IL-7 et le récepteur à l'IL-2. Cette double expression augmente lors de l'exposition à l'IL-7. En outre, la combinaison d'IL-2 et d'IL-7 favorise la prolifération des cellules de Sézary. Enfin, les ARNm de l'IL-7 sont détectés dans la peau lésionnelle, mais également dans la peau non lésionnelle des patients. Une hypothèse émise, grâce à cette observation, est que la présence accrue d'IL-7 en peau "normale" chez ces patients initierait la prolifération des cellules du syndrome de Sézary (expliquant ainsi leur épidermotropisme) et induirait le développement du lymphome. L'IL-7 pourrait, d'autre part, faire partie d'une boucle autocrine ou paracrine dans le réseau régulant la croissance des cellules de Sézary. Dans ce cas l'IL-7 participerait de manière prépondérante à l'initiation de la prolifération épidermique des lymphocytes et à son entretien.

## B - Le mycosis fongoïde

Trois stades successifs caractérisent le mycosis fongoïde : on distingue un érythème constitué de macules et de plaques cutanées érythémateuses qui évoluent lentement vers l'infiltration associée au second stade. Enfin apparaissent des plaques et des tumeurs nodulaires avec atteinte ganglionnaire assez précoce. La progression vers les organes profonds et le sang est assez tardive. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infiltrants expriment un profil de type Th1 (expression d'IL-2 et d'IFN-γ) (Saed G, 1994).

Contrairement au syndrome de Sézary, les ARNm de l'IL-7 sont présents en un nombre limité de copies et ne sont pas surexprimés dans les lésions cutanées du mycosis

fongoïde. De plus, l'expression de l'IL-7 n'augmente pas avec la progression du mycosis fongoïde. Compte tenu de l'importance de l'infiltrat lymphocytaire malin dans les lésions cutanées à un stade avancé, l'IL-7 n'est probablement pas un facteur de croissance autocrine pour les lymphocytes malins du mycosis fongoïde (Asadullah K, 1996). Ces résultats, opposés à ceux du syndrome de Sézary, n'excluent cependant pas le rôle potentiel de l'IL-7 dans la progression tumorale puisque l'IL-7 pourrait agir comme facteur de croissance paracrine sécrété par les kératinocytes, même à de très faibles concentrations.

Enfin, l'étude de l'expression du récepteur à l'IL-7 sur différents types cellulaires de ces lymphomes cutanés T avec épidermotropisme montre une large expression de celui-ci, mais qui ne serait pas corrélée à l'épidermotropisme de l'infiltrat cutané (Bagot M, 1996). Ceci suggère que l'IL-7 interviendrait donc plutôt dans la prolifération des lymphocytes malins que dans leur épidermotropisme.

## 1.2 – Les souris transgéniques pour l'IL-7

Le rôle d'une molécule endogène *in vivo* peut être étudié soit en l'éliminant soit en rendant son expression constitutive. Les modèles de souris transgéniques ont constitué un outil de choix pour rendre ces recherches possibles. L'utilisation de différents promoteurs a permis de répondre à de nombreuses questions biologiques qui n'auraient pu être résolues par d'autres moyens. Depuis 1991, plusieurs types de souris transgéniques pour l'IL-7 ont été décrits, exprimant de façon constitutive cette cytokine dans différents tissus, dont la peau (Mertsching E, 1995; Rich BE, 1993; Samardis J, 1991; Uehira M, 1993; Williams IR, 1997). Des différences phénotypiques sont observées dans chacun de ces modèles de souris transgéniques, ce phénomène est principalement lié à la localisation de l'expression du transgène, elle-même dépendante du promoteur choisi. Ainsi parmi les cinq types de souris transgéniques disponibles, trois présentent des anomalies cutanées importantes. En effet les animaux dont l'expression de l'IL-7 est devenue constitutive au niveau de la peau développent une dermatite associant prurit, érythrodermie, alopecie, parfois lymphoadénopathie et infiltrat lymphocytaire T massif surtout dans le derme et parfois dans l'épiderme. Il est important de noter que la gravité du phénotype est associée à l'expression homozygote du transgène et par conséquent à la quantité d'IL-7 présente dans le tissu cutané. Par contre, lorsque les cellules

cutanées n'expriment pas le transgène, on observe une expansion lymphocytaire T et B limitée aux organes lymphoïdes et une lymphocytose associée.

Il existe une période de latence avant le développement des manifestations dermatologiques dans les trois modèles de souris transgéniques à expression cutanée. Chez les souris IL-7/K14, le transgène est exprimé par les cellules épithéliales d'une manière générale (épithélium thymique, muqueux et cutané) et dans la peau par les kératinocytes basaux. Les premiers signes débutent à l'âge de deux semaines par une blépharite corrélée avec le début de l'apparition de l'infiltrat dermique (Williams IR, 1997). A trois semaines, il apparaît un érythème à distribution tronculaire et des plaques d'alopecie. Chez les souris homozygotes pour le transgène IL-7/K14, le phénotype apparaît plus tôt et est plus sévère avec des plaques d'alopecie beaucoup plus étendues révélant un infiltrat dense de lymphocytes dans le derme s'étendant jusqu'à l'épiderme. L'infiltrat est constitué de lymphocytes T, distincts des DETC, précurseurs des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ , exprimant le CD3 et un niveau intermédiaire de réarrangement du TCR (Williams IR, 1997). Ces lymphocytes ont une distribution préférentiellement périfolliculaire. Par contre, l'évolution de cet infiltrat bénin vers un lymphome T n'a pas été observé chez la souris IL-7/K14.

Pour les deux autres modèles de souris transgéniques, la période de latence est plus longue (environ 12 semaines pour les souris IL-7/E $\mu$ P $\mu$  hétérozygotes, et entre 3 à 60 semaines chez les souris IL-7/SR $\alpha$ ). Chez ces derniers animaux, l'infiltrat dermique est constitué de lymphocytes T doubles négatifs CD4 $^-$ CD8 $^-$  exprimant le TCR  $\gamma\delta$  et infiltrant également les organes lymphoïdes (Uehira M, 1993). De plus, les animaux IL-7/SR $\alpha$  présentant une dermatite ont des niveaux très élevés d'IgE sériques alors que le taux d'IgE sérique est normal chez les souris transgéniques pour l'IL-7 ne présentant pas d'anomalie cutanée (Uehira M, 1998). Enfin les souris IL-7/SR $\alpha$  développent une colite chronique marquée par un infiltrat de lymphocytes T CD4 $^+$  dans la lamina propria.

Les souris IL-7/E $\mu$ P $\mu$  présentent une alopecie d'extension progressive, avec histologiquement, une atrophie folliculaire, une hyperkératose et une hyperplasie épidermique, ainsi qu'un infiltrat dermique de lymphocytes T exprimant les marqueurs Thy-1, CD3 et CD5 et dont la maturation n'est pas thymodépendante. Il apparaît ensuite, dans un délai de 3 ou 4

mois un lymphome B ou T. De plus, ce phénotype peut être transmis de façon horizontale par greffe de peau à des souris saines indiquant une migration spécifique d'organe des cellules transgéniques. Ce phénomène de transmission horizontale par greffe n'apparaît pas chez les souris K14 provenant pourtant de la même souche. Ceci indique d'une part, que le fond génétique de la souris n'est pas un facteur contributif et, d'autre part, que la production autocrine d'IL-7 par les lymphocytes T cutanés chez les souris IL-7/E $\mu$ P $\mu$  favorise leur évolution en clones malins alors que la sécrétion paracrine d'IL-7 par les kératinocytes chez les souris IL-7/K14 ne prédispose pas à leur conversion maligne. Ainsi, le phénotype peut être transféré, de manière autonome, par les cellules mobiles de l'épiderme (probablement les lymphocytes infiltrants). De plus, cette étude montre de manière intéressante que l'IL-7 agit comme un oncogène dans l'organisme (Rich BE, 1993). Les similitudes existant parmi ces populations de souris transgéniques suggèrent l'expansion d'une même population de lymphocytes T exprimant un niveau intermédiaire de réarrangement du récepteur des lymphocytes T.

Enfin, il est assez frappant que le syndrome observé chez les souris transgéniques pour l'IL-7, bien que n'ayant pas d'équivalent précis chez l'homme, partage cependant des caractères communs à certains lymphomes cutanés T. D'un point de vue immunologique, les lymphomes cutanés humains expriment très fréquemment les marqueurs TCR  $\alpha\beta$ , CD3 et CD5 que l'on retrouve à la surface des cellules infiltrantes de certaines souris transgéniques pour l'IL-7 (Rich BE, 1993). C'est principalement l'absence totale ou partielle d'un infiltrat épidermique qui différencie ces animaux transgéniques des lymphomes cutanés humains. Au-delà de la compréhension du rôle joué par l'IL-7 dans la peau, ces modèles montrent que l'IL-7 est certainement impliquée de manière importante dans les pathologies cutanées malignes.

## **2 – Pathologies infectieuses cutanées**

### **2.1 - La lèpre**

La lèpre est une maladie infectieuse chronique cutanée, neurologique et systémique, due au bacille de Hansen ou *Mycobacterium leprae*. La transmission se fait par contact, direct ou indirect, ou par effraction cutanée du bacille. Après une période d'incubation variable (en moyenne de 2 à 7 ans), apparaissent des lésions d'aspects cliniques variés associées à des troubles de la sensibilité cutanée. Deux formes majeures reflétant le niveau d'immunité

cellulaire caractérisent d'une part la forme lépromateuse (immunité cellulaire faible) et d'autre part la forme tuberculoïde (immunité cellulaire forte). Ce modèle est particulièrement intéressant, dans la mesure où les manifestations cliniques sont directement corrélées à l'immunité à médiation cellulaire. Le rôle de l'IL-7, dans la régulation de l'immunité mise en place dans cette infection, a été étudié (Sieling PA, 1995). La capacité de l'hôte à se défendre avec succès contre ce pathogène intra-cellulaire dépend de la multiplication clonale de lymphocytes T spécifiques. L'IL-7 pourrait jouer un rôle important en tant qu'inducteur de la prolifération des cellules T. Tout d'abord cette étude montre que les ARNm de l'IL-7 et de son récepteur sont présents dans les lésions tuberculoïdes (à forte immunité cellulaire). Les kératinocytes traités par l'IFN- $\gamma$ , ainsi que les monocytes induits par l'IFN- $\gamma$  ou *Mycobacterium leprae* présentent un niveau de transcription des ARNm de l'IL-7 augmenté. Les lésions précoces de la lèpre apparaissant vraisemblablement dans l'épiderme, les kératinocytes pourraient jouer un rôle dans l'initiation de la réponse en facilitant l'immunité à médiation cellulaire T spécifique de l'antigène. Les kératinocytes peuvent en effet présenter des antigènes de *Mycobacterium leprae* aux cellules T CD4 $^{+}$  (Mutis T, 1993). La capacité des monocytes à tuer les pathogènes intracellulaires est probablement augmentée par l'IL-7. Des tests de prolifération *in vitro* ont permis de montrer que la réponse des cellules T à *Mycobacterium leprae* est dépendante de la production d'IL-7 et peut être stimulée par l'addition d'IL-7 recombinante. Enfin chez les patients lépreux à faible immunité cellulaire l'expression et la réponse à l'IL-7 est réduite. Par ailleurs, la production de cytokines de type Th1, telles que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ , est généralement associée à l'efficacité de l'hôte à limiter la croissance du pathogène, tel que *Mycobacterium leprae* (Yamamura M, 1991). Dans le cas présent cela signifie que la production d'IL-7 corrèle avec l'expression de cytokines de type I et donc avec la résistance à l'infection. Cet effet n'est certainement pas direct mais semble favoriser la prolifération et l'efficacité des cellules effectrices. En effet l'IL-7 seule n'est pas capable d'induire une immunité cellulaire efficace chez les patients présentant la forme lépromateuse. Ainsi la synthèse d'IL-7 et de son récepteur au site infectieux faciliterait la mise en place d'une immunité cellulaire dirigée contre le pathogène. La dérégulation de ce système contribuerait à l'incapacité de l'hôte à contrôler correctement l'infection.

## 2.2 - La leishmaniose cutanée

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* inoculés à l'homme par des phlébotomes. La zone d'endémie de l'affection est très étendue; répartie sur le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, l'Afrique tropicale et une partie de l'Amérique centrale et du Sud. On distingue les leishmanioses cutanées, cutanéo-muqueuses et viscérales.

Au cours de la leishmaniose expérimentale murine, les réponses immunes font intervenir des facteurs génétiques (ainsi les souches de souris C57BL/6 sont résistantes à l'infection alors que les souris Balb/c sont particulièrement sensibles), les sous-populations lymphocytaires CD4<sup>+</sup>, les cytokines et l'orientation des réponses immunes vers un profil Th1 ou Th2. La protection vis à vis de *Leishmania major* chez les souris Balb/c est conférée par une sécrétion de cytokines de type Th1. A l'inverse la sensibilité est exacerbée par l'expansion des lymphocytes de type Th2. La destruction des parasites est essentiellement médiée par les macrophages, ceux-ci sont activés par l'IL-2 et l'IFN-γ (cytokines de type Th1), alors que l'IL-4 et l'IL-10 (cytokines de type Th2) bloquent cette activation et inhibent la voie vers le type Th1. Le devenir de la réponse immune dépend, dans ce cas, d'une orientation correcte vers un profil Th1; l'IFN-γ et l'IL-12 sont d'ailleurs des éléments majeurs intervenant dans la résistance, mais les mécanismes précis conduisant à la différenciation et/ou la prolifération préférentielle des sous-populations Th1 et Th2 restent encore à déterminer (Constantinescu CS, 1998; Launois P, 1998).

Après infection, les leishmanies sont rapidement internalisées par les macrophages dermiques résidents qui assurent ainsi leur multiplication intracellulaire. De manière tout à fait intéressante l'IL-7 a montré une activité leishmanicide, sur les formes intracellulaires amastigotes, par l'activation de macrophages murins *in vitro* (Gessner A, 1993) L'utilisation *in vivo* de cette cytokine était donc prometteuse. Pourtant deux études réalisées chez les souris susceptibles de souche Balb/c (Gessner A, 1995) et Balb.Xid (Hoerauf A, 1995) ont montré que l'injection sous-cutanée d'IL-7 conduisait à une aggravation des lésions.

Dans le modèle utilisant les souris Balb/c, ces résultats étaient associés à une augmentation de la charge parasitaire splénique et ganglionnaire de plus de 40 fois et par conséquent à une mortalité précoce. La réponse immune de type Th2 n'est pas altérée (production d'anticorps, d'IL-4 et d'IL-10) alors que la réponse de type Th1 et notamment la

production d'IFN- $\gamma$  par les cellules spléniques et ganglionnaires est diminuée. En fait dans ces organes lymphoïdes, on observe l'expansion d'une sous-population lymphocytaire B qui interviendrait dans la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4 $^{+}$  et stimulerait ainsi le développement des cellules Th2. L'injection d'IL-7 provoque donc une prolifération polyclonale de lymphocytes B et aboutit à une aggravation de la pathologie. Ainsi le nombre de cellules B confrontées au parasite lors de la mise en place de la réponse immunitaire serait impliqué de façon critique dans l'immunité initiale et le devenir de l'infection.

Enfin, les souris Balb.Xid, caractérisées par une absence totale de sous-population lymphocytaire B1 et un nombre restreint de lymphocytes B2, développent une réponse Th1 protectrice dominante, suite à l'infection. Dans ce cas l'injection d'IL-7 augmente sélectivement la lymphopoïèse des cellules B2 et non des B1 ce qui aboutit aux mêmes observations que dans le modèle Balb/c; augmentation de la charge parasitaire, abolition de la production d'IFN- $\gamma$  et aggravation de la pathologie (Hoerauf A, 1995).

Le rôle de l'IL-7 dans l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni* a fait l'objet d'une étude approfondie dans notre laboratoire, le chapitre IV décrit en détail cette parasitose et la réponse immune associée.

## CHAPITRE IV

### LE PARASITE *SCHISTOSOMA MANSONI*

La schistosomiase est une parasitose chronique qui affecte 200 millions de personnes dans le monde, et cause 300 à 500 000 décès par an (Schistosomiasis WEC, 1993). L'infection à *Schistosoma (S.) mansoni* sévit dans les zones tropicales et subtropicales du globe, principalement en Afrique et en Amérique latine, elle est responsable de la bilharziose intestinale et hépatosplénique. Le développement du parasite est assez complexe et son étude permet de comprendre la pathologie associée à cette infection.

#### I- Le cycle de vie du parasite *Schistosoma mansoni* (Planche 10)

Le cycle de vie de ce parasite fait intervenir un hôte intermédiaire invertébré *Biomphalaria glabrata*, un mollusque d'eau douce et un hôte définitif vertébré qui peut être l'homme. Le parasite est excrété par l'homme au stade œuf dans les fèces. Ces œufs éclosent dans l'eau donnant des miracidia qui infectent l'hôte intermédiaire. Après une phase de multiplication et de maturation, la forme infestante du parasite ou furcocercaire émerge du mollusque. L'infection de l'hôte mammifère s'effectue par un passage transcutané obligatoire lors des activités quotidiennes dans des eaux contaminées par des mollusques parasités. Après migration via les poumons, les parasites atteignent le foie et les plexus veineux mésentériques. Les vers adultes sont alors accouplés de manière permanente et la femelle pond plusieurs centaines d'œufs par jour qui traversent les parois intestinales et sont éliminés dans les selles ou sont piégés dans les tissus et principalement dans le foie. Ceux-ci font l'objet d'une réaction inflammatoire appelée granulome qui persiste durant plusieurs semaines. Le granulome tout d'abord cellulaire aboutit à la destruction des œufs. Ensuite, il devient fibreux et finalement la disparition du stimulus antigénique entraîne une évolution du granulome vers une fibrose modérée.

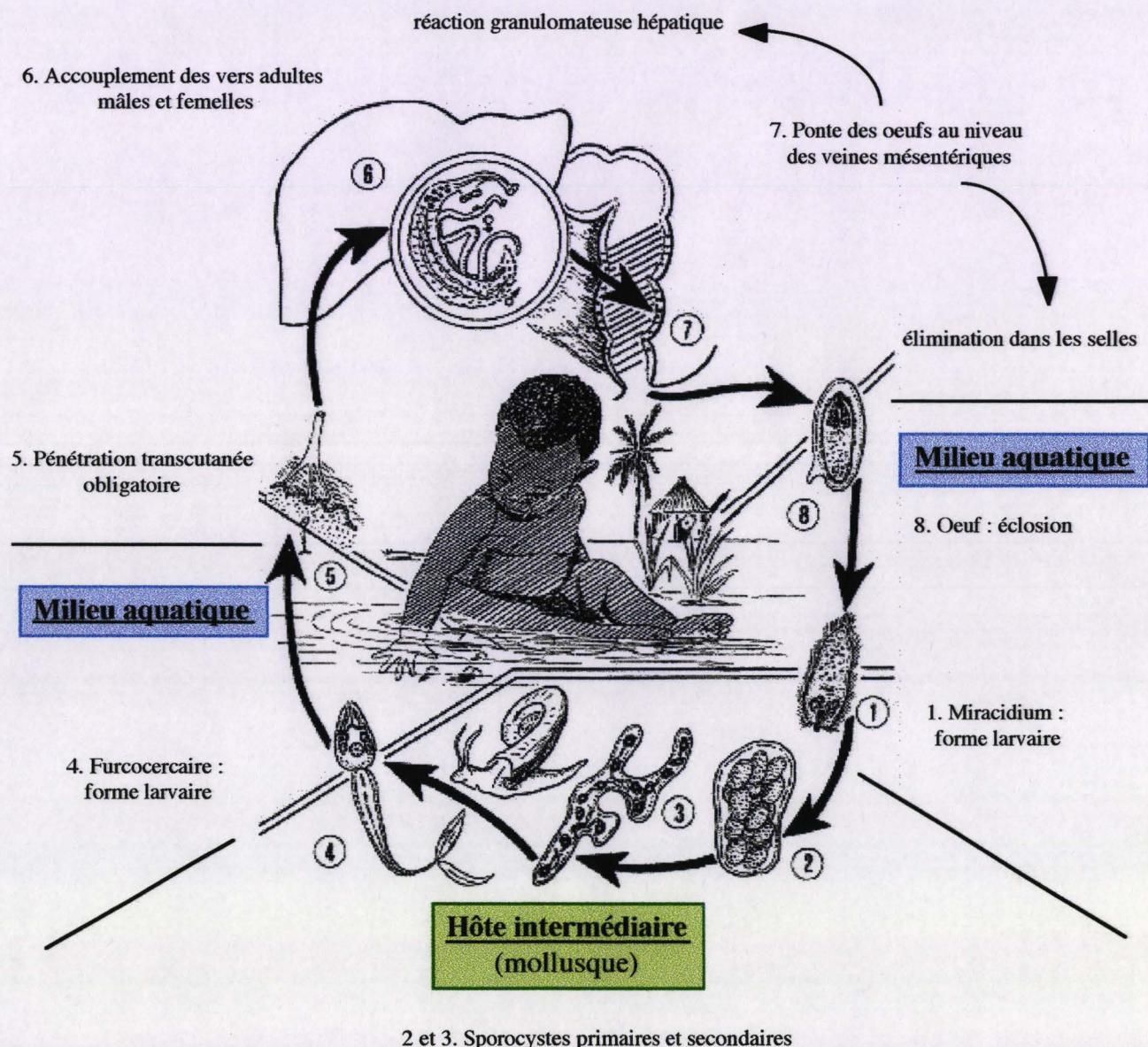


Planche 10

### Cycle de vie du parasite *Schistosoma mansoni*

D'après Golvan (Golvan Y, 1974).

Une mauvaise immunorégulation de cette fibrose, qui devient alors chronique va induire une hypertension portale et une hépatosplénomégalie. La chronicité de la maladie conduit à la cachexie, une ascite abdominale et finalement la mort.

## II- Réponse immune développée à l'encontre du schistosomule

L'étude de la réponse immunitaire induite contre le parasite *Schistosoma mansoni* a pu être réalisé dans le cadre d'infections expérimentales de rongeurs; les souris développent une pathologie proche de celle observée chez l'homme, tandis que le rat élimine les vers adultes naturellement, mais présente des mécanismes effecteurs proches de ceux développés chez l'homme.

Les mécanismes effecteurs développés à l'encontre du schistosomule sont originaux (Capron A, 1987), et font peu appel aux cellules de type Natural Killer (Attallah AM, 1980) ou aux lymphocytes T cytotoxiques (Butterworth AE, 1979a), qui sont inefficaces dans ce cas. Il s'agit principalement, comme cela a tout d'abord été démontré *in vitro* puis confirmé *in vivo* (Capron M, 1984a), de réactions de cytotoxicité médiée par anticorps (ADCC), les anticorps opsonisants étant en majorité des anticorps de classe IgE, et les cellules effectrices étant aussi variées que les macrophages (Capron A, 1975), les granulocytes éosinophiles (Butterworth AE, 1975; Capron M, 1981) et aussi les plaquettes (Joseph M, 1983). Tous les trois présentent à leur surface le récepteur de faible affinité au Fc des IgE (Fc $\epsilon$ RII) (Capron A, 1986), appelé CD23 (Delespesse G, 1988), permettant la fixation des IgE opsonisants. Ils relarguent des radicaux oxygénés (Joseph M, 1980), les macrophages produisant en plus des radicaux nitrés (James SL, 1989). Les granulocytes éosinophiles libèrent en plus leurs produits de sécrétion spécifiques, tels que la protéine basique majeure (MBP) et la peroxydase (EPO) (Khalife J, 1986), qui sont hautement toxiques pour les schistosomules (Butterworth AE, 1979b).

Chez le rat, les anticorps d'isotype IgG2a peuvent également, en association avec les granulocytes éosinophiles, tuer les schistosomules *in vitro* et *in vivo* (Grzych JM, 1982a). Chez l'homme, comme chez le babouin, les phénomènes d'ADCC en association avec les IgE ont également été mis en évidence (Capron M, 1984b; Joseph M, 1978).

Il a été montré que l'activité cytotoxique des macrophages envers les schistosomules était augmentée lorsque ces cellules étaient activés par l'IFN- $\gamma$  (James SL, 1990), et que l'IFN- $\gamma$  jouait également un rôle au niveau des plaquettes, en induisant leurs fonctions cytotoxiques (Pancre V, 1987). L'IFN- $\gamma$  est produit par les cellules T de type Th1, qui sont induites contre les schistosomules aux temps précoce de l'infection, période durant laquelle seule cette forme parasitaire est présente dans l'organisme (Pearce EJ, 1991). Une réponse de type Th1 est également retrouvée lors d'infection avec des cercaires unisexuées ou irradiées, deux cas d'infection où il n'y aura pas de dépôt d'oeufs (Oswald IP, 1993). C'est donc en majorité une réponse de type Th1 qui est protectrice contre les schistosomules, en effet la suppression de la réponse Th2 par des anticorps anti-IL-4 et anti-IL-5 n'affecte pas l'immunité anti-schistosomule (Sher A, 1990).

### III- Réponse immune développée à l'encontre des œufs

Lorsque les œufs se déposent au niveau du foie, un foyer inflammatoire se développent autour de ceux-ci. En effet le miracidium qui se développe dans l'œuf va susciter, de par ces sécrétions à travers les micropores de la coquille (Stenger RJ, 1967), le recrutement de diverses populations cellulaires. On décrit ainsi successivement l'apparition de macrophages, de lymphocytes T et d'éosinophiles, suivis peu après par des cellules géantes multinucléées; on rencontre également mais en nombre plus restreint des mastocytes, des neutrophiles et des plasmocytes (Chensue SW, 1994a). L'intensité de l'accumulation cellulaire présente un pic, 15 jours après son initiation (soit vers la 5<sup>ème</sup> semaine suivant l'infestation chez la souris). Les cellules précédemment évoquées sont, par la suite, progressivement remplacées par des fibroblastes. Ceux-ci produisent différentes protéines matricielles et notamment les collagènes de types I et III, dont le dépôt va aboutir localement à la constitution d'un nodule fibreux. A 8 semaines, la taille des granulomes atteint un maximum et ceci coïncide avec le pic de synthèse de collagène. A partir de la 11<sup>ème</sup> semaine, on constate une diminution de la production de collagène ce qui entraîne une réduction importante de la fibrose (Boros DL, 1989).

Les conséquences de la réponse granulomateuse sont multiples :

- ⇒ En tout premier lieu, le granulome permet la séquestration des sécrétions miracidiales potentiellement toxiques pour les tissus environnants. Chez les animaux dépourvus de réponse granulomateuse (souris athymiques), de sévères lésions nécrotiques du parenchyme hépatique sont en effet observées (Byram JE, 1977).
- ⇒ La deuxième conséquence importante est bien sûr la destruction du miracidium, processus dans lequel les éosinophiles jouent un rôle majeur (Hsu SY, 1980).
- ⇒ Il n'est d'autre part pas exclu que le granulome lui-même et donc la réponse de l'hôte, soit à l'origine de dommages tissulaires par le biais de nombreux composés actifs relargués par les cellules en état d'activation.

Comme nous venons de le voir, l'évolution de ces granulomes peut être décomposée en trois phases (Stadecker MJ, 1992): une phase d'induction, durant laquelle le granulome se développe; une phase de maintenance, où le foyer inflammatoire persiste de façon anormale; et une phase de rétraction (« downmodulation »), durant laquelle le granulome est lentement remplacé par une fibrose cicatricielle.

### **1 - Phase d'induction**

Durant la phase d'induction de ces granulomes, la production d'IFN- $\gamma$  dans les organes lymphoïdes prédomine, puis diminue, tandis que la production d'IL-4 domine lors du pic de développement du granulome. Les lymphocytes de type Th1 permettent donc la mise en place du granulome, avec l'infiltration de cellules mononucléées (Chikunguwo SM, 1991); ce sont les marques caractéristiques d'une réaction d'hypersensibilité retardée.

On observe ensuite une diminution de l'activité des lymphocytes Th1, tandis qu'une réponse de type Th2 se met en place (Pearce EJ, 1991) et persiste, après passage par un stade transitoire de type Th0, où les deux profils de cytokines sont produits simultanément (Vella AT, 1992b). Ce passage d'une réponse de type Th1 à une réponse de type Th2 est directement dû au dépôt des œufs dans le parenchyme hépatique (Grzych JM, 1991).

L'émergence d'une production de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T dans les granulomes hépatiques est mal comprise. Cependant, différents éléments permettent de mieux l'appréhender. Comme nous l'avons vu, l'IL-4 est le facteur majeur d'induction d'un profil de type Th2. Il a été montré qu'une production précoce d'IL-4 par des cellules non-T a

lieu lors du dépôt des œufs dans le foie (Sabin EA, 1995), ces cellules étant vraisemblablement des granulocytes basophiles (Falcone FH, 1996) et éosinophiles (Sabin EA, 1996). De plus, ces granulocytes éosinophiles favorisent la production d'IL-5 par les lymphocytes Th2 ainsi mis en place (Metwali A, 1993a). L'IL-5 est, en retour, essentiel pour le développement de ces granulocytes éosinophiles (Metwali A, 1993b).

Cette émergence d'IL-4 ne peut pas expliquer à elle seule la diminution d'activité des lymphocytes Th1, puisque des souris déficientes en IL-4 ne développent pas de réponse Th1 à l'encontre des œufs (Metwali A, 1996). Chiaramonte *et al.* ont récemment montré que l'IL-13, une autre cytokine de type Th2, joue un rôle clé dans la formation du granulome (Chiaramonte MG, 1999a; Chiaramonte MG, 1999b). Son activité présente une forte redondance avec l'IL-4, non seulement dans le développement de la fibrose, mais aussi dans l'inhibition du profil Th1 (Jankovic D, 1999; McKenzie GJ, 1999). D'autres mécanismes sont impliqués dans cette régulation. Il a été montré qu'une production d'IL-10 corrèle avec la diminution de la synthèse de cytokines Th1 durant le développement du granulome (Chensue SW, 1994b; Sher A, 1991), suggérant que l'IL-10, produit par les lymphocytes B (Velupillai P, 1994) ou les lymphocytes de type Th2 émergeants, contribuerait à la diminution d'activité des lymphocytes de type Th1 (Stadecker MJ, 1994). Par ailleurs, la mort par apoptose des cellules de type Th1 a été mise en évidence, dans la rate ainsi que dans les infiltrats inflammatoires périovulaires hépatiques (Fallon PG, 1998). Le rôle inducteur de l'IL-10, de ce phénomène apoptotique fût également démontré (Estaquier J, 1997). Enfin, il semble que la production d'IL-10, par les cellules de l'hôte, pourrait être directement induite par le parasite *via* l'oligosaccharide Lewis<sup>x</sup> (Velupillai P, 1994).

## **2 - Persistance du granulome**

Durant la phase de maintenance du granulome, la réponse de type Th2 persiste, les ARNm codant l'IL-4 étant abondants aussi bien au niveau des granulomes que dans les organes lymphoïdes (Henderson GS, 1991), tandis que les lymphocytes T effecteurs spécifiques des antigènes des œufs présentent un profil Th2 (Vella AT, 1992a). Cette prédominance Th2 est si importante, qu'elle semble pouvoir influer sur la réponse envers des antigènes irrelevants, en

orientant une réponse attendue comme étant de type Th1 vers une réponse de type Th2 (Kullberg MC, 1992).

Cette persistance de production d'IL-4 agit négativement sur les fonctions effectrices des macrophages, permettant ainsi aux œufs de résister aux attaques de l'organisme (Oswald IP, 1992), peut-être en induisant la fusion de ces macrophages en cellules géantes multinucléées (McInnes A, 1988). De même, l'IL-10 pourrait agir en faveur du parasite en inhibant les fonctions cytotoxiques des macrophages (Gazzinelli RT, 1992). L'utilisation d'un modèle expérimental d'induction de granulome avec des billes enrobées d'antigènes d'œufs (Chensue SW, 1995b) a montré que ces macrophages, sous l'effet de l'IL-4 et de l'IL-10, présentent également un défaut de production d'IL-12 (Chensue SW, 1995a). Cette absence d'IL-12 se concrétise par une faible production de cytokines de type Th1, nécessaires à l'activation des macrophages du granulome (Chensue SW, 1995b).

Ainsi, les œufs semblent utiliser les cytokines Th2 de l'hôte pour se protéger, en rendant les mécanismes effecteurs du granulome peu efficaces (Figure 10). L'IL-4 participe donc à la pathologie induite par les œufs, le traitement par des anticorps anti-IL-4 diminuant considérablement la taille des œufs (Chensue SW, 1992), et l'utilisation d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  augmentant la taille des granulomes (Chensue SW, 1995b). Il semblerait que le système immunitaire régule tout de même la production exacerbée d'IL-4 par le récepteur soluble à l'IL-4 (Fernandez BR, 1995).

Lors de la rétraction du granulome, la réponse de type Th2 diminue, le niveau d'ARNm codant l'IL-4 baissant progressivement (Henderson GS, 1992). On observe également une diminution de production d'IL-10 (Chensue SW, 1994b). Il semble que cette suppression de la production de l'IL-4 touche également toutes les cytokines. Le granulome, s'il n'est pas ainsi régulé, est infiltré par du collagène, ce qui crée une fibrose. Cette fibrose est exacerbée, entraînant les troubles hépatiques pathognomoniques de la schistosomiase intestinale. Les travaux de Wynn *et al.* (Wynn TA, 1995) ont montré, dans un modèle de vaccination associant l'injection d'œufs et d'IL-12, que cette cytokine permet d'inhiber la formation du granulome et réduit considérablement la fibrose. L'IL-12 est une cytokine connue pour favoriser l'initiation

d'une réponse de type Th1 (Germann T, 1993; Manetti R, 1993). L'effet anti-fibrotique, observé ici, est accompagné par le remplacement du profil de cytokines de type Th2, caractéristique de l'infection à *S. mansoni*, par un profil de type Th1 (Wynn TA, 1995). Dans ce modèle, la présence de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-12 endogènes est indispensable à la réduction de la pathologie hépatique (Hoffmann KF, 1998).

#### **IV- Le séjour cutané du parasite ou le premier contact avec l'hôte**

La parasite *S. mansoni* possède un mode d'infection rare puisqu'il est capable de pénétrer une peau saine donc, en absence de toute lésion. Ceci suppose que les larves infectantes disposent de capacités d'attachement à la peau puis de digestion et de mobilité qui lui permettent de traverser le tégument et de rejoindre la circulation sanguine intradermique. Lors de cette étape cutanée, le parasite subit de grandes modifications qui lui permettent d'une part, de s'adapter aux nouvelles conditions du milieu (température, osmolarité, etc.) et d'autre part de s'immiscer en profondeur dans le tissu. Plusieurs études sur la migration du schistosomule dans la peau montrent que les larves quittent l'épiderme 24 heures après l'infection et sont principalement présentes dans le derme de la peau abdominale ou de la peau des oreilles respectivement après 48 et 72 heures (Wheater PR, 1979). Ces observations concernent uniquement la peau murine et pour des raisons évidentes, n'ont pu être réalisées chez l'homme. Cependant les peaux humaine et murine présentent de nombreuses différences particulièrement en ce qui concerne l'épaisseur et la compacité de l'épiderme, ainsi que la densité de poils. Ces caractéristiques sont déterminantes dans la pénétration de l'épiderme par le parasite. La route transfolliculaire incluant les glandes sébacées est la voie la plus empruntée par les schistosomules. En effet la jonction dermo-épidermique constitue une barrière assez efficace et oriente la migration transépidermique des larves vers une zone d'entrée plus facile : le pore du follicule pileux. En outre, la peau humaine contient très peu de poils par rapport à la peau murine, les larves n'ont donc d'autres choix que de traverser la jonction dermo-épidermique afin de pénétrer dans le derme. La digestion de cette lame basale est longue et c'est ce qui explique certainement le fait que le séjour du schistosomule dans la peau humaine peut atteindre 4 jours (Roye O, 1998) contre 2 jours chez la souris.

Une démangeaison est souvent ressentie dans l'heure suivant la pénétration du parasite dans la peau. Dans certains cas, des papules érythémateuses peuvent apparaître et ne disparaissent qu'après plusieurs jours (Boros DL, 1989). Chez la souris saine, l'infection cause une réaction œdémateuse modérée, avec infiltration de neutrophiles dans le derme et l'épiderme (Colley DG, 1972; Lichtenberg F, 1976). La réaction non-spécifique initiale est associée à des dommages locaux responsables de l'activation du complément (Machado AJ, 1975), impliqué dans le recrutement de cellules polynucléaires. La dégranulation locale de mastocytes et la libération d'histamine sont alors responsables des démangeaisons. Dans le cas de réinfection, cette réaction est plus intense et plus rapide. Des lymphocytes T mémoires sont activées (Colley DG, 1972) et participent à la mise en place de réponses humorales et cellulaires renforcées impliquant les éosinophiles, cellules composant majoritairement l'infiltrat (Lichtenberg F, 1976). Ces mécanismes sont supposés protecteurs en contribuant à la mort des cercaires dans la peau (Damian RT, 1984; Phillips SM, 1978). Néanmoins, ces mécanismes n'ont pas pu être démontré chez l'homme et les cas de dermatite sont particulièrement rares chez les patients vivant en zone d'endémie.

Au cours de la phase cutanée, le parasite entre en contact avec la plupart des cellules immunocompétentes de la peau et notamment les kératinocytes, les LC, les lymphocytes T, les DETC chez la souris, les cellules dendritiques dermiques et enfin les cellules endothéliales. Ces cellules sont, de fait, susceptibles de prendre part activement à l'initiation de la réponse immune en particulier par l'apprêttement et la présentation des antigènes aux cellules compétentes des ganglions drainant la peau. Ces phénomènes encore mal connus pourraient intervenir dans l'orientation vers le profil de cytokine de type Th1 observé dans les ganglions et décrit plus haut.

## **RESULTATS**

## ARTICLE 1

**Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$  production and leads to an aggravation of the disease.**

*Immunology, 1997, V.91, p.35-44.*

## I - OBJECTIFS

Le but initial de nos études consistait à mettre en évidence les toutes premières étapes de la réponse immune, potentiellement initiée dans la peau et les ganglions drainant le site d'infection cutanée par le parasite *Schistosoma mansoni*. Dans ce but, il était indispensable de pouvoir discriminer les événements immunitaires liés à la présence du parasite dans l'organisme, de ceux induits uniquement par la pénétration transcutanée des larves. Trois groupes d'animaux traités de manière spécifique furent ainsi élaborés. Le premier groupe comprenait des animaux infectés par la méthode classique décrite par Smithers et Terry en 1969 (Smithers SR, 1969). Cette méthode consiste à déposer sur la peau abdominale des souris, une solution contenant les cercaires, qui laissées à l'obscurité pendant une demi-heure vont gagner la peau par thermo- et chimio-tactisme, se fixer à la couche cornée et rapidement se localiser à la base de l'épiderme au dessus de la lame basale. Le second groupe était également composé d'animaux infectés, non plus par pénétration transcutanée, mais par injection intraveineuse de schistosomules préalablement maturés par un passage transcutané *ex-vivo* (Clegg JA, 1972). Ce groupe présentait l'intérêt d'obtenir des animaux infectés, en dehors de tout contact avec la peau. Un troisième et dernier groupe d'animaux non-infectés servait de groupe témoin. Une étude cinétique du jour 1 au jour 90, de la production des ARNm de nombreuses cytokines fut ensuite réalisée, afin de déterminer les événements induits par la stricte pénétration transcutanée des parasites.

## II - RESULTATS

L'expression des ARNm spécifiques de l'IL-1, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-10, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  fut évaluée au sein de fragments cutanés, d'animaux issus de chaque groupe. De manière intéressante, les ARNm de l'IL-7, de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  furent exclusivement détectés dans les peaux d'animaux infectés par passage transcutané. Les transcrits spécifiques de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 quant à eux, furent détectables cinq jours après l'infection, mais produits en quantité faible et de manière transitoire. La synthèse d'IL-7 fut

observée jusqu'au jour 21 suivant l'infestation. Enfin seuls l'IFN-γ et l'IL-7 étaient présents en dehors du site de pénétration des parasites.

Afin de préciser le rôle joué par l'IL-7, produite dans la peau des souris infectées de manière transcutanée, de nouvelles infections furent réalisées après injection préalable d'une dose unique d'IL-7 recombinante, autour de la zone d'infestation, 12 h avant celle-ci. Cette expérience a permis de montrer que l'injection d'IL-7 aboutissait à une diminution de l'expression des ARNm spécifiques de l'IFN-γ dans la peau et les ganglions drainant. De plus, à la suite à cette injection, la présence de transcrits spécifiques de l'IL-12 (p40) fut aussi diminuée dans les ganglions drainant. La présence d'IL-7, injectée dans la peau, modifie donc au moins, les caractéristiques de l'environnement local cutané, ce qui est susceptible d'agir sur la migration du parasite au sein de son hôte infecté. L'étude du nombre de parasites présents dans les poumons et le foie du 5<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour permet de préciser le profil de migration. Celui-ci est en effet altéré après l'injection d'IL-7. Ainsi dans le groupe des animaux traités par l'IL-7, on retrouve moins de schistosomules dans les poumons à J5, ainsi que dans le foie à J15. Par contre au jour 42, la charge parasitaire hépatique est augmentée après traitement par l'IL-7. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. D'une part, il est possible que la migration du parasite, avant de rejoindre le foie, soit largement modifiée et donc que le trajet classiquement observé soit dévié et ne corresponde plus à celui emprunté par le parasite. D'autres délais de migration seraient alors à prendre en considération. D'autre part, la migration peut simplement avoir été retardée, et les parasites finissent par arriver dans le foie.

Conjointement à l'augmentation du nombre de vers adultes à J42, une hausse de la quantité de collagène hépatique est observée. Celle-ci peut être associée à une ponte plus importante, puisque l'on observe plus de vers adultes, et/ou à une réaction granulomateuse plus intense. L'injection d'IL-7 favorise donc le développement du parasite et mène à une aggravation de la pathologie. Celle-ci est particulièrement dépendante du profil de la réponse immune développée à l'encontre des vers adultes et des œufs. Elle peut être caractérisée par le type de cytokines présentes dans les sera ainsi que par les isotypes mis en jeu dans la réponse humorale spécifique.

Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux quantités d'IFN-γ et d'IL-4 (témoins respectifs de l'orientation de la réponse immune vers un profil de type Th1 ou Th2) présentes en périphérie, dans les sera des souris traitées par l'IL-7 puis infestées par

*Schistosoma mansoni.* Une diminution de la concentration de chacune de ces cytokines a été observée (de manière plus marquée pour l'IFN- $\gamma$ ). Par ailleurs, l'analyse de la réponse humorale, associée à un profil Th1 ou Th2, effectuée par le dosage des anticorps d'isotype IgG2a et IgG1 respectivement, montre une nette orientation de la réponse immune dirigée contre les antigènes d'œufs, vers le type Th2 (IgG1). Enfin, nous avons pu montrer que le nombre de cellules B dans les ganglions drainant la peau était augmenté chez les animaux traités par l'IL-7. Une légère diminution du nombre de cellules T fut parallèlement observée.

### III - CONCLUSION

Dans le modèle de vaccination par l'utilisation de cercaires irradiées, il a été clairement démontré que l'immunité protectrice était médiée par des lymphocytes T CD4 $^{+}$  producteurs d'IFN- $\gamma$  (Pemberton RM, 1991b), cytokine clé dans la mise en place d'une réponse de type Th1. La diminution de la synthèse de cette cytokine dans la peau, les ganglions drainant et le sérum, observée chez les animaux injectés par l'IL-7, associée à l'augmentation du nombre de cellules B dans les ganglions drainant, permet d'expliquer l'orientation préférentielle vers une réponse humorale de type Th2 spécifique des antigènes d'œufs et donc l'aggravation de la pathologie. En effet, les lymphocytes B en tant que cellules présentatrices d'antigènes, induisent préférentiellement une réponse immune de type Th2 (Gajewski TF, 1991).

Sur la base de ces données, nous nous sommes intéressés à un autre modèle murin dans lequel l'IL-7 est exprimée constitutivement par les kératinocytes basaux; elle est ainsi présente dans la peau dès la pénétration du parasite (voir Article 2).

## Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$ production and leads to an aggravation of the disease

I. WOLOWCZUK,\* M. DELACRE,\* O. ROYE,\* S. L. GIANNINI† & C. AURIAULT\* \*Institut Pasteur de Lille, CNRS U.R.A. 1854, Lille, France, and †University of Liège, Department of Pathology, Liège, Belgium 7

### SUMMARY

The effect of recombinant interleukin-7 (rIL-7) on the course of murine schistosomiasis and the development of the accompanying immune response were investigated. We demonstrated that IL-7 expression could be detected in the skin of infected mice from 1 to 21 days following infection. We here report that intradermal injection of exogenous human IL-7, prior to the penetration of the parasite into the skin, leads to a more severe liver pathology and an increased number of surviving adult parasites. In addition, injection of rIL-7 alters parasite migration (estimation of burdens of young larvae in lungs and liver). Administration of rIL-7 led to a decrease of IL-12 and interferon- $\gamma$ - (IFN- $\gamma$ ) specific messengers RNA in skin and, more markedly, in skin-draining lymph nodes. The number of B220 expressing cells was increased, and T-cell number was reduced, in IL-7-treated infected mice. In addition, levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 in sera were significantly reduced, whereas there was a shift from a Th1 to a Th2 type associated humoral response towards the egg antigens. Our experimental observations illustrate that the exogenous administration of rIL-7 affects both the development of the host's immune response and the behaviour of the parasite within the infected host. The early and specific production of IL-7 in the host skin, following infection with *Schistosoma mansoni*, raises fascinating questions concerning the relationships between the parasite and its host at the very beginning of their interaction.

### INTRODUCTION

Currently, over 200 million people world-wide are infected with the parasite *Schistosoma mansoni*.<sup>1</sup> The infection is characterized by the presence of adult worms in the portal and mesenteric veins of humans and other mammals. The pathology in this disease occurs as a result of hypersensitivity reactions against worm eggs trapped in various tissues of the infected host, the major sites being the intestines, liver and lungs.

Schistosomes have a complex migratory cycle which is initiated when furcocercariae, shed by infected freshwater snails penetrate the skin. During the process of penetration, cercariae lose their tail, and undergo a series of biochemical, physiological and morphological changes to transform into schistosomula.<sup>2</sup> After gaining entry into the skin, the larvae remain there for about 48–72 hr before migrating further, into the lungs.<sup>3</sup> This delayed residence in the skin provides ample opportunity for host-parasite interactions. The nature of this interaction is still not fully understood, but seems to be critical for the migratory behaviour of the parasite, and therefore for

the outcome of the infection. Indeed, it has been shown that the slower migration pattern of irradiation attenuated cercariae through the skin and the lungs is responsible for the induction of high levels of protection against challenge infection.<sup>4</sup>

Recent evidence from murine experimental models indicates that schistosome infection causes an increase in Th2 cytokine production, concomitant with a down-regulation of cytokines of the Th1 subset of CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>5,6</sup> In addition, data from the well-documented model of vaccination with radiation attenuated larvae of *S. mansoni* in C57B1/6 mice, show that the immune effector mechanisms appear to be mediated by interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) producing CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>7</sup> In this model the parasite attrition predominantly occurs during their passage through the pulmonary vasculature.<sup>8</sup> Recent data suggest that the antigen-specific Th1 cells are generated in the lymph nodes draining the subcutaneous vaccination site, before being recruited to the lungs.<sup>9</sup>

Surprisingly, little work has been devoted to studying the initiation of the immune response in the skin following infection with *S. mansoni*. Recently, increasing attention has been drawn to the involvement of resident epidermal Langerhans' cells (LC) in the induction of skin-related immunological events.<sup>10</sup> It has been proposed that epidermal LC may also be involved in the induction of immunity to skin-penetrating parasites including *S. mansoni*.<sup>11–13</sup> If LC are omnipresent cutaneous antigen-presenting cells (APC), keratinocytes,

Received 21 October 1996; revised 21 January 1997; accepted 23 January 1997.

Correspondence: Dr I. Wolowczuk, Institut Pasteur de Lille, CNRS U.R.A. 1854, 1 rue du Professeur Albert Calmette, 59019 Lille cedex, France.

which constitute over 95% of the epidermal cells, can also become immunocompetent APC after stimulation.<sup>14</sup> Both cells express, or can be induced to express, MHC class II antigens and adhesion molecules, necessary for the migration and/or retention of inflammatory cells.<sup>15</sup> They also produce monokines helping the migration of epidermotropic T cells, including interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and TNF- $\beta$ .<sup>16</sup>

It has been demonstrated that TNF- $\alpha$ , produced by keratinocytes after skin sensitization<sup>17</sup> may have an important influence on LC migration.<sup>18</sup> As the different migration patterns of APC have been correlated to the final outcome of Th1- versus Th2-type responses,<sup>19</sup> early reactions occurring in epidermis or dermis could play an important role in the further orientation of the immune response to the parasite.

To monitor the immune response occurring in the skin at early stage of infection, we performed time-course measurements of cytokines mRNA. We compared the cytokine profiles in the skin of transcutaneously infected mice, intravenously larvae-injected mice and uninfected mice.

We first demonstrated that IFN- $\gamma$ , IL-4 and more importantly IL-7, were only expressed in skin samples of animals transcutaneously infected with *S. mansoni*. Interestingly, whereas the production of IFN- $\gamma$  and IL-4 disappeared with time, IL-7 was still detectable in infected skin for as long as 21 days following parasite penetration.

Since the long lasting cutaneous IL-7 production in transcutaneously infected animals could affect the immune response even when parasites have left skin, we investigated the effects of a single intradermal injection of recombinant IL-7, on both host and parasite.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and parasites*

Six- to eight-week-old female C57BL/6 mice were obtained from Iffa Credo (L'Arbresle, France) and housed in a specific pathogen-free investigator access room throughout the study. The *S. mansoni* life cycle was maintained using *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts and golden hamsters as definitive hosts.

### *Infection protocols and experimental groups*

All animals were anaesthetized with pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) and shaved at an abdominal site prior to infection. They were divided into three groups as follows:

Group A, animals were exposed percutaneously to 50 furcercariae, according to the method first described by Smithers and Terry;<sup>20</sup> Group B, animals injected intravenously with 70 skin-schistosomula;<sup>21</sup> and Group C, non-infected animals.

### *In vivo treatment with IL-7*

Purified recombinant human IL-7 was purchased from Genzyme (Cambridge, MA) and had a specific bioactivity of  $1 \times 10^7$  units per mg. A single dose of IL-7 (0.3  $\mu$ g/mouse) was injected intradermally (i.d.), at the site surrounding the parasite deposition. Twelve hours later animals were infected transcutaneously with 50 furcercariae. The control animals were injected i.d. with phosphate-buffered saline (PBS) 12 hr before being infected. Each group consisted of 15 animals.

Mice were repeatedly bled at day 0, 28, 35 and 42 postinfection for determination of IL-4, IFN- $\gamma$  and antibody levels in sera. The parasite burden was determined at day 42 by total blood perfusion of the animals. Livers of day 42-infected animals were fixed in Bouin's solution before being further processed for histopathological examinations and collagen measurement.

### *Schistosomula recovery from the lungs*

Mice were killed, the lungs excised and chopped into the smallest possible fragments before transfer into a small Petri dish containing 0.2 ml of minimum essential medium (MEM). The moistened fragments were then transferred onto a 90  $\mu$ m mesh (Hartmann-Larochette, Châtenois, France) which was placed on a 50 ml glass tube filled to the top with MEM. The young worms that migrated from the lungs into the MEM were collected after an overnight incubation at 37°.

### *RNA extraction*

Five days after infection, abdominal skin (the site of parasite deposition) and skin-draining lymph nodes (axillary, brachial and inguinal) were removed from pools of three mice per group. Mice were killed and the abdominal hair was carefully removed with a dry razor. After excision of skin, the fat and vessels were removed by blunt dissection and 4  $\times$  4 cm specimens were prepared and frozen immediately in liquid nitrogen. RNA was extracted using 1 ml of RNAzol per 100 mg of skin. Concurrently, single cell suspensions from skin-derived lymph nodes were prepared by mechanical disaggregation using forceps and pellets of  $5 \times 10^6$  cells were treated with 1 ml of RNAzol. In all cases, quality of RNA was checked on an 1% agarose gel.

### *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Equal amounts of RNA (1  $\mu$ g) were reverse-transcribed with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Gibco BRL, Eragny, France), 4 units RNAsin (Promega, Lyon, France), 50 ng oligodT, 2 mM dNTP, 4 mM dithiothreitol (DTT) in a final volume of 27  $\mu$ l. Products were then denatured by heating at 95° before being stored at -20°.

PCR amplification was performed using mouse specific primers for  $\beta$ -actin (5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' and 5' CTT TAG CAC GCA CTG TAA TTC CTC 3'), IFN- $\gamma$  (5' GTC TGA AGT AAC TAT TTT AAC TCA AG 3' and 5' CGG TCA ATG CTC CAG CTT GTT GGG TG 3'), IL-4 (5' TG ATG GGT CTC AGC CCC CAC CTT G 3' and 5' C TTT CAG TGT TGT GAG CGT GGA CTC 3'), IL-7 (5' CAG ACC ATG TTC CAT GTT TCT 3' and 5' TTG AAG GGC AGT ATA TAA ACA GG 3') and IL-12 p40 (5' GGC CAG TAC ACC TGC CAC AAA GGA GG 3' and 5' CCT AGG ATC GGA CCC TGC AGG GAA C 3'). Samples of cDNA were amplified for 35 cycles (for  $\beta$ -actin) or 38 cycles (for IL-4, IL-7 and IFN- $\gamma$ ) at an annealing temperature of 60° using a Perkin Elmer DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Saint-Quentin, France). For each cDNA preparation, a control synthesis reaction was performed without RT to ensure that there was no contaminating genomic DNA. PCR products were analysed in 1.5% agarose gel in TBE 1X containing ethidium bromide (25  $\mu$ g/50 ml gel) (Interchim, Montluçon, France).

### Measurement of collagen

Sections of liver (6 µm thick) were put on slides, deparaffinized and incubated with a saturated solution of picric acid in distilled water containing 0·1% Fast green FCF (Sigma) which stained non-collagenous proteins and 0·1% Syrius red F3B (Gurr B.D.H. Chemicals Ltd, Poole, UK) which stained collagen. Sections were kept in the dark and incubated at room temperature for 2 hr under continuous, mild agitation. Slides were rinsed with distilled water until the elution fluid was completely colour-free. Each section was then covered with 1 ml of 0·1 M NaOH in absolute methanol (volume to volume) until complete fading (usually within a few seconds). Fluids were then carefully withdrawn and read in a spectrophotometer DU 64 (Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA). Fast green has its maximal absorbance at 630 nm and Syrius red at 540 nm. Collagen levels were calculated according to the formula previously described.<sup>22</sup> Eight animals per group were tested and for each liver, collagen was measured in triplicate. The Student's *t*-test and the coefficient of correlation were used in the statistical evaluation of the results. Data are reported as mean ± SEM of µg collagen per mg protein.

### Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

IL-4 and IFN-γ were detected in sera (dilution 1:20) by specific two-site ELISA. The antibody pairs for the detection of IL-4 (11B11 and biotinylated BVD6-24G2) and IFN-γ (affinity purified R4-6A2 monoclonal antibody and biotinylated XMG1-2) were purchased from PharMingen (San Diego, CA). The procedure used was recommended by the supplier. For determination of total IgG, IgG1 and IgG2a serum levels, microtitre plates were coated overnight with 10 µg/ml goat anti-mouse IgG (H + L) antibody. After blocking with 5% bovine serum albumin (BSA), plates were incubated with experimental sera (dilution 1:200) for 2 hr. Peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a antibodies (from Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) were used for detection. ELISA were developed with *o*-phenylenediamine (Sigma) + 0·001% hydrogen peroxide in phosphate/citrate buffer as substrate.

Specific anti-adult worm (anti-SM) or anti-egg (anti-SEA) antibody titres (IgG, IgG1, IgG2a) were detected by ELISA using reagents from the same origin, but after preincubation of the microtitre plates with 0·5 µg/ml of either parasitic extracts.

Optical densities at 492 nm were measured using a multichannel spectrophotometer (Titertek multiskan MCC 1340).

### Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

Staining of lymph node cells was performed using the following antibodies: biotin-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody (clone RA3-6B2), for specific staining of B cells, and hamster biotin-conjugated anti-mouse CD3-ε monoclonal antibody (clone 145-2C11), for specific staining of T cells. In both cases, staining was revealed using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin. All reagents were purchased from PharMingen and used according to the instructions of the company.

Analysis of cell staining was performed in a FACScan® cytometer (Epics Elite, Coultronics, Margency, France) using the Print Q5-2 software (Coultronics).

## RESULTS

### IL-7 is produced in skin of mice, following transcutaneous infection

Epidermal cells are capable of secreting immunoregulatory cytokines, supporting the notion that immune responses can originate in the epidermis. In order to address this question in the case of *S. mansoni* infection, we designed a set of experiments to compare the cytokine profiles in skin samples of transcutaneously infected mice (group A), intravenously (i.v.) larvae-injected mice (group B), and control uninfected mice (group C). Between days 1 and 90, the expression of specific cytokine messenger RNAs (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IFN-γ and TNF-α) was measured using the technique of RT-PCR.

We observed that IL-1- and TNF-α-specific mRNA were expressed in all skin samples, whether the animals were infected (groups A and B) or not (group C) (data not shown). To our knowledge, IL-1 is the only cytokine to be produced under normal conditions in intact skin.<sup>23</sup>

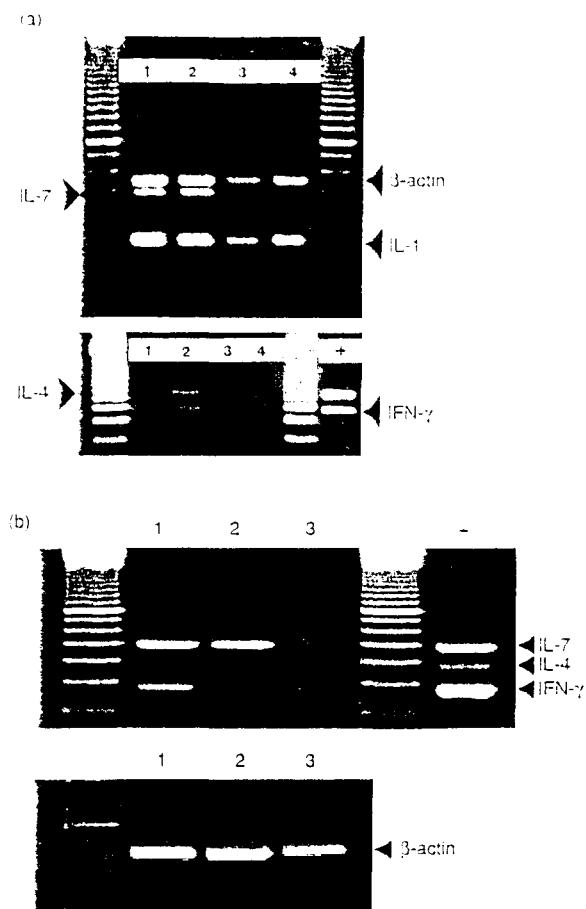
In infected skin samples (groups A and B), we could detect IL-6-specific mRNA, but not in uninfected skins (data not shown). It was recently shown that epidermal cells can express mRNA encoding IL-6<sup>24</sup> and that its release can be up-regulated by cytokines such as IL-1. It is noteworthy that IL-1, TNF-α and IL-6 share various biological effects and can modulate each other's production and/or function. In contrast, neither IL-2, IL-5 nor IL-10 were detected using our experimental conditions, at any time-point following the infection.

Interestingly, IL-7 was specifically detected in skin of transcutaneously infected animals (Fig. 1a, lanes 1 and 2). This detection of IL-7 mRNA at the site of infection, began at day 1 and continued until day 21 following penetration of the larvae. In addition, mRNA specific for IFN-γ and IL-4 were detectable 5 days after penetration of the parasite (Fig. 1a), but the signals were weak and transient.

In order to assess if the detection of IL-7 mRNA in skin of transcutaneously infected mice was strictly a local event, we performed the same RT-PCR on skin samples harvested either from the abdominal site of infection or from flanks (distant from the site of infection), on the same mice (Fig. 1b). Messenger RNA specific for IL-7 and IFN-γ were detected in the skin of infected mice (lanes 1 and 2) both at the site of infection (lane 1) and at a distant site (lane 2), whereas they were undetectable in the skin of uninfected mice (lane 3), thus demonstrating that expression of IL-7 and IFN-γ in the infected skin is not restricted to the local site of transcutaneous penetration of the parasite. In contrast, mRNA specific for IL-4 was detected only in skin recovered from the infection site (lane 1), but not in skin samples from distant site (lane 2) nor in skin from uninfected mice.

### Analysis of mRNA specific for IFN-γ and IL-12, in skin and skin-draining lymph nodes, 5 days after infection

Since IL-7 was detected in *S. mansoni*-infected skin, we hypothesized that this cytokine could potentially have a beneficial influence on the host's immune defence against the parasite. We thus investigated the effects of a single intradermal injection of recombinant human IL-7 on infection. We first analysed whether the i.d. injection of IL-7 led to changes in IFN-γ

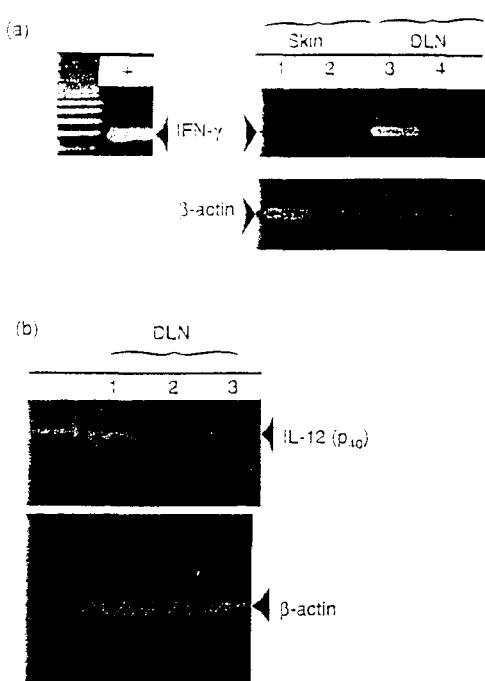


**Figure 1.** IL-7 mRNA is produced in skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice. (a) In this series of experiments, we measured the levels of mRNA specific for IL-1, IL-4, IL-7 and IFN- $\gamma$  in the skin, using the technique of RT-PCR 5 days after the initiation of infection.  $\beta$ -Actin was used as internal control for the integrity of the RNA. Three groups of animals were compared: group A of transcutaneously infected mice (lanes 1 and 2); group B of mice infected by intravenous injection of larvae (lane 3); group C of control, uninfected, mice (lane 4). +, cDNA positive for either IFN- $\gamma$  and IL-4 (concanavalin A-stimulated splenocytes); the data are representative of five independent experiments. (b) In order to test whether IL-7, IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA expression consecutive to the penetration of the parasite through the skin, is strictly a local event, we did RT-PCR on skin samples from the site of infection (lane 1), from a distant site on the same mouse (lane 2) and from uninfected skin (lane 3). -, cDNA positive for IL-4 and IFN- $\gamma$  (concanavalin A-stimulated splenocytes), and for IL-7 (infected skin).

mRNA expression in the skin and draining lymph nodes, 5 days after penetration of the parasite.

IL-12 was also included in our analysis since it has recently been shown to induce T cells to produce IFN- $\gamma$  thereby inhibiting Th2 responses.<sup>25</sup>

This experiment showed that IL-7 injection led to a decrease in mRNA specific for IFN- $\gamma$  in skin and skin draining lymph nodes, as early as 5 days following infection (Fig. 2a). In addition, IL-7 injection also led to a decrease of IL-12 (p40) mRNA in skin-draining lymph nodes, as shown in Fig. 2(b). No mRNA specific for IL-12 were detected in the skin of either group.



**Figure 2.** Effect of IL-7 administration on production of mRNA specific for IL-12 and IFN- $\gamma$  in skin and skin-draining lymph nodes (DLN), 5 days following infection. Detection of IFN- $\gamma$  mRNA is reported in (a): lane 1, skin of infected mice; lane 2, skin of IL-7-treated, infected mice; lane 3, draining lymph node of infected mice; and lane 4, draining lymph node of IL-7-treated, infected mice; +, cDNA positive for IFN- $\gamma$  (concanavalin A-stimulated splenocytes). Detection of IL-12 (p40) mRNA, in draining lymph node (DLN), is reported in (b): lane 1, infected mice; lanes 2 and 3, IL-7-treated, infected mice.

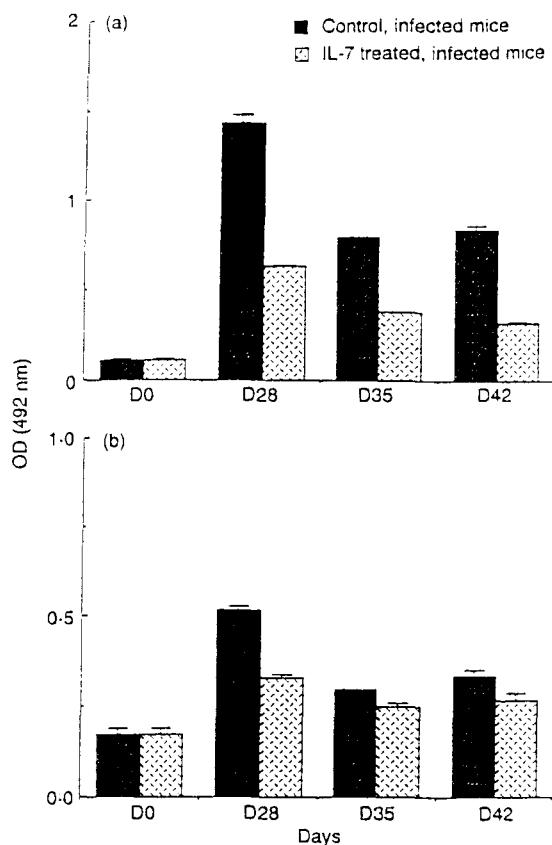
#### Analysis of IFN- $\gamma$ and IL-4 in sera during the course of *S. mansoni* infection

Levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 in sera of infected mice and IL-7-treated, infected mice, on days 0, 28, 35 and 42 following infection, were detected by ELISA (Fig. 3).

We observed a twofold, highly significant decrease of IFN- $\gamma$  in the sera of IL-7-treated, infected mice at all time-points tested (Fig. 3a). In addition, we also noted a significant decrease of IL-4 levels at day 28 following the infection (Fig. 3b).

#### Analysis of Th1-type- and Th2-type-associated humoral response towards adult worm and egg antigens

Recent evidence from murine experimental models indicates that, during infection by schistosomes, a shift in CD4 $^{+}$  T-cell subsets occurs from a Th1 to a Th2 phenotype.<sup>26</sup> This striking switch occurs coincidentally with the release of the eggs into the tissues by female parasites. Furthermore, schistosome egg antigens are potent enough to elicit Th2 responses to irrelevant antigens that alone generate only Th1 responses.<sup>27</sup> As we observed that IL-7 treatment induced a striking decrease in IFN- $\gamma$  (produced by Th1-type CD4 $^{+}$  T cells) we determine the IgG subclasses (IgG1 mainly associated with a Th2-type response, and IgG2a mainly associated with a Th1-type response) specific for adult worm antigenic extracts or egg

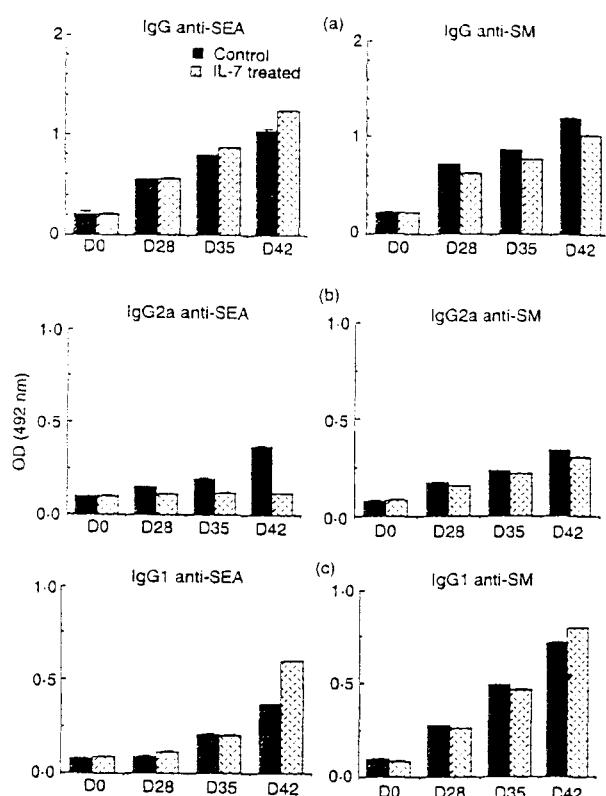


**Figure 3.** Effect of IL-7 administration on production of IFN- $\gamma$  and IL-4 in the sera of infected mice. IL-7-treated, infected mice (▨) and control, infected mice (■), were repeatedly bled at days 0, 28, 35, 42 following the infection. IFN- $\gamma$  (a) and IL-4 (b) were measured in the sera by ELISA (pooled sera diluted at 1:20). This experiment has been done twice, independently and gave the same results.

extracts in the sera of IL-7-treated, infected mice, compared to the control, infected mice (Fig. 4). The determination of the IgG specific for adult worm antigens or the egg extracts showed that, in the group of IL-7-treated mice, an increase in IgG anti-soluble egg antigens (anti-SEA) was observed from day 35, being more important at day 42 (Fig. 4a). In contrast, a lower level of IgG specific for the adult worm antigenic extracts was observed. Measurement of the IgG isotypes IgG2a (Fig. 4b) and IgG1 (Fig. 4c) showed that IL-7-treated, infected mice exhibited a marked decrease in IgG2a specific for the egg antigens (which remains at a level close to the non-infected sera) (Fig. 4b). At day 42, which corresponds to the beginning of egg laying, IgG2a anti-SEA were not detected in IL-7-treated, infected mice. A slight reduction in IgG2a specific for adult worm was also observed in IL-7-treated, infected mice, this difference was less pronounced than that for the anti-SEA IgG2a-specific response.

In contrast, the IgG1 response to adult worm antigens was increased in the group of IL-7-treated, infected mice (Fig. 4c). As observed for total IgG and IgG2a, the modification of IgG1 was more evident towards the egg antigenic extracts.

Taken together, these data show that IL-7 treatment leads to a modification of the humoral response to egg antigens with an increase of the IgG1 and a decrease of IgG2a, whereas



**Figure 4.** Effect of IL-7 administration on the humoral response during *S. mansoni* infection. Total IgG (a), IgG2a (b) and IgG1 (c) specific for egg antigenic extracts (SEA) (right panels) or adult worm antigenic extracts (SM) (left panels) were detected by ELISA in IL-7-treated, infected mice (▨) and control, infected mice (■).

the humoral response to adult antigens remains almost unchanged.

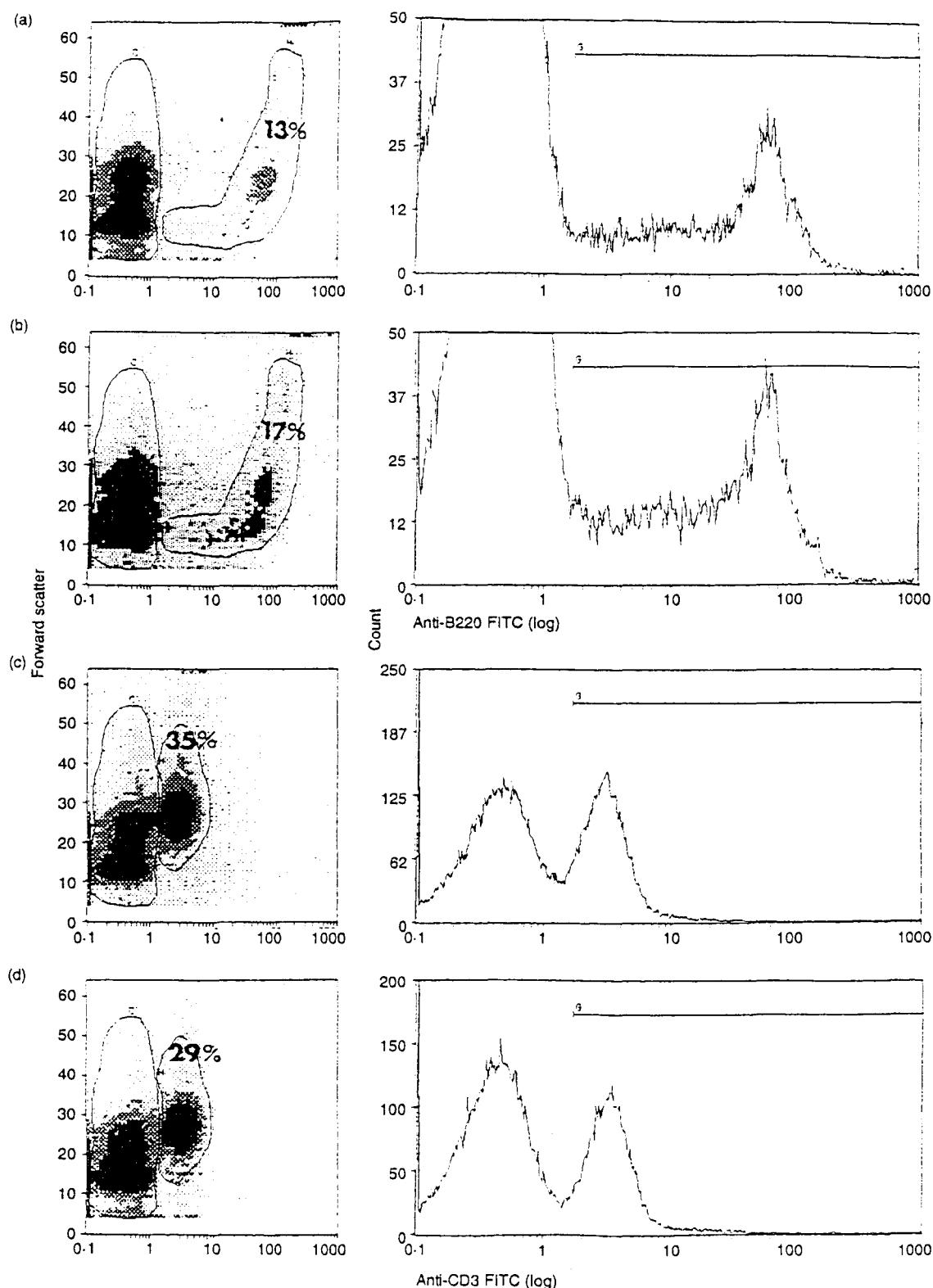
#### Analysis of the percentages of B220<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> T cells in the skin-draining lymph nodes

In view of the known effects of IL-7 on B-cell and T-cell proliferation<sup>28,29</sup> and the very potent role for B cells as APC driving a Th2 response,<sup>30</sup> we determined the percentages of B220-expressing cells and CD3<sup>+</sup> cells, in skin-draining lymph nodes at a early time-point after infection (day 15).

Cytofluorometry analysis (Fig. 5a: control mice and Fig. 5b: IL-7-treated mice) demonstrated that i.d. injection of IL-7 led to an increase in B220<sup>+</sup> cell number in lymph nodes (right panels of Fig. 5a and b). Contrary to its effect on the percentage of B cells, IL-7 treatment led to a slight reduction of CD3-expressing T cells (Fig. 5c: control mice and Fig. 5d: IL-7-treated mice).

#### Analysis of the time-course of early parasite migration in lung and liver

The rapid effect of IL-7 administration (as early as day 5) on IFN- $\gamma$  mRNA in the skin draining lymph nodes, led us to determine the fate of schistosomula at the very early stages of infection, especially in the lungs, the major site of parasite elimination.<sup>8</sup>



**Figure 5.** Determination of the percentages of B and T cells in skin-draining lymph nodes of IL-7-treated, infected mice (b, d) and control, infected mice (a, c). B-cell numbers (a, b) were determined using an anti-B220 monoclonal antibody, and T-cell numbers (c, d) were determined using an anti-CD3 $\varepsilon$  monoclonal antibody. Results are representative of three independent experiments. The total cell numbers in lymph nodes of mice from both experimental groups were not significantly different.

Mice were infected with 500 cercariae, 12 hr after having been injected with PBS (controls) or IL-7. At days 5, 7, 9 and 15 following infection, parasite burdens in lungs and livers were measured as described in the Materials and methods (Fig. 6).

The number of parasites recovered from the lungs of IL-7-treated, infected mice (open circles) was strikingly reduced compared to the control, infected group (close circles) at day 5 postinfection (Fig. 6). At day 15, almost no parasites were found in the lungs of either group. We then determined the worm burden of livers by perfusion of isolated livers and observed that parasites began to reach the liver from day 9 following infection. A lower number of parasites was observed in the livers of IL-7-treated, infected mice, compared to the control, infected mice (Fig. 6).

This demonstrates that there is a different migration and/or localization of the parasites in the IL-7-treated, infected mice at the very early stages of infection (IL-7 has no effect on the parasite *in vitro*, data not shown).

#### Analysis of the total worm burden and the pathology in the liver

Forty-two days postinfection, the total worm burden was assessed by blood perfusion (Fig. 7a) and collagen was measured in the infected livers (Fig. 7b).

A single intradermal administration of exogenous IL-7 (0.3 µg/mouse) prior to infection, led to a dramatic increase in the parasite burden (Fig. 7a). In addition, the determination of the level of collagen in livers of both groups (Fig. 7b), shows that IL-7 treatment induced a more severe fibrosis and pathology associated with *S. mansoni* infection.

#### DISCUSSION

Skin plays an important role in the immune system. It is the site of complex humoral and cellular responses. In mice, epidermis in itself may be regarded as a self-supporting immunological organ composed of Langerhans' cells, dendritic T cells

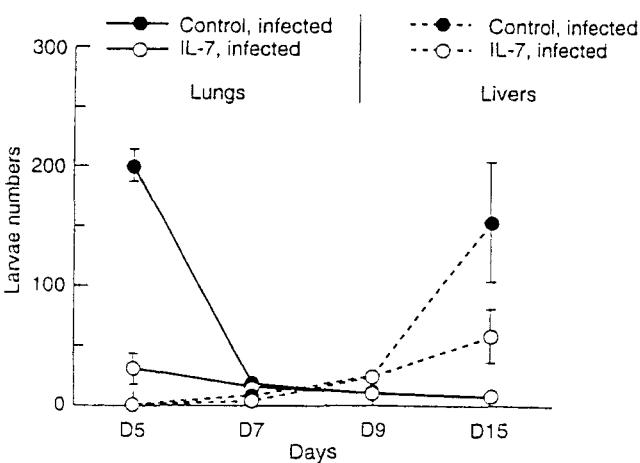


Figure 6. Early migration pattern of *S. mansoni* in IL-7-treated mice, compared to control, infected mice (representative of three independent experiments). Mice were infected with 500 cercariae and at days 5, 7, 9 and 15 following infection, the number of young parasites was determined in lungs and in isolated livers in IL-7-treated, infected mice (open circles) and in control, infected mice (close circles).

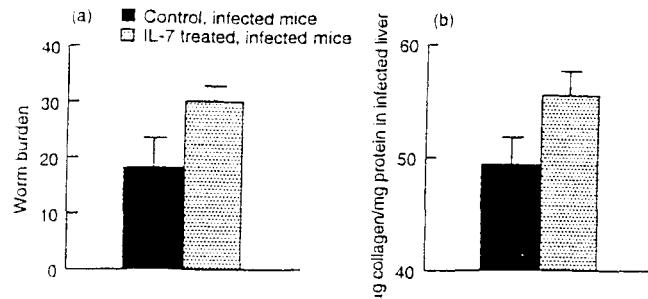


Figure 7. Effect of IL-7 administration on the infection by the parasite *S. mansoni*: determination of the worm burden (a) and the pathology associated with the disease (b). Mice ( $n=15/\text{group}$ ) were i.d. injected with rh-IL-7, (▨) or with PBS (■) 18 hr before being infected with 50 furcercariae. As described in the Materials and methods, 42 days later, the total adult worm burden was determined by blood perfusion (a). A statistical analysis using the Student's *t*-test gave a high significance of the difference between the two groups ( $2P<0.0001$ ). The levels of collagen in IL-7-treated, infected mice (▨) and in control, infected mice (■) is reported in (b). Statistical analysis of the difference between both groups (Student's *t*-test) gave a value of  $2P<0.0137$ . This experiment is representative of two independent experiments. Data are reported as mean  $\pm$  SEM of  $\mu\text{g}$  collagen per mg protein.

and keratinocytes. It seems therefore obvious that these cells can play an important role in the initiation of the immune response by their ability to produce cytokines.

In our study, we addressed the potential role played by skin following an infection by *S. mansoni*. We first designed a series of experiments to compare the cytokine profiles in skin samples of mice infected intravenously or transcutaneously with the parasite, or in control animals. We observed that IL-1 and TNF- $\alpha$  could be detected in all skin samples, whereas IL-6 was only detected in infected mice. In contrast, IL-2, IL-5 and IL-10 were not detected. Most interestingly, IL-4, IL-7 and IFN- $\gamma$  were only present in the skin of mice infected transcutaneously. The maximal detection of IL-4 and IFN- $\gamma$  was observed 5 days following the penetration of the parasite, coinciding with the moment the larvae leaves the skin for the lungs. By day 7, the expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA was undetectable. Quite unexpectedly, we observed that the expression of IL-7 began at day 1 postinfection and continued until day 21. We hypothesized that this prolonged expression of IL-7 in the skin could play a role, either indirectly or directly, on the outcome of the infection. As a result of this observation, we decided to focus our attention on the potential role of IL-7 in the development of the immune response in murine *S. mansoni* infection.

IL-7 is a bone-marrow stromal cell-derived cytokine, first identified as a soluble molecule with pre-B-cell growth factor activity.<sup>33,31</sup> It has also been proposed to promote the maturation of T cells<sup>32</sup> and the viability or growth of early adult and fetal thymic T cells.<sup>33</sup> IL-7 can also support the proliferation of mature T cells,<sup>29</sup> increase cytotoxic T-cell or lymphokine-activated killer activity<sup>34</sup> and augment monocyte functions.<sup>35</sup> It is noteworthy that keratinocyte-derived IL-7 is a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice.<sup>36</sup>

Recent studies have shown that IL-7 can play a beneficial as well as a detrimental role in the case of infectious diseases. In patients with tuberculoid leprosy, it was shown that IL-7

is specifically produced in lepromatous skin lesions<sup>37</sup> and therefore may be involved in the cell-mediated immune response to *Mycobacterium leprae*. In addition, it has been demonstrated *in vitro* that IL-7 activates the leishmanicidal effector functions of murine macrophages<sup>38</sup> and *in vivo*, that i.v. administration of human recombinant IL-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis by stimulating lymphopoiesis of B cells belonging to the B2 subset.<sup>39,40</sup> In contrast, it has been recently reported that i.v. injection of human recombinant IL-7 stimulates protective immunity against the parasite *Toxoplasma gondii*.<sup>41</sup>

The potential role of IL-7 as an immunoregulatory cytokine during *S. mansoni* infection *in vivo* was investigated in our study. A single intradermal injection of recombinant IL-7 was performed at the site of infection prior to parasite deposition onto the skin. Unexpectedly, this study demonstrated that *in vivo* IL-7 treatment aggravated the course of murine schistosomiasis, illustrated by an increased adult worm burden and a more dramatic fibrosis in the liver.

In the well-documented model of percutaneous vaccination with irradiated cercariae, it has clearly been demonstrated that protection against challenge infection is not mediated by CD8<sup>+</sup> T cells,<sup>42</sup> but by IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T cells since *in vivo* administration of neutralizing antibody to IFN- $\gamma$  reduced the level of protection by 90%.<sup>43</sup> We thus looked for the presence of IFN- $\gamma$  in the sera of IL-7-treated and untreated infected mice. The data showed very clearly that IL-7 administration in the skin prior to parasite penetration, led to a strong decrease of IFN- $\gamma$  production during the later course of infection. Moreover, the effect of IL-7 administration on IFN- $\gamma$  was very rapid since we could observe a reduction of the expression of IFN- $\gamma$ -specific messengers as early as 5 days after infection, in skin and skin-related lymph nodes. This reinforces the central role for IFN- $\gamma$  in protective immunity, particularly at the stage of elimination of young larvae in the lungs. The strong reduction of IFN- $\gamma$  would lead to a less effective cell-mediated parasite killing in the lungs and may be responsible for the higher adult worm burden observed in the IL-7-treated, infected mice.

The parallel decrease in IL-4 levels in the sera of IL-7-treated, infected mice, was less pronounced than for IFN- $\gamma$ , but was still significant. The cross-talk between IL-4 and IFN- $\gamma$  has been reported. IL-4 is antagonistic for many of the activities of IFN- $\gamma$  and suppresses the development of IFN- $\gamma$ -producing cells, but enhances IFN- $\gamma$  synthesis.<sup>44</sup> When the production of IFN- $\gamma$  is maximal, the coincidental IL-4 production could enhance IFN- $\gamma$  synthesis, but slowly inhibit the development of new IFN- $\gamma$ -producing cells. This would favour the emergence of Th2-type cells. From our data, we cannot conclude how IL-7 influences IFN- $\gamma$  and IL-4 expression, but the observation that both cytokines decrease in the group of IL-7-treated, infected mice, suggests a close regulation between the three cytokines during the first stage of infection (before the onset of egg-laying). This may give insight into the tight regulation between Th1- and Th2-type cells occurring during *S. mansoni* infection.

Along the same lines, we demonstrated that there is a modification in Th1-/Th2-associated isotype profiles (respectively IgG2a and IgG1) of egg antigen-specific IgG, without the concomitant expression of Th2 'classical cytokine' such as IL-4. This, associated with lower level of IFN- $\gamma$  both in sera

and skin-draining lymph nodes and the decrease of IL-12 in skin-draining lymph nodes, might allow us to propose the following explanations to our results.

First, IL-7, by decreasing the levels of IFN- $\gamma$  and IL-12, both of which play a major role in promoting Th1 differentiation,<sup>45,46</sup> would favour the development of Th2 cells. In addition, we observed an increase in B-cell number in IL-7-treated, infected mice. Since B cells are known to be very potent APC for Th2-type cells,<sup>30</sup> this observation could also explain the effect of IL-7 on accelerating or favouring the development of this CD4<sup>+</sup> T-cell subset.

The second explanation might be that the presence of IL-7 in infected skin could directly act on the migration of the parasite within the infected host and interfere with the development of the immune response of the host. In order to assess this hypothesis experimentally, we estimated the number of young larvae both in the lungs and liver from day 5 to day 15 following infection. The results showed that the migration kinetics and/or the migratory route of the parasites might have been altered in IL-7-treated, infected mice. Indeed, fewer larvae were detected in lungs of IL-7-treated mice. Since the migration route of the parasite has been shown to be involved in the development of protective immunity, we are now investigating, in greater detail, the route of parasite migration in IL-7-treated, infected mice. We are also testing whether IL-7, produced in the skin during penetration of cercariae, and the migration of the larvae through the skin, leads to up- and/or down-regulation of adhesion molecules in the skin that may accelerate, delay or modify the migration of the parasites.

In conclusion, our data show that a single i.d. administration of IL-7 prior to infection, aggravates the disease thus favouring the parasite more than its host. Endogenous IL-7 may be important in the immune response against *S. mansoni*, since this cytokine was detected in infected skin, both at the site of infection and, interestingly, at a distant site, and never in non-infected, intact murine skin. To give further insight into a potential physiological role of epidermal-derived IL-7, it would be valuable to identify the cutaneous cells which produce IL-7 after infection (presumably keratinocytes,<sup>37,47</sup> our preliminary observations) and to study whether other epidermal symbionts such as Langerhans' cells or dendritic T cells respond to IL-7. In addition, we are now testing whether parasite extracts themselves can lead to the production of IL-7 in the skin or if its expression is up-regulated in the skin because of the trauma caused by penetration of the parasite and the subsequent inflammation.

Alternative approaches to assess the role of endogenous IL-7 in the immune response to *S. mansoni* would be either to treat the animals with neutralizing monoclonal antibodies to IL-7,<sup>48</sup> or to use IL-7 knock-out mice.<sup>49</sup>

Undoubtedly, skin appears to be the primary organ of immune sensitization following infection with *S. mansoni*. Regarding the parasite-host interaction in the skin, IL-7 treatment led to a better survival of the parasites due to their escape from the host's immune attack. The cutaneous route of infection may favour the parasite during the initial stages of the infection and the local production of IL-7 could enhance the survival of the infected larvae. In addition, the long-lasting production of IL-7 in infected skin, might also be beneficial for the parasites during reinfection. This might be a clue to

explain why this very peculiar method of infection has been maintained during evolution.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Fontaine, R. Neveu, Dr D. Dombrovic, R.J. Pierce, Dr P. Sutton and Dr C. Verwaerde for their very helpful and kind discussions, and M. Leroux and S. Vanwingene for technical help in the preparation of the parasite materials. The assistance of B. Quatanens for FACS analysis, F. Bonet for secretarial help and J.-L. Neyrinck for statistical studies on our experimental data, were greatly appreciated.

#### REFERENCES

- WHO Expert Committee on the control of Schistosomiasis (1993) Public health impact of schistosomiasis: disease and mortality. *Bull WHO* **71**, 657.
- STIREWALT M.A. (1974) *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomula. *Adv Parasitol* **12**, 115.
- GEORGI J.R. (1982) *Schistosoma mansoni*: quantification of skin penetration and early migration by differential radioassay and autoradiography. *Parasitology* **84**, 263.
- KAMIYA H., OZAKI T., NAKAYAMA H. & INABA T. (1993) Immunizing potential of ultraviolet attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* in rodent hosts. *Parasitol Res* **79**, 293.
- PEARCE E.J., CASPAR P., GRZYCH J.-M., LEWIS F.A. & SHER A. (1991) Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* **173**, 159.
- MOSMANN T.R. & MOORE K.W. (1991) The role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. *Immunol Tod* **12**, 49.
- SMYTHIES L.E., PEMBERTON R.M., COULSON P.S., MOUNTFORD A.P. & WILSON R.A. (1992) T cell-derived cytokines associated with pulmonary immune mechanisms in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **148**, 1512.
- WILSON R.A., COULSON P.S. & DIXON B. (1986) Migration of the Schistosomula of *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae and normal mice: an attempt to identify the timing and site of parasite death. *Parasitology* **92**, 101.
- MOUNTFORD A.P., COULSON P.S., PEMBERTON R.M., SMYTHIES L.E. & WILSON R.A. (1992) The generation of interferon-gamma producing T lymphocytes in skin-draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology* **75**, 250.
- SILBERBERG-SINAKIN I., GIGLI I., BAER R.L. & THORBECKE G.J. (1980) Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. *Immunol Rev* **53**, 203.
- MOLL H. (1993) Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* **14**, 383.
- BIEBER T. (1994) Fc<sub>α</sub>RI on human Langerhans cells: a receptor in search of new functions. *Immunol Tod* **15**, 52.
- SATO H. & KAMIYA H. (1995) Role of epidermal Langerhans' cells in the induction of protective immunity to *Schistosoma mansoni* in guinea-pigs. *Immunology* **84**, 233.
- GASPARI A.A. & KATZ S.I. (1988) Induction and functional characterization of class II MHC (Ia) antigens on murine keratinocytes. *J Immunol* **140**, 2596.
- RAMASWAMY K., SALAFSKY B., LYKKEN M. & SHIBUYA T. (1995) Modulation of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1 RA production in human keratinocytes by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Immunol Infect Dis* **5**, 100.
- KUPPER T.S. (1995) The role of epidermal cytokines. In: *The Immunophysiology of Cells and Cytokines*. (eds E. Shevach & J. Oppenheim) Oxford University Press, New York.
- ENK A.H. & KATZ S.I. (1992) Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1398.
- CUMBERBATCH M. & KIMBER I. (1992) Dermal tumor necrosis factor- $\alpha$  induces dendritic cell migration to draining lymph nodes and possibly provides one stimulus to Langerhans cell migration. *Immunology* **75**, 257.
- MORIKAWA Y., TOHYA K., ISHIDA H., MATSUURA N. & KAKUDA K. (1995) Different migration patterns of antigen-presenting cells correlate with Th1/Th2-type responses in mice. *Immunology* **85**, 575.
- SMITHERS S.R. & TERRY R.J. (1969) Immunity in schistosomiasis. *Ann N Y Acad Sci* **160**, 826.
- CLEGG J.A. & SMITHERS S.R. (1972) The effects of immune Rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int J Parasitol* **2**, 79.
- LOPEZ DE LEON A. & RODSKIND M. (1985) A simple method for collagen and total protein determination in formalin-fixed-embedded sections. *J Histochem Cytochem* **33**, 737.
- HAUSER C., SAURAT J.H., SCHMITT A., JANNIN F. & DAYER J.M. (1986) Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol* **136**, 3317.
- KIRNBAUER R., KÖCK A., SCHWARZ T. et al. (1989) Interferon  $\beta$ 2, B-cell differentiation factor 2, hybridoma growth factor (Interleukin 6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol* **142**, 1922.
- AFONSO L.C.C., SCHARTON T.M., VIEIRA L.Q., WYSOKA M., TRINCHERI G. & SCOTT P. (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* **263**, 235.
- PEARCE E.J., CASPAR P., GRZYCH J.-M., LEWIS F.A. & SHER A. (1991) Down regulation of TH1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* **173**, 159.
- KULLBERG M.C., PEARCE E.J., HEINY S., SHER A. & BERZOFSKY J.A. (1992) Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol* **148**, 3264.
- GOODWIN R.G., LUPTON S. & SCHMIERER A. (1989) Human interleukin-7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 302.
- MORRISSEY P.J., GOODWIN R.G., NORDAN R.P. et al. (1989) Recombinant interleukin-7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med* **169**, 707.
- GAJEWSKI T.F., PINNAS M., WONG T. & FITCH F.W. (1991) Murine Th1 and Th2 cell clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol* **146**, 1750.
- NAMEN A.E., LUPTON S. & HJERRILD K. (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**, 571.
- WILES M.V., RUIZ P. & IMHOFF B.A. (1992) Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol* **22**, 1037.
- MURRAY R., WRIGHTON N., LEE F. & ZLOTNICK A. (1989) Interleukin-7 is a thymocyte growth and maintenance factor for mature and immature thymocytes. *Int Immunol* **1**, 526.
- JICHA D.L., MULE J.J. & ROSENBERG S.A. (1991) Interleukin-7 generates anti-tumor cytotoxic T lymphocytes against murine sarcomas with efficacy in cellular adoptive immunotherapy. *J Exp Med* **174**, 1511.
- STANDIFORD T.J., STRIETER R.M., ALLEN R.M., BURDICK M.D. & KUNKEL S.L. (1992) IL-7 up-regulates the expression of IL-8 from resting and stimulated human monocytes. *J Immunol* **149**, 2035.
- MATSUE H., BERGSTRESSER P.R. & TAKASHIMA T. (1993) Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *J Immunol* **151**, 6012.
- SIELING P.A., SAKIMURA L., UYEMURA K. et al. (1995) IL-7 in the

- cell-mediated immune response to a human pathogen. *J Immunol* **36**, 2775.
38. GESSNER A., VIETH M., WILL A., SCHRÖPPEL K. & RÖLLINGHOFF M. (1993) Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Infect Immunol* **61**, 4008.
39. GESSNER A., WILL A., VIETH M., SCHRÖPPEL K. & RÖLLINGHOFF M. (1995) Stimulation of B-cell lymphopoiesis by interleukin-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis. *Immunology* **84**, 416.
40. HOERAUF A., SOLBACH W., RÖLLINGHOFF M. & GESSNER A. (1995) Effect of IL-7 treatment on *Leishmania major*-infected BALB.Cid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *Int Immunol* **7**, 1879.
41. KASPER L.H., MATSUURA T. & KAHN I.A. (1995) IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **155**, 4798.
42. VIGNALI D.A.A., CROCKER P., BICKLE Q.D., COBBOLD S., WALDMAN H. & TAYLOR M.G. (1989) A role for CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to *Schistosoma mansoni* induced by 20krad-irradiated and RoII-3128 terminated infections. *Immunology* **67**, 466.
43. SMYTHIES L.E., COULSON P.S. & WILSON R.A. (1992) Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice previously vaccinated with irradiated cercariae. *J Immunol* **149**, 3654.
44. NOBLE A. & KEMENY D.M. (1995) Interleukin-4 enhances interferon- $\gamma$  synthesis but inhibits development of interferon- $\gamma$  producing cells. *Immunology* **85**, 357.
45. GAJEWSKI T.F., JOYCE J. & FITCH F.W. (1989) Anti-proliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IFN- $\gamma$ . *J Immunol* **143**, 15.
46. SEDER R.A., GAZZINELLI R., SHER A. & PAUL W.E. (1993) IL-12 acts directly on CD4<sup>+</sup> T cells to enhance priming for IFN- $\gamma$  production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1088.
47. HEUFLER C., TOPAR G., GRASSEGER A. et al. (1993) Interleukin-7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* **178**, 1109.
48. GRABSTEIN K.H., WALDSCMIDT T.J., FINKELMAN F.D. et al. (1993) Inhibition of murine B and T lymphopoiesis *in vivo* by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J Exp Med* **178**, 257.
49. VON FREEDEN-JEFFRY U., VIERA P., LUCIAN L.A., MCNEIL T., BURBACH S.E.G. & MURRAY R. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* **181**, 1519.

## ARTICLE 2

**Cutaneous interleukin-7 transgenic mice display a propitious environment to *Schistosoma mansoni* infection.**

*Soumis à Parasite Immunology, Novembre 1999.*

## I - OBJECTIFS :

Lors de nos précédents travaux, nous avons mis en évidence l'expression d'IL-7 dans la peau de souris, infectées par le parasite *Schistosoma mansoni*, et ceci dès les premières heures suivant l'infection. L'administration intradermique d'IL-7 avant infection, favorise le développement du parasite. Néanmoins, l'injection d'IL-7 dans la peau, a pu conduire à une diffusion de la molécule, susceptible de modifier les conditions d'induction précoce de la réponse immune. Les kératinocytes constituant la première source potentielle d'IL-7 rencontrée par les schistosomules, une étude du rôle précis de l'IL-7 produite par les kératinocytes nous est apparue indispensable. Récemment un modèle de souris transgénique pour l'IL-7, dont le transgène présente la particularité d'être exprimé principalement par les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, a été décrit (Williams IR, 1997). Les caractéristiques immunologiques connues de ces souris ont été décrites dans le chapitre III de l'Introduction. Ce modèle apparaissait tout à fait adapté à notre étude. L'infection de ces animaux a donc été réalisée et comparée avec des animaux non-transgéniques de même fond génétique.

## II - RESULTATS :

Suite à leur pénétration transcutanée, les schistosomules entament une longue migration *via* les poumons et finissent par se fixer au niveau des veines mésentériques. A ce stade, les vers adultes mâles et femelles sont accouplés et la ponte débute vers la 6<sup>ème</sup> semaine de l'infection (Wheater PR, 1979). Les œufs sont éliminés dans les selles pour la plupart, mais certains d'entre-eux restent bloqués dans les tissus et notamment dans le foie. Une réaction inflammatoire à l'origine du granulome bilharzien se développe et aboutit à une fibrose plus ou moins intense.

Il faut tout d'abord noter que la numération des vers adultes au jour 54 montre une charge parasitaire plus élevée chez les animaux transgéniques. Par contre, le nombre d'œufs hépatiques ainsi que la fécondité des femelles sont identiques, dans les deux groupes de souris.

Ce résultat est assez surprenant puisque, dans la mesure où la fécondité des femelles est inchangée et que les animaux transgéniques présentent un nombre augmenté de vers adultes, la quantité d'œufs devrait être plus importante, ce qui n'est pas le cas ici. En fait une analyse de la répartition mâles / femelles montre un nombre plus élevé de mâles chez les souris transgéniques, ce qui peut expliquer les résultats que nous avons obtenus. Parallèlement la quantité de collagène hépatique (témoin de la fibrose) est augmentée chez les animaux transgéniques; ce phénomène est associé à une augmentation de la taille de la réaction granulomateuse périovulaire et non à une augmentation du nombre d'œufs.

La schistosomiase murine expérimentale est associée à une réponse immune précoce de type Th1, dirigée contre le stade larvaire, caractérisée par la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 (Anderson S, 1998; Mountford AP, 1998; Pemberton RM, 1991a). Dès le début de la ponte, une commutation vers une réponse de type Th2 intervient; elle est associée à la production d'IL-4 et d'IL-10 (Cheever AW, 1994; Wynn TA, 1997). Par ailleurs, le profil isotypique des anticorps produits au cours de ces réponses est lui aussi caractéristique d'une association entre la réponse Th1 et les IgG2a alors que les IgG1 sont associées à une réponse de type Th2 (Coffman RL, 1988). De la même manière que lors de l'injection intradermique d'IL-7, on observe une orientation de la réponse humorale spécifique des antigènes d'œufs vers un profil Th2. Aucune variation de la réponse humorale spécifique des antigènes de vers adultes n'est observée, là encore, comme dans le cas de l'injection d'IL-7.

Afin d'expliquer le rôle potentiel de la réponse immune précoce initiée dans la peau et les ganglions drainant le site d'infection, une analyse des populations cellulaires ganglionnaires a été réalisée. En effet, l'IL-7 joue un rôle de facteur de croissance sur les populations cellulaires lymphoïdes (Goodwin RG, 1989; Grabstein KH, 1990). Une augmentation du nombre de cellules B associée à une diminution du nombre de lymphocytes T est observée chez les animaux transgéniques non infectés. De plus, 5 jours après infection le nombre total de cellules B est aussi augmenté dans ce même groupe d'animaux. Enfin, nous nous sommes intéressés à la synthèse de différents ARNm spécifiques de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  (type Th1) ainsi que l'IL-4 et l'IL-13 (type Th2). La différence majeure, entre les animaux transgéniques et les animaux contrôles, concerne l'expression d'IL-4 dans les peaux saines transgéniques et la forte augmentation de sa transcription dès le 2<sup>ème</sup> jour suivant l'infection. A ce stade, elle reste encore indétectable dans les peaux des animaux contrôles.

### **III - CONCLUSION**

Cette seconde étude permet de confirmer le rôle de l'IL-7 sur le développement du parasite ainsi que sur la réponse immune associée, bien que rien ne permette de décrire un effet direct de cette cytokine. Les résultats obtenus ici confirment l'étude concernant l'injection intradermique d'IL-7. Contrairement à nos attentes, la présence de cette cytokine ou du moins ses effets ne semblent pas se limiter strictement à la peau dans ce dernier modèle. Néanmoins, il est indiscutable que la présence d'IL-7 dans l'épiderme dès la pénétration du parasite induit des modifications, probablement environnementales, qui favorisent le développement du parasite et aboutissent à une aggravation de la pathologie hépatique.

**Title : Cutaneous interleukin-7 transgenic mice display a propitious environment to *Schistosoma mansoni* infection.**

**Running Title : *Schistosoma mansoni* infection in IL-7 transgenic mice.**

**Authors :** Olivier ROYE\*<sup>‡</sup>, Myriam DELACRE\*, Ifor R. WILLIAMS<sup>#</sup>, Claude AURIAULT\* and Isabelle WOLOWCZUK\*.

<sup>‡</sup> : corresponding author

\* : CNRS UMR 8527, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur A. Calmette, BP 447, 59021 LILLE, France.

# : Depts. of Pathology and Dermatology, Emory University School of Medicine, 2339 WMB, 1639 Pierce Drive, Atlanta, GA 30322, USA.

**Key Words :** *Schistosoma mansoni*, interleukin-7, skin.

## **Abstract**

IL-7 is early produced in *Schistosoma mansoni*-infected human and murine skin. This cytokine was recently shown to favor the development of maturing larvae. Here, we chose to investigate the role of keratinocyte-derived IL-7. Indeed, these cells are the predominant constituents of epidermis, the first tissue encountered by the parasite *Schistosoma mansoni* when larvae infect the definitive vertebrate host. For this purpose, IL-7 cutaneous transgenic mice were infected and compared to infected littermate control. While egg number and female fecundity remained unchanged, increased number of adult worms was observed. This was associated to biased male / female sex ratio. Finally, we observed a more intensive hepatic fibrosis and then an important aggravation of the pathology. Moreover, these infected transgenic animals exposed a dominant Th2-type humoral response towards egg antigens that could be explained by the particular immunological cutaneous features arising from the higher IL-7 levels. The results of this study confirm the benefic role of IL-7 to *Schistosoma mansoni* focusing on keratinocyte-derived IL-7.



# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

*Schistosoma mansoni* is one of the causative agents of schistosomiasis, a parasitic disease affecting 200 million people worldwide. Infection of the vertebrate host is initiated by obligatory penetration of the skin by the aquatic larvae. They leave the skin after 24 to 48 hours in mice and 3 to 4 days in human (Roye O., *et al.* 1998). Then, they are engulfed in a dermal vessel and reach the lungs following the bloodstream. Finally, they enter the hepatic portal system via systemic circulation where adult worms complete their maturation and females begin to lay numerous eggs at the mesenteric vein level.

In mice, immunity against *S. mansoni* initially involves a Th1-type response directed against schistosomula in lungs. This profile is progressively replaced by a Th2-type response depending on the beginning of egg laying in liver (Pearce E. J., *et al.* 1991). Interestingly, a model of vaccination with radiation attenuated larvae in C57Bl/6 mice show that parasite attrition occurred in lungs and is mediated by mechanisms involving interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produced by CD4 $^{+}$  T lymphocytes (Pearce E. J., *et al.* 1991). Moreover it appears that these Th1 cells could be generated in the lymph nodes draining the cutaneous infection site and quickly join the lungs (Mountford A. P., *et al.* 1992). Moreover, during skin penetration, schistosomula are in close contact with various cellular populations such as keratinocytes, Langerhans cells, dendritic epidermal T-cells, and while leaving the cutaneous environment, the dermal endothelial cells. All these cells could potentially participate to the induction of the immune response directed against *Schistosoma mansoni*. The necessary communication between the epidermal and dermal cells is principally mediated by cytokines. These molecules

are considered as soluble mediators produced by immune cells. Beyond these activities, cytokines such as granulocyte-macrophage colony-simulating factor (Greil J., *et al.* 1988), interleukin (IL)-3 (Feng Z. Y., *et al.* 1988), IL-2 (Mazingue C., *et al.* 1989) and also tumor necrosis factor  $\alpha$  (Kongshavn P. A. L. & Ghadirian E. 1989) and IFN- $\gamma$  (Bakhiet M., *et al.* 1993) were shown to be positively involved in differentiation, growth and maturation process of several parasites within their host (Denis M., *et al.* 1991). Recently we demonstrated that IL-7, one of these cytokines, play a preponderant role to *Schistosoma mansoni* parasite survival in mice (Wolowczuk I., *et al.* 1997, Wolowczuk I., *et al.* 1999, Wolowczuk I., *et al.* 1999).

The initial studies of IL-7 activities revealed a potent proliferative stimulus of pro-B and pre-B cells from normal bone marrow (Namen A. E., *et al.* 1988). Subsequent tissue distribution analysis demonstrated that high level of IL-7 mRNA was present in the thymus and it was soon discovered that this cytokine was also a potent growth promoter for T cell progenitors (Suda T. & Zlotnik A. 1991, Watson J. D., *et al.* 1989), indeed disruption of the gene reveals IL-7 as a non redundant cytokine (Von-Freeden-Jeffry U., *et al.* 1995). IL-7 has since emerged as a major factor in the process of both B cell and T cell development. As studies with IL-7 have continued to progress, additional biological activities have begun to emerge. IL-7 stimulates the growth of immature and mature T cells (Londei M., *et al.* 1990) and promotes the expansion and effector function of cytolytic T cells and their precursors (Appasamy P. M. 1993). Moreover, IL-7 enhances lymphokine-activated killer cell activity in peripheral blood (Moller P., *et al.* 1996) and can stimulate the antitumor abilities of monocytes and macrophages (Alderson M. R., *et al.* 1991). Different cellular type and especially stromal medullar cells, epithelial thymic and intestinal cells and macrophages are

able to produce IL-7 (Appasamy P. M. 1993). In skin, its principal sources are activated keratinocytes (Heufler C., *et al.* 1993) and endothelial cells (Roye O., *et al.* 1998).

We recently showed that amount of IL-7 mRNA is increased in skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice from day 0 to day 21. Moreover this synthesis was strictly dependent on the percutaneous penetration of the infectant larvae since intravenous injection of schistosomula did not reproduced this effect. To study the role of that IL-7 production, 12 h before infection, we intradermally injected the recombinant cytokine at the site surrounding parasite deposition. Surprisingly we observed that this unique injection led to a more severe liver pathology and to an increased worm burden. Concomitantly, IL-12 and IFN- $\gamma$  specific mRNA synthesis in skin and in infection site-draining lymph nodes were decreased. Finally a shift from Th1 to Th2 type associated humoral response towards the egg antigens occurred (Wolowczuk I., *et al.* 1997). These results showed that IL-7 affects both the development of the host's immune response and the behaviour of the parasite within the infected animals. So, IL-7 early produced in infected skin could fundamentally influence the course of infection. These encouraging findings led us to study their relevance in human infection using a model of severe combined immunodeficient mice engrafted with human skin and injected with autologous peripheral blood leucocytes. Subsequent, analysis of the infected human skin revealed an *in vivo* expression of human IL-7 in the epidermal layers and strikingly at the endothelial level. In addition, the vascular production of IL-7 was shown to be directly inducible by schistosome larvae. Finally, measurements of IL-7 concentrations in plasma of infected Africans revealed that the youngest, which are also the most infected, displayed the highest IL-7 levels (Roye O., *et al.* 1998). We further clarify issue regarding the contribution of this cytokine in schistosomiasis by infecting with targeted inactivation of the IL-7 gene (IL-7

KO mice (Von-Freeden-Jeffry U., *et al.* 1995)). In IL-7 KO mice, the parasite-specific humoral response followed a Th1 profile and schistosome development was greatly impaired since it led to an altered fecundity of females and to a surprising, unexpected blockade of parasite growth, allowing to qualify schistosomes developing in an IL-7 deprived environment as dwarf parasites (Wolowczuk I., *et al.* 1999).

All these results highlight the particular importance of IL-7 on parasite survival and development, and point out the fascinating host-parasite relationship as soon as during the cutaneous stage. The very first contact between cercariae and IL-7 occurs with epidermal keratinocytes. This questions about the precise role of IL-7 produced by these particular cells in the infection. The IL-7 KO mice did not allow us to address this question since the entire animal is deprived of IL-7. Beside, the intradermal administration of rIL-7 could not exclude the diffusion of the molecule thus modifying the peripheric immune response. We thus chose to investigate the course of *Schistosoma mansoni* infection in transgenic (Tg) mice overexpressing IL-7 in basal keratinocytes under the control of the human K14 promoter. These mice were recently generated by Williams *et al.* (Williams I. R., *et al.* 1997). Because overproduction of IL-7 in skin is thus limited to epidermis, infection of these Tg mice could give further insight into the potential roles of keratinocyte-derived IL-7 during infection with the skin penetrating parasite *schistosoma mansoni* and perhaps, more generally, during cutaneous diseases.

## **MATERIALS AND METHODS**

## MATERIALS AND METHODS

### 1 – Parasites

The *Schistosoma mansoni* (Puerto Rican strain) life cycle was maintained at the Pasteur Institute of Lille using *Biomphalaria glabrata* snails as the intermediate hosts and golden hamsters as the definitive hosts. Cercariae of *S. mansoni* were obtained from infected *B. Glabrata* snails by use of artificial light.

### 2 – Animals and infection protocols

K14/IL-7 transgenic (Tg) mice were generated and kindly provided by Williams I. R. (REF). Transgenic mice and littermate control (Lc) sex matched mice were used at the age of 6 to 8 weeks. Because homozygous Tg mice display acute skin lesions and prematurely die, only heterozygous Tg mice were used in our experiments.

For infection, animals were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg; Sanofi, Libourne, France) and then percutaneously exposed to 50 furcocercariae (or 500 for lungs and lymph nodes studies), according to the method first described by Smithers *et al.* (Smithers S. R. & Terry R. J. 1969). Uninfected mice used as controls were anesthetized using the same procedure with the infectious furcocercariae solution being replaced by parasite-free water.

### 3 – Parasites recovery from lungs and liver and enumeration of eggs

Mice were sacrificed at day 6, lungs excised and chopped into very small fragments before transfer into a small petri dish containing 2 ml of minimum essential medium (MEM).

The moistened fragments were then transferred onto a 90 µm mesh (Hartmann-Larochette, Charente, France) which was placed on a 50 ml glass tube filled to the top with MEM. The young worms that migrated from the lungs into the MEM were collected after an overnight incubation at 37°C.

The parasite burden was determined at day 54 by total blood perfusion of the animals. At the time of perfusion, livers were collected, weighed and one lobe was fixed in Bouin's solution for collagen measurement after paraffin-embedding (Paraplast Plus, Sherwood Medical, Saint Louis, MO., USA), whereas the remaining organ was digested overnight with 4% potassium hydroxide for egg enumeration.

#### **4 – Measurement of collagen**

Sections of liver (10 µm thick) were put on slides, deparaffinized and incubated with a saturated solution of picric acid in distilled water containing 0.1% Fast Green FCF (Sigma, St. Louis, MO, USA) which stains noncollagenous proteins, and 0.1% Syrius Red F3B (Gurr BDH, Chemicals Ltd, Poole, UK) which stains collagen. Sections were kept in the dark and incubated at room temperature for 2 hours under continuous mild agitation. Slides were rinsed with distilled water until the elution fluid was completely colour-free. Each section was then covered with 1 ml of 0.1 N NaOH in absolute methanol until complete fading (usually within few seconds). Fluids were then carefully withdrawn and read using a multichannel spectrophotometer (Labsystems, Helsinki, Finland). Fast Green has its maximal absorbance at 630 nm and Syrius Red at 540 nm. Values of collagen and protein levels were calculated according to the formula described previously (Lopez-De Leon A. & Rojkind M. 1985). For

each liver, collagen was measured in triplicate and data are reported as (mean  $\pm$  SE) of  $\mu\text{g}$  of collagen per mg protein for each individual mouse.

## **5 – Serum antibody determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Sera were obtained from blood samples collected from infected Tg and Lc animals at days 5, 15, 22, 32, 42 postinfection. Mice were individually tested for the presence of parasite specific immunoglobulin (Ig)G 1 and IgG2a. Determination of IgG1 and IgG2a specific for anti-adult worm antigenic extract (SWAP) or anti-egg antigenic extract (SEA) was performed as previously described (Wolowczuk I., *et al.* 1999). Briefly, wells of microtiter plates were coated overnight with 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of either parasitic extracts. Dilutions of experimental sera (1 : 200) were incubated for 2 h at room temperature. The final reaction was recorded with a multichannel spectrophotometer (Labsystems) at 492 nm.

## **6 – Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis**

Day 5 postinfection, inguinal skin draining lymph nodes were removed from 5 Tg mice and 5 Lc mice. Single cell suspensions were prepared by mechanical disaggregation and samples of  $1 \times 10^6$  cells were placed in 96-wells plate for immunostaining. Monoclonal antibodies specific for B220 (B lymphocytes), (RA3-6B2, Pharmigen, San Diego, CA, USA), CD3 (T lymphocytes), (145-2C11, Pharmigen), were used. Second step reagent used was a R-phycerythrin-conjugated goat anti-rat IgG polyclonal antibody (Southern Biotechnology associates, Birmingham, AL, USA). All stainings were performed under vigorous agitation for 15 mn at room temperature. Cells were washed three times and fixed with 2 %

paraformaldehyde. Analysis of cell staining was performed on a Epics® XL-MCL cytometer (Coultronics, Margency, France) using XL-II acquisition software.

## 7 – RNA isolation, cDNA synthesis and PCR

Total RNA was isolated from frozen punch biopsies of abdominal skin using SV total RNA isolation system (Promega, Madison, WI ,USA). cDNA were synthesized from equal amounts of oligo-dT primed RNA (1 µg) by incubation at 42°C with 200 units of Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco BRL, Eragny, France). PCR amplification was performed using primers specific for murine  $\beta$ -actin, IL-7, IL-4, IL-13 and IFN- $\gamma$  as previously described (Wolowczuk I., *et al.* 1997). Samples of cDNA were amplified for 38 cycles at an annealing temperature of 55°C using a Perkin Elmer DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Saint-quentin, France). For each cDNA preparation, a control synthesis reaction was performed without cDNA synthesis to ensure that there was no contaminating genomic DNA. PCR products were analysed in 1.5% agarose gel in TBE 1X containing ethidium bromide (25µg/50 ml gel) (Interchim, Montluçon, France).

# **RESULTS**

## RESULTS

### 1 - Parasitologic features in liver of day 54-infected mice

When adult parasites reach the liver, (from day 28 postinfection) worm pairs settle at portal vein level and females begin to lay up to several hundred eggs per day (Wheater P. R. & Wilson R. A. 1979). Some of them will be trapped in tissues (among which liver) and will initiate the granulomatous response ultimately leading to collagen depositions.

Fifty-four days infected mice were sacrificed and adult worm burden was determined after total blood perfusion. In order to enumerate eggs, livers were weighed prior being digested with potassium hydroxyde. We found more adult worms in livers of IL-7 Tg infected mice compared to control animals. (Fig 1A). Eggs were quantified in digested liver solutions. The Figure 1B shows number of eggs per gram of liver in the two different animal groups. Surprisingly, no statistical difference between Tg and Lc mice could be observed regarding to egg burden and female fecundity (Fig. 1C; number of eggs per gram of tissue and per female worm). These puzzling results led us to determine the male : female adult worm ratio (often simply called the "sex ratio"). Although some individual variations could be observed among mice, a clear bias toward male worms occurred in Tg animals while controls exhibited a sex ratio commonly observed in *S. mansoni*-infected mice (Mitchell G. F., *et al.* 1990) (Fig. 2).

Hepatic fibrosis was assessed at day 54 using the colorimetric method firstly described in 1985 by Lopez De Leon (Lopez-De Leon A., *et al.* 1985). Data showed that hepatic collagen is higher in Tg mice compared to the controls (Figure 3A). This can not be

explain by elevated numbers of eggs in liver of Tg mice (see Fig. 1), we thus evaluated the size of granulomatous reaction arround eggs in liver of Tg and control animal (Fig. 3B).

## **2. Specific humoral immune response against adult worm and egg antigens**

In murine experimental schistosomiasis, the infection first induces a Th1 type immune response characterized by the secretion of IFN- $\gamma$  and IL-12 (Anderson S., *et al.* 1998, Mountford A. P., *et al.* 1998, Pemberton R. M., *et al.* 1991) and directed against the larval stage of the parasite. At the onset of egg laying (from day 42 postinfection), a radical shift towards a Th2 type immune response occurs, characterized by the secretion of IL-4 and IL-10 (Cheever A. W., *et al.* 1994, Wynn T. A., *et al.* 1997). One major difference between the two cellular populations, which produce these Th1- or Th2-type associated cytokines, is their ability to stimulate the production of certain Ig isotypes. Indeed a Th2 type response is associated with IgG1 isotype while IgG2a is associated with a Th1 type (Coffman R. L., *et al.* 1988). Since we previously reported that administration of exogenous IL-7 favor a Th2 type of SEA antibody response during *S. mansoni* infection (Wolowczuk I., *et al.* 1997), we tested the isotype profiles of IgG specific for both adult worm antigen extracts (SWAP) and egg antigen extracts (SEA) in both group of mice (Figure 4). Antibodies were detected in sera from day 0 to day 42 following infection. IgG2a and IgG1 antibodies directed against adult worm antigens were respectively detectable from day 22 and from day 32. No difference could be observed between infected Tg and Lc mice. On the other hand, we could demonstrate higher levels of SEA specific IgG1 in sera from day 42-infected Tg mice compared to Lc mice. Moreover IgG2a anti-SEA antibody titers of Tg mice remained low and constant up to day 42,

even though IgG2a titers of Lc mice increased from day 32. Taken together, these results showed an amplified Th2 humoral egg-specific response in Tg mice associated with a non developing Th1 type response. Taken together, our data showed that IL-7 overexpression in the skin leads to variations in the specific humoral response. Interestingly, this modification concerns eggs specific humoral response, whereas adult worm specific humoral response remains unchanged.

### **3. Analysis of T and B lymphocyte populations in skin-draining lymph nodes**

IL-7 is known to play an important role on lymphoid cells proliferation (Goodwin R. G., *et al.* 1989, Grabstein K. H., *et al.* 1990). Moreover we showed that injection of IL-7 in murine skin led to an increase in B cell number in draining lymph node associated to a decrease in T cell number (Wolowczuk I., *et al.* 1997). We thus studied cellular populations in skin draining lymph node from naive or infected Tg and Lc mice. Lymph node cells of 6 week-old mice were enumerated and processed for flow cytometric assays. Analysis of cellularity showed a 2.3-fold increase of cells in uninfected Tg mice compared to Lc mice. Five days following infection, Tg mice showed a 2-fold increase in total cell number compared to uninfected Tg while Lc animals increased times 1.7 the cell number after infection. Populations of B and T cells were discriminated using the expression of B220 and CD3 respectively. Infection induced a slight increase of the percentage of B cell associated to a decrease of the T cell subset and so altered B / T cells relative ratio (Fig 5). Uninfected Tg mice showed a higher proportion of B cells and a decrease in T cell number compared to uninfected control mice. Infection of both groups of animals increased B cells number and decreased T cells number.

#### **4. Analysis of early cutaneous expression of cytokines**

We previously reported that early events occurring in *S. mansoni* infected skin, namely IL-7 production, are involved in the latter immune response directed against this parasite (Wolowczuk I., *et al.* 1997). In the same paper, we showed that percutaneous penetration of the parasite led to early cutaneous production of IL-7 together with IFN- $\gamma$  and IL-4. The figure 6 shows cytokine specific mRNA produced in the skin at day 2 and day 5 infected skin and detected using RT-PCR method. We studied the synthesis of IL-4 and IL-13 as Th2-type cytokines and IFN- $\gamma$  as Th1-type cytokine. IL-7 specific mRNA level are also set out. Skin of uninfected Lc mice exposed low levels of IL-7 and IL-13 whereas IL-4 and IFN- $\gamma$  were absent. In skin of uninfected Tg mice, IL-7, IL-13 and IFN- $\gamma$  were abundantly produced and low level of IL-4 was observed. All these cytokines were detected with high level in infected skin at day 5 in Lc mice and at day 2 and day 5 in Tg mice. Lower amount appeared only in skin of day 2-infected Lc mice, excepted for IL-4 which was absent. The major result concerned on the one hand, the basic synthesis of IL-4 in Tg mice and on the other hand, its strong increase as early as day 2 post infection while undetectable in infected Lc mice. Concomitantly IL-7, IFN- $\gamma$  and IL-13 production were not modulated from day 2 to day 5. This fact would explain the results previously observed concerning the worm burden and humoral specific response and will be discussed beyond.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Various strategies exist for transferring cloned DNA sequences to animals. Transferred genes are often expressed in a tissue-specific and developmentally-regulated manner. A number of genes related to immune function have been transferred to mice. Both histocompatibility (Class I and II (Yamamura K., *et al.* 1985, Yoshioka T., *et al.* 1987)) and immunoglobulin (mu, gamma and kappa (Brinster R. L., *et al.* 1983, Gram H., *et al.* 1992, Weaver D., *et al.* 1985)) genes have been expressed in appropriate cell types, in transgenic mice. The first interleukin used as a transgene was IL-2 (Ishida Y., *et al.* 1988) and transgenic animals expressing the  $\alpha$ -chain of IL-2 receptor was subsequently produced (Nishi M., *et al.* 1988). In order to study the role of numerous cytokines, transgenic technology was extensively used (Chen X. Z., *et al.* 1988, Keffer J., *et al.* 1991, Tepper R. I., *et al.* 1990, Young H. A., *et al.* 1989).

Only few transgenic animal models were studied to investigate involvement of cytokines in immunity to parasite. Considering the helminth *Schistosoma mansoni*, research on eosinophil as an effector cell in *Schistosoma mansoni* infection were performed using IL-5 transgenic mice (Freeman G. L., Jr., *et al.* 1995) and overexpression of IL-4 was investigated in granulomatous reaction (Lukacs N. W., *et al.* 1997).

In this report, we used a model of cutaneous IL-7 transgenic mice (Williams I. R., *et al.* 1997) to study the role of this cytokine in *Schistosoma mansoni* infection. Indeed, we recently reported that intradermal injection of IL-7 favors development of the parasite and leads to an aggravation of the hepatic pathology (Wolowczuk I., *et al.* 1997). Moreover, when schistosomes infect an IL-7 deprived host, maturation and complete development were greatly compromised leading to dwarf parasites (Wolowczuk I., *et al.* 1999).

We showed here, that cutaneous constitutive synthesis of IL-7 displays a propitious environment to *Schistosoma mansoni* infection since adult worm burden was increased. Egg number and female fecundity remained unchanged and surprisingly a male biased sex ratio was observed in IL-7 Tg mice. Sex ratios of adult schistosomes usually observed in mice are almost

invariably different from 1.0 and are biased towards males (Mitchell G. F., *et al.* 1990). No evidence in the literature, beside any treatment, show that immunity directed against schistosomes is more efficient to affect « female » larvae (sexually determined but undifferentiated) or adult female worms. So, we can hypothetize that instead of a "targeted destruction" of females, higher level of IL-7 preferentially favored males development. Indeed, in IL-7 KO mice, the growth of adult male worms were more importantly reduced than females (Wolowczuk I., *et al.* 1999). Thus, males might be more sensitive to modifications of the environment induced by the constitutive expression of IL-7.

Concomitant with higher parasite burden, we observed a marked increase of hepatic collagen deposition in Tg mice versus Lc mice. Schistosome egg granulomas are primarily Th1 cellular reactions and subsequently switch to Th2 response. Eggs are considered to be the major stimulus of this Th2 response (Grzych J. M., *et al.* 1991). Consecutive fibrosis is also dependent of intensity of Th2 response principally directed by IL-4 (Cheever A. W., *et al.* 1994). Thus, it was not surprising to determine a dominantly Th2-type humoral specific response in IL-7 Tg mice. Indeed SEA specific IgG1 antibody titers were more elevated at day 42 post infection whereas SEA specific IgG2a antibody titers remained at a basic level. Because egg number and female fecundity were unchanged, egg burden can not be responsible for this phenomenom. We thus attempted to highlight modifications of immune response initiation occurring in Tg mice. We previously showed that intradermal injection of IL-7 is able to modulate environmental cytokines involved in early immune response. Yet, a decrease of IFN- $\gamma$  and IL-12 observed day 5 after the initiation of infection in IL-7-treated mice was proposed to be involved in the latter orientation of the immune response (Wolowczuk I., *et al.* 1997).

In the model presented here, IL-7 is overproduced in the epidermis. Local modifications of synthesized cytokines in skin were assessed using RT-PCR method. First, uninfected Tg mice expressed IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 in skin. IL-7 overproduction could be positively involved in this phenomenom as it was already demonstrated (Borger P., *et al.* 1996). Subsequently, we described a strong increase of IL-4 expression in skin of day 2 infected Tg mice. This point constitute a major result with respect to the preferential

orientation of the immune response, observed later. Concomitantly, we showed that IL-13 and IFN- $\gamma$  were present in IL-7 Tg mice but infection did not change their level of expression.

The skin draining lymph nodes actively participate to initiation of the early immune response, as it has been demonstrated in vaccination model using irradiated cercariae (Mountford A. P., *et al.* 1992). Surprisingly we found higher total B cell number in lymph nodes of uninfected IL-7 Tg mice compared to Lc mice. Moreover, increase of cellularity was observed in IL-7 overexpressing mice associated to a concomitant increase of B cell number, equivalent in Tg and Lc mice, at day 5 post infection. The increase of B cell population in uninfected Tg mice was unexpected and could be explained by a diffusion of IL-7 overexpressed in skin, which would stimulate proliferation of lymph node B cells (Joshi P. C. & Choi Y. S. 1991). Beside keratinocytes, IL-7 transgene expression, directed by the keratin 14 promoter, is thought to be expressed in numerous cells from epithelial tissue such as cornea, tongue, oesophagus and intestine (Xie W., *et al.* 1999). Thus, the total amount of constitutively produced IL-7 could be high and lead to an elevated systemic concentration which would explain the increase of cellularity and B cell number. Indeed, Komschlies *et al.* showed that exogenous administration of IL-7 causes an increase of B-cell lineage in spleen and lymph nodes (Komschlies K. L., *et al.* 1994). In this report, IL-7-induced effects were dose-dependent, increased with duration of treatment, and were reversible after cessation of IL-7 administration. Finally, B cells, as antigen presenting cells, are known to preferentially induce a Th2 type response (Gajewski T. F., *et al.* 1991). Thus, infected Tg mice display high level of IL-4 in skin and elevated total number of B cells in skin draining lymph node versus infected control mice. These results might explain the more intensive Th2 type response characterized by humoral SEA specific response and aggravated fibrosis.

Very similar results were obtained in IL-7 Tg mice compared to intradermally IL-7 injected mice. The influence of IL-7 locally overproduced in epithelial tissue seems to have larger effects than expected. Nevertheless, the present work reinforces the peculiar role of IL-7 produced as soon as the cutaneous stage of parasite migration. The major difference between these two models concerns features of parasite development. Although the number of adult worm was increased in both models, only males seemed to be favored in Tg mice; we supposed above that males might be more sensitive to modifications of the environment

induced by constitutive expression of IL-7. Thus, the modification of schistosome development would proceed in dose dependent manner.

Since we worked with transgenic heterozygous mice which express just one allele of the transgene, amount of IL-7 could not be sufficient to modulate female development and to reproduce the results previously obtained with the intrademal IL-7 treatment. Finally, infection of IL-7 KO mice suggest crossed interactions between immune and endocrine system, probably mediated by IL-7 and thyroid hormones (Wolowczuk I., *et al.* 1999), leading to modification of environment for the maturing schistosomula. Because IL-7 Tg mice express the transgene from embryonic life, compensation phenomenon might occurred to restore appropriate development conditions. Thus, the resulting animals could not be really different from Lc mice with regard to hormonal environment.

## BIBLIOGRAPHY

Alderson M. R., Tough T. W., Ziegler S. F. & Grabstein K. H. (1991) Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* **173**, 923-30.

Anderson S., Shires V. L., Wilson R. A. & Mountford A. P. (1998) In the absence of IL-12, the induction of Th1-mediated protective immunity by the attenuated schistosome vaccine is impaired, revealing an alternative pathway with Th2-type characteristics. *Eur J Immunol* **28**, 2827-38.

Appasamy P. M. (1993) Interleukin-7: biology and potential clinical applications. *Cancer Invest* **11**, 487-99.

Bakhiet M., Olsson T., Eldund C., Höjeberg B., et al. (1993) A *trypanosoma brucei*-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon- $\gamma$  secretion: purification, characterization and protective effects *in vivo* by treatment with a monoclonal antibody against the factor. *Scand. J. Immunol.* **37**, 165-178.

Borger P., Kauffman H. F., Postma D. S. & Vellenga E. (1996) IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol* **156**, 1333-8.

Brinster R. L., Ritchie K. A., Hammer R. E., O'Brien R. L., et al. (1983) Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice. *Nature* **306**, 332-6.

Cheever A. W., Williams M. E., Wynn T. A., Finkelman F. D., et al. (1994) Anti-IL-4 treatment of Schistosoma mansoni-infected mice inhibits development of T cells and non-B,

non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol* **153**, 753-9.

Chen X. Z., Yun J. S. & Wagner T. E. (1988) Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon. *J Virol* **62**, 3883-7.

Coffman R. L., Seymour B. W., Lebman D. A., Hiraki D. D., *et al.* (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* **102**, 5-28.

Denis M., Campbell D. & Gregg E. O. (1991) Cytokine stimulation of parasitic and microbial growth. *Res Microbiol* **142**, 979-83.

Feng Z. Y., Louis J., Kindler V., Pedrazzini T., *et al.* (1988) Aggravation of experimental cutaneous leishmaniasis in mice by administration of interleukin-3. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1245-1251.

Freeman G. L., Jr., Tominaga A., Takatsu K., Secor W. E., *et al.* (1995) Elevated innate peripheral blood eosinophilia fails to augment irradiated cercarial vaccine-induced resistance to *Schistosoma mansoni* in IL-5 transgenic mice. *J Parasitol* **81**, 1010-1.

Gajewski T. F., Pinnas M., Wong T. & Fitch F. W. (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol* **146**, 1750-8.

Goodwin R. G., Lupton S., Schmierer A., Hjerrild K. J., *et al.* (1989) Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 302-6.

Grabstein K. H., Namen A. E., Shanebeck K., Voice R. F., *et al.* (1990) Regulation of T cell proliferation by IL-7. *J Immunol* **144**, 3015-20.

Gram H., Zenke G., Geisse S., Kleuser B., *et al.* (1992) High-level expression of a human immunoglobulin gamma 1 transgene depends on switch region sequences. *Eur J Immunol* **22**, 1185-91.

Greil J., Bodendorfer, Röllinghoff M. & Solbach W. B. (1988) Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1527-1533.

Grzych J. M., Pearce E., Cheever A., Caulada Z. A., *et al.* (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol* **146**, 1322-7.

Heufler C., Topar G., Grasseger A., Stanzl U., *et al.* (1993) Interleukin-7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 1109-1114.

Ishida Y., Nishi M., Taguchi O., Inaba K., *et al.* (1988) Immunological abnormalities in human interleukin-2 or interleukin-2/interleukin-2 receptor L chain transgenic mice. *Princess Takamatsu Symp* **19**, 61-71.

Joshi P. C. & Choi Y. S. (1991) Human interleukin 7 is a B cell growth factor for activated B cells. *Eur J Immunol* **21**, 681-6.

Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., *et al.* (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* **10**, 4025-31.

Komschlies K. L., Gregorio T. A., Gruys M. E., Back T. C., *et al.* (1994) Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. *J Immunol* **152**, 5776-84.

Kongshavn P. A. L. & Ghadirian E. (1989) Enhancing and suppressive effects of tumor necrosis factor/cachectin on *trypanosoma musculi* growth. *Parasite Immunol.* **10**, 581-588.

Londei M., Verhoef A., Hawrylowicz C., Groves J., *et al.* (1990) Interleukin 7 is a growth factor for mature human T cells. *Eur J Immunol* **20**, 425-8.

Lopez-De Leon A. & Rojkind M. (1985) A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* **33**, 737-43.

Lukacs N. W., Addison C. L., Gauldie J., Graham F., *et al.* (1997) Transgene-induced production of IL-4 alters the development and collagen expression of T helper cell 1-type pulmonary granulomas. *J Immunol* **158**, 4478-84.

Mazingue C., Cottrez-Detoeuf F., Louis J., Kweider M., *et al.* (1989) *In vitro* and *in vivo* effects of interleukin-2 on the protozoan parasite Leishmania. *Eur. J. Immunol.* **19**, 487-491.

Mitchell G. F., Garcia E. G., Wood S. M., Diasanta R., *et al.* (1990) Studies on the sex ratio of worms in schistosome infections. *Parasitology* **101 Pt 1**, 27-34.

Moller P., Bohm M., Czarnetszki B. M. & Schadendorf D. (1996) Interleukin-7. Biology and implications for dermatology. *Exp Dermatol* **5**, 129-37.

Mountford A. P., Coulson P. S., Pemberton R. M., Smythies L. E., *et al.* (1992) The generation of interferon-gamma-producing T lymphocytes in skin- draining lymph nodes, and their recruitment to the lungs, is associated with protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Immunology* **75**, 250-6.

Mountford A. P., Shires V. L. & Anderson S. (1998) Interleukin-12 and protective immunity to schistosomes. *Braz J Med Biol Res* **31**, 163-9.

Namen A. E., Schmierer A. E., March C. J., Overell R. W., *et al.* (1988) B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med* **167**, 988-1002.

Nishi M., Ishida Y. & Honjo T. (1988) Expression of functional interleukin-2 receptors in human light chain/Tac transgenic mice. *Nature* **331**, 267-9.

Pearce E. J., Caspar P., Grzych J. M., Lewis F. A., *et al.* (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* **173**, 159-66.

Pemberton R. M., Smythies L. E., Mountford A. P. & Wilson R. A. (1991) Patterns of cytokine production and proliferation by T lymphocytes differ in mice vaccinated or infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunology* **73**, 327-33.

Roye O., Delhem N., Trottein F., Remoue F., *et al.* (1998) Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection. *J Immunol* **161**, 4161-8.

Smithers S. R. & Terry R. J. (1969) Immunity in schistosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **160**, 826.

Suda T. & Zlotnik A. (1991) IL-7 maintains the T cell precursor potential of CD3-CD4-CD8- thymocytes. *J Immunol* **146**, 3068-73.

Tepper R. I., Levinson D. A., Stanger B. Z., Campos-Torres J., *et al.* (1990) IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell* **62**, 457-67.

Von-Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian L. A., McNeil T., *et al.* (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* **181**, 1519-26.

Watson J. D., Morrissey P. J., Namen A. E., Conlon P. J., *et al.* (1989) Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J Immunol* **143**, 1215-22.

Weaver D., Costantini F., Imanishi-Kari T. & Baltimore D. (1985) A transgenic immunoglobulin mu gene prevents rearrangement of endogenous genes. *Cell* **42**, 117-27.

Wheater P. R. & Wilson R. A. (1979) *Schistosoma mansoni*: an histological study of migration in the laboratory mouse. *Parasitol.* **79**, 49-62.

Williams I. R., Rawson E., Manning L., Karaoli T., *et al.* (1997) IL-7 overexpression in transgenic mouse keratinocytes causes a lymphoproliferative skin disease dominated by intermediate TCR cells. *J. Immunol.* **159**, 3044-3056.

Wolowczuk I., Delacre M., Roye O., Giannini S. L., *et al.* (1997) Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$  production and leads to an aggravation of the disease. *Immunol.* **91**, 35-44.

Wolowczuk I., Nutten S., Roye O., Delacre M., *et al.* (1999) Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* **67**, 4183-90.

Wolowczuk I., Roye O., Nutten S., Delacre M., *et al.* (1999) Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host. *Microbes and infection* **1**, 545.

Wynn T. A., Morawetz R., Scharton-Kersten T., Hieny S., *et al.* (1997) Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. *J Immunol* **159**, 5014-23.

Xie W., Chow L. T., Paterson A. J., Chin E., *et al.* (1999) Conditional expression of the ErbB2 oncogene elicits reversible hyperplasia in stratified epithelia and up-regulation of TGFlalpha expression in transgenic mice. *Oncogene* **18**, 3593-607.

Yamamura K., Kikutani H., Folsom V., Clayton L. K., *et al.* (1985) Functional expression of a microinjected Ed alpha gene in C57BL/6 transgenic mice. *Nature* **316**, 67-9.

Yoshioka T., Bieberich C., Scangos G. & Jay G. (1987) A transgenic class I antigen is recognized as self and functions as a restriction element. *J Immunol* **139**, 3861-7.

Young H. A., Komschlies K. L., Ciccarone V., Beckwith M., *et al.* (1989) Expression of human IFN-gamma genomic DNA in transgenic mice. *J Immunol* **143**, 2389-94.

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1 :**

Total adult worm burden (A), numbers of eggs expressed per gram of liver (B), and numbers of eggs expressed per gram of liver and per female worm in IL-7 Tg and Lc day 54-*Schistosoma mansoni*-infected animals. Each point shows an individual data and the horizontal bar shows the mean for each group of mice. This experiment is representative of three independent experiments.

### **Figure 2 :**

Mice were sacrificed at day 54 for determination of number and sex of worms after total perfusion. The Y-axis label the ratio between male and female worm numbers. Combined data of three independent experiments.

### **Figure 3 :**

Pathology of livers of IL-7 Tg and Lc animals infected with *Schistosoma mansoni* for 54 days.. Results of collagen measurement are expressed for each individual mouse and are representative of three independent experiments. Horizontal bars show the mean for each group of animals (A). Histological staining for collagen on liver sections of IL-7 Tg and Lc infected mice 54 days post infection. Masson's trichrome stain was used. Collagen fibers show blue staining. Magnification, X100 (B).

### **Figure 4 :**

Specific antibody response in IL-7 Tg (10 animals) and (9 animals) Lc mice during the course of *Schistosoma mansoni* infection. Total IgG1 and IgG2a specific for SWAP and SEA are shown. Each animal was repeatedly bled on days 0, 5, 15, 22, 32, 42 post infection. Sera were pooled in each group and assessed by triplicate determination using specific ELISA.

**Figure 5 :**

Determination of the percentages of B and T cells in skin-draining lymph nodes of IL-7 Tg and Lc mice infected or not. Lymph nodes were harvested 5 days following infection and subsequently processed for cytometric analysis. Results are representative of four independent experiments.

**Figure 6 :**

Levels of expression of IL-4, IL-13, IL-7 and IFN- $\gamma$  in abdominal skin are measured for uninfected IL-7 Tg (lane 1) and Lc mice (lane 2). Lane 3 and 5 show mRNA levels in skin of infected IL-7 Tg mice at day 2 and day 5 post infection, respectively. Lane 4 and 6 show mRNA levels in skin of infected Lc mice at day 2 and day 5 post infection, respectively.  $\beta$ -actin was used as internal control for integrity of the RNA. Data are representative of four independent experiments.

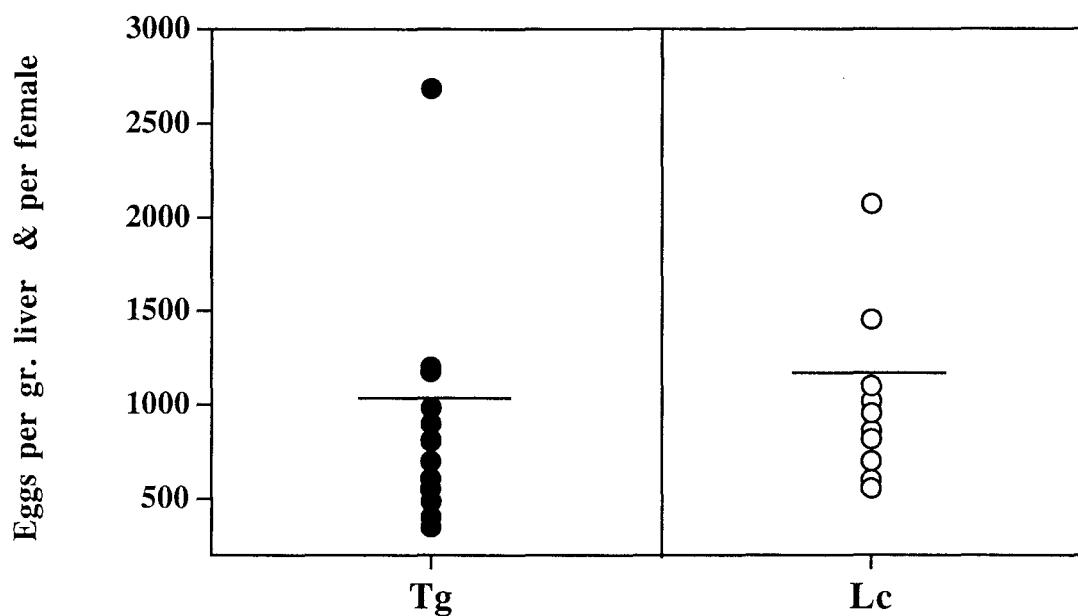
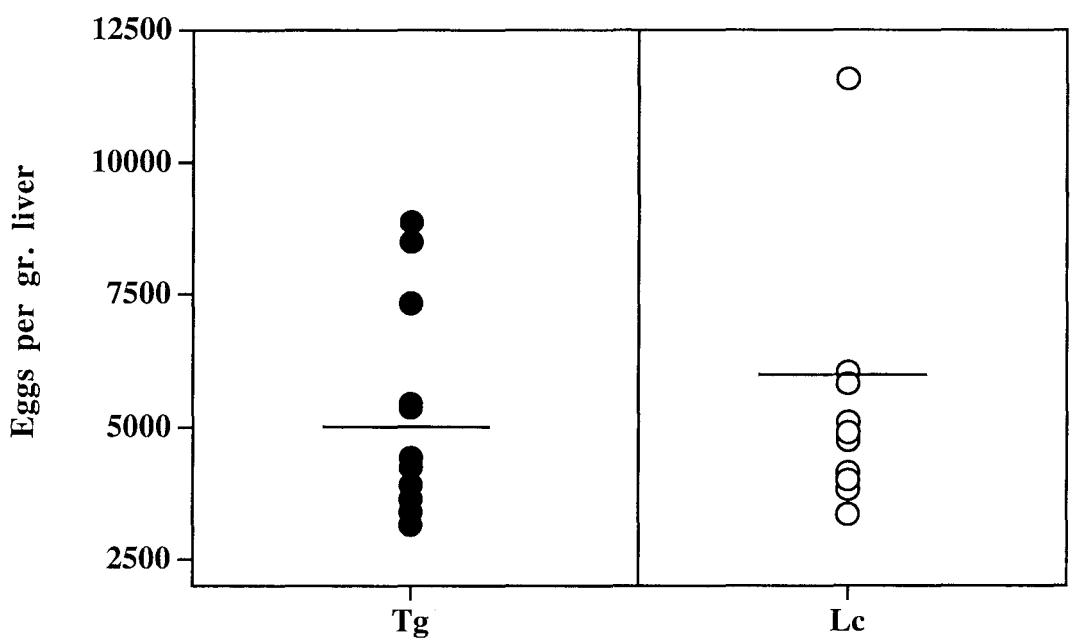
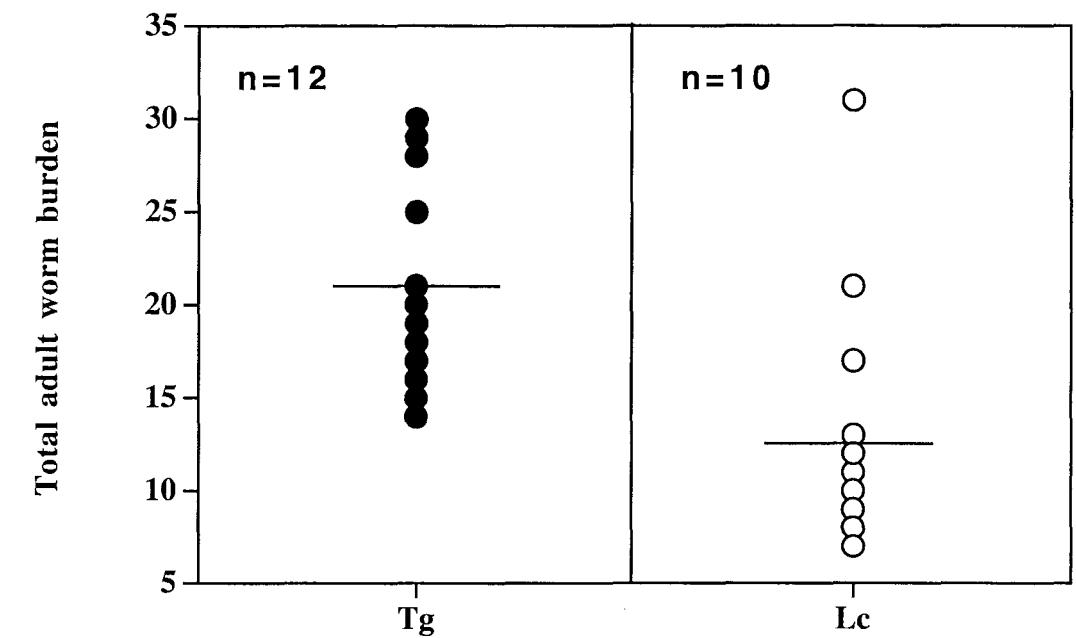
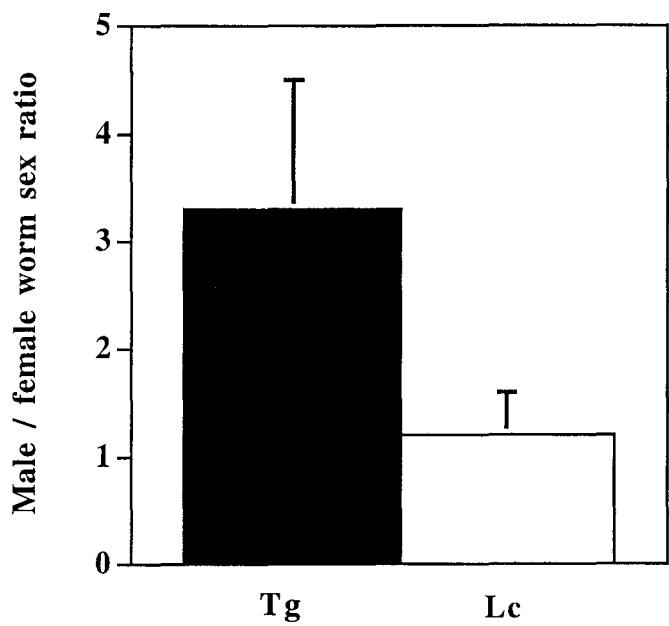
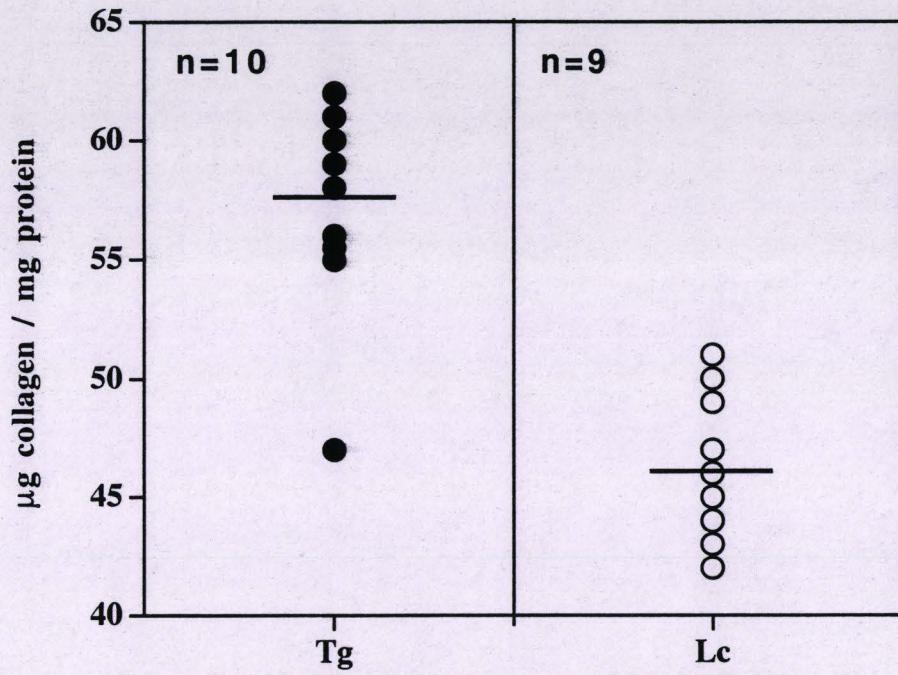
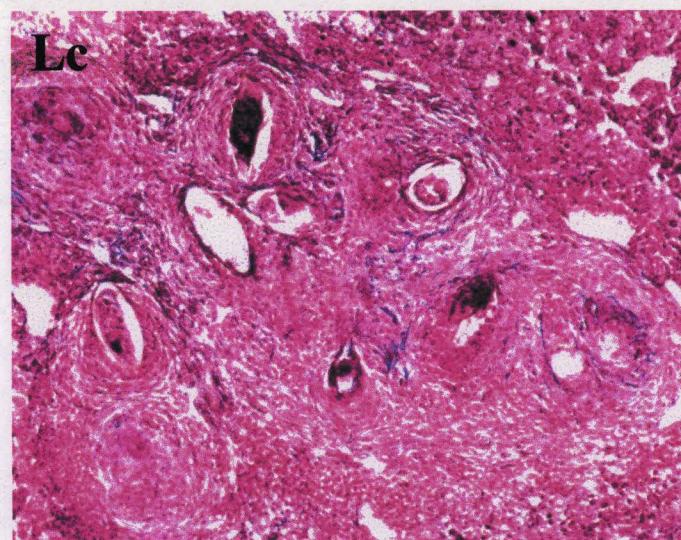
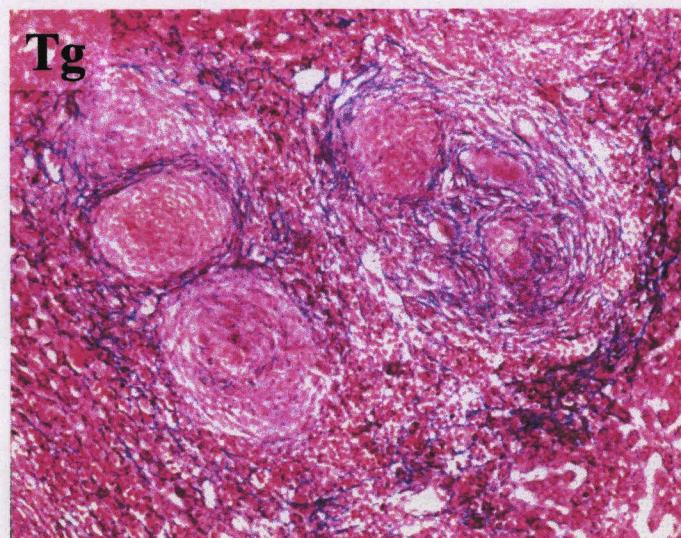
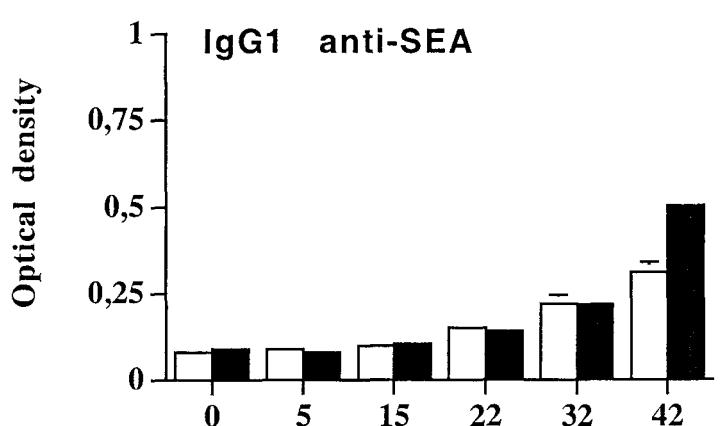
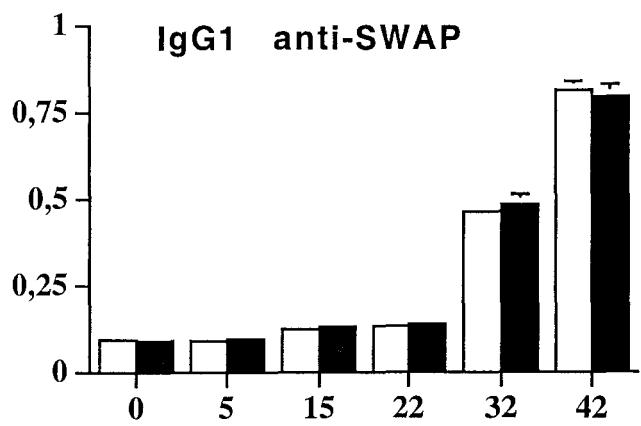
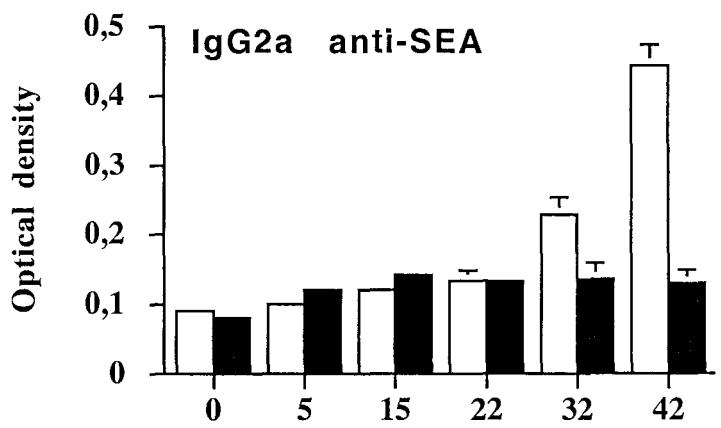
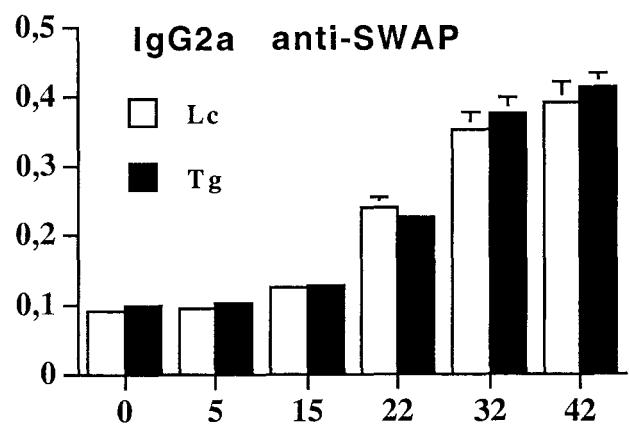


Figure 1

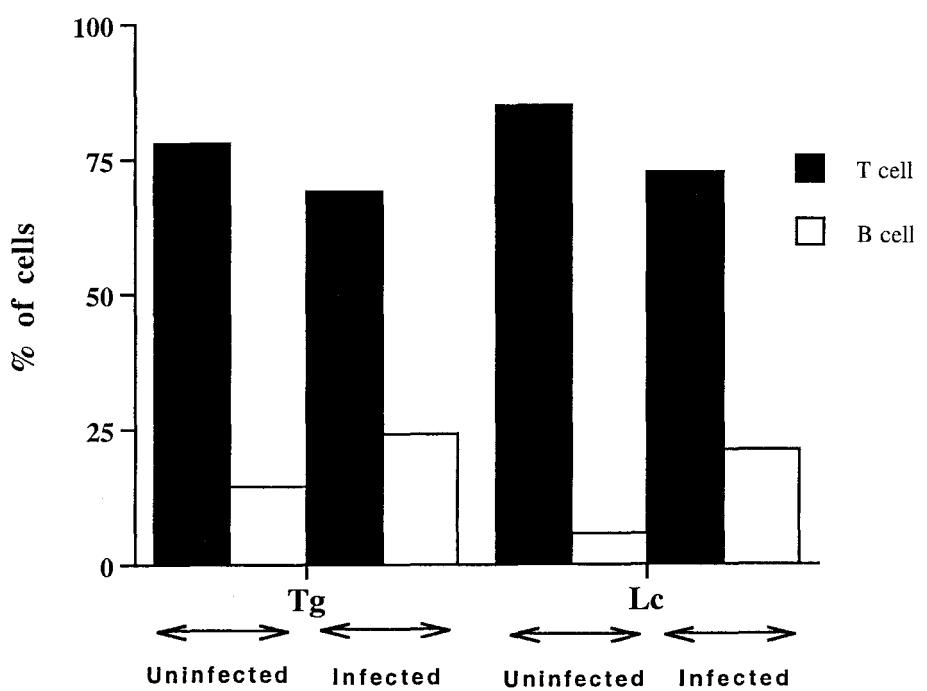


**Figure 2**

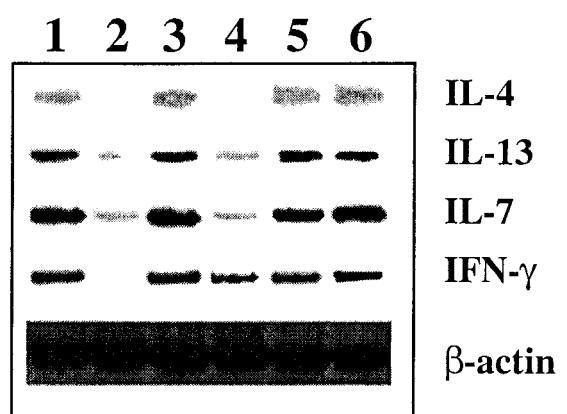
**A****B****Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

## ARTICLE 3

**Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection.**

*The Journal of Immunology, 1998, V.161, p.4161-4168.*

## I - OBJECTIFS

### 1 - Généralités

La schistosomiase humaine affecte 200 millions d'individus dans le monde. La pathologie induite par *Schistosoma mansoni* est caractérisée par une réaction granulomateuse hépatique et aboutit à une hépatosplénomégalie associée à une hypertension portale. A terme, la pathologie aboutit parfois à une cachexie et une ascite abdominale, puis au décès du patient.

Comme nous l'avons montré dans le modèle murin, la production d'IL-7, au moins au niveau cutané, favorise considérablement la survie et le développement du parasite au sein de son hôte. Cette observation est de plus associée à une modification de la réponse immunitaire, qui serait, dans le cas présent, plus favorable à l'infection. L'implication de ces résultats sur la pathologie elle-même, apparaît être de tout premier ordre chez l'animal et c'est pourquoi nous avons souhaité étudier la concordance de ces données chez l'homme. Pour des raisons évidentes, il est impossible de reproduire ces expériences à l'identique avec un hôte humain. Par contre, l'étude concernant les événements cutanés précoces a pu être mise en place. En effet récemment un modèle de souris greffées par des lambeaux de peaux humaines fut décrit et utilisé, en particulier dans le cadre d'études dermatologiques (Juhasz I, 1993; Kim YH, 1992; Rowden G, 1992; Wrone-Smith T, 1996; Yan HC, 1993).

### 2 - Description du modèle

C'est en 1983, qu'une mutation autosomale récessive (*scid*) à l'origine du syndrome SCID est décrite chez la souris CB-17 par Bosma *et al.* (Bosma GC, 1983). Elle est située sur le chromosome 16 murin (Bosma GC, 1989) et probablement sur le chromosome 8 humain (Bangs SS, 1994). La mutation *scid* affecte spécifiquement le processus à l'origine du réarrangement V(D)J et par conséquent, de la diversité des récepteurs à l'antigène exprimés par les lymphocytes T et B. L'expression de ces récepteurs est ainsi compromise de même que le développement des cellules T et B. Les étapes qui conditionnent l'émergence de cette diversité interviennent au cours de la différenciation des cellules de la lignée lymphoïde dans le thymus et la moelle osseuse. En fait, l'assemblage des différents segments V(D)J nécessite l'intervention d'un système enzymatique complexe impliquant le clivage et la ligation de

fragments d'ADN. La mutation scid concerne une enzyme appelée ADN protéine kinase (Kirchgessner CU, 1995), intervenant dans les dernières étapes du réarrangement.

Les souris homozygotes pour la mutation scid présentent une lymphopénie, avec absence de lymphocytes fonctionnels T et B. Les quantités d'immunoglobulines sériques sont également extrêmement faibles. A l'exception de la moelle osseuse, qui apparaît histologiquement normale, tous les tissus et sites lymphoïdes sont hypoplasiques. Le thymus représente au plus 1/10<sup>ème</sup> de sa taille habituelle, les ganglions sont également de taille extrêmement réduite et la rate ne présente aucun follicule lymphoïde, ni centre germinatif (Bancroft GJ, 1994; Custer RP, 1985; Dorshkind K, 1984).

Chez la souris SCID, le développement des cellules lymphoïdes T et B est arrêté à un stade précoce. On ne peut donc observer de réponse immunitaire primaire T ou B. Les cellules spléniques ne prolifèrent pas en présence de mitogènes, tels que le LPS ou la concanavaline A (Bosma GC, 1983; Dorshkind K, 1984). Par contre, la fonction et la différenciation des cellules myéloïdes apparaissent normales (Bancroft GJ, 1994; Dorshkind K, 1984). Leur proportion et leur distribution semblent classiques (Bancroft GJ, 1986) et leur fonction de présentation d'antigène est efficace (Czitrom AA, 1985). Par conséquent ces animaux doivent être maintenus dans un environnement exempt de tout pathogène, afin de leur assurer une survie de 1 à 2 ans.

Le statut immunodéficient de ces souris et donc leur incapacité à rejeter tout type de greffes, a permis la mise en oeuvre de « l'humanisation » de ces animaux. Elle a consisté tout d'abord à l'implantation chirurgicale d'organes lymphoïdes humains foetaux tels que des fragments de thymus (Mc Cune JM, 1988), de foie (Namikawa R, 1990), d'os long (Kyoizumi S, 1992) mais aussi d'intestin (Savidge TC, 1995) ou de poumon (Cesbron JY, 1994). Tout ces modèles ont permis d'étudier avec plus ou moins de succès les mécanismes de la lymphopoïèse humaine et aussi des cas d'infections virales (notamment le VIH (Namikawa R, 1988)) ou de pathologies cancéreuses (Inada M, 1997). La faible migration des cellules humaines vers les tissus murins, l'absence de réponse immune et la difficulté d'obtention de tissus fœtaux humains a suscité la mise en place d'une alternative à ce type « d'humanisation ».

Ce second principe consiste à injecter des cellules mononucléées issues du sang périphérique humain par voie intraveineuse ou intrapéritonéale (Mosier DE, 1988). L'injection

péritonéale semble plus efficace (Hoffmann-Fezer G, 1992) même si la voie intraveineuse a été beaucoup utilisée. Dans ce dernier cas, la colonisation des tissus murins a lieu, et à partir de la quatrième semaine suivant la reconstitution, on retrouve des cellules T et B en périphérie (Tary-Lehmann M, 1992). Il est généralement admis que le développement d'une réponse primaire B ou T est variable et difficile à obtenir, cependant certains travaux rapportent l'induction d'une réponse primaire de type B (Mazingue C, 1991; Sandhu J, 1994). Les cellules T humaines isolées à partir des souris SCID semblent être anergiques et l'induction d'une immunité cellulaire T vis-à-vis d'un antigène exogène ne pourrait avoir lieu que peu de temps après l'injection (3 à 4 semaines) (Tary-Lehmann M, 1992). La plus grande simplicité de réalisation de ce modèle a permis de nombreuses études dans des domaines très divers tels que les maladies infectieuses, auto-immunes et aussi cancéreuses. Ces aspects ont fait l'objet d'une revue détaillée par Cesbron *et al.* (Cesbron JY, 1998).

Le manque de fonctionnalité réelle des cellules humaines injectées constitue une des principales limites de ce modèle. En effet l'obtention d'une réponse primaire immune est très controversée et l'induction d'une réponse T primaire restreinte au CMH n'a pas encore été décrite. De plus, il apparaît que la période d'immunisation après la reconstitution soit capitale et assez limitée dans le temps. Ces limites pourraient en fait, être liées à l'absence de cellules présentatrices d'antigènes appropriées (Tary-Lehmann M, 1995). Ainsi, certains auteurs ont associé à l'injection des leucocytes, une greffe de peau humaine contenant en particulier des cellules de Langerhans capables de jouer un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immune (Teunissen MB, 1992). Les premières expériences de greffes de peau chez la souris SCID furent réalisées par Kim *et al.* (Kim YH, 1992) et sont aujourd'hui particulièrement utilisées en recherche dermatologique. Delhem *et al.* furent les premiers à obtenir et à caractériser des lignées cellulaires cytotoxiques humaines spécifiques d'un antigène donné, dans ce modèle, après immunisation cutanée (Delhem N, 1998).

Ce dernier modèle, présentant des potentialités de réponses immunes satisfaisantes au sein d'un fragment cutané humain, nous a semblé particulièrement approprié à l'analyse des événements cutanés précoces, suite à l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni*.

## II - RESULTATS

Des études préliminaires ont permis de définir ce modèle comme étant approprié à l'infection transcutanée par *Schistosoma mansoni*; en effet les larves peuvent être observées dans la peau à la base de l'épiderme humain une heure après infection, et dans les poumons des souris 6 jours plus tard. Quatre semaines après la greffe, les animaux sont injectés par des leucocytes périphériques humains autologues à raison de  $23.10^6$  cellules par animal. Deux semaines plus tard, l'infestation par 60 furcocercaires a lieu au niveau du greffon humain.

Une première analyse anatomo-pathologique de la peau humaine 6 jours après infection montre un infiltrat intradermique modéré, de lymphocytes humains. Des techniques immunohistochimiques ont mis en évidence une localisation périvasculaire prédominante et l'expression du marqueur membranaire CD4<sup>+</sup> par ces cellules. Ce recrutement cellulaire n'a pas été observé dans les peaux humaines prélevées sur les animaux non-infectés. Par ailleurs un nombre très restreint de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> fut identifié dans l'épiderme basal, mais aucune différence ne put être observée suite à l'infection. Enfin, on note une absence totale de lymphocyte B dans les peaux humaines infectées ou non.

Alors que nos précédents travaux chez la souris mettaient en évidence une production d'IL-7, d'IFN-γ et d'IL-4 dans la peau infectée, seule l'IL-7 fut détectée chez l'homme. Les kératinocytes et de manière inattendue les cellules endothéliales dermiques, furent identifiées comme étant les cellules productrices de l'IL-7 humaine dans la peau. A ce jour, cette nouvelle source d'IL-7 était encore inconnue. Grâce à la mise en place de coculture de cellules endothéliales dermiques humaines avec des larves parasitaires maturées *ex-vivo*, nous avons démontré que le parasite lui-même était capable d'induire cette synthèse d'IL-7. Le même type d'expérience réalisé à partir de cultures de kératinocytes humains n'a pas permis de montrer l'existence d'un tel effet. Enfin, nous avons cherché à savoir si la présence d'IL-7 après infection était uniquement locale ou si au contraire une présence systémique pouvait être envisagée. Pour cela, une analyse de plasma de patients humains infectés, vivant en zone d'endémie, a été réalisée. Par comparaison à des individus Africains (vivant en zone endémique) et Européens sains, une liaison statistique forte entre l'âge et le taux d'IL-7 plasmatique fut démontrée, uniquement chez les patients Africains infectés. En effet, les

individus appartenant aux classes d'âges les plus jeunes, qui sont aussi les plus infectés, présentent les taux d'IL-7 les plus élevés.

### **III - CONCLUSION**

L'obtention de tels résultats dans ce modèle, confirme nos précédentes études réalisées chez la souris et apporte des données similaires chez l'homme. Par ailleurs, la démonstration de la production d'IL-7 par les cellules endothéliales dermiques et surtout le fait que cette synthèse soit directement induite en présence des larves parasitaires, constituent des informations majeures sur la base des effets favorables de l'IL-7 sur le développement du parasite, mis en évidence chez la souris.

Afin de définir plus précisément les relations entre l'IL-7 et le parasite, une étude parasitologique et immunologique détaillée a été réalisée chez un hôte incapable de produire cette cytokine, la souris délétée pour le gène de l'IL-7 (Von-Freeden-Jeffry U, 1995).

# Dermal Endothelial Cells and Keratinocytes Produce IL-7 In Vivo After Human *Schistosoma mansoni* Percutaneous Infection<sup>1</sup>

Olivier Roye,<sup>2\*</sup> Nadirah Delhem,<sup>†</sup> François Trottein,<sup>‡</sup> Franck Remoué,<sup>‡§</sup> Sophie Nutten,<sup>‡</sup> Jean-Pierre Decavel,<sup>‡</sup> Myriam Delacre,<sup>\*</sup> Véronique Martinot,<sup>¶||</sup> Jean-Yves Cesbron,<sup>¶||</sup> Claude Auriault,<sup>\*</sup> and Isabelle Wolowczuk<sup>\*</sup>

The parasite *Schistosoma mansoni* infects its definitive mammalian host through an obligatory cutaneous penetration. In this work, we studied early immune response following migration of larvae through human skin, the first immunocompetent organ encountered by the parasite. For this purpose we used an experimental model of severe combined immunodeficient mice engrafted with human skin and injected with autologous PBL. Six days after percutaneous infection, we observed an infiltration of lymphocytes within the human skin, predominantly composed of CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, among the cytokines potentially present in the infected skin, immunohistochemistry analysis revealed an in vivo expression of IL-7 in the epidermal layers and strikingly at the level of vascular endothelium. Using an in vitro coculture system, we showed that the *S. mansoni* larvae directly trigger IL-7 production by human dermal microvascular endothelial cells but not by keratinocytes. Finally, measurements of IL-7 concentrations in plasma of 187 *S. mansoni*-infected individuals showed that the youngest, which are also the most infected, displayed the highest IL-7 levels. Together, these findings describe dermal endothelial cells as a novel source of IL-7, a cytokine particularly important in schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 4161–4168.

Interleukin-7 is produced by the bone marrow, spleen and thymus stromal/epithelial cells, intestinal epithelial cells, keratinocytes, and monocytes (1). Its synthesis by endothelial cells has only been recently reported (2). This cytokine, initially described as a growth factor for B cell precursors (3), exerts pleiotropic effects, such as stimulation of thymocyte growth, promotion of NK/LAK activity, modulation of cytokine production (IL-4, IFN- $\gamma$ ), increased IL-2R $\alpha$  expression on T lymphocytes, and activation of mature T lymphocytes and monocytes (see Refs. 1 and 4 for review). More recently, the pivotal role of IL-7 in the skin has been highlighted (5). Several authors described the involvement of IL-7 in human skin pathology. In *Mycobacterium leprae* infection, IL-7 produced at the site of lesion facilitates the cellular infectious responses in potentiating Ag-specific T cells. The authors postulated that the dysregulation of IL-7 production might contribute to the host's inability to control infection (6). Bonifati et al. (7) de-

scribed an increase in IL-7 concentrations in lesional skin and in the sera of patients with plaque-type psoriasis. Increased IL-7 mRNA synthesis was also demonstrated in skin of patients with atopic dermatitis. Indeed, IL-7 is supposed to amplify inflammation, acting principally as a growth factor for in vivo primed Ag-specific T cells and enhancing their proliferation in the skin (8).

Apart from these studies, the role of IL-7 produced in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice has only been recently reported (9). Indeed, this parasite infects its definitive host by an obligatory penetration through the skin. The larvae that are responsible for schistosomiasis, a parasitic disease affecting over 200 million individuals worldwide (10), remain in cutaneous tissue for 3 to 4 days, almost exclusively in the deep epidermal layers in close contact with keratinocytes. Subsequently, they reach dermal vessels (11), then are passively carried by the bloodstream to the lungs where they remain a few days. Finally, via the systemic circulation, they enter the hepatic portal system, where they mature into egg-producing adult worms at the mesenteric vein level (12). During the penetration and shortly thereafter, the cutaneous cells could play an active role in the initiation of the immune response through processing and presentation of the Ag to the competent cells of skin draining lymphoid compartments. By itself, the skin presents all the characteristics which suggest that it can function as an autonomous immunologic organ (13). We recently reported the early immunologic cutaneous events occurring during murine *S. mansoni* infection and their importance to the fate of the late immune response. Indeed, we were able to show that IL-7 expression was detectable in the skin of infected mice, between days 1 and 21 following infection. In addition, intradermal injection of exogenous IL-7, before the penetration of the cercariae, led to a more severe liver pathology and to an increased number of surviving adult parasites, thus favoring the parasite rather than its host (9).

The growing body of information on the important role of IL-7 in immunologic and pathologic cutaneous reactions and

\*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 1854, Institut de Biologie de Lille, Lille, France; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 167, Physiopathologie des Affections Neurodégénératives Transmissibles, Institut Pasteur, Lille, France; ‡Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 167, Institut Pasteur, Lille, France; §Laboratoire de SOR, European Special Program for Operational and Integrated Research, Saint Louis, Sénégal; ¶Service de Chirurgie Plastique et Reconstructive, Hôpital Roger Salengro, Lille, France; and ||Université de Lille II, Lille, France

Received for publication April 6, 1998. Accepted for publication June 17, 1998.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut Pasteur de Lille. The work in Senegal received financial support from European Economical Community Contract ICI8CT95-0013. N.D. was supported by a grant from Sidaction, and O.R. was supported by grants from the Région Nord-Pas de Calais and the Institut Pasteur de Lille.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Olivier Roye, Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 1854, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, BP 447, F-59021 Lille Cedex, France.

our own demonstration of its participation in cutaneous reactions in the murine experimental system (9) prompted us to assess the involvement of this cytokine in human *S. mansoni*, particularly at cutaneous level, in the first days of infection. Recently, human skin grafts were performed on SCID mice. This system was extensively used to investigate fundamental and pathologic dermatology (14–18). Subsequent injection with human peripheral blood leukocytes led to the SCID-hu-PBL/skin mouse model, allowing human cutaneous immunologic assays (46). We thus decided to use SCID-hu-PBL/skin mice to infect human skin with *S. mansoni* and analyzed, on the one hand, the unknown localization of schistosomula in human skin and, on the other hand, the onset of early immunologic events (6 days after infection), such as human cell recruitment and human cytokine production. Interestingly, we observed a cutaneous infiltration of lymphocytes and detected IL-7 production in the epidermal layers and the dermal vascular endothelium. We also demonstrate the direct effect of larvae on human dermal endothelial cells in vitro. In addition to its cutaneous production we finally documented the presence of IL-7 in plasma of *S. mansoni*-infected patients from a highly endemic focus.

## Materials and Methods

### Animals

Six-week-old homozygous *scid/scid* C57BL/6 (SCID) mice were obtained from the specific pathogen-free animal breeding facility at the Pasteur Institute (Lille, France) and kept in isolators under barrier-sustained conditions, without prophylactic administration of antibiotic.

### Skin transplantation and hu-SCID mice reconstitution

The protocol of skin transplantation was performed as previously described by Yan et al. (14). Animals were anesthetized by i.p. injection of a mixture of Imalgene 1000 (80 mg/kg; Rhône Mérieux, Lyon, France) and valium (2.5 mg/kg; Roche Products, Neuilly-sur-Seine, France). Human skin (~1.5 × 2 × 0.2 cm) was grafted onto a full skin excisional field of the shaved back of the SCID mice and fixed with nonadsorbable 4-0 Ethibond Excel sutures (Ethicon, Neuilly-sur-Seine, France). After applying a sterile Vaseline-impregnated gauze, the graft was protected from self injury with compressive dressing. Dressings were kept in place, and the wounds resolved spontaneously within 4 to 6 wk. Human skin consisted of biopsies from reconstructive surgery (Roger Salengro Hospital, Lille, France) after obtaining informed consent from the patient. Blood samples from skin donor were collected 4 wk after surgery. Mononuclear cells were isolated using Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Skin-grafted SCID mice were injected i.v. with 23 × 10<sup>6</sup> human peripheral blood leukocytes per mouse.

### Parasites and infection protocols

The *S. mansoni* (Puerto Rican strain) life cycle was maintained at the Pasteur Institute of Lille using the *Biomphalaria glabrata* snail as the intermediate host and the *Mesocricetus auratus* hamster as the definitive host. For infection of human skin-grafted SCID mice, animals were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg; Sanofi, Libourne, France). The human skin graft site was then exposed to 60 furcrocercariae (1600 cercariae were used for histologic studies, see below), according to the method first described by Smithers et al. (19). Control mice were anesthetized in the same way, and the infectious furcrocercariae solution was replaced by water without parasite.

### Histologic analysis

**Histology.** Human skin graft infected with 1600 furcrocercariae was aseptically harvested 1 h postinfection (p.i.)<sup>3</sup> then fixed overnight in Bouin's solution and paraffin embedded. Sections of 6 µm were dewaxed in xylene then, rehydrated, and stained with Masson's trichrome (Sigma, St. Louis, MO) before being mounted with Entellan resin (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France) for histologic observations.

**Immunohistochemistry.** Six days p.i., a punch biopsy was performed on human skin graft from two infected mice (60 furcrocercariae) and two non-infected mice as control. Biopsies were split and snap-frozen into liquid nitrogen for subsequent RNA extraction (see above) and immunohistochemical analysis, using a standard immunoperoxidase staining protocol (LSAB-II Kit, Dako, Trappes, France). We chose the 3-amino-9-ethyl-carbazol as red substrate for peroxidase to discriminate between specific staining and the natural brown color of melanin. Negative controls were performed by omission of the primary Abs. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) and then mounted in Glycerol (Sigma).

### RNA isolation, cDNA synthesis, and PCR

Total RNA was isolated from punch biopsies using 1 ml of RNAsol/100 mg of snap-frozen skin samples. The quality of the RNA was checked on an 1% agarose gel. cDNA were synthesized from equal amounts of oligo(dT)-primed RNA (1 µg) by incubation at 42°C with 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Eryagny, France). PCR amplification was performed using primers specific for human β-actin (5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'), IL-4 (5'-TGC CTC CAA GAA AAC AAC TG-3' and 5'-AAC GTA CTC TGG TTG GCT TC-3'), and IFN-γ (5'-GCA GAG CCA AAT TGT CTC CT-3' and 5'-ATG CTC TTC GAC CTC GAA AC-3'). Samples of cDNA were amplified for 40 cycles (for β-actin and IL-4) or for 33 cycles (for IFN-γ) at an annealing temperature of 55°C using a Perkin-Elmer DNA thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus, Saint-Quentin, France). For each cDNA preparation, a control synthesis reaction was performed without cDNA synthesis to ensure that there was no contaminating genomic DNA. PCR products were analyzed in 1.5% agarose gel in 1× TBE containing ethidium bromide (25 µg/50 ml gel; Interchim, Montluçon, France).

### Immunologic reagents and cells

**Monoclonal Abs.** mAbs specific for human CD4 (Th lymphocytes; MT310, Dako, Trappes, France), CD8 (CTL; B9.11, Immunotech, Marseille, France), CD22 (B lymphocytes: 4KB128, Dako), IL-7 (B-N18, Diaclone, Besançon, France), IFN-γ (B-B1, Diaclone), and IL-4 (provided by Sandoz, Basel, Switzerland) were used. The anti-human IL-7 mAb do not cross-react with another human cytokine or with murine IL-7 as indicated by the manufacturer.

**Endothelial cells, keratinocytes, and schistosomula coculture.** Human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-d) and human keratinocytes were purchased from Boehringer Ingelheim Bioproducts (Gagny, France) and grown according to the recommendations of the manufacturer (passages 3–5). *S. mansoni* schistosomula were prepared from furcrocercariae by the skin penetration procedure (20) and resuspended in culture medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere until use. For determination of IL-7 concentration, HMVEC-d and keratinocytes were cultured to confluence in six-well plates (Polylabo, Strasbourg, France), and the medium was renewed 1 h before addition of parasites. Aliquots of schistosomula (100 parasites/10-µl aliquot) were added to each well and incubated at 37°C for various periods of time (duplicate samples were harvested for each time point). During the course of the experiment (120 h), parasites remained alive, and no proliferation of endothelial cells was observed in our culture conditions. Culture supernatants were centrifuged at 4000 × g for 5 min to eliminate residual cells and parasites and were frozen at -70°C until use.

### Study area and population of infected human

A human population was drawn from Guidakhar village, located along the Senegal River in Richard-Toll district. All age groups presented the same history of exposure. Indeed, Guidakhar village, where schistosomiasis began in 1987 is highly endemic for *S. mansoni* infection (21) with a prevalence reaching almost 100% (*Schistosoma haematobium* is absent (22)). Fecal samples were obtained from each individual, and the diagnostic of *S. mansoni* infection was assessed using the Kato-Katz technique (23). Results were expressed as the number of eggs per gram of feces (EPG), taken as the mean of countings performed on 5 consecutive days. A cohort was selected from 8 to 60 yr of age, after stratification by age in positive population for *S. mansoni* infection. Plasma was collected from 187 positive individuals and was selected before chemotherapy by praziquantel. Twenty uninfected Africans resident in St. Louis, a nonendemic region, and 104 healthy European individuals were chosen with the same age class distribution and studied as controls. Infected and uninfected populations consisted of equal numbers of males and females.

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: p.i., postinfection; HMVEC-d, dermal human microvascular endothelial cells; EPG, number of eggs per gram of feces.

**FIGURE 1.** Histologic features of the connective zone between human and murine skin from SCID-hu-PBL/skin mice 4 to 6 wk after engraftment. Murine and human skin, respectively, correspond to the left and the right parts of the section. Continuous junction could be observed between murine and human skin, and an usual aspect of the different cutaneous components, such as epidermis, dermis, annexa, and blood vessels could be observed without cellular alterations. Masson's trichrome stain was used. Magnification,  $\times 100$ .



#### ELISA for IL-7 determination

IL-7 concentrations were determined in plasma from *S. mansoni*-infected or uninfected humans and in endothelial cell-schistosomulum coculture supernatants using a highly sensitive test (R & D Systems, Oxon, U.K.; detection level, 0.025 pg/ml for a 200- $\mu$ l sample). Assays were performed strictly following the manufacturer's instructions. A multichannel spectrophotometer, LabSystems, Helsinki, Finland were used to measure the absorbance at 492 nm.

#### Results

##### *Human skin-grafted SCID mice is a suitable model to study early cutaneous events during S. mansoni infection*

Five to six weeks after engraftment, macroscopic examination of the human skin revealed a classical aspect as defined by a normal pigmentation and by the absence of inflammation and skin breakdown. Histologic observations of biopsies corresponding to the connective zone between human and murine skins showed a continuous junction (Fig. 1). An usual aspect of the different cutaneous components, such as epidermis, dermis, annexa, and blood vessels, could be observed without cellular alterations. As the human engrafted skin appeared macroscopically and microscopically intact,

we performed an infection with *S. mansoni* cercariae (as described in Materials and Methods).

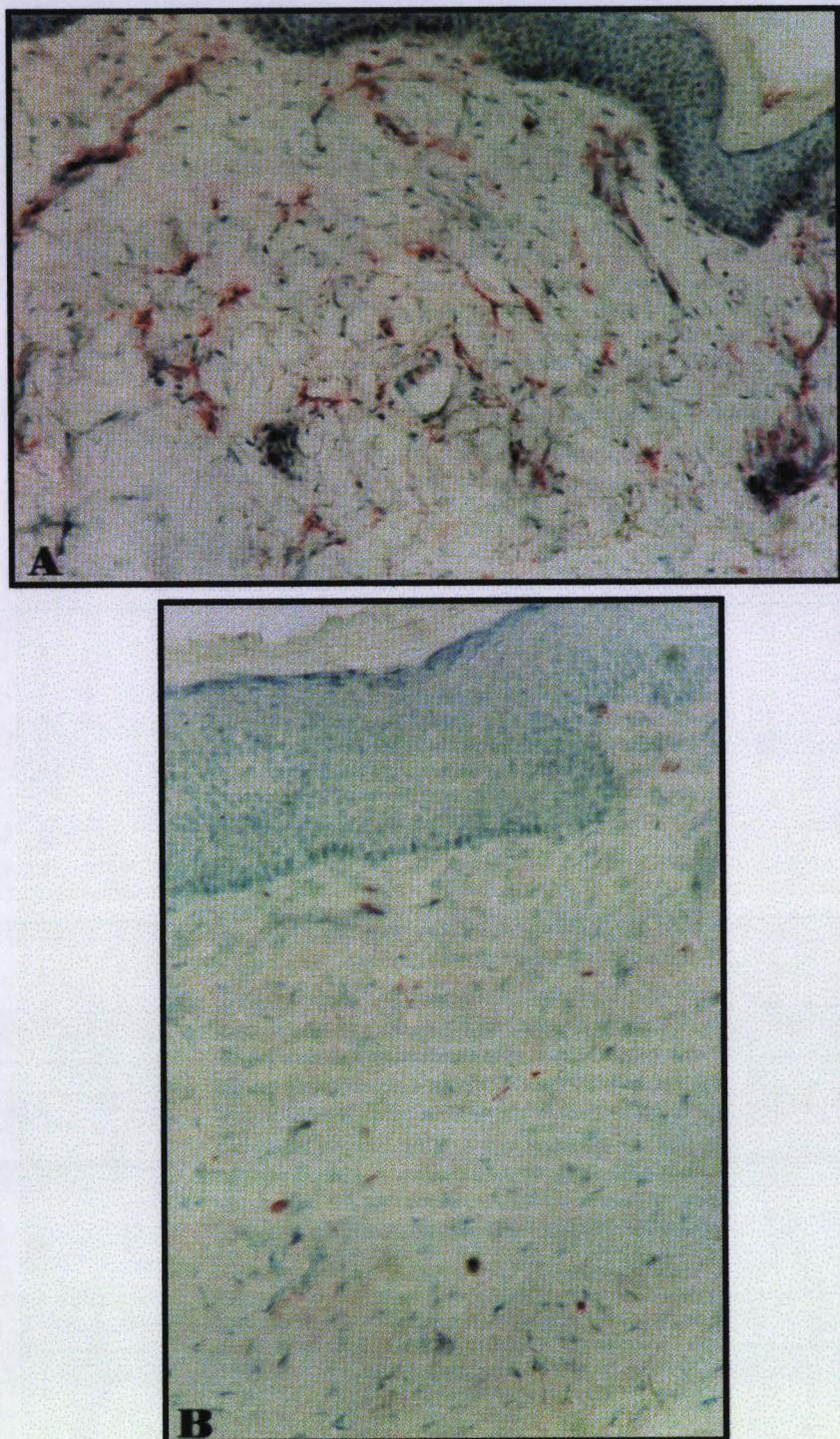
When human skin was examined 1 h p.i., schistosomula were observed principally at the dermo-epidermal junction, (Malpighi layer; Fig. 2). In all cases, they were found within lacunae as described by Wilson et al. for rodent skin (24). Furthermore, we found parasites in the lungs 6 days p.i. (data not shown), as observed during the migration in the mouse model, thus demonstrating that vascularization of the human graft is perfectly connected with the host's vascular system. Taken together, these observations presented no difference compared with the mouse model (12, 24) and validated this experimental system for the study of early immunologic events in human skin.

##### *Lymphocytes infiltrate the infected human skin*

The skin was described as a unique immunologic environment that contains many of the cellular constituents needed for the initiation, modulation, and elicitation of the immune response (25). Immunologic events occurring immediately after penetration of cercariae in human skin were not extensively studied in previous reports

**FIGURE 2.** Light microscopic appearance of human grafted skin 1 h postinfection with *S. mansoni*. Arrows denote schistosomula principally present at the dermal-epidermal junction, into the Malpighi layer. Schistosomula can quickly penetrate the grafted human skin. Note the absence of epidermal alteration after parasite penetration, except for large lacunae surrounding the larvae. Masson's trichrome stain was used. Magnification,  $\times 100$ .





**FIGURE 3.** Immunohistochemical distribution of CD4-positive T cells in skin from SCID-hu-PBL/skin mice on day 6 after *S. mansoni* infection (*A*) compared with that in uninfected skin (*B*). In *A*, the infected skin is characterized by a dermal infiltrate of CD4-positive T cells with a preferential perivascular localization. Notice the absence of such cells on uninfected skin sections (*B*). The epidermis from the control sample presented in *B* was thicker than the corresponding layers in the infected samples (*A*). This only reflects the conditions of skin regeneration after graft, since other control samples presented epidermis thickness equivalent to that of infected skin, and identical results were obtained with these samples. Avidin-biotin immunoperoxidase stain was used. Magnification,  $\times 200$ .

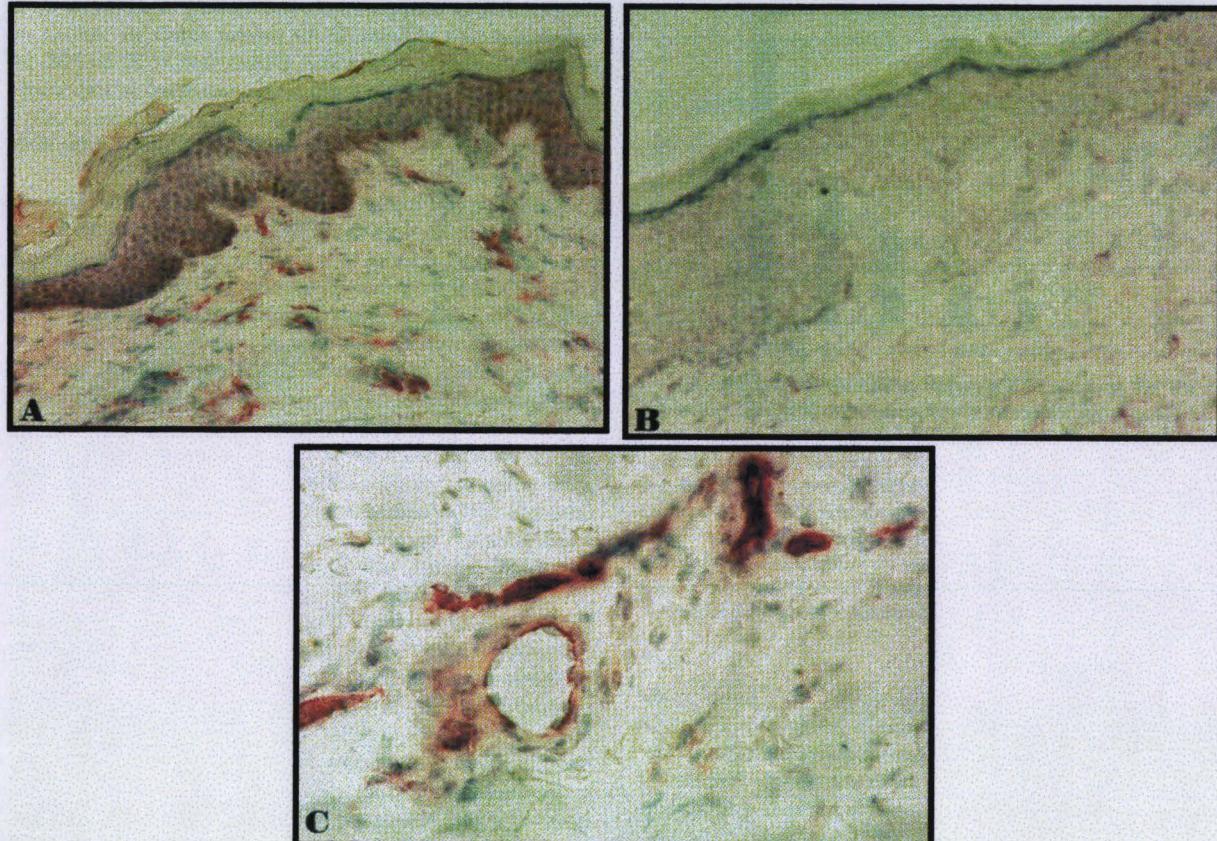
for obvious ethical reasons. In our model of SCID-hu-PBL/skin mice, a functional humanized immune response to schistosomulum transcutaneous penetration could potentially occur.

The anatomo-pathologic analysis of the infected human skin sections (6 days p.i.) showed a moderate intradermal infiltration of human lymphocytes. Immunohistochemistry analysis confirmed the infiltration of human CD4<sup>+</sup> Th lymphocytes, exclusively in the dermis with a perivascular predominance (Fig. 3A). No CD4<sup>+</sup> T cells were detected in control noninfected SCID-hu-PBL/skin mice (Fig. 3B). Few human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were present in the basal epidermis, but no differences could be observed between

control and infected skin. No CD22<sup>+</sup> B lymphocytes were found in any biopsies whether infected or not (data not shown).

#### *Keratinocytes and endothelial cells produce increased amounts of IL-7 in human infected skin*

In earlier work we reported that IL-4, IL-7, and IFN- $\gamma$  are produced in murine infected skin within the first days after parasite penetration (9). Thus, we investigated cytokine production following penetration of the parasite through the human skin graft. Immunohistochemical stainings were conducted on skin sections (6 days p.i.), and a strong increase of IL-7 was revealed in human



**FIGURE 4.** IL-7 expression in human infected skin on day 6 after infection (*A*) compared with that in uninfected skin (*B*). Note in *A* the diffuse staining in the epidermis and the strong staining of the vessels in the dermis. A higher magnification shows a well-defined staining surrounding the endothelial cells (*C*). IL-7 was not detectable in uninfected skin sections on either epidermis or dermal vessels (*B*). Avidin-biotin immunoperoxidase stain was used. Magnification: *A* and *B*,  $\times 200$ ; *C*,  $\times 400$ .

skin following infection (Fig. 4*A*; noninfected control is shown in Fig. 4*B*). A diffuse staining in the total epidermis and at the vascular level in the dermis was observed. At higher magnification, a well-defined staining surrounding the endothelial cells was apparent (Fig. 4*C*), suggesting a possible synthesis of IL-7 by the dermal vascular cells. In contrast, neither IL-4 nor IFN- $\gamma$  was detected by immunohistochemistry at the protein level (data not shown). These findings were confirmed using RT-PCR method. Indeed, IL-4 mRNA and IFN- $\gamma$  mRNA were not detectable in either human infected skin or human uninfected skin (Fig. 5).

#### *Schistosomula* increase IL-7 production by human microvascular dermal endothelial cells, but not by keratinocytes, *in vitro*

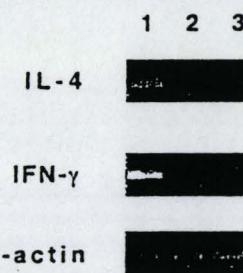
To determine whether the parasite could be directly responsible for the IL-7 endothelial production and to exclude a possible diffusion from keratinocytes, we conducted cocultures of schistosomula with dermal human microvascular endothelial cells. At different time points, culture supernatants were harvested, and IL-7 accumulation was measured. As shown in Figure 6, a continuous constitutive synthesis of IL-7 by HMVEC-d was observed in the absence of parasite. Cocultures with schistosomula showed a significantly higher synthesis at 72 h compared with that in the control culture. This was confirmed after 120 h, with 2.5-fold increased production.

To determine the involvement of the parasite in IL-7 production in epidermis (observed on tissue sections), similar experiments using cocultures were performed to study the possible IL-7 produc-

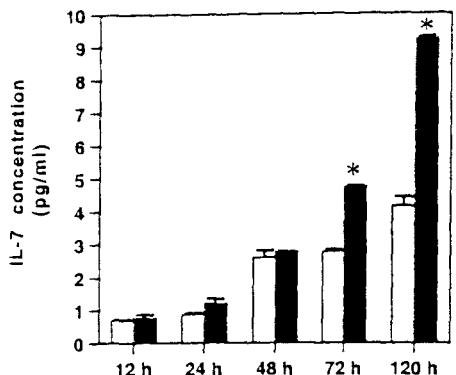
tion by human keratinocytes. In contrast to dermal endothelial cells, from 12 to 120 h in the absence or the presence of parasite, no significant production of IL-7 by keratinocytes could be measured in culture supernatants (data not shown).

#### *Highly S. mansoni-infected patients show high IL-7 levels in plasma*

Considering these results, we questioned whether the local (epidermal and endothelial) IL-7 production in *S. mansoni*-infected



**FIGURE 5.** IL-4 mRNA and IFN- $\gamma$  mRNA are absent in human infected skin on day 6 after infection.  $\beta$ -Actin was used as an internal control for the integrity of the RNA. PCR with specific primers was then used to detect IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA. Infected human skin (*lane 2*), noninfected human skin (*lane 3*), and cDNA positive for IL-4 (48-h Con A-stimulated Jurkat cells) and for IFN- $\gamma$  (48-h PHA-stimulated PBMC; *lane 1*) are shown. Neither IL-4 nor IFN- $\gamma$  mRNA was detected in infected or noninfected human skin.



**FIGURE 6.** IL-7 synthesis in dermal endothelial cell/schistosomula cocultures. Human microvascular dermal endothelial cells were cultured in either the presence (■) or the absence (□) of schistosomula. At different time points, culture supernatants were harvested, and IL-7 concentrations were assessed using a highly sensitive ELISA. Note the baseline IL-7 production and the strong increase in this synthesis after 72- and 120-h culture periods in the presence of parasites. Three independent experiments were performed in duplicate. We presented here the results of one representative experiment. Data are reported as the mean  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.01$  vs control (endothelial cells alone) after statistical evaluation using Student's *t* test.

human skin could be extended to detectable IL-7 levels in the plasma of infected individuals. The results presented in Figure 7B show the distribution of IL-7 concentrations in the different age classes in the infected population (with comparable numbers of individuals for each class). The youngest individuals exhibited the highest IL-7 concentrations, whereas the oldest displayed the lowest levels. Several population studies in major schistosomiasis endemic areas highlighted a negative correlation between age and infection intensity (determined by EPG) (26–29). It was then crucial to check whether this was the case in our chosen population and subsequently to test potential correlation between IL-7 and age. To validate statistical tests, we conducted logarithmic transformations of EPG values and IL-7 values to obtain a normal distribution of these parameters. Therefore, correlation coefficients ( $r$ ) were calculated between EPG and age and between IL-7 and age. On the one hand, the highly significant negative correlation ( $r = 0.252$ ;  $p < 0.0005$ ) between EPG and age was confirmed. On the other hand, we showed a strong negative correlation ( $r = 0.371$ ;  $p < 0.0001$ ) between IL-7 and age (Fig. 7C). Therefore, IL-7 concentrations and EPG are displaying the same age-dependent evolution (the highest IL-7 levels and EPG values in the lowest age class). Moreover, identical analysis of the African and European uninfected control populations revealed comparable IL-7 plasma concentrations in the whole populations (Fig. 7A). Any difference between the amount of IL-7 in each age group could be observed, and statistical analysis for each of these populations did not single out any significant correlation between IL-7 levels and age.

## Discussion

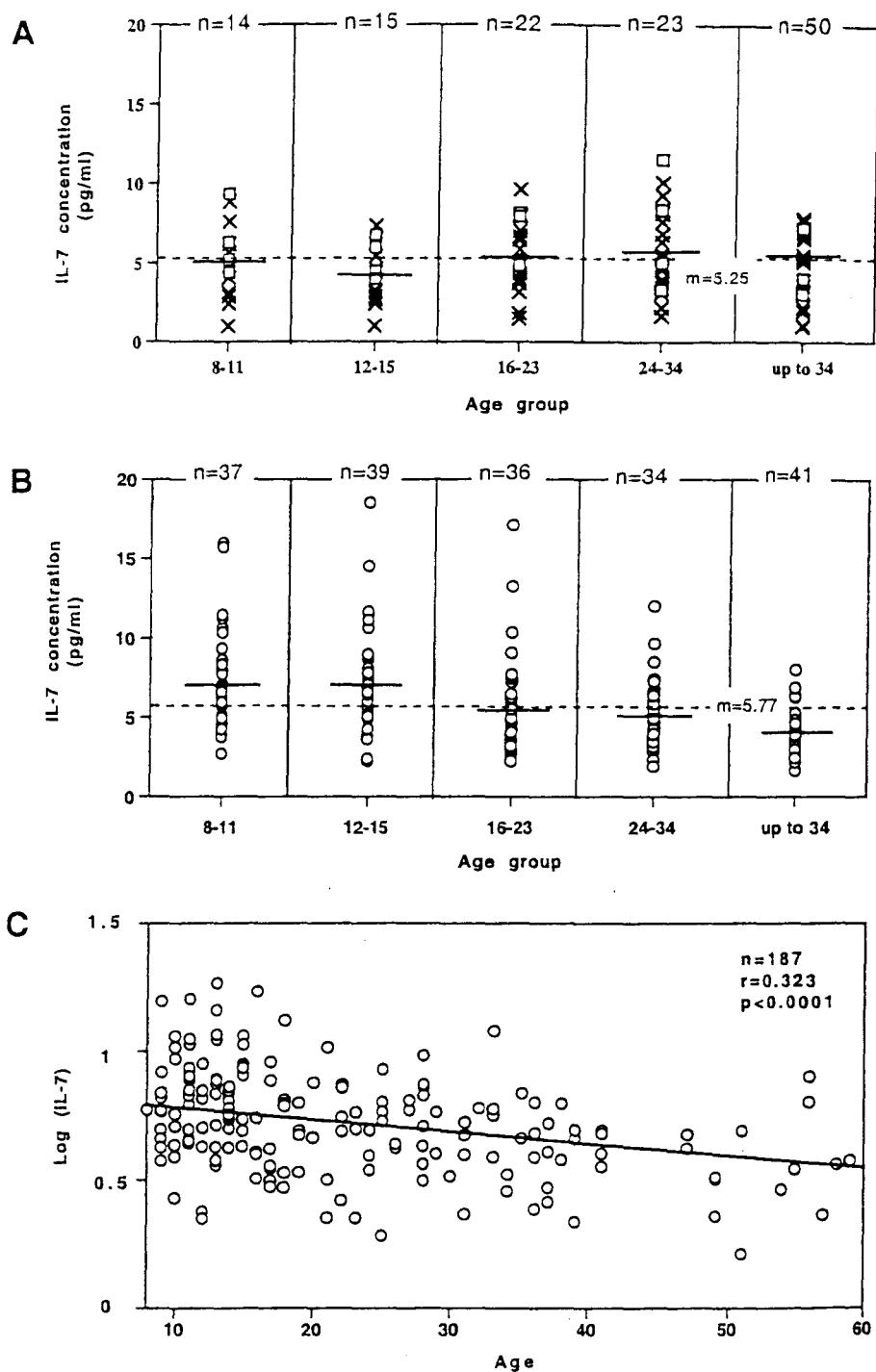
The first description of skin as an immunocompetent organ was made by Streilein (30). Langerhans cells, keratinocytes, epidermotropic T cells, and skin-associated draining lymph nodes collectively form an immunologic unit that provides the skin with immune surveillance mechanisms (13). In addition, it is now obvious that inflammatory reactions and immune responses involve close interactions between immunocompetent cells and the vascular endothelium. By producing cytokines and chemokines (31) and by expressing specific adhesion molecules (32), endothelial cells play an important part in modulating selective cellular recruitment. Vi-

ral, bacterial, or protozoan infections directly or indirectly involve endothelial cells (33–35). In the present report we studied early events occurring in human skin grafted onto SCID-hu-PBL mice after *S. mansoni* infection, and we demonstrated an important involvement of the dermal endothelial cells. Indeed, these cells are able to produce IL-7 and to recruit T lymphocytes in the skin in response to schistosomula penetration.

*S. mansoni* is a topical endovascular parasite; from host penetration through the skin, to migration via the lungs to the liver and mesenteric vein, *S. mansoni* is in close contact with the endothelial compartment at each maturation step. In a previous work (9) we detected IL-7 mRNA synthesis in murine infected skin and demonstrated that parasite migration at least in part depends on this cytokine. Indeed, mice infected 12 h after intradermal injection of rIL-7 show a different migration and/or localization of the parasites at the very early stages of infection. In addition, this single injection before infection leads to an increased worm burden and to a more severe pathology associated with *S. mansoni* infection. Furthermore, in IL-7-deficient mice (36) infected with *S. mansoni*, the worm burden is decreased, and the clinical status of the infected host is ameliorated. In addition, and interestingly, worms never develop to full sexual maturity in infected IL-7-deficient mice, implying an important role of IL-7 in schistosome growth and maturation (I. Wolowczuk, manuscript in preparation).

Therefore, our demonstration of increased IL-7 endothelial production in human infected skin triggered by the parasite could be to its own benefit. Whether others auto-, para-, and/or intracrine molecular activities are involved is still unknown, and the molecular identity and the mechanism of action of parasitic factors involved in this stimulation remain to be determined. Among others cytokines potentially produced by endothelial cells, IL-7 appears to be uniquely expressed in response to the parasite (F. Trottein, unpublished observation). Beyond IL-7 production by dermal endothelial cells, IL-7 synthesis by lung endothelium was investigated in vitro subsequent to parasite entry, using human pulmonary endothelial cells. Coculture assays showed high baseline levels of IL-7 production, which were not modulated by the presence of parasites (data not shown). Therefore, the parasite-dependent increase in IL-7 synthesis might be limited to the cutaneous environment. We also noticed increased production of IL-7 in the epidermis (in vivo) probably produced by keratinocytes (37). Moreover, IL-7 was not observed in the epidermis of SCID-hu-skin mice not injected with autologous PBL and was undetectable in keratinocyte-schistosomulum cocultures (data not shown). Taken together, these observations could mean that keratinocytes need additional factors present in the *S. mansoni*-infected skin to produce IL-7, in contrast to endothelial cells. We are investigating the potential increase in IL-7 production due to the parasite using cytokines added to coculture medium, such as IFN- $\gamma$ , which is known to activate keratinocytes (6). Therefore, from these observations we could postulate that IL-7 would be available for the parasite, at least from skin to lung.

In our study we reported a perivascular recruitment of CD4 $^{+}$  T cells in the dermis of *S. mansoni*-infected human skin. That seems to be specific to parasite penetration, and the absence of CD8 $^{+}$  T lymphocytes could not be due to limitation of cellular reconstitution of the mice. Indeed, using the same experimental system, Delhem et al. observed a cutaneous infiltration of CD8 $^{+}$  T lymphocytes after injection of virus in human skin (see Footnote 3). Recently, IL-7 was described as an inducer of T cell adhesion to endothelial cell (38, 39). Particularly, this cytokine increase VLA-4 and LFA-1 expression on activated CD4 $^{+}$  CD23 $^{+}$  T cells subsets (40). Therefore, we could hypothesize that IL-7 produced by dermal endothelial cells may promote the observed CD4 $^{+}$  T



**FIGURE 7.** IL-7 concentration analysis in the plasma of 104 healthy individuals vs that in 187 *S. mansoni*-infected individuals. In *A*, African (□) and European (×) healthy populations were stratified in age groups with the indicated number (*n*) of individuals. In *B*, the cohort of *S. mansoni*-infected individuals (○) was also stratified in the same age groups. The mean (*m*) of IL-7 concentrations is represented by a continuous horizontal bar for each age group and by a dashed line by integrating the whole population. In *C*, the correlation between IL-7 concentration (after logarithmic transformation) and age in the infected cohort is presented. The population was first sorted following increasing ages. We obtained a highly significant negative correlation ( $r = 0.323$ ;  $p < 0.0001$ ).

cell recruitment. In addition, IL-7 could probably act as a costimulus (coreceptor and/or cytokine) to induce human resting peripheral blood T lymphocytes to proliferate within the skin (41). In murine skin, IL-7 overexpression by keratinocytes from transgenic mice causes a large expansion of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCR cells in the skin (42). Finally, IL-7 regulates TCR usage and T cell proliferation in HIV-1 infection (43). Therefore, it seems pertinent to hypothesize a role for endothelium- and/or keratinocyte-derived IL-7 not only for increasing T cell adhesiveness but also for final peripheral activation and proliferation of dermal recruited T cells. T cells of the cutaneous infiltrate are presently being cloned to determine their specificity, effector role, and particularly the presence of the cutaneous leukocyte antigen, a unique skin homing receptor expressed

by memory T cells (44). Finally, double-graft experiments would be performed to determine whether T cell infiltration is restricted to the infection site or is systemic, within the uninfected fragment of human skin.

We have demonstrated that IL-7 is not only locally produced in the skin but that IL-7 concentrations are also increased in the plasma of the youngest infected patients. Monocytes (6) and platelets (45) from peripheral blood might be the principal sources of this secretion. Moreover, we established a significant negative correlation between IL-7 and age, whereas no such link was found in African and European uninfected populations. Nevertheless, we cannot reach a conclusion about the role of IL-7 in the level of infectivity in humans. The fact that IL-7 can be detected in human

sera re-enforces the validity of the observation made in the model of SCID-hu-PBL/skin mice and justifies further analysis of human infected populations.

IL-7 has a very pleiotropic action; it is thus difficult to hypothesize a single specific role in schistosomiasis or in other parasite diseases. Our results provide evidence that keratinocytes and dermal endothelial cells synthesize increased amounts of IL-7 upon penetration of *S. mansoni* larvae. These findings were relevant in the field, since high IL-7 levels could be measured in the plasma of infected individuals. Finally, this first demonstration of IL-7 production by dermal endothelial cells, the first cells encountered by infiltrating T cells, provides a new view of the T cell proliferation responsible for the most common cutaneous diseases, such as psoriasis (7) or atopic dermatitis (8). To conclude, the effect of IL-7 concomitantly exerted on the parasite and on the immune response could be very intricate and reflects the complex relationships between host and parasite.

## Acknowledgments

We thank M. Niang (ESPOIR Program), M.-C. Galissot, M. Marguerite, and the inhabitants of Guidakhar village. We are grateful to F. Richard, S. Danet, and J.-L. Neyrinck for statistical evaluation of our data; to F. Carpentier for pathologic anatomy examination; and to F. Hautecoeur for coordination with the Roger Salengro Hospital. Blood from healthy donors was purchased by P. Boutin and C. Derycke. Finally, we thank the patients who donated skin and blood to make these studies possible, and D. Dombovicz for critical review of the manuscript.

## References

- Costello, R., J. Imbert, and D. Olive. 1993. Interleukin-7, a major T-lymphocyte cytokine. *Eur. Cytokine Netw.* 4:253.
- Kröncke, R., H. Loppnow, H. D. Flad, and J. Gerdes. 1996. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur. J. Immunol.* 26:2541.
- Namen, A. E., A. E. Schmieder, C. J. March, R. W. Overell, L. S. Park, D. L. Urdal, and D. Y. Machizuki. 1988. B-cell precursor growth-promoting activity: purification and characterization of a growth-factor active on lymphocyte precursors. *J. Exp. Med.* 167:988.
- Priti, T. M., J. A. Grant, and J. P. Siegel. 1995. Synergistic effect of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J. Immunol.* 154:5093.
- Moiler, P., M. Bohm, B. M. Czarnetski, and D. Schadendorf. 1996. Interleukin-7: biology and implications for dermatology. *Exp. Dermatol.* 5:129.
- Sieling, P. A., L. Sakimura, K. Ueyama, M. Yamamura, J. Oliveros, B. J. Nickoloff, T. H. Rea, and R. L. Modlin. 1995. IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen. *J. Immunol.* 154:2775.
- Bonifati, C., E. Trento, P. Cordiali-Fei, M. Carducci, A. Mussi, L. D'Auria, F. Pimpinelli, M. Fazio, and F. Ameglio. 1997. Increased interleukin-7 in lesional skin and in the sera of patients with plaque-type psoriasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:41.
- Yamada, N., M. Wakugawa, S. Kuwata, H. Nakagawa, and K. Tamaki. 1996. Changes in eosinophil and leukocyte infiltration and expression of IL-6 and IL-7 messenger RNA in mite allergen patch test reactions in atop dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:291.
- Wolowczuk, I., M. Delacre, O. Roye, S. L. Giannini, and C. Auriault. 1997. Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$  production and leads to an aggravation of the disease. *Immunology* 91:35.
- Schistosomiasis, W.H.O. Expert Committee. 1993. Public health impact of schistosomiasis: disease and mortality. *Bull. W.H.O.* 71:657.
- Miller, P., and R. A. Wilson. 1978. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. *Parasitology* 77:281.
- Wheater, P. R., and R. A. Wilson. 1979. *Schistosoma mansoni*: an histological study of migration in the laboratory mouse. *Parasitology* 79:49.
- Bos, J. D. 1997. The skin as an organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 107:3.
- Yan, H. C., I. Juhasz, J. Pilewski, G. F. Murphy, M. Herlyn, and S. M. Albeida. 1993. Human/severe immunodeficient mouse chimeras: an experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J. Clin. Invest.* 91:986.
- Rowden, G., P. Colp, S. Dean, F. Auger, and C. Lopes-Valle. 1992. Comparative epidermal Langerhans cell migration studies in epidermal/dermal equivalent grafts. *J. Invest. Dermatol.* 99:59.
- Wrone-Smith, T., and B. J. Nickoloff. 1996. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J. Clin. Invest.* 98:1878.
- Kim, Y. H., D. T. Woodley, K. C. Wynn, W. Giomi, and E. A. Bauer. 1992. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa phenotype is preserved in xenografts using SCID mice: development of an experimental in vivo model. *J. Invest. Dermatol.* 98:191.
- Juhasz, I., G. S. Lazarus, G. F. Murphy, I. M. Shih, and M. Herlyn. 1993. Development of pemphigus vulgaris-like lesions in severe combined immunodeficiency disease mice reconstituted with lymphocytes from patients. *J. Clin. Invest.* 92:2401.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1969. Immunity in schistosomiasis. *Ann. NY Acad. Sci.* 160:826.
- James, E. R., and M. G. Taylor. 1976. Transformation of cercariae to schistosomula: a quantitative comparison of transformation techniques and of infectivity by different injection routes of the organisms produced. *J. Helminthol.* 50:223.
- Talla, I., A. Kong, and P. Verlé. 1992. Preliminary study of the prevalence of human schistosomiasis in Richard-Toll (the Senegal river basin). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86:182.
- Picquet, M., J. C. Ernould, J. Vercret, V. R. Southgate, A. Mbaye, B. Sambou, M. Niang, and D. Rollinson. 1996. The epidemiology of human schistosomiasis in the Senegal river basin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:340.
- Katz, N., A. Chaves, and J. Pellegrino. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 14:397.
- Wilson, R. A., and J. Ruth Lawson. 1980. An examination of the skin phase of schistosome migration using a hamster pouch preparation. *Parasitology* 80:257.
- Krueger, G. G., and G. Stingle. 1989. Immunology/Inflammation of the skin: a 50 year perspective. *J. Invest. Dermatol.* 92:32.
- Dessein, A. J., M. Begley, and C. Demeure. 1988. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37 kDa larval surface antigen. *J. Immunol.* 140:2727.
- Abel, L., F. Demenais, A. Prata, A. E. Souza, and 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.
- Wilkins, H. A. 1989. Reinfection after treatment of schistosome infections. *Parasitol. Today* 5:83.
- Butterworth, A. E., M. Capron, and J. S. Cordingly. 1985. Immunity after treatment of human *Schistosomiasis mansoni*. II. Identification of resistant individuals and analysis of their immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:393.
- Streilein, J. W. 1983. Skin-associated lymphoid tissue (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80:12s.
- Mantovani, A., F. Bussolino, and M. Introna. 1997. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today* 18:231.
- Ley, K. 1996. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 32:733.
- Jones, K., C. Rivera, C. Sgadari, J. Franklin, E. E. Max, K. Bhatia, and G. Tosato. 1995. Infection of human endothelial cells with Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 182:1213.
- Fan, S.-T., K. Hsia, and T.S. Edgington. 1994. Upregulation of human immunodeficiency virus-1 in chronically infected monocytic cell line by both contact with endothelial cells and cytokines. *Blood* 84:1567.
- Yao, L., V. Bennighaus, F. D. Lowy, J. J. Gibbons, V. B. Hatcher, and J. W. Berman. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63:1835.
- Von Freeden-Jeffry, U., P. Viera, L. A. Lucian, T. MacNeil, S. E. G. Burbach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181:1519.
- Heusler, C. G., Topar, A. Grasseger, U. Stanzl, F. Koch, N. Romani, A. E. Naranen, and G. Schuler. 1993. Interleukin-7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.* 178:1109.
- Denis, V., P. Dupuis, N. Bizouarné, S. Sampao, L. Hong, M. Lebret, M. Monsiby, M. Nakache, and C. Kieda. 1996. Selective induction of peripheral and mucosal endothelial cell addressins with peripheral lymph nodes and Peyer's patch cell-conditioned media. *J. Leukocyte Biol.* 60:744.
- Arieli, A., R. Herskowitz, L. Cahalon, D. E. Williams, S. K. Akiyama, K. M. Yamada, C. Chen, R. Alon, T. Lapidot, and O. Lider. 1997. Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *Eur. J. Immunol.* 27:2562.
- Fratazzi, C., and C. Carini. 1996. Interleukin-7 modulates intracytoplasmic CD23 production and induces adhesion molecule expression and adhesiveness in activated CD4<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> T cell subsets. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81:261.
- Welch, P. A., A. E. Naranen, R. G. Goodwin, R. Armitage, and R. D. Cooper. 1989. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J. Immunol.* 143:3562.
- Williams, I. R., E. Rawson, L. Manning, T. Karaoli, E. Benjamin, and T. Kupper. 1997. IL-7 overexpression in transgenic mouse keratinocytes causes a lymphoproliferative skin disease dominated by intermediate TCR cells. *J. Immunol.* 159:3044.
- Carini, C., M. Guerriero, and C. Fratazzi. 1997. Modulation of TCR usage in HIV-1 infection is regulated by IL-7 and sCD23. *Allergol. Immunopathol.* 25:238.
- Picker, L. J., S. A. Michie, L. S. Rott, and E. C. Butcher. 1990. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans: preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am. J. Pathol.* 136:1053.
- Soslau, G., D. A. Morgan, J. S. Jaffe, I. Brodsky, and Y. Wang. 1997. Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. *Cytokine* 9:405.
- Delhem, N., F. Hadida, G. Gorochov, F. Carpentier, J. P. de Cavel, J. F. Andreani, B. Autran, and J. Y. Cesbron. 1998. Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin. *J. Immunol.* 161:2060.

## ARTICLE 4

**Infection of mice lacking interleukin-7 reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*.**

*Infection and Immunity*, 1999, V.67, p.4183-4190.

## I - OBJECTIFS ET DESCRIPTION DU MODELE

La production précoce d'IL-7 dans la peau à la suite de l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni*, participe à une modification de la réponse immune tardive et à une aggravation de la pathologie. Nous avons observé ces effets par le biais d'injection d'IL-7 recombinante, ainsi que dans un modèle de souris à expression constitutive cutanée de cette même cytokine. De plus, ces résultats furent confirmés et complétés chez l'homme après analyse de peaux humaines infectées. Sur la base de ces données, nous souhaitions alors étudier les caractéristiques du développement du parasite et de la réponse immune associée, au sein d'un hôte murin incapable de produire l'IL-7.

L'obtention des souris délétées pour le gène de l'IL-7 (IL-7 *-/-*) réalisée par von Freeden-Jeffry, *et al.* (Von-Freeden-Jeffry U, 1995), a permis de préciser le rôle de cette cytokine dans la lymphopoïèse (décrit plus haut). D'une manière générale ces animaux présentent une lymphopénie sévère ainsi qu'une large diminution de la cellularité thymique et splénique. Au niveau de la moelle osseuse, bien que le nombre de cellules soit inchangé, on ne trouve pas de lymphocytes B matures, conséquence d'un blocage de la maturation des lymphocytes entre les stades pro- et pré-B. Dans la rate, la population de cellules B, bien que très réduite, est constituée de cellules matures et de quelques cellules immatures.

Les compartiments lymphocytaires T présentent une faible cellularité. En outre, les cellules T subsistantes sont réparties suivant une distribution phénotypique CD3, CD4, CD8 classique. Par contre, la population de lymphocytes T exprimant un récepteur à l'antigène de type  $\gamma\delta$  a presque complètement disparu, que ce soit au niveau central dans le thymus, qu'en périphérie au niveau de l'épithélium intestinal par exemple.

Enfin, il est particulièrement intéressant de constater que la fonction des rares lymphocytes T et B matures n'est pas altérée. En effet, ils répondent tous deux normalement à une stimulation par la Concanavaline A ou le lipopolysaccharide (LPS), respectivement. De plus les lymphocytes B présents sont capables de produire des niveaux sériques normaux d'IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b et IgE (Von-Freeden-Jeffry U, 1998). Ces dernières données font de ce modèle un outil particulièrement adapté à notre recherche, puisque ces animaux

présentent une absence totale d'IL-7 et restent malgré tout potentiellement capables de mettre en place une réponse immunitaire fonctionnelle.

## II - RESULTATS

Après infection et analyse des critères parasitologiques classiques, on observe un nombre plus faible de couples de vers adultes, produisant moins d'œufs présentant un taux d'éclosion plus faible. En conséquence, après mesure du taux de collagène hépatique, on note une nette amélioration de la pathologie associée à une réponse humorale spécifique de type Th1. Par ailleurs, des modifications importantes de la migration du parasite au cours de son développement ont été observées. En effet un nombre plus important de larves pulmonaires est observé au jour 6 alors que la charge parasitaire évaluée au jour 42 est plus faible. Ce phénomène pourrait en partie être justifié par une variation de l'expression de certaines molécules d'adhésion qui interviennent dans les processus de migration. A ce titre, on note une augmentation du niveau d'expression du Lewis<sup>x</sup> (motif d'adhésion cellulaire interagissant avec des molécules membres de la famille des sélectines (Rossiter H, 1997) reconnu par des anticorps cytolytiques participant à la destruction des larves (Nyame AK, 1996; Trottein F, 1997)). De plus au sein de l'épithélium pulmonaire, une augmentation de l'expression de ICAM-1 apparaît chez les souris IL-7 -/- infectées. La participation de ICAM-1 dans l'immunité anti-schistosome fut récemment démontrée (Lukacs NW, 1994; Ramaswamy K, 1997). De manière tout à fait étonnante, nous avons pu observer que les parasites adultes récupérés par perfusion totale 42 et 80 jours après l'infection étaient de taille très réduite; ceci permettant de parler de nanisme parasitaire. Cette observation est particulièrement importante car elle reflète une altération majeure de la croissance du parasite s'étant développé dans hôte déficient en IL-7. Il semble donc que le schistosome ne puisse se développer correctement dans cet environnement modifié par l'absence d'IL-7. Enfin, l'amélioration de la pathologie observée chez les souris IL-7 -/- ne serait donc que la conséquence d'un développement incomplet et inadapté du parasite.

### III - CONCLUSION

L'étude de l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni* dans ce modèle de souris IL-7 *-/-*, donc en l'absence d'IL-7, apporte d'une manière générale les informations inverses à celles extraites des modèles présentant des niveaux d'IL-7 augmentés (par injection ou par expression constitutive). Ce travail permet également de montrer le rôle essentiel de l'IL-7 dans l'accomplissement du développement et de la maturation complète du parasite. En effet, son absence conduit à l'obtention de schistosomes adultes, mâles ou femelles, accouplés, mais nains. Il apparaît donc que l'IL-7 présente une double influence en modifiant d'une part la réponse immune et d'autre part la migration et le développement du parasite. Le rôle précis de l'IL-7 n'a pas encore pu être déterminé et son mécanisme d'action probable ainsi que nos perspectives de travail seront discutées dans la partie suivante.

# Infection of Mice Lacking Interleukin-7 (IL-7) Reveals an Unexpected Role for IL-7 in the Development of the Parasite *Schistosoma mansoni*

ISABELLE WOLOWCZUK,<sup>1,\*</sup> SOPHIE NUTTEN,<sup>2</sup> OLIVIER ROYE,<sup>1</sup> MYRIAM DELACRE,<sup>1</sup>  
MONIQUE CAPRON,<sup>2</sup> RICHARD M. MURRAY,<sup>3</sup> FRANÇOIS TROTTEIN,<sup>2</sup>  
AND CLAUDE AURIAULT<sup>1</sup>

*Laboratoire d'Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, UMR 8527, Institut de Biologie,<sup>1</sup>  
and Communication Cellulaire, Mécanismes Effecteurs et Régulateurs, INSERM U167,  
Institut Pasteur,<sup>2</sup> Lille, France, and DNAX Research Institute of Molecular  
and Cellular Biology, Palo Alto, California<sup>3</sup>*

Received 15 January 1999/Returned for modification 12 March 1999/Accepted 18 May 1999

A single intradermal administration of recombinant interleukin-7 (IL-7) has been shown to aggravate the course of murine schistosomiasis, to favor the development of Th2-associated antibodies specific for the parasite, and to alter migration kinetics and/or migratory route of the parasite within its vertebrate host. Here we show that after infection of IL-7-deficient mice with *Schistosoma mansoni*, the predominant parasite-specific humoral response follows a Th1 pattern, and the development of the parasite is greatly impaired. In IL-7-deficient mice, increased numbers of larvae reach the lungs and fewer larvae reach the liver, compared to control mice. In the absence of IL-7, female worms show an altered fecundity, leading to decreased numbers of eggs trapped in the tissues and to an amelioration of the pathology of the infected host. The most striking observation is the blockade of parasite growth in an IL-7-defective environment, leading to dwarf male and female worms. The results of this study have important implications for the role of IL-7 in the host-parasite relationship and show how parasites can disable or evade the host immune response.

The mammalian immune system is a complex network of interacting cell types and functions. Much of the regulation of cell growth and differentiation is accomplished by the elaboration of soluble factors, principally cytokines, that interact with specific receptors found on responsive cells. On the other hand, the precise adaptation of parasites in mammalian hosts implies that conditions required for their growth, differentiation, and maturation are present. Several reports describe the involvement of cytokines in the regulation of host-parasite relationships (reviewed in reference 8). During infection with *Leishmania* spp., it has been shown that interleukin-3 (IL-3) (12, 21), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (13, 29), and IL-2 (22) favored parasite growth. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and gamma interferon have been reported to stimulate the growth of *Trypanosoma* spp. (3, 17). In the case of *Schistosoma mansoni* infection, there is little information concerning the effect(s) of host cytokine(s) on migration and/or maturation of the worm within its vertebrate host. This could be due to the complex life cycle of the parasite which involves different developmental stages and an arduous and intricate migration over a period of many days from the skin to the lungs and liver until the final residence in the systemic circulation system. There the worms mature sexually, male and female pairing occurs, and egg laying begins (11). It has been reported that the host's cytokines do influence the

egg laying (9), and it was recently shown that the parasitic worms require TNF- $\alpha$  to lay and excrete eggs (2, 15).

The stroma-derived cytokine IL-7 was originally described as a growth-promoting, and possibly differentiating, factor for B-lymphocyte precursors (25) and immature thymocytes (36). IL-7 is also involved in inflammatory reactions (33), in the induction of adhesion molecule expression (4), and in the activity of mature T cells and NK/LAK cells (1, 24). Despite the multiple and pleiotropic effects already described for IL-7 (reviewed in reference 23), disruption of the IL-7 gene in the murine germ line identifies IL-7 as a nonredundant cytokine (34).

Our previous reports showed that IL-7 is expressed in the skin of *S. mansoni*-infected mice from days 1 to 21 following parasite penetration (37) and that keratinocytes and dermal endothelial cells of infected human skin produced IL-7 (27). Furthermore, intradermal administration of recombinant IL-7 in mice prior to infection altered the migration of the parasite and led to an increased number of surviving adult parasites and to a more-severe liver pathology. At the same time, IL-7-treated mice had increased levels of Th2-associated specific antibodies (37). The above observations suggest that IL-7 influences both the host's immune response and the development of the parasite.

To clarify issues regarding the contribution of IL-7 during *S. mansoni* infection, we performed a detailed examination of infection in mice with targeted inactivation of the IL-7 gene (IL-7 $^{-/-}$  [34]). We examined migration of the larvae to the lungs, adult worm and egg burdens, hepatic pathology, and parasite-specific antibody responses. This study shows that *S. mansoni* development is strikingly impaired in an IL-7-deprived environment.

The data presented in this paper reinforce our previous

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, UMR 8527, Institut de Biologie, 1 rue du Pr. A. Calmette, BP 447, F-59021 Lille Cedex, France. Phone: (33) 3 20 87 12 42. Fax: (33) 3 20 87 12 33. E-mail: Isabelle.Wolowczuk@pasteur-lille.fr.

observations (27, 37) and support the concept that IL-7 is one of the key host-derived cytokines involved in the complete and proper development of *S. mansoni* in the infected host. The role of IL-7 in the innate response of the *S. mansoni*-infected vertebrate host and its use for the benefit of the parasite are discussed.

#### MATERIALS AND METHODS

**Collection of *S. mansoni* cercariae.** The life cycle of *S. mansoni* was maintained, using golden hamsters as the definitive hosts and *Biomphalaria glabrata* snails as the intermediate hosts. Cercariae of *S. mansoni* were obtained from infected *B. glabrata* snails by use of artificial light.

**Infection of mice with *S. mansoni*.** Mice with a targeted deletion within the gene coding for IL-7 ( $IL-7^{-/-}$ ) were generated by von Freeden-Jeffry et al. (34). Animals were housed under microisolator caps in quarantine room. Female littermate control mice ( $IL-7^{+/+}$ ) and female mutant mice were used at the age of 7 to 8 weeks. Animals were percutaneously infected as previously described (28), with  $50 \pm 5$  cercariae of *S. mansoni* unless otherwise noted (namely, the experiments assessing migration to the lungs).

**Quantification of adult worm and egg burdens.** Mice were sacrificed 42 and 80 days postinfection (p.i.) by intraperitoneal injection of 15 mg of pentobarbital (Sanofi Santé Animale, Gentilly, France) and 60 U of heparin (Sanofi Choay, Gentilly, France). Adult worms were harvested by perfusion of the portal venous system (10), and the numbers of female and male adult worms were determined with a light microscope. At the time of perfusion, livers were collected, weighed, and digested overnight with 4% potassium hydroxide, and eggs were counted in 500- $\mu$ l samples under a microscope.

**In vitro egg hatching assay.** Schistosome eggs were recovered from the livers of infected mice 80 days p.i. Briefly, livers were first treated with collagenase (Sigma) (1 mg per liver) for 1 h at 37°C and then homogenized on ice. Extracts were washed several times with ice-cold phosphate-buffered saline. About 200 eggs (approximately 50% mature eggs) were distributed into the wells of a 24-well plate (Nunc, Intermed S.A., Roskilde, Denmark) in calcium-free water, in a final volume of 1.5 ml. Egg hatching was performed by incubating the plates at 30°C for 90 min. Hatching was then stopped by the addition of 100  $\mu$ l of 1% Lugol. Miracidia and living eggs (mature and immature) and nonliving eggs were counted under a phase-contrast microscope. Eggs were classified by using morphological criteria (32); immature eggs show a developing embryo, mature eggs have a fully developed miracidium, and dead eggs have a dark, retracted miracidium. Hatching assays were performed for each individual mouse, and data were expressed as follows: % Hatching = [number of eggshells/(number of mature eggs + number of shells)]  $\times$  100 and % Maturation = [(number of mature eggs + number of shells)/number of total eggs]  $\times$  100.

**Histopathology and collagen measurement in the liver.** Livers were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin, sectioned (6  $\mu$ m), and stained for histopathological examination and collagen measurement. Sections were deparaffinized and incubated at room temperature for 2 h in the dark under continuous, mild agitation with a saturated solution of picric acid in distilled water containing 0.1% fast green FCF (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) which stained noncollagenous proteins and 0.1% Sirius red F3B (Gurr BDH Chemicals Ltd., Poole, England) which stained collagen. Half of the slides were then mounted for microscopical evaluation of the histopathology. The other half was destained for collagen determination as previously described (20). Data are reported as the numbers of micrograms of collagen per milligram of protein (mean  $\pm$  standard error) for each individual mouse.

**Evaluation of schistosomula migration to the lungs.** Mice infected with 500 cercariae were sacrificed at day 6, and their lungs were excised and chopped into the smallest possible fragments before transfer into a petri dish containing 0.2 ml of minimum essential medium (MEM). The moistened fragments were then transferred onto a 90-mm mesh (Hartmann-Larochette, Chatenois, France) which was placed on a 50-ml glass tube filled to the top with MEM. The young worms that migrated from the lungs into the MEM were collected after incubation at 37°C overnight and counted under a microscope.

**Serum antibody determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Sera were prepared from blood samples collected from infected  $IL-7^{+/+}$  and  $IL-7^{-/-}$  animals at days 14, 21, 28, 35, and 42 p.i. Mice were individually tested for the presence of parasite-specific total immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2a.

For determination of specific anti-adult worm antigenic extract (anti-SWAP) or anti-egg antigenic extract (anti-SEA) antibody titers (total IgG, IgG1, and IgG2a), the wells in microtiter plates were coated overnight with 15  $\mu$ g/ml of either parasitic extracts. After saturation with 3% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline, plates were incubated with experimental sera (dilution 1:200) for 2 h at room temperature. Peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG, IgG1, and IgG2a antibodies (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Ala.) were used for detection. ELISAs were performed with o-phenylenediamine (Sigma) and 0.001% hydrogen peroxide in phosphate-citrate buffer as substrate. Reaction was recorded with an automated plate reader at 492 nm (Multiskan MS; Labsystems, Helsinki, Finland).

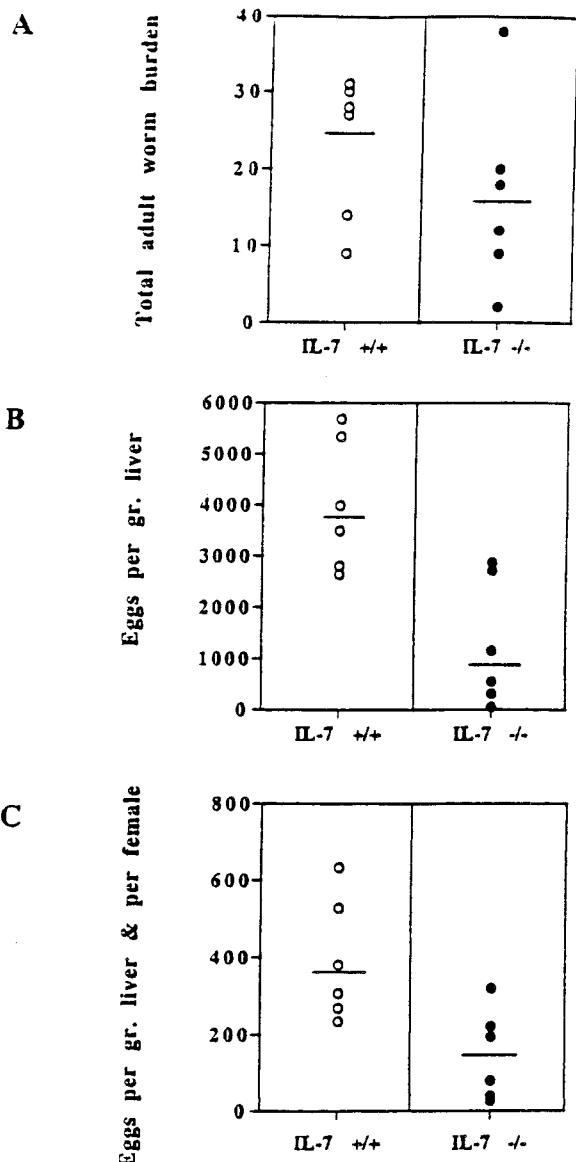


FIG. 1. Total adult worm burden (A), numbers of eggs expressed per gram of liver (B), and numbers of eggs expressed per gram of liver and per female worm (C) in  $IL-7^{+/+}$  and  $IL-7^{-/-}$  *S. mansoni*-infected animals. Each datum point shows the value for one mouse (six mice per group), and the horizontal bar shows the mean for that group of mice. This experiment is representative of four independent experiments. Statistical analysis using the Student's *t* test gave *P* values of 0.15 (A), 0.002 (B), and 0.05 (C).

**Statistics.** Statistical significance was determined by using Student's *t* test and *P* values of  $<0.05$ .

#### RESULTS

**Parasite development and egg-induced pathology in  $IL-7^{-/-}$  deficient mice.** Adult schistosomes dwell as pairs of male and female worms in the portal veins draining the large intestine of their vertebrate permissive host. The egg laying begins within 4 to 5 weeks p.i. (11).

(i) **Adult worm and egg burdens in  $IL-7^{-/-}$  mice.** The number of male and female worms was assessed by total blood perfusion of  $IL-7^{+/+}$  and  $IL-7^{-/-}$  *S. mansoni*-infected mice 42 days p.i. Livers were removed and weighed, and hepatic egg

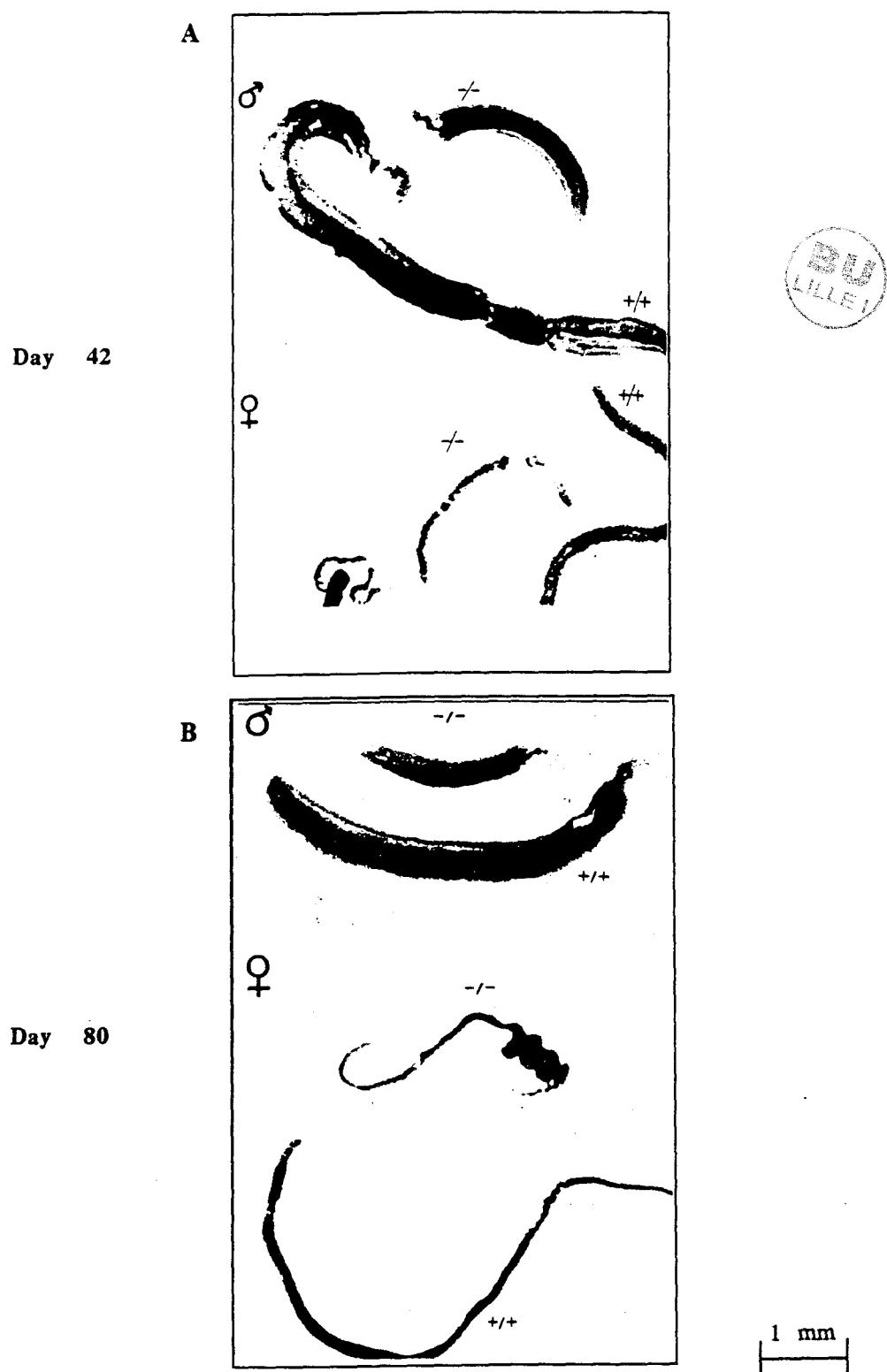


FIG. 2. Morphology of worms (males and females) collected from IL-7<sup>+/+</sup> infected animals (+/+) and IL-7<sup>-/-</sup> infected animals (-/-) at day 42 (A) and day 80 (B) following infection with *S. mansoni* cercariae.

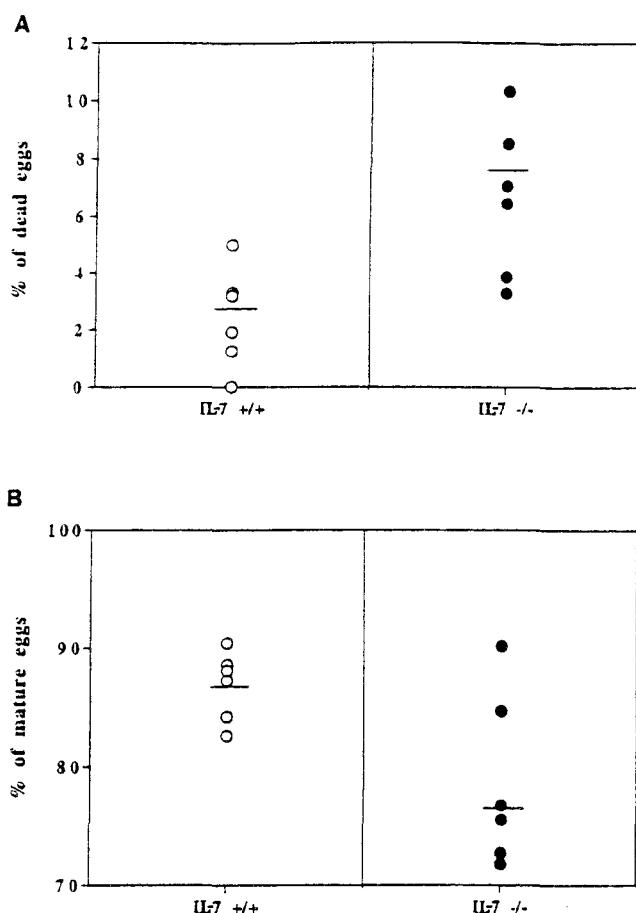


FIG. 3. Percentages of dead eggs (A) ( $P = 0.005$ ) and mature eggs (B) ( $P = 0.014$ ) laid by females in the livers of IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> animals. Each datum point shows the value for one mouse, and the horizontal bar shows the mean for that group.

burdens were determined after alkali digestion of the organs (Fig. 1). IL-7<sup>-/-</sup> mice showed a reduced adult worm burden (28%) (Fig. 1A) with comparable ratios of males to females in the two groups of mice (not shown). In addition, the numbers of eggs expressed per gram of liver (Fig. 1B) and per female worm (Fig. 1C), were drastically decreased in IL-7<sup>-/-</sup> mice compared to the corresponding control animals (68 and 64%, respectively).

(ii) **Morphology of worms in IL-7<sup>-/-</sup> mice.** An important difference was noticed in the parasite morphology 42 days after infection. Indeed, all male and female worms were strikingly smaller in IL-7<sup>-/-</sup> mice than in IL-7<sup>+/+</sup> mice (Fig. 2A). To ascertain whether this size reduction corresponded to a delay or blockade of worm maturation, we performed another series of infection of IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> mice and collected the parasites 80 days p.i. when they should have attained their full size and maturity. Again, as shown in Fig. 2B, worms were smaller in the group of IL-7<sup>-/-</sup> animals.

(iii) **Fecundity of female worms in IL-7<sup>-/-</sup> mice.** Figure 1C shows the number of hepatic eggs laid per gram of liver and per female worm in both strains of mice. We further determined the percentages of viable (mature and immature) and dead eggs in the livers of IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> *S. mansoni*-infected animals. This experiment showed that female worms developing in IL-7<sup>-/-</sup> mice laid significantly more dead eggs (63%) (Fig. 3A) and fewer mature eggs than the worms in control

mice (10%) (Fig. 3B). Nevertheless, when the capability of mature eggs to hatch in vitro was determined, no statistical difference was observed between the experimental groups (data not shown).

(iv) **Liver pathology in IL-7<sup>-/-</sup> mice.** The key pathogenic event during *S. mansoni* infection is granuloma formation around eggs trapped in the liver. The immunopathology results from cellular infiltration and residual fibrosis surrounding the eggs (5). Measurement of the collagen deposits in the livers of mice after 80 days of infection showed a markedly reduced level of collagen in the livers of IL-7<sup>-/-</sup> infected mice (15%) (Fig. 4A). Corresponding liver sections observed before de-staining visualized the reduced collagen deposition in the livers of IL-7<sup>-/-</sup> mice, yet inflammatory reactions developed around eggs trapped in the hepatic tissue of IL-7-deficient animals (Fig. 4B).

This series of data demonstrates the impairment of *S. mansoni* development in IL-7-deficient mice. IL-7<sup>-/-</sup> mice infected with *S. mansoni* larvae do not support normal parasite growth and development. Consequent to the reduction of number of eggs, liver pathology is reduced. Finally, male and female parasites which developed in IL-7<sup>-/-</sup> mice are stunted and could be considered "dwarf" parasites.

**Migration of *S. mansoni* to the lungs in IL-7-deficient mice.** Development and maturation of schistosomes are intimately associated with their migration in the definitive vertebrate host (11). Therefore, we suspected that IL-7 deficiency could alter the capacity of the parasite to properly migrate from the skin to the lungs and then to the liver, as previously hypothesized (37). We thus investigated migration of the parasite to the lungs in IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> mice 6 days after parasite penetration.

More schistosomula reached the lungs in IL-7<sup>-/-</sup> mice than in IL-7<sup>+/+</sup> animals (28%) (Fig. 5). This observation is consistent with the injection of recombinant IL-7 prior to infection, which led to the opposite effect on parasite migration to the lungs (37). Therefore, the impairment of *S. mansoni* development and maturation in IL-7-deficient mice is associated with an alteration of the migratory route of the parasites to the lungs and to the liver.

**Specific humoral immune response of IL-7-deficient mice.** IL-7<sup>-/-</sup> mice have large reductions in lymphoid tissue cellularity in both the T- and B-cell lineages but have a normal ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> subsets (34). One important difference between the CD4<sup>+</sup> T cells of Th1 and Th2 subsets is their ability to stimulate the production of certain Ig isotypes (7).

In mice infected with schistosomes, Th2 responses have convincingly been involved in the development of granulomatous lesions around tissue-trapped parasite eggs (14). We previously demonstrated that a single intradermal injection of recombinant IL-7 prior to *S. mansoni* infection, led to an increase of the Th2 responses towards the egg antigenic extracts (37).

We therefore analyzed the isotype profiles of IgG specific for both SWAP and SEA during the course of infection in IL-7<sup>-/-</sup> and IL-7<sup>+/+</sup> mice. The data represented in Fig. 6 show that for both SWAP (Fig. 6A) and SEA (Fig. 6B) antigens, the specific IgG1 antibodies are lower in IL-7<sup>-/-</sup> mice compared to the control mice, whereas specific IgG2a antibodies predominate in the IL-7<sup>-/-</sup> mice.

## DISCUSSION

With the advent of selective gene knockout technology, a number of studies have used mice with targeted disruption of cytokine genes to assess the contribution of these molecules to immune and inflammatory responses (16). However, there is

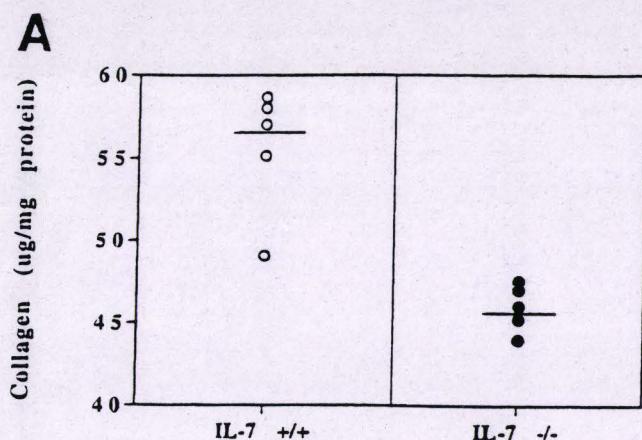
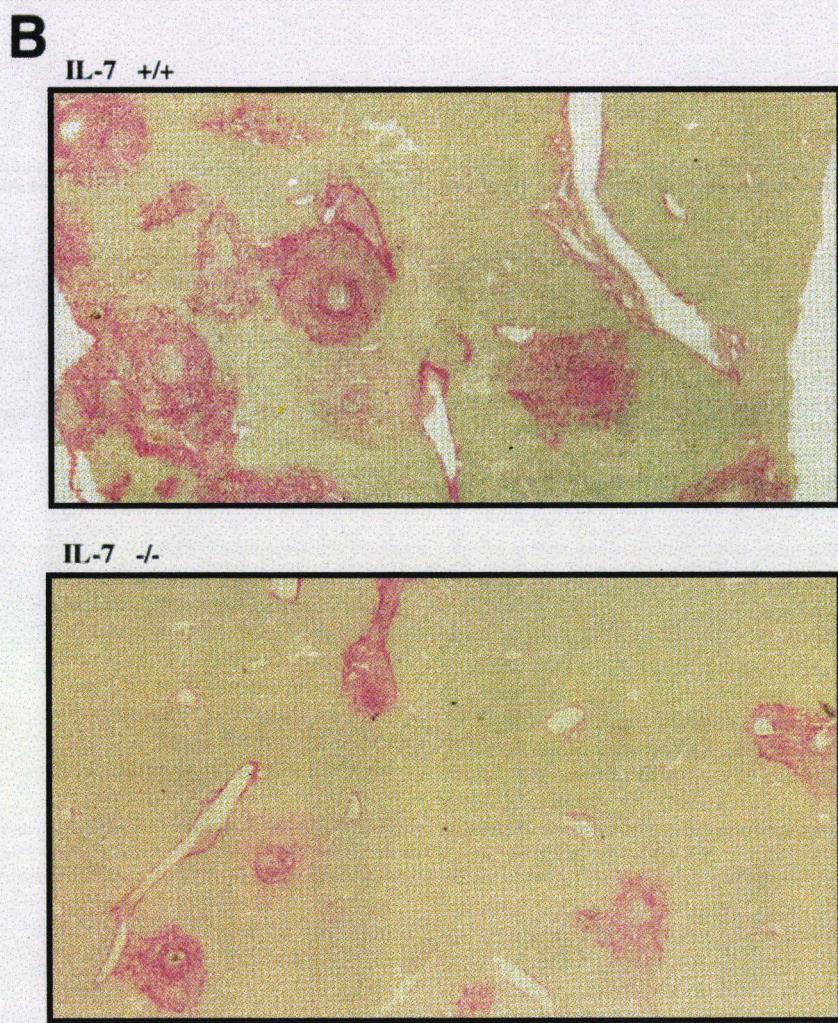


FIG. 4. Pathology of livers of IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> animals infected with *S. mansoni* for 80 days. (A) Collagen measurement (in micrograms per milligram of protein). Results are expressed for each individual mouse and are representative of three independent experiments. The horizontal bars show the means for the two groups of mice which were significantly different ( $P = 0.001$ ). (B) Histological staining for collagen on liver sections of IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> infected mice 80 days p.i. Sirius red F3B stained collagen in red. Magnification,  $\times 100$ .



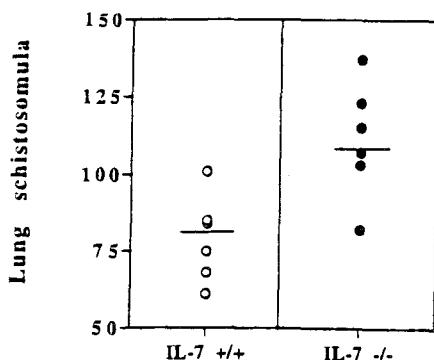


FIG. 5. Migration of *S. mansoni* schistosomula to the lungs in IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> *S. mansoni*-infected mice day 6 p.i. Each datum point shows the value for one mouse. The horizontal bars show the mean values for the two experimental groups which were significantly different ( $P = 0.0035$ ). This experiment was performed twice and gave similar results.

still little information on the use of these models for studying the participation of cytokines in the innate host-parasite partnerships. For the parasite *S. mansoni*, it was demonstrated that adult worms induced the expression of hepatic TNF- $\alpha$  required for egg laying and excretion of eggs from the host (2, 19). In this study, we reported that the absence of the bioactive IL-7 molecule results in the impairment of the development of the parasite *S. mansoni* in its vertebrate host.

We found that IL-7-deficient mice (IL-7<sup>-/-</sup>) (34) infected with *S. mansoni* cercariae did not support normal parasite development. Compared with control immunocompetent mice, schistosome-infected IL-7<sup>-/-</sup> mice had fewer adult worm pairs. In addition, in vitro, the number of mature eggs produced by these worm pairs was reduced and they released more dead eggs. Consequent to the decreased egg numbers, liver pathology of IL-7<sup>-/-</sup> infected mice was improved and the humoral specific response during the course of infection was predominantly of the Th1 type. Of note are our previous observations of the injection of recombinant IL-7 leading to an increased number of worm pairs, a more severe hepatic pathology, and a dominant Th2-related humoral response (37). Since in schistosome-infected mice, eggs are the primary stimulus of the Th2 response (14), the effects of IL-7 on the Th1 and Th2 immune responses would instead be indirectly due to differential egg burdens in the IL-7-treated mice and IL-7<sup>-/-</sup> mice compared to that of control mice.

Similarly, the influence of IL-7 on parasite migration from the skin to the lungs was different in recombinant IL-7-injected mice and in IL-7<sup>-/-</sup> mice. Fewer larvae reached the lungs of IL-7-treated mice, whereas more reached the lungs of IL-7<sup>-/-</sup> animals. One could propose that IL-7 produced in the skin (27, 37) drove the proper migration of the parasite from the skin to the lungs. In addition, we showed that the parasite directly triggered IL-7 release from endothelial cells of dermal vessels (27), further support for the notion that at some point between the penetration of this endovascular parasite in the skin to its migration to the lungs, *S. mansoni* encountered IL-7. Interactions between *S. mansoni* and its vertebrate host might be relevant for several features of the life cycle of the parasite, particularly for its migration and homing. Those interactions require direct contact between the parasite and the mammalian cells, which involve host cell-parasite adhesion (6).

Among parasite adhesive motifs that may have implications for the host-parasite relationship is the Lewis $x$  (Le $x$ ) determinant (30). Recently, Le $x$  was shown to be involved in the mechanisms of cytotoxicity against schistosomula (31), but the

precise role of this determinant in parasite survival in infected animals is unknown. We have preliminary data showing that stunted parasites of IL-7<sup>-/-</sup> infected mice expressed higher levels of Le $x$  on their surface (38). We are presently investigating the expression of adhesion molecules, particularly ligands of Le $x$ , on the host tissues. Differential expression of adhesion molecules on either the worm or the host's tissues could be a partial explanation for the mechanisms by which IL-7 acts on parasite migration.

Unexpectedly, schistosomes which developed in IL-7<sup>-/-</sup> mice were smaller than those in control mice. Both male and female worms were smaller, and this phenomenon was definitely a blockade, and not a delay, since it occurred at a time when the worms were fully developed (i.e., day 80 p.i.). Interestingly, parasites developing in IL-7<sup>-/-</sup> mice were sexually differentiated, and they mated and laid eggs, even if in reduced number. These worms could thus be called "dwarf" parasites.

IL-7 knockout mice are deficient in several aspects of the immune system (34) due to the lack of IL-7. However, none of the numerous immunodeficient mice so far infected with *S. mansoni* allowed the development of such dwarf parasites, which means that the effects we report for IL-7 on the development of *S. mansoni* are not due to the immunodeficiency of the animals but are due (directly or indirectly) to IL-7. To our knowledge, the unique report in the literature of reduced-size *S. mansoni* worms corresponded to hypothyroid mice (35) in which the parasite phenotype was similar to the phenotype of IL-7<sup>-/-</sup> infected mice. This raises questions about the relationship between IL-7 and thyroid hormones. Experiments are presently under way to investigate this matter. Various hormones of vertebrate hosts have been implicated in the stimulation or induction of growth or sexual reproduction of their parasites (18). Perhaps IL-7 deficiency creates a hormonal environment in the host to which schistosomes adapt by developing ad minima as male and female dwarf worms, laying eggs to ensure its transmission to new hosts.

In conclusion, our study reveals an unexpected and central role for IL-7 in the development of the skin-penetrating parasite *S. mansoni* in its definitive vertebrate host. This contention is supported both by the results of our previous sets of experiments (27, 37) and by the present results. The signals delivered through IL-7 to the parasite in the skin and throughout its migration in the host allow proper migration, maturation, and development of the worms. Further studies to determine the mechanism of action of IL-7 in the modulation of host's immune response and how it affects parasite development are needed. Ligand binding studies with radiolabelled IL-7 so far suggest that this cytokine does not directly bind on the parasite surface (our unpublished observation). Therefore, the observed effects of IL-7 (27, 37; this report) can be attributed to alterations of the host's immune and/or endocrine responses. For this particular aspect, infection of IL-7 receptor-deficient mice (26) could help in dissociating the effects of IL-7 on the host's responses from those acting directly on the parasite. The similar phenotype of the parasites (namely, male and female worms of reduced size) developing in IL-7<sup>-/-</sup> and hypothyroid animals (35) could mean that IL-7 exerts effects on parasites, possibly by increasing their responsiveness to host endocrine factors. Understanding the level of interaction(s) between IL-7, the endocrine system, and *S. mansoni* is obviously critical to the host-parasite interactions.

Clearly, IL-7 is a key cytokine in the host-parasite relationship which increases the permissiveness of the definitive host to infection, far beyond the development of the host's immune response.

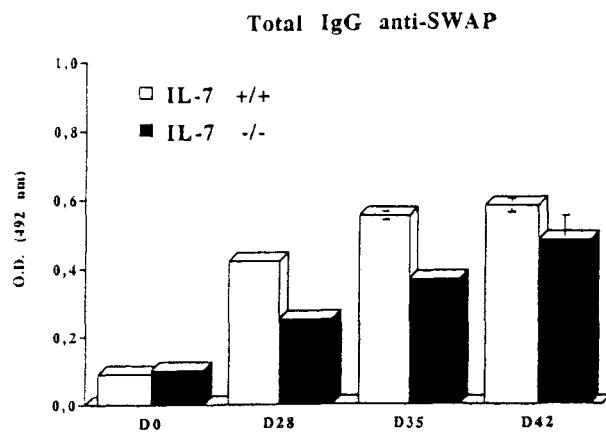
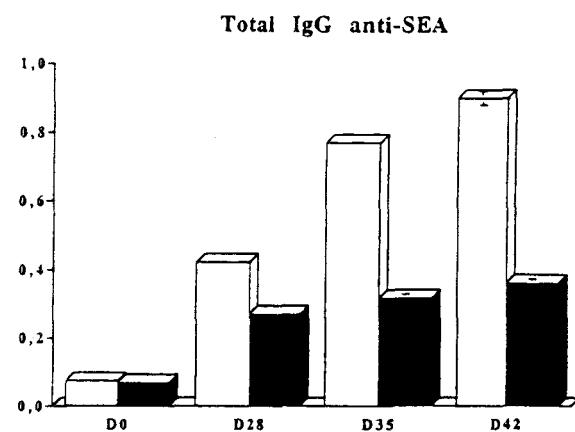
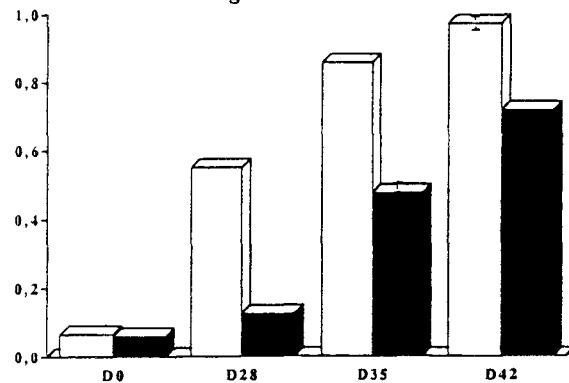
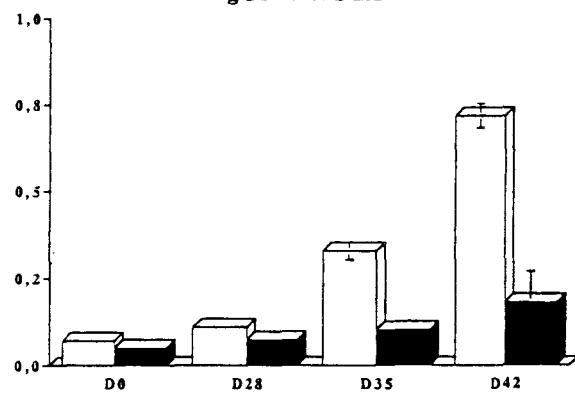
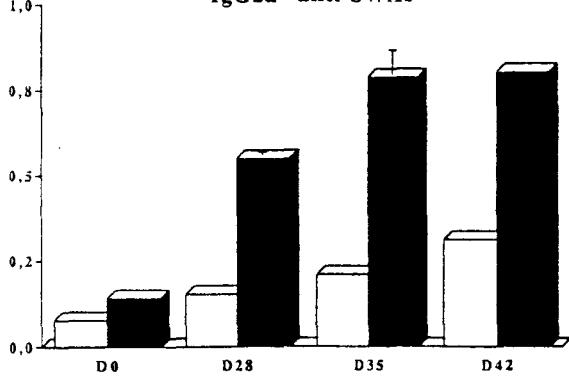
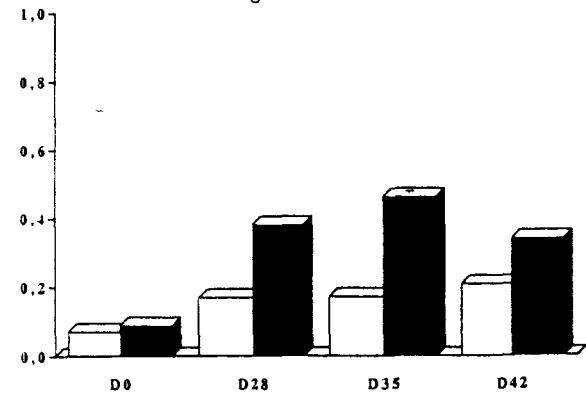
**A****B****IgG1 anti-SWAP****IgG1 anti-SEA****IgG2a anti-SWAP****IgG2a anti-SEA**

FIG. 6. Specific antibody response in IL-7<sup>+/+</sup> and IL-7<sup>-/-</sup> mice during the course of *S. mansoni* infection. Total IgG, IgG1, and IgG2a specific for SWAP (A) and egg-specific IgG, IgG1, and IgG2a (SEA) (B) are shown. In this experiment, seven animals per group were infected and repeatedly bled on days 0, 28, 35 and 42 following infection. For each time point, sera from the 7 animals were pooled and tested by specific ELISA. Each test was done in triplicate. The y-axis label (optical density at 492 nm [O.D. (492 nm)]) and symbol key shown in the top bar graph in panel A apply to all bar graphs in the figure.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur de Lille, and Lille II University. O. Roye and S. Nutten were supported by grants from the Région Nord-Pas de Calais and from the Institut Pasteur de Lille.

We thank J. Fontaine for many helpful discussions on the parasite. The critical views on our work of D. D. Dombrovic, C. Dissous, and R. Pierce were of great value. The assistance of S. Vanwigene in preparation of the parasite, E. Fleurbaix in breeding mice, and J.-M. Merchez in photography is greatly appreciated.

## REFERENCES

- Alderson, M. R., H. M. Sassenfeld, and M. B. Widmer. 1990. Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 172:577-587.
- Amiri, P., R. M. Lockley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Rector, D. Ritter, and J. H. McKerrow. 1992. Tumor necrosis factor-alpha restores granuloma and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356: 604-607.
- Bakhiet, M., T. Olsson, C. Eldund, B. Höjeborg, K. Holmberg, J. Lorentzen, and K. Kristensson. 1993. A *Trypanosoma brucei*-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to secrete interferon-γ: purification, characterization and protective effects in vivo by treatment with a monoclonal antibody against the factor. *Scand. J. Immunol.* 37:165-178.
- Barth, C., P. O'Connell, B. Zanker, and T. B. Strom. 1991. Interleukin-7 (IL-7) and its effect on the expression of the intercellular adhesion molecule ICAM-1 in T cells. *Transplant. Proc.* 23:824-825.
- Boros, D. L., and K. S. Warren. 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* 132:488-507.
- Butterworth, A. E., M. A. Vadas, D. L. Wassom, A. Dessein, M. Hogan, B. Sherry, G. J. Gleich, and J. R. David. 1979. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible adherence. *J. Exp. Med.* 150:1456-1471.
- Coffman, R. L., B. W. Seymour, D. A. Lebman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Chewinski, H. F. J. Savelkoul, F. D. Finkelman, M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.* 102: 5-28.
- Denis, M., D. Campbell, and E. O. Gregg. 1991. Cytokine stimulation of parasitic and microbial growth. *Res. Microbiol.* 142:979-983.
- Doenhoff, M. J., J. Musallam Bain, and A. McGregor. 1978. Studies of the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg secretion. *Immunology* 35:771-778.
- Duval, R. H., and W. B. DeWitt. 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16:483-486.
- Faust, E. C., C. A. Jones, and W. A. Hoffman. 1934. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. *Puerto Rico J. Public Health Trop. Med.* 10:133-196.
- Feng, Z. Y., J. Louis, V. Kindler, T. Pedrazzini, J. F. Eliason, R. Behin, and P. Vassalli. 1988. Aggravation of experimental cutaneous leishmaniasis in mice by administration of interleukin-3. *Eur. J. Immunol.* 18:1245-1251.
- Greil, J., B. Bodendorfer, M. Röllinghoff, and W. Solbach. 1988. Application of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has a detrimental effect in experimental murine leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 18: 1527-1533.
- Grzych, J. M., E. J. Pearce, A. Cheever, Z. A. Claulada, P. Caspar, S. Hiény, F. A. Lewis, and A. Sher. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146:1322-1327.
- Joseph, A. L., and D. L. Boros. 1993. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J. Immunol.* 151:5461-5471.
- Koller, B. H., and O. Smithies. 1992. Altering genes in animals by gene targeting. *Annu. Rev. Immunol.* 10:705-730.
- Kongshavn, P. A. L., and E. Ghadirian. 1989. Enhancing and suppressive effects of tumour necrosis factor/cachectin on *Trypanosoma musculi* growth. *Parasite Immunol.* 10:581-588.
- Lawrence, P. O. 1991. Hormonal effects on insects and other endoparasites *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:487-496.
- Leptak, C. L., and J. H. McKerrow. 1997. Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. *J. Immunol.* 158:301-307.
- Lopez De Leon, A., and M. Rodjkind. 1985. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* 33:737-743.
- Louis, J. A., T. Pedrazzini, R. G. Titus, I. Müller, J. P. Farrell, V. Kindler, P. Vassalli, G. Marchal, and G. Milon. 1987. Subsets of specific T cells and experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138: 755-758.
- Mazingue, C., F. Cottrez-Detoeuf, J. Louis, M. Kweider, C. Auriault, and A. Capron. 1989. *In vitro* and *in vivo* effects of interleukin-2 on the protozoan parasite *Leishmania*. *Eur. J. Immunol.* 19:487-491.
- Mertsching, E., V. Meyer, J. Linares, S. Lombard-Platet, and R. Ceredig. 1998. Interleukin-7, a non-redundant potent cytokine whose over-expression massively perturbs B-lymphopoiesis. *Int. Rev. Immunol.* 16:285-308.
- Morrissey, P. J., R. G. Goodwin, R. P. Nordan, D. Anderson, K. H. Grabstein, D. Cosman, J. Sims, S. Lupton, B. Acres, and S. G. Reed. 1989. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J. Exp. Med.* 169:707-716.
- Namen, A. E., A. E. Schmierer, C. J. March, R. W. Overrel, L. S. Park, D. L. Urdal, and D. Y. Mochizuki. 1988. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J. Exp. Med.* 167:988-1002.
- Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Marakovský, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in IL-7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:1955-1960.
- Roye, O., N. Delhem, F. Trottein, F. Remoué, S. Nutten, J.-P. Decavel, M. Delacre, V. Martinot, J.-Y. Cesbron, C. Auriault, and I. Wolowczuk. 1998. Dermal endothelial cells and keratinocytes produce interleukin-7 *in vivo* after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection. *J. Immunol.* 161: 4161-4168.
- Smithers, S. R., and R. J. Terry. 1969. Immunity in schistosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 160:826-840.
- Solbach, W., J. Greil, and M. Röllinghoff. 1987. Anti-infectious responses in *Leishmania major*-infected Balb/c mice injected with recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138:759-762.
- Srivatsan, J., D. F. Smith, and R. D. Cummings. 1992. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis<sup>x</sup> antigen. *J. Biol. Chem.* 267:20196-20203.
- Trottein, F., S. Nutten, J.-P. Papin, C. Leportier, O. Poulaïn-Godefroy, A. Capron, and M. Capron. 1997. Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J. Immunol.* 159:804-811.
- Vertruyse, J., V. R. Southgate, D. Rollinson, and H. M. Hilderson. 1988. Observations on the infectivity and fecundity of *Schistosoma curassoni* from Senegal in albino mice. *J. Helminthol.* 62:103-109.
- Viney, J. L. 1998. Altering cytokine soups: a recipe for inflammatory bowel disease? *Gut* 42:607-608.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Viera, L. A. Lucian, T. MacNeil, S. E. G. Burbach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181:1519-1526.
- Wahab, A. M. F., K. S. Warren, and R. P. Levy. 1971. Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* 124: 161-171.
- Watson, J. D., P. J. Morrissey, A. E. Namen, P. J. Conlon, and M. B. Widmer. 1989. Effect of IL7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J. Immunol.* 143:1215-1222.
- Wolowczuk, I., M. Delacre, O. Roye, S. L. Giannini, and C. Auriault. 1997. Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon-γ production and leads to an aggravation of the disease. *Immunology* 91:35-44.
- Wolowczuk, I. Unpublished observations.

## ANALYSE COMPAREE DES DIFFERENTS MODELES UTILISES DANS LE CADRE DE L'ETUDE DU ROLE DE L'IL-7 DANS L'INFECTION PAR SCHISTOSOMES

Nos études se sont donc focalisées sur le rôle de l'IL-7 présente dans la peau dès le début de l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni*. Elles ont été réalisées grâce à l'utilisation de 4 modèles différents :

- 1 - Injection intradermique d'IL-7 chez la souris la veille de l'infection (Article 1),
- 2 - Infection de souris transgéniques pour l'IL-7, à expression cutanée du transgène (Article 2),
- 3 - Infection de peaux humaines greffées sur des souris SCID « humanisées » (Article 3),
- 4 - Infection de souris déficientes pour le gène de l'IL-7 (Article 4).

Un autre modèle étudié au laboratoire a apporté des informations importantes dans la compréhension du rôle de l'IL-7 sur le développement du parasite. Il s'agit de l'infection du rat. Le rat est un modèle expérimental principalement utilisé pour étudier les phénomènes de résistance immune à l'infection. En effet, contrairement à la souris et à l'homme, il s'agit d'un hôte semi-permissif dans lequel les vers adultes n'atteignent pas une maturation complète et produisent peu, voire pas, d'œufs. Les vers sont en effet presque totalement rejetés 3 à 4 semaines après l'infestation (Capron A, 1987). Ceci est suivi d'une immunité à la réinfection efficace et prolongée. La participation des mécanismes d'ADCC dirigés contre les schistosomules et impliquant les anticorps anaphylactiques d'isotype IgG2a, IgE, les cellules phagocytaires (éosinophiles, macrophages) et les plaquettes a été particulièrement étudiée (Capron A, 1980a). Ainsi, la réponse immune protectrice développée chez le rat infecté, fait essentiellement intervenir une immunité humorale (Capron A, 1980b; Grzych JM, 1982b; Verwaerde C, 1987).

L'injection intradermique d'IL-7 chez le rat avant l'infection favorise transitoirement le développement du parasite (Batard ML, 1998). Ceci confirme nos hypothèses sur la participation de l'IL-7 dans ce processus suite aux observations réalisées chez la souris. On

parle donc d'une augmentation de la permissivité de ce rongeur. Celle-ci semble majoritairement indépendante du développement de la réponse immunitaire.

Le **tableau 9** résume les principales données obtenues dans ces 5 modèles d'étude.

	1 - Injection d'IL-7 chez la souris	2 - Souris transgéniques pour le gène de l'IL-7	3 - Peaux humaines greffées sur des souris SCID	4 - Souris déficientes pour le gène de l'IL-7	5 - Injection d'IL-7 chez le rat
Nombre de parasites dans les poumons	→	N.D.	N.D.	→	N.D.
Nombre de parasites dans le foie	→	→	N.D.	→	Inchangée à J21 Augmentée à J42
Nombre d'œufs dans le foie	→	Inchangé	N.D.	→	Absence d'œufs
Fibrose hépatique (collagène)	→	→	N.D.	→	Absence de fibrose
Morphologie du parasite	Inchangée à J42	Inchangée à J42	N.D.	Nains	Gras / Trapus
Réponse humorale anti-œufs	Th2 amplifiée	Th2 amplifiée	N.D.	Th1 amplifiée	N.D.
Réponse humorale anti-vers adultes	Inchangée	Inchangée	N.D.	Th1 amplifiée	Th2 classique
Cellules B dans les ganglions	→	→	N.D.	N.D.	N.D.
IL-4 et IFN- $\gamma$ sériques	→	N.D.	N.D.	→	N.D.
Production cutanée de cytokines (J5)	IL-7, IL-4, IFN- $\gamma$	IL-7, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-13	IL-7 Ni IL-4, ni IFN- $\gamma$	N.D.	Ni IL-7, ni IL-4, ni IFN- $\gamma$

*Tableau 9* - Analyse comparée des résultats obtenus dans chacun des modèles étudiés.

## **DISCUSSION**

Tout être vivant évolue dans un environnement spécifique, auquel il est particulièrement adapté. Ce statut ne lui assure pourtant pas une survie passive. En effet l'entretien de la vie est un investissement et une remise en question de chaque instant. L'adaptation ne fournit pas les moyens d'une autosubsistance restreinte à un individu mais plutôt les facultés d'interagir avec un milieu de vie plus ou moins hostile, plus ou moins exigeant. En fait un organisme ou plus largement une espèce, est dite adaptée parce qu'elle est capable de trouver les ressources nécessaires à son développement (nourriture, habitat, etc.), capable de faire face aux contraintes induites par l'instabilité de son environnement (conditions climatiques et géologiques, etc.), et enfin capable d'entretenir sa survie (reproduction, échappement à la préation, etc.).

Certains organismes vivants doivent affronter plusieurs milieux de vie (par exemple un milieu aquatique et un milieu aérien, ou encore des eaux salées et des eaux douces, etc.). On parle parfois de conditions de vie extrêmes telles que des températures très élevées, l'absence totale de lumière, ou encore la rareté des ressources nutritionnelles. Mais ces conditions ne sont extrêmes que par notre vision anthropomorphique et parce que peu d'espèces y sont adaptées.

L'organisme auquel nous nous sommes intéressés est particulier puisque c'est un parasite, mais pour autant, il ne dépend pas moins des conditions décrites ci-dessus et donc des exigences de l'adaptation. Il en est même un remarquable exemple. En effet, comme nous l'avons déjà précisé dans l'introduction, *Schistosoma mansoni* est un parasite hétéroxène présentant un cycle complexe de développement, faisant intervenir un hôte intermédiaire, mollusque d'eau douce et un hôte définitif, mammifère. Le développement de cet être vivant est remarquable; il fait en effet intervenir quatre formes successives morphologiquement distinctes, chacune particulièrement bien adaptée à un environnement et à un dessein spécifique.

Les travaux présentés ici concernent le stade d'infection de l'hôte mammifère et c'est l'étape de pénétration transcutanée qui a particulièrement retenu notre attention. Cette invasion à travers le tégument est dite obligatoire puisqu'elle est indispensable à la maturation normale des larves et donc à la continuité du cycle.

La peau est le premier organe rencontré par le parasite et nous avons montré qu'une molécule produite dans ce tissu, l'interleukine-7, joue un rôle bénéfique dans le développement du parasite. Cet effet est démontré par l'injection d'IL-7 dans la peau murine, préalablement à l'infection et confirmé par l'infection de souris transgénique pour l'IL-7. La réalisation de greffes de peau humaine sur des souris immunodéficientes permet d'établir la relevance de ces résultats chez l'homme. Enfin, l'étude de l'infection de souris incapables de synthétiser l'IL-7 (IL-7 KO), définit plus précisément l'implication de cette cytokine dans la croissance et la maturation du schistosome.

Lorsque les larves infestantes ou cercaires pénètrent la peau, une production d'IL-7 est très rapidement observée (dans les premières heures). Elle est associée à la synthèse d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4. La présence d'IL-7 est remarquable puisqu'elle perdure jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour suivant l'infection. Cette réponse à l'infection, tout à fait primaire, n'est pas strictement locale. En effet, en dehors du site d'infection on retrouve aussi l'IL-7 et l'IFN- $\gamma$ . Dans certains cas, l'IL-7 est capable de moduler la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 (Borger P, 1996). Ceci peut expliquer l'association de ces trois cytokines. Un effet inducteur plus puissant sur la synthèse d'IFN- $\gamma$  que sur l'IL-4 a, de plus été, décrit et pourrait être à l'origine de son absence en périphérie (Borger P, 1996).

L'injection intradermique d'IL-7 dans la zone d'infection, la veille de celle-ci, aboutit à la diminution de la synthèse d'IFN- $\gamma$  dans la peau et les ganglions drainant et d'IL-12 uniquement dans les ganglions. La diminution d'IFN- $\gamma$  est également observée dans les séra au cours des phases plus tardives de l'infection. La vaccination par l'utilisation de cercaires infectantes irradiées a permis de démontrer que la protection contre une réinfection classique

est médiée par des lymphocytes T exprimant le marqueur membranaire CD4<sup>+</sup> (Vignali DA, 1989). En effet, l'injection d'anticorps neutralisant l'IFN-γ diminue de 90% le niveau de protection (Smythies LE, 1992). Ainsi dans notre étude, la diminution d'IFN-γ pourrait aboutir à une destruction, à médiation cellulaire, du parasite dans les poumons moins efficace et serait responsable de l'augmentation de la charge parasitaire observée au jour 42 chez les animaux injectés par l'IL-7. Une implication de l'IL-7 dans la modulation de la synthèse d'IFN-γ est probable, mais cet effet semble plutôt être une conséquence d'une modification de la migration au sein de l'hôte.

Des observations similaires apparaissent dans le modèle de souris transgéniques pour l'IL-7 et peuvent être associées à une synthèse plus précoce d'IL-4 dans la peau des animaux transgéniques comme nous l'avons montré.

L'orientation préférentielle vers un profil de type Th2 (IgG1) de la réponse humorale spécifique dirigée contre les antigènes d'œufs semble favorisée, en présence d'IL-7. Il ne semble pas que cela soit lié à une action directe de l'IL-7, mais plutôt à la présence d'un nombre d'œufs plus important (Article 1); ceux-ci constituent un stimulus majeur de la commutation vers une réponse de type Th2 (Grzych JM, 1991). De plus, les conditions précoces d'induction et de mise en place de la réponse immune dès le stade cutané sont aussi susceptibles d'influencer l'immunité tardive. Il est surprenant que seule l'immunité humorale spécifique des antigènes d'œuf soit modifiée. En effet la réponse spécifique anti-vers adultes reste inchangée. Ceci montre que la prépondérance du type Th2 n'est probablement pas associée à un effet direct de l'IL-7, auquel cas la réponse anti-vers serait également modifiée.

L'intensité de la fibrose hépatique constitue un critère d'évaluation de la pathologie. Elle est déterminée par la quantité de collagène présente par milligramme de protéine totale. Comme il est précisé dans l'introduction, son initiation vers la 8<sup>ème</sup> semaine dépend de la synthèse de cytokines de type Th2 et notamment l'IL-4 (Pearce EJ, 1991) et l'IL-13 (Chiaramonte MG, 1999a). Elle est régulée négativement à partir de la 11<sup>ème</sup> semaine sous l'influence de cytokines de type Th1 telle que l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-12 ( Hoffmann KF,

1998). L'absence de cette régulation aboutit à une fibrose chronique responsable de la pathologie.

La présence de niveaux d'IL-7 élevés dans la peau, dans le cadre de l'infection murine par *Schistosoma mansoni* entraîne systématiquement une aggravation de la fibrose et donc de la pathologie. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation du nombre d'œufs hépatiques (Article 1) et / ou par une immunorégulation du processus fibrogénique moins efficace (Articles 1 et 2), liée à la dominance d'une réponse de type Th2 observées dans ces modèles.

Pour des raisons évidentes la totalité de ces études ne peut pas être réalisée chez un hôte humain. Par contre, l'étape cutané de l'infection qui est donc déterminante sur le devenir du parasite et de la pathologie associée est réalisée grâce à un modèle de greffes de peaux humaines sur des souris immunodéficientes (Article 3).

Ainsi, nous avons constaté que la synthèse précoce d'IL-7 après l'infection a également lieu dans la peau humaine. Cette étude nous a permis de montrer que les kératinocytes et les cellules endothéliales sont les sources cellulaires cutanées d'IL-7. De plus *in vitro*, des co-cultures de cellules endothéliales microvasculaires dermiques et de schistosomules de stade cutané, montrent que les larves sont capables d'induire la production d'IL-7 par ces cellules. Les kératinocytes auraient quant à eux besoin du contact avec le parasite mais aussi d'un autre facteur, probablement l'IFN- $\gamma$ , pour synthétiser l'IL-7 (ref).

**Il est donc particulièrement intéressant de constater que lorsque le parasite pénètre dans la peau, il induit une synthèse d'IL-7, cytokine qui favorise sa propre évolution au sein de l'hôte vertébré.**

Pour mieux comprendre de quelle manière l'IL-7 est propice au développement du parasite, nous avons étudié les modalités de l'infection de souris incapables de produire cette

molécule. Dans cet hôte particulier, le parasite ne peut pas croître normalement et la ponte des œufs, qui constitue l'ultime but du schistosome afin d'entretenir son cycle de vie, est diminuée de manière importante. On observe donc des vers adultes mâles et femelles de petite taille; on parle alors de nanisme parasitaire. Il apparaît ainsi que la croissance et la maturation du parasite *Schistosoma mansoni* chez l'hôte mammifère, dépendent en partie de la présence d'IL-7. Il semble donc que cette cytokine soit impliquée de manière plus ou moins directe dans des processus qui s'étendent certainement au delà de ses fonctions immunes connues.

Un seul autre cas de schistosomes nains est décrit dans la littérature et de manière très intéressante il concerne l'infection de souris hypothyroïdiennes (Wahab MF, 1971).

La thyroïde est une glande endocrine plaquée à la face antérieure de la région laryngotrachéale. L'activité de la thyroïde est placée sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. De plus, la synthèse des hormones thyroïdiennes (HT) est dépendante de l'apport exogène en iodé. Ces hormones, thyroxine (ou T4) et triiodothyronine (ou T3) sont relarguées dans la circulation sanguine, où elles sont prises en charge par des protéines de transport plasmatiques. La T4 représente 90% des HT sécrétées par la thyroïde, et elle est le précurseur de la T3 qui constitue l'hormone active (Baillet J, 1992). Les HT ont de nombreux rôles dans le développement et le métabolisme de l'organisme, et agissent au niveau de différents organes et systèmes: cerveau, cœur, muscles, os, appareils digestif et génital, synthèse protéique, lipogenèse, lipolyse, absorption du glucose, glycogénolyse, néoglucogenèse, pour les principaux (Baillet J, 1992). Les récepteurs aux HT appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription ligand-dépendants.

Dans le cadre de notre étude il est intéressant de noter que les récepteurs aux HT sont présents dans différents types cellulaires de la peau, tels que les kératinocytes, les cellules constituant les follicules pileux et les cellules endothéliales (Ahsan MK, 1998).

Les relations bidirectionnelles entre l'immunologie et l'endocrinologie *via* les cytokines et les hormones sont décrites depuis quelques années.

L'IL-1, l'IL-2 et l'IL-6 sont capables de moduler l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire, et de réguler l'expression de certaines hormones (ex : la GH (growth hormone) par l'IL-1 et l'IL-6, la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) par l'IL-1 (Dardenne M, 1996). Il a été montré que l'administration de TNF- $\alpha$  à des rats ou des souris modifie l'activité de la thyroïde (Pang XP, 1989). Ces cytokines et leurs récepteurs jouent donc un rôle clé dans la communication des deux systèmes.

Certaines fonctions du système immunitaire (prolifération lymphocytaire, production d'immunoglobulines) sont partiellement contrôlées par le système endocrinien (Kiess W, 1986). Les leucocytes possèdent en effet des récepteurs aux hormones endocriniennes. Par exemple, la TSH agit comme régulateur endogène du système immunitaire, *via* des récepteurs présents à la surface des lymphocytes B : *in vitro*, la production d'anticorps est augmentée lorsque les cellules B sont en présence de TSH et de lymphocytes T (Weigent DA, 1989). Les HT participent également au contrôle du développement et de la prolifération des lymphocytes B (Foster M, 1998; Montecino-Rodriguez E, 1997), et sont capables d'intervenir dans la fonction lymphocytaire T (Wang J, 1996).

Par ailleurs, les cellules du système immunitaire sécrètent des hormones. Les hormones thymiques (thymuline, thymosine, thymopoïétine, ...), produites par les cellules épithéliales du thymus, sont essentielles pour la maturation et la différentiation des lymphocytes T (Dardenne M, 1996). Les travaux effectués dans ce domaine concernent essentiellement les hormones hypophysaires et hypothalamiques. Entre autres, la sécrétion de la TSH par les lymphocytes T (comme par les cellules adénohypophysaires) est induite par la Thyroid Releasing Hormone (TRH, hormone hypothalamique régulatrice de la sécrétion de la TSH hypophysaire), et bloquée par l'hormone thyroïdienne T3 (Smith EM, 1983; Weigent DA, 1989).

A l'inverse, certaines cellules du système endocrinien sécrètent des cytokines. En effet, au niveau de l'hypophyse, les différents types cellulaires expriment diverses cytokines et leurs

récepteurs (IL-1, IL-2, IL-6), qui régulent non seulement la fonction, mais aussi la croissance des cellules hypophysaires (Arzt E, 1998).

**Ainsi, les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire, et celles produites par d'autres organes endocriniens, contrôlent l'activité du système immunitaire à plusieurs niveaux (développement, maturation et activation des lymphocytes, production des cytokines), tandis que les cytokines contrôlent l'activité du système endocrinien, et particulièrement la sécrétion des hormones.**

De récents travaux effectués dans notre laboratoire se sont intéressés au développement du parasite au sein d'hôtes dont la fonction thyroïdienne est modifiée (Bossu M, 1999). Deux modèles d'études apportent des informations importantes.

Le premier concerne le traitement de souris par l'HT T4, préalablement à l'infestation. Ce protocole aboutit à une augmentation du nombre de vers adultes, ainsi que du nombre d'œufs hépatiques. Par contre la fibrose bien d'un aspect différent, n'est pas plus intense. En outre, on observe de façon tout à fait intéressante, une augmentation de la taille des parasites dans ce modèle de souris hyperthyroïdiennes.

Le second modèle consiste à induire une hypothyroïdie en soumettant les souris à un régime pauvre en iodé. Chez ces animaux, le nombre de parasites n'est pas modifié. Cependant les vers femelles sont moins matures, et cela se traduit par une diminution du nombre d'œufs pondus. Ce manque de maturité peut être associé à une phase de résistance du parasite, et constitue un critère caractéristique d'un stade de diapause. Ceci représente une information fondamentale et l'apparition de ce phénotype particulier est discutée ci-dessous.

D'autres modèles de souris hypo- et hyperthyroïdiennes obtenues par manipulation génétique et notamment par déplétion des récepteurs aux HT de type  $\alpha 1$  et  $\beta$  respectivement. ont également été étudiés, ils ne seront pas décrits ici en détail car les caractéristiques de maturation du schistosomes dans ces hôtes ne sont pas modifiées. Néanmoins, il convient de

préciser que ces deux derniers modèles présentent des taux d'HT modifiés mais constants dans le temps alors que dans les deux premiers (injection de T4 et régime pauvre en iodé), les niveaux d'HT varient de manière transitoire et/ou locale. Ces travaux ont permis de conclure que dans le cas de l'hypo- comme de l'hyperthyroïdie, le développement du schistosome n'est altéré que lorsqu'il doit s'adapter à des modifications du taux d'HT.

Ces travaux montrent que le parasite dépend de modulations des taux d'hormones thyroïdiennes, que nous supposons être essentielles pendant que la parasite séjourne dans la peau. En effet, l'injection de T4 est réalisée par voie intradermique peu avant l'infection, la durée de demi-vie de cette hormone étant d'à peine 24 heures, il est probable que les effets de ce traitement ne durent que les quelques jours coïncidant avec le séjour cutané du parasite. Par ailleurs le régime pauvre en iodé a des répercussions cutanées, puisqu'il bloque la repousse des poils, même 7 semaines après le rasage préalable à l'infection.

Ainsi le parasite serait sensible à une variation d'un signal hormonal dès sa pénétration, ce qui sera déterminant pour son développement. Une modification de ce signal serait la cause d'un développement accru (vers adultes de grandes tailles chez les animaux traitées par la T4) ou altéré (vers femelles moins matures dans le cas d'un régime pauvre en iodé). Ces modifications hormonales cutanées peuvent intervenir dans le développement du parasite probablement en agissant sur les cellules de la peau.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux concernant la présence et le rôle de l'IL-7 produite dans la peau. Il est de fait, très probable que les voies d'action impliquant d'une part les HT et d'autre part l'IL-7 interagissent. Aucune donnée n'existe dans la littérature quant à l'existence d'une relation entre IL-7 et fonction thyroïdienne. Néanmoins, nous avons montré que les souris déficientes pour le gène de l'IL-7 constituaient un environnement défavorable à l'infection par *Schistosoma mansoni* et que dans ce cas les vers étaient moins nombreux et de petite taille. **Si, préalablement à l'infection, on injecte l'hormone thyroïdienne T4 à ces animaux, on restaure partiellement la charge parasitaire et la taille des parasites**

(Wolowczuk I., communication personnelle). **Ceci est un argument de poids, en faveur de l'interaction des hormones thyroïdiennes et de l'IL-7.**

Enfin comme nous l'avons brièvement décrit, le rat, hôte semi-permissif à l'infection par *Schistosoma mansoni*, à la suite d'injection intradermique d'IL-7 présente une hausse transitoire de la permissivité (charge parasitaire augmentée) et l'on peut observer des parasites gras et trapus possédant des corpuscules gras hypertrophiés ou HFB (hypertrophied fat bodies (Chirico J, 1994). Ce phénotype particulier observé dans un environnement très hostile, mais en présence d'IL-7 s'apparente à une phase de survie temporaire du parasite, en état de latence. Cet état peut être assimilé à une diapause similaire à celle décrite pour la première fois chez certains insectes (Il'inskaia NB, 1965), et plus récemment des nématodes (Armour J, 1974) et des marsupiaux (Berger PJ, 1966). (Les souris soumises à un régime pauvre en iodé étaient immatures, un autre critère de la diapause).

Le taux de TSH sérique dosé chez les rats traités par l'IL-7 et infectés montre un niveau plus élevé que chez les rats non traités. De plus, ces résultats concordent avec le fait que le rat thyroïdectomisé, donc hypothyroïdien (augmentation résultante de TSH) présente une augmentation de la charge parasitaire (Knopf PM, 1980). Cette dernière donnée concernant le rat hypothyroïdien s'oppose aux données obtenues dans le modèle murin. Ceci pourrait être lié aux statuts différents vis à vis de la permissivité à *Schistosoma mansoni* de ces deux rongeurs.

Les travaux que nous avons présentés dans ce manuscrit nous permettent d'aller plus loin dans la connaissance des relations que *Schistosoma mansoni* entretient avec son hôte vertébré. Ainsi, lorsque les larves pénètrent la peau, elles sont capables d'induire la synthèse d'IL-7 par différents types cellulaires du tissu cutané. La présence de cette cytokine dès le stade cutané de l'infection est indispensable à son développement au sein de l'hôte définitif. Le parasite conserve cette aptitude aussi bien chez la souris que chez l'homme, ce qui renforce son importance toute particulière.

Un lien très fort entre l'IL-7, les hormones thyroïdiennes et la maturation des larves en vers adultes est clairement démontré. Même si les caractéristiques précises d'interactions de ces molécules restent à déterminer, nous pensons qu'elles jouent un rôle clé dans la mise en place ou le maintien d'un environnement défini, favorable à la croissance de *Schistosoma mansoni*. De plus, lorsque les conditions sont défavorables, un phénomène remarquable est observé, comme nous le montrons dans le modèle de souris déficientes pour le gène de l'IL-7, chez les souris soumises à un régime pauvre en iodé donc hypothyroïdiennes ou encore chez le rat hôte semi-permissif traité par l'IL-7. Celui-ci s'apparente de manière surprenante à un phénomène appelé diapause facultative ou hypobiose transitoire (Combes C, 1995). Cette caractéristique partagée par de nombreux nématodes, (appartenant tout comme les schistosomes (trématodes) à l'embranchement des plathelminthes) parasites ou non, consiste en un arrêt du développement, généralement lorsque les conditions du milieu de vie sont difficiles. Elle représente alors un moyen de survie. Elle peut aussi être corrélée à un phénomène d'auto-régulation de l'infection parasitaire lorsqu'elle devient trop lourde pour l'hôte (Russel SW, 1966). Cela permet alors de préserver la survie de l'hôte et donc la pérennité de l'infection.

Ainsi, la peau, premier partenaire rencontré par les larves de schistosomes, possède au moins deux caractéristiques majeures et indispensables au développement et donc à la continuité de la transmission du parasite : la capacité à produire l'IL-7 et la réactivité à certaines hormones (notamment thyroïdiennes).

**Une nouvelle fonction probablement non-immune de l'IL-7 semble ainsi avoir été identifiée. Par ailleurs, l'existence d'un phénomène de diapause n'avait jamais été décrit chez les trématodes.**

Enfin, ce travail illustre parfaitement la notion de phénotype étendu (extended phenotype), au sens décrit par Dawkins (Dawkins R, 1982), qui consiste à déterminer un phénotype non pas par le sens restrictif commun du terme, mais à prendre en compte la totalité des implications dépendantes d'un organisme vivant. Dans le cas présent, le

phénotype des larves de schistosomes présentes dans la peau, s'étend en effet au moins à l'induction de la synthèse d'Interleukine-7. La remarquable complexité des relations hôte-parasite apparaît une fois encore sous un aspect des plus fascinants.

## **REVUE GENERALE**

**Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host.**

*Microbes and infection, 1999, V.1, p.545-551.*

# Role of interleukin-7 in the relation between *Schistosoma mansoni* and its definitive vertebrate host

Isabelle Wolowczuk<sup>a\*</sup>, Olivier Roye<sup>a</sup>, Sophie Nutten<sup>b</sup>, Myriam Delacre<sup>a</sup>, François Trottein<sup>b</sup>, Claude Auriault<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut de Biologie de Lille (IBL), CNRS UMP 8527, BP 447, 59021 Lille, France

<sup>b</sup>Institut Pasteur de Lille, INSERM U167, 59019 Lille, France

## 1. Introduction

Human infections with schistosome are of economic and social importance throughout the tropics and represent a major constraint in developing countries. Schistosomiasis (bilharziasis) is caused by species of flukes that exhibit differences in the structure of the adult parasites and their ova, in their preferences for intermediate hosts (various types of freshwater snails), and in their attrition for particular anatomic sites in their primary hosts. Currently, over 200 million people worldwide are infected with different species of *Schistosoma* [1]. *Schistosoma mansoni* parasites have a complex migratory cycle which is initiated when cercariae shed by infected snails penetrate the skin. During this process, cercariae lose their tails, undergo biochemical, physiological, and morphological changes [2], and begin a long vascular journey, starting at the dermal lymphatics and venules. After gaining access to the circulation, the larvae, termed schistosomula, pass through the lungs where they are retained several days, continue on the left side of the heart, and finally reach the intrahepatic venous system where they mature into adult flukes. The worms then migrate against the portal flow to the mesenteric and colonic venules, where females are fertilized. The ova that accumulate in various organs, especially the colon, liver, spleen, and lungs, induce a granulomatous hypersensitivity reaction that eventually leads to fibrosis. The eggs which are deposited in the water with human fecal matter, hatch and invade nearby snails. After a developmental period within the invertebrate host, large numbers of larvae will emerge as free-swimming cercariae, ready to pierce any human skin that may be immersed in the vicinity. Because the skin barrier is not inert, but is a biological entity capable of mounting a strong immunological defense against invasion by pathogens [3], cercariae/skin interactions might be expected.

In this review, we will report on the early cutaneous immune responses occurring during murine and human

*S. mansoni* infection and on how this influences the outcome of infection.

## 2. Early cutaneous immune responses to schistosome infection in a murine experimental model: interleukin-7 is produced in murine infected skin

After penetrating into the cutaneous layers of the vertebrate definitive host, the larvae remain in the skin for about 48 to 72 h before migrating to the lungs. This delayed residence in the skin provides ample opportunity for host-parasite interactions. The nature and the immunological consequences of these interactions are still not fully understood, but seem to be critical for the migratory behavior of the parasite, and therefore for the outcome of the infection [4].

The cellular immune response which develops against ongoing murine *S. mansoni* infection is well defined. It initially involves a Th1-type response, progressively replaced by Th2-type immunity starting from the onset of egg laying [5]. Surprisingly, little work has been devoted to studying the initiation of the immune response in the skin of the definitive host. Yet some cutaneous cells could play an active role in this process by capturing and presenting parasitic antigens to the immunocompetent cells of the skin draining lymphoid compartments. Indeed, in itself, the skin presents all the characteristics which suggest that it can function as an autonomous immunological organ [3]. Recently, increasing attention has been drawn to the involvement of resident epidermal Langerhans' cells (LCs) in the induction of skin-related immunological events [6]. It has been proposed that epidermal LCs may also be involved in the induction of immunity to skin-penetrating parasites including *S. mansoni* [7, 8]. While LCs are omnipresent and migrating cutaneous antigen-presenting cells (APCs), keratinocytes, which constitute over 95% of the epidermal cells, can also become immunocompetent APCs after stimulation [9].

Thus we first investigated the early immune response occurring in the skin of *S. mansoni*-infected mice [10]. By

\* Correspondence and reprints

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) we tested production of several cytokines (interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in abdominal skin samples of C57BL/6 infected mice from day 1 to day 90 following a primary infection. Cytokine profiles were compared between groups of transcutaneously infected mice, intravenously larvae-injected mice, and uninfected mice. Certain cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ ) were detected in all skin samples, while others (IL-6) were found only in infected skins (in both transcutaneous and intravenous infections). In contrast, IL-2, IL-5, and IL-10 were not detected in any sample at any time postinfection. Interestingly, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-7 were found to be expressed exclusively in the group of transcutaneously infected animals. The maximal detection of IL-4 and IFN- $\gamma$  was observed five days after parasite penetration, coinciding with the departure of larvae to the lungs. By contrast, IL-7 was detected from day 1 onward and continued until day 21. In addition, it was noteworthy that both IFN- $\gamma$  and IL-7 were also produced at a site (the flank) distant from the site of parasite penetration (the abdomen).

The long-lasting production of IL-7 (from day 1 to day 21) in *S. mansoni*-infected skins led us to assess the role of this cytokine during murine infection, raising questions about the influence of early responses to later development and progression of infection and disease. We hypothesized that early production of IL-7 in the host's skin following infection could be of potential benefit to the host organism.

### 3. Interleukin-7 and its receptor

Interleukin-7, originally defined as a 25-kDa soluble murine glycoprotein with pre-B cell growth factor activity [11], is a pivotal cytokine widely involved in cell growth and differentiation during lymphopoiesis and myelopoiesis [12]. As a member of the hematopoietin family of cytokines, the structure of IL-7 is described as four helix bundles with an up-up-down-down topology [13]. Murine and human genes are 81% homologous and their amino acid sequences exhibit 60% homology [14]. Recently, ovine and bovine IL-7 genes have been cloned [15, 16].

IL-7 is produced by fetal liver, bone marrow, spleen and thymus stromal/epithelial cells, intestinal epithelial cells, keratinocytes and monocytes [17]. Its synthesis by endothelial cells has only recently been reported [18, 19]. IL-7 exerts pleiotropic effects, such as stimulation of thymocyte growth, promotion of natural killer/lymphocyte-activated killer (NK/LAK) activity, modulation of cytokine production (IL-4, IFN- $\gamma$ ), an increase in IL-2R $\alpha$  expression on T lymphocytes, and activation of mature T lymphocytes and monocytes [12]. IL-7 has been shown to be a growth factor and costimulant for T cells in various tissues including the skin [20]. Dendritic epidermal T cells have an enhanced response to concanavalin A when cocultured with IL-7 and IL-7 could extend their survival. It was also shown that epidermal keratinocytes produce IL-7 and could support dendritic epidermal T-cell growth in vitro.

These studies illustrate the potential importance of IL-7 in immune responses in the skin. Furthermore, recent findings indicate that IL-7 could play an important role in development and/or maintenance of  $\gamma\delta$  T cells, at least in mice [21]. Despite the multiple and pleiotropic effects described above, disruption of the IL-7 gene in the murine germline nevertheless identifies IL-7 as a nonredundant cytokine [22].

IL-7 binds to a heterodimeric receptor consisting of an IL-7-specific chain (IL-7R) and the common gamma ( $\gamma$ C) chain [23]. IL-7 receptors have been found on cells of both the lymphoid and myeloid lineages and structural analysis of the IL-7R has revealed it to be a member of the hematopoietin receptor superfamily [24]. The  $\gamma$ C chain is shared with several other receptors, including those for IL-2, IL-4, IL-9, and IL-15 [25–27]. This has important implications for T-lymphocyte biology in that it helps to explain the partial functional redundancy that exists among several important T-cell-stimulating cytokines [28].

### 4. Participation of IL-7 in murine *S. mansoni* infection: administration of recombinant IL-7 in the skin prior to infection

Considering the participation of IL-7 in infectious diseases, it was recently demonstrated that IL-7 activates the leishmanicidal effector functions of murine macrophages in vitro [29] and that in vivo administration of human recombinant IL-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis [30, 31]. In contrast, IL-7 stimulates protective immunity against the parasite *Toxoplasma gondii* [32].

Since we have shown that IL-7 is produced in the skin of transcutaneously infected mice, we postulated that this host-derived cytokine may have an immunoregulatory role in *S. mansoni* infection. Recombinant human IL-7 was thus injected once, at the site of parasite penetration one day prior to infection. This treatment resulted in the impairment of parasite migration to the lungs, in an increased number of surviving adult worms, and in a more severe liver pathology. Concurrently, the accompanying immune response was modified, since IL-7-treated mice had increased levels of Th2-associated specific antibodies and increased levels of B cells in the skin-draining lymph nodes [10].

Unexpectedly, these data suggested that IL-7 influences both the host's immune response and the migration/development of the parasite. IL-7 might even favor the infesting parasite rather than the vertebrate host. We were mainly puzzled by the apparent contradiction between the migration of the parasites to the lungs and their arrival in the liver. Indeed, less larvae were detected in lungs of IL-7-treated mice, while more finally routed to the liver. This led us to hypothesize that IL-7 could directly influence parasite migration within the infected host. However, ligand binding studies with radiolabelled IL-7 suggest that this cytokine does not bind to the parasite surface (unpublished observations). In addition, modifications of the accompanying host immune response resulting from the

injection of IL-7 would be a consequence of differential migratory behavior rather than a direct effect of IL-7 on the developing antiparasitic immune response.

This showed that the early cutaneous events occurring after *S. mansoni* penetration (namely production of IL-7) play an important role in the outcome of the infection. The cutaneous route of infection would thus favor the parasite during the initial phases of the infection and local production of IL-7 by dermal cells would have a positive effect on survival of infected larvae in the definitive host.

## 5. Participation of IL-7 in murine *S. mansoni* infection: infection of IL-7-deficient mice

An alternative approach to assessing the role of endogenous IL-7 in the immune response to *S. mansoni* would have been either to treat animals with neutralizing mAb to IL-7 [33] or to use IL-7 knockout (KO) mice [22]. We chose to infect IL-7 KO mice with *S. mansoni*. IL-7 KO mice have large reductions in lymphoid tissue cellularity in both the T-cell and the B-cell lineages. B-cell development appeared to be blocked between the pro-B and the pre-B cell stages. Thymocytes, while reduced 20-fold in number, have a normal ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> subsets. IL-7 KOs [22] and IL-7 receptor KOs [34] are the first single cytokine KOs to have such a strong effect on lymphopoiesis, demonstrating the importance of IL-7 in T-cell and B-cell development and the apparent absence of other cytokines that can compensate for the lack of IL-7.

We thus analyzed the pattern of development of the infection in IL-7 KO mice as evaluated by the intensity of infection and the specific immune response, compared to that observed in normal immunocompetent mice.

We could show that the absence of IL-7 results in impaired development of the parasite *S. mansoni* in its definitive vertebrate host. The mechanism by which parasite migration is altered appeared to be associated with differential expression of adhesion molecules on the surface of the parasite and on the infected tissues.

IL-7 KO animals did not support normal parasite development. Compared with control immunocompetent mice, schistosome-infected IL-7 KO mice had less adult worm pairs. In addition, the number of mature eggs produced by these worm pairs was reduced, whereas they released more dead eggs. Consequent to the decreased egg numbers, liver pathology of IL-7 KO infected mice was improved and the humoral specific response during the course of infection was predominantly of the Th1 type. Of note are our previous observations, which followed the injection of recombinant IL-7, leading to an increased number of worm pairs, a more severe hepatic pathology, and a dominant Th2-related humoral response [10]. Since, in schistosome-infected mice, eggs are the primary stimulus of the Th2 response [35], the effect of IL-7 on the Th1/Th2 immune responses would rather be indirectly due to differential egg burdens in the IL-7-treated mice and IL-7 KO mice compared to control animals. Similarly, the influence of IL-7 on parasite migration from the skin to the

lungs in recombinant IL-7-injected mice was totally different from that in IL-7 KO animals. Less larvae reached the lungs of IL-7-treated mice, whereas more could route to the lungs of IL-7 KO animals. The differential expression of adhesion molecules on either the worms or the infected host tissues provided a partial explanation for the mechanisms through which IL-7 affects parasite migration. Worms collected from IL-7 KO animals expressed higher levels of Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>), a trisaccharide adhesive motif known to be involved in cell/cell communications by interacting with members of the selectin family [36]. In *S. mansoni* infection, Le<sup>x</sup> has been reported to elicit cytolytic antibodies reactive with host cells [37] and to participate in the elimination of the parasite [38]. In addition, we found increased expression of ICAM-1 on alveolar epithelial cells in lungs of IL-7 KO mice compared to control mice with similar parasite burdens.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was recently shown to participate in early and late immune responses in *S. mansoni* infection [39, 40]. Therefore, the increased expression of ICAM-1 in lungs of *S. mansoni*-infected IL-7 KO mice may be the result of a stronger inflammatory reaction developing in this organ, thus leading to the retention and further destruction of the larvae at that site. This would explain the reduced number of adult worms later found in the IL-7 KO-infected animals. Unexpectedly, schistosomes which developed in IL-7 KO mice were of strikingly reduced size. Both male and female worms were smaller, with this phenomenon being a definitive blockade and not a delay, since it occurred at a time when worms should have reached full development long ago (i.e., day 80 postinfection). Interestingly, parasites developing in IL-7 KO mice were sexually differentiated and mated; in addition they could lay eggs, even if in reduced number. These worms could thus be designated as 'dwarf' parasites.

This reinforces our previous observations [10, 19] and supports the concept that IL-7 is one of the key host-derived cytokines used by the parasite to create a favorable environment in the infected tissues in order to ensure its complete development. Again, modification of the parasite-specific immune response would be a consequence and not a cause of the alteration in parasite migration and development. In addition, as the only example so far described of dwarf schistosomes is that of hypothyroid mice [41], this work raised questions concerning the relationship between IL-7 and host hormones in *S. mansoni* infection.

## 6. Participation of IL-7 in human *S. mansoni* infection: the experimental model of human skin-engrafted SCID mice

The growing body of information on the important role of IL-7 in immunological and pathological cutaneous reactions [20] and our own demonstration of its participation in cutaneous reactions in the murine experimental system [10] prompted us to assess the involvement of this



**Figure 1.** Light microscopy appearance of human grafted skin 1 h postinfection with *S. mansoni*. Schistosomula are mainly present at the dermal-epidermal junction, in the Malpighi layer. Masson's trichrome stain was used. Magnification,  $\times 100$ .

cytokine in human schistosomiasis mansoni, particularly at the cutaneous level, in the first days of infection. Severe combined immunodeficient (SCID) mice [42], which lack autologous T and B lymphocytes, are being increasingly used as hosts for adoptive transfer of human peripheral blood leukocytes (PBLs) [43]. This approach is usually termed the SCID-hu-PBL mouse model, and human PBLs are inoculated intravenously or in the peritoneal cavity [44]. In this model, it has been shown that human leukocytes are functional during the first month after injection into the SCID mice. After that time, human T cells localize in murine extralymphoid tissues such as lungs, liver, and spleen [43, 44]. Moreover, the obtaining of a primary response in these xenogeneic chimeras is still controversial [45, 46]. The major limitations for developing a human immune response in the SCID-hu-PBL mouse model is the lack of the appropriate human APCs and of a suitable microenvironment, which are needed to support survival of naive human T cells, and to activate them after antigenic stimulation [43].

Recently, human skin has been grafted onto SCID mice. As we described above, cutaneous Langerhans cells play an important role in the induction of immune responses [6]. Therefore, the grafted skin could improve the efficacy of this rebuilt human immune system. These SCID-hu-PBL/skin mice have been extensively used to investigate fundamental and pathological dermatology [47].

Several authors have described the involvement of IL-7 in human skin pathology. In *Mycobacterium leprae* infec-

tion, IL-7 produced at the site of the lesion facilitates the cellular infectious responses by potentiating antigen-specific T cells; the dysregulation of IL-7 production might contribute to the host's inability to control infection [48]. In the sera of patients with plaque-type psoriasis, there is an increase in the IL-7 concentrations in lesional skin [49]. IL-7 was also believed to amplify inflammation, acting principally as a growth factor for in vivo-primed antigen-specific T cells and enhancing their proliferation in the skin of patients with atopic dermatitis [50].

We thus decided to use SCID-hu-PBL/skin mice to infect human skin with *S. mansoni* and we analyzed i) the localization of schistosomula in human skin, and ii) the onset of early immunological events (six days after infection), such as human cell recruitment and human cytokine production [19].

When human skin was examined 1 h postinfection (p.i.), schistosomula were observed within a lacunae as described for rodent skin [51], principally at the dermo-epidermal junction. Furthermore, parasites were recovered in the SCID lungs 6 days p.i., thus demonstrating that vascularization of the human graft perfectly connected with the host's vascular system. This validated the SCID-hu-PBL/skin model for studying early immunological events in human skin infected with *S. mansoni* (figure 1).

We observed perivascular recruitment of CD4<sup>+</sup> T cells in the dermis of *S. mansoni*-infected human skin and detected IL-7 production in the epidermal layers and in the dermal vascular endothelium at day 6 p.i. It has been shown that IL-7 increases VLA-4 and LFA-1 expression in

activated CD4<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> T-cell subsets [52] and induces T-cell adhesion to endothelial cells [53]. Therefore, we hypothesized that IL-7 produced by dermal endothelial cells may promote the observed CD4<sup>+</sup> T-cell recruitment. In addition, IL-7 could probably act as a costimulus to induce human resting peripheral blood T lymphocytes to proliferate within the skin [54]. Therefore, it seems pertinent to hypothesize a role for endothelium- and/or keratinocyte-derived IL-7 not only in increasing T-cell adhesiveness but also in final peripheral activation and proliferation of dermal recruited T cells.

In addition, we demonstrated that parasites directly triggered IL-7 production by dermal endothelial cells. Indeed, cocultures of human endothelial cells with schistosomula showed significantly higher IL-7 synthesis compared to control cultures.

Finally, we showed that IL-7 is not simply locally produced in the skin during human *S. mansoni* infection. Indeed, IL-7 concentrations are increased in plasma of young infected patients, who are also the most severely infected. Endothelial cells and monocytes from peripheral blood might be the principal sources of this secretion [48]. In our experiments, we established a significant negative correlation between IL-7 and age, whereas no such link was found in African and European uninfected populations. The high IL-7 levels in young patients could be explained by their high frequency of infection. Indeed, as more schistosomula passed through the skin, this would trigger higher IL-7 production by cutaneous endothelium and keratinocytes. Furthermore, we postulate that IL-7 is produced during the development of the immune response against the parasite. As the youngest infected individuals have more parasites and eggs, IL-7 would thus be found in higher amounts so as to supply the necessary number of functional immune cells, acting as a general stimulator, in particular on B- and T-lymphocyte precursors and on mature T lymphocytes [12]. Nevertheless, we cannot yet reach a conclusion as to the precise role of IL-7 in the level of human infectivity.

The fact that IL-7 can be detected in infected human sera reinforces the validity of our observations in the SCID-hu-PBL/skin mouse model and justifies further analysis of human infected populations.

Our demonstration of IL-7 production by dermal endothelial cells, the first cells encountered by infiltrating T cells, should encourage new and interesting views concerning T-cell proliferation responsible for the most common cutaneous diseases such as psoriasis and atopic dermatitis.

## 7. Concluding remarks

The precise adaptation of parasites to their mammalian hosts implies that conditions required for their growth, differentiation, and maturation are present. The role of cytokines in regulating the host-parasite relationship is poorly understood [55]. In the case of *S. mansoni* infection, there is scarce information available concerning the effect(s) of host cytokine(s) on migration and/or maturation of the worm within its definitive host. This lack of infor-

mation is likely due to the complex life cycle of the parasite, which involves different developmental stages and an arduous and intricate migration over a period of many days. It has been reported that host cytokines do influence egg laying [56]; indeed, parasitic worms require TNF- $\alpha$  to lay and excrete eggs [57, 58].

Our studies reveal an unexpected and central role for IL-7 in the development of the skin-penetrating parasite *S. mansoni* in its definitive vertebrate host. In human infected skin, we demonstrated a direct effect of the parasite on IL-7 synthesis by dermal endothelial cells. Signals delivered through IL-7 to the parasite in the skin, and then throughout its migration in the host, enabled proper migration, maturation, and development of the worms. In addition, to our knowledge, the only report in the literature of reduced-sized *S. mansoni* worms corresponded to hypothyroid mice [41] in which the parasite phenotype was similar to that of IL-7 KO infected mice. No difference in circulating thyroid hormones in the sera of naïve IL-7 KO and control mice was found (unpublished observation). Experiments are currently in progress to elucidate this question. Various hormones of vertebrate hosts have been implicated in the stimulation or induction of growth or sexual reproduction of their parasites [59]. It might be that IL-7 deficiency creates a host hormonal environment to which schistosomes adapt by developing as male and female dwarf worms, laying eggs to ensure transmission to new hosts.

The central role of IL-7 with respect to schistosomes could be to modulate the expression of adhesion molecules on the migrating worms and the host's tissues and possibly to favor parasite responsiveness to host endocrine factors. Understanding the level of the interaction(s) between IL-7 and *S. mansoni* is obviously critical for understanding host-parasite interactions.

Taken together, and in conclusion, our observations thus point to IL-7 as a key cytokine in the host-parasite relationship, favoring permissiveness of the definitive host to infection, far beyond the development of the host's immune response.

## Acknowledgments

The author would like to thank J. Fontaine for endless and friendly discussions on the parasite. The sharp and critical views on our work by Drs D. D. Dombrovic, C. Dissous, and R. Pierce were of great value. The assistance of S. Vanwigene for preparation of the parasite and E. Fleurbaix for mice breeding was greatly appreciated.

## References

- [1] World Health Organization (WHO) [www.who.ch](http://www.who.ch), 1998.
- [2] Stirewalt M.A., *Schistosoma mansoni*: cercariae to schistosomule, Adv. Parasitol. 12 (1974) 115–182.
- [3] Strelein J.W., Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions, J. Invest. Dermatol. 80 (1983) 12S–16S.

- [4] Kamiya H., Ozaki T., Nakayama H., Inaba T., Immunizing potential of ultraviolet-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* in rodent hosts, *Parasitol. Res.* 79 (1993) 293–296.
- [5] Pearce E.J., Caspar P., Grzych J.M., Lewis F.A., Sher A., Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni*, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 159–166.
- [6] Silberberg-Sinakin I., Gigli I., Baer R.L., Thorbecke G.J., Langerhans cells: role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages, *Immunol. Rev.* 53 (1980) 203–232.
- [7] Moll H., Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis, *Immunol. Today* 14 (1993) 383–387.
- [8] Sato H., Kamiya H., Role of epidermal Langerhans cells in the induction of protective immunity to *Schistosoma mansoni* in guinea pigs, *Immunology* 84 (1995) 233–240.
- [9] Gaspari A.A., Katz S.I., Induction and functional characterization of class II MHC (Ia) antigens on murine keratinocytes, *J. Immunol.* 140 (1988) 2956–2963.
- [10] Wolowczuk I., Delacre M., Roye O., Giannini S.L., Auriault C., Interleukin-7 in the skin of *Schistosoma mansoni*-infected mice is associated with a decrease in interferon-gamma production and leads to an aggravation of the disease, *Immunology* 91 (1997) 35–44.
- [11] Namen A.E., Lupton S., Hjerrild K., Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7, *Nature* 333 (1988) 571–573.
- [12] Mertsching E., Meyer V., Linares J., Lombard-Platet S., Ceredig R., Interleukin-7 a non-redundant potent cytokine whose over-expression massively perturbs B lymphopoiesis, *Int. Rev. Immunol.* 16 (1998) 285–308.
- [13] Kroemer R.T., Doughty S.W., Robinson A.J., Richards W.G., Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling, *Protein Eng.* 9 (1996) 493–498.
- [14] Goodwin R.G., Friend D., Ziegler S.F., Jerzy R., Falk B.A., Gimpel S., Cosman D., Dower S.K., March C.J., Namen A.E., Park L.S., Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily, *Cell* 60 (1990) 941–951.
- [15] Barcham G.J., Andrews A.E., Nash A.D., Cloning and expression of a cDNA encoding ovine interleukin-7, *Gene* 154 (1995) 265–269.
- [16] Cludts I., Dtoogmans L., Cleuter Y., Kettmann R., Burny A., Sequence of bovine interleukin-7, *DNA Seq.* 3 (1992) 55–59.
- [17] Costello R., Imbert J., Olive D., Interleukin-7 a major T-lymphocyte cytokine, *Eur. Cytokine Netw.* 4 (1993) 253–262.
- [18] Kröncke R., Loppnow H., Flad H.D., Gerdes J., Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction, *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 2541–2544.
- [19] Roye O., Delhem N., Trottein E., Remoué F., Nutten S., Decavel J.P., Delacre M., Martinot V., Cesbron J.Y., Auriault C., Wolowczuk I., Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection, *J. Immunol.* 161 (1998) 4161–4168.
- [20] Moller P., Bohm M., Czarnetski B.M., Schadendorf D., Interleukin-7. Biology and implications for dermatology, *Exp. Dermatol.* 5 (1996) 129–137.
- [21] Uehira M., Matsuda H., Hikita I., Sakata T., Fujiwara H., Nishimoto H., The development of dermatitis infiltrated by gamma delta T cells in IL-7 transgenic mice, *Int. Immunol.* 5 (1993) 1619–1627.
- [22] Von Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian L.A., MacNeil T., Burbach S.E.G., Murray R., Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a non-redundant cytokine, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1519–1526.
- [23] Kondo M., Takeshita T., Higuchi M., Nakamura M., Sudo T., Nishikawa S., Sugamura K., Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes, *Science* 263 (1994) 1453–1454.
- [24] Taga T., Kishimoto T., Immune and hematopoietic cell regulation: cytokines and their receptors, *Current Opin. Immunol.* 2 (1990) 174–184.
- [25] Kondo M., Takeshita T., Ishii N., Nakamura M., Watanabe S., Arai K., Sugamura K., Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4, *Science* 262 (1993) 1874–1877.
- [26] Kimura Y., Takeshita T., Kondo M., Ishii N., Nakamura M., Van Snick S.J., Sugamura K., Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex, *Int. Immunol.* 7 (1995) 115–120.
- [27] Giri J.G., Ahdieh M., Eisenman J., Shanebeck K., Grabstein K., Kumaki S., Namen A., Park L.S., Cosman D., Anderson D., Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15, *Embo J.* 13 (1994) 2822–2830.
- [28] Murray R., Physiologic roles of interleukin-2 interleukin-4 and interleukin-7, *Curr. Opinion Hematol.* 3 (1996) 230–234.
- [29] Gessner A., Vieth M., Will A., Schröppel K., Röllinghoff M., Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages, *Infect. Immun.* 61 (1993) 4008–4012.
- [30] Gessner A., Will A., Vieth M., Schröppel K., Röllinghoff M., Stimulation of B-cell lymphopoiesis by interleukin-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis, *Immunology* 84 (1995) 416–422.
- [31] Hoerauf A., Solbach W., Röllinghoff M., Gessner A., Effect of IL-7 treatment on *Leishmania major*-infected BALB/c mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease, *Int. Immunol.* 7 (1995) 1879–1884.
- [32] Kasper L.H., Matsuura T., Kahn I.A., IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*, *J. Immunol.* 155 (1995) 4798–4804.

- [33] Grabstein K.H., Waldschmidt T.J., Finkelman F.D., Hess B.W., Alpert A.R., Boiani N.E., Namen A.E., Morrissey P.J., Inhibition of murine T and B lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin-7 monoclonal antibody, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 257–264.
- [34] Peschon J.J., Morrissey P.J., Grabstein K.H., Ramsdell F.J., Marakowsky D.E., Gliniak B.C., Park L.S., Ziegler S.F., Williams D.E., Ware C.B., Meyer D.J., Davison B.L., Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor-deficient mice, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1955–1960.
- [35] Grzych J.M., Pearce E.J., Cheever A., Caulada Z.A., Caspar P., Hieny S., Lewis F.A., Sher A., Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni, *J. Immunol.* 146 (1991) 1322–1327.
- [36] Rossiter H., Alon R., Kupper T.S., Selectins T-cell rolling and inflammation, *Mol. Med. Today* 3 (1997) 214–222.
- [37] Nyame A.K., Pilcher J.B., Tsang V.C., Cummings R.D., *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells, *Exp. Parasitol.* 82 (1996) 191–200.
- [38] Trottein E., Nutten S., Papin J.P., Leportier C., Poulaing-Godefroy O., Capron A., Capron M., Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosomes targets, *J. Immunol.* 159 (1997) 804–811.
- [39] Ramaswamy K., He Y.X., Salafsky B., ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*, *Exp. Parasitol.* 86 (1997) 118–132.
- [40] Lukacs N.W., Chensue S.W., Strieter R.M., Warmington K., Kunkel S.L., Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha inducible intercellular adhesion molecule-1, *J. Immunol.* 152 (1994) 5883–5889.
- [41] Wahab M.F., Warren K.S., Levy R.P., Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni, *J. Infect. Dis.* 124 (1971) 161–171.
- [42] Bosma G.C., Custer R.P., Bosma M.J., A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse, *Nature* 301 (1983) 527–530.
- [43] Mosier D.E., Gulizia R.J., Baird S.M., Wilson D.B., Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency, *Nature* 335 (1988) 256–259.
- [44] Torbett B.E., Picchio G., Mosier D.E., hu-PBL-SCID mice: a model for human immune function AIDS and lymphomagenesis, *Immunol. Rev.* 124 (1991) 139–164.
- [45] Saxon A., Macy E., Denis K., Tary-Lehmann M., Witte O., Braun J., Limited B cell repertoire in severe combined immunodeficient mice engrafted with peripheral blood mononuclear cells derived from immunodeficient or normal humans, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 658–665.
- [46] Markham R.B., Donnenberg A.D., Effect of donor and recipient immunization protocols on primary and secondary human immune responses in SCID mice reconstituted with human peripheral mononuclear cells, *Infect. Immun.* 60 (1992) 2305–2308.
- [47] Rowden G., Colp P., Dean S., Auger F., Lopes-Valle C., Comparative epidermal Langerhans cell migration studies in epidermal and epidermal/dermal equivalent grafts, *J. Invest. Dermatol.* 99 (1992) 59S–61S.
- [48] Seling P.A., Sakimura L., Uyemura K., Yamamura M., Oliveros J., Nickoloff B.J., Rea T.H., Modlin R.L., IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen, *J. Immunol.* 154 (1995) 2775–2783.
- [49] Bonifati C., Trento E., Cordiali-Fei P., Carducci M., Mussi A., D'Auria L., Pimpinelli F., Fazio M., Ameglio F., Increased-IL-7 concentrations in lesional skin and in the sera of patients with plaque-type psoriasis, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83 (1997) 41–44.
- [50] Yamada N., Wakugawa M., Kuwata S., Nakagawa H., Tamaki K., Changes in eosinophil and leukocyte infiltration and expression of IL-6 and IL-7 messenger RNA in mite allergen patch test reactions in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 (1996) 201–206.
- [51] Wilson R.A., Lawson J.R., An examination of the skin phase of schistosome migration using a hamster cheek pouch preparation, *Parasitology* 80 (1980) 257–266.
- [52] Fratazzi C., Carini C., Interleukin-7 modulates intracytoplasmatic CD23 production and induces adhesion molecule expression and adhesiveness in activated CD4<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> T cell subsets, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81 (1996) 261–270.
- [53] Ariel A., Hershkoviz R., Cahalon L., Williams D.E., Akiiyama S.K., Yamada K.M., Chen C., Alon R., Lapidot T., Lider O., Induction of T-cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 2562–2570.
- [54] Welch P.A., Namen A.E., Goodwin R.G., Armitage R., Cooper R.D., Human IL-7: a novel T cell growth factor, *J. Immunol.* 143 (1989) 3562–3567.
- [55] Denis M., Campbell D., Gregg E.O., Cytokine stimulation of parasitic and microbial growth, *Res. Microbiol.* 142 (1991) 979–983.
- [56] Doenhoff M.J., Musallam Bain J., McGregor A., Studies of the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: The immunological dependence of parasite egg secretion, *Immunology* 35 (1978) 771–778.
- [57] Amiri P., Locksley R.M., Parslow T.G., Sadick M., Rector E., Ritter D., McKerrow J.H., Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice, *Nature* 356 (1992) 604–607.
- [58] Joseph A.L., Boros D.L., Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation, *J. Immunol.* 151 (1993) 5461–5471.
- [59] Lawrence P.O., Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27 (1991) 487–496.

## PUBLICATION ANNEXE

**Infection of B-cell deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni* :  
Demonstration of the participation of B cells in granuloma modulation.**

*Scandinavian Journal of Immunology, 1998, V.48, p.233-240.*

# Infection of B-Cell-Deficient Mice by the Parasite *Schistosoma mansoni*: Demonstration of the Participation of B Cells in Granuloma Modulation

I. FERRU\*, O. ROYE, M. DELACRE, C. AURIAULT & I. WOLOWCZUK

*Institut de Biologie de Lille (IBL), CNRS URA 1854, Lille cedex, France*

(Received 16 December 1997; Accepted in revised form 19 March 1998)

FERRU I, ROYE O, DELACRE M, AURIAULT C, WOLOWCZUK I. Infection of B-Cell-Deficient Mice by the Parasite *Schistosoma mansoni*: Demonstration of the Participation of B Cells in Granuloma Modulation. Scand J Immunol 1998;48:233–240

The contribution of B lymphocytes to immunity towards the parasite *Schistosoma mansoni* has been investigated in a mouse strain rendered genetically B-cell deficient (the  $\mu$ MT mouse). These studies demonstrated that T cells primed *in vivo* in B-cell-deficient mice proliferate less efficiently *in vitro* in response to parasite antigenic extracts except at 10 weeks of infection. In addition, analysis of the cytokine profiles (IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- $\gamma$ ), investigated using RT-PCR, showed that spleens of  $\mu$ MT animals displayed a predominant Th1-like profile compared to control, B-cell-intact infected mice. This showed that B cells, either *per se* or through their secretions, are involved in the *in vivo* generation and/or maximal expansion of Th2-type T lymphocytes during the course of murine *S. mansoni* infection. Interestingly, the data showed that B-cell-deficient mice display an increased hepatic fibrosis at 10 weeks postinfection (p.i.), whereas they behaved like infected controls, with regard to the other assessed parasitological parameters (e.g. worm burden estimation). This demonstrated that even if B lymphocytes are not essential for the development of the general immune response towards *S. mansoni* in the mouse, they may nevertheless be involved in the correct immunoregulation of the granulomatous reaction around the eggs.

I. WOLOWCZUK, Institut de Biologie de Lille (IBL), CNRS URA 1854, 1 rue du Professeur Albert Calmette, BP 447, 59021, Lille cedex, France

## INTRODUCTION

To date, numerous studies have been performed in an attempt to identify the immune mechanisms responsible for acquired immunity in experimental rodent and primate models of schistosomiasis. The course of an initial infection with *Schistosoma mansoni* varies in different experimental hosts [1].

After a short, self-limiting infection, it appears as a persistent low worm burden and concomitant immunity in the rhesus monkey and the rat. In the rat experimental model, protective immunity is mainly based on a humoral response [2, 3] involving antibodies of the IgE and IgA isotypes [4, 5].

In mice, a low-level infection persists resulting in a chronic

disease state. The pathophysiology is associated with a granulomatous hypersensitivity reaction around embolized eggs in host tissues [6]. From the onset of egg laying, a striking T-helper type-1 subset (Th1) to Th2 switch occurs [7, 8] eventually leading to a generalized imbalance in the Th1/Th2 response [9]. Once the granulomatous reaction is initiated, mainly under the control of Th2 lymphocytes [8], the vigorous, highly cellular lesion changes to a compact, less intense response [10]. This spontaneous immunomodulation is associated with a change in the secreted cytokines directing the recruitment and proliferation of cells comprising the granuloma, paralleled with a down-regulation of the Th2 response and a reduction in macrophage effector functions [11]. A fine balance is therefore established in which the inflammatory response is down-regulated, preserving the protective primary role of the granuloma: egg destruction and sequestration of potentially harmful egg secretions.

\*Present address: Division of Immunology and Cell Biology, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, ACT, Australia.

In the model of *S. mansoni* murine infection, there is relatively little information concerning the participation of B cells and/or antibodies. Serum antibody responses during the development of chronic murine infection have been characterized in detail [12], but their role in acquired immunity in mice, and their possible interaction with the cellular components have not yet been fully defined. In early investigations, transfer of hyperimmune serum failed to confer protection in mice [12]. There have also been reports about the protective effects of immune serum transfers [13–15]. Circulating antibodies have also been shown to influence the development and regulation of delayed-type hypersensitivity reactions [16]. More recently, it has been reported that IgE may even play a detrimental, rather than beneficial, role for the host in murine schistosomiasis [17], and that intestinal IgA production is implicated in the evolution of nephropathy in chronic schistosomiasis [18].

Whereas the granuloma around the *S. mansoni* eggs is built up largely by a cell-mediated immune reaction, fully differentiated plasma cells and antibody deposits are also found [19, 20], probably functioning as a local humoral antibody barrier which allows a slow and progressive neutralization of the egg antigens.

To investigate the regulatory role of B cells in murine *S. mansoni* infection, the effect of *in vivo* B-cell depletion on primary and secondary infections, has been experimentally achieved by administration of antimouse  $\mu$ -chain serum [21, 22]. Because of the possible side-effects of this treatment or of the incompleteness of B-cell depletion, the data obtained from anti- $\mu$ -suppressed mice must be interpreted with caution. Recently, genetic manipulation of the murine immune system has led to numerous gene-deletion mutants [23]. Those knockout (KO) mice can obviously provide insight into the *in vivo* participation of the product of the knocked-out gene in immune responses.

Here we report on a series of experiments using a model of congenital, complete and selective *in vivo* B-cell deficiency, generated by gene targeting ( $\mu$ MT [24]), to determine the contribution of B cells to the development of the immune response to murine schistosomiasis mansoni.

In  $\mu$ MT mice, T cells appear to develop normally as indicated by normal numbers of CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T lymphocytes in the spleen [24], and proliferation *in vitro* in response to Concanavalin (Con) A (a T-cell mitogen) (J. Roes, I. Wolowczuk and K. Rajewsky, unpublished observations). In the very controversial area of research on the role of B cells as antigen presenting cells (APC) involved in the *in vivo* generation of T-helper lymphocytes [25, 26], we postulated that infection of these B-cell-deficient mice with the parasite *S. mansoni* would provide interesting information on the generation of Th1 and Th2 cells occurring during infection, and would also give insights into the immunoregulation of the granuloma reaction in a B-cell-deficient environment. We thus infected control and  $\mu$ MT mice with *S. mansoni* and compared their parasitological parameters and cellular immune responses at various time points following a primary infection.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and parasites.** Inactivation of the transmembrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  heavy chain in the mouse germline (a mutation designated  $\mu$ MT) results in the complete absence of B cells, as determined by flow cytometry [24], and of serum immunoglobulin (J. Roes, personal communication) and the failure of spleen cells to respond to lipopolysaccharide (a B-cell mitogen) *in vitro* (J. Roes, I. Wolowczuk and K. Rajewsky, unpublished observations).

The  $\mu$ MT mutation was crossed eight times onto the C57BL/6 background (kindly provided by Dr W. Frels, Bioqual, Inc., Rockville, MD, USA). Mice of the N8 generation were intercrossed to obtain animals homozygous for the mutation. C57BL/6 mice of matched sex and age, were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) and used as control animals throughout the experiments. All animals were 6–8 weeks old when used for experiments.

The *S. mansoni* life cycle was maintained (in Pasteur Institute, Lille, France) using *Biomphalaria glabrata* snails as intermediate hosts and golden hamsters as definitive hosts.

**Infection procedure.** Animals were exposed percutaneously to 50 cercariae, according to the method described previously [27]. Mice were repeatedly bled at days 0, 28, 35 and 42 p.i. for determination of interleukin-4 (IL-4) and IFN- $\gamma$  in the sera.

The total adult worm burden was determined on day 42 by total blood perfusion of the infected mice. Livers and spleens of day 42- and day 70 infected animals were fixed in Bouin's solution before being further processed for histopathological examinations and collagen measurement.

Egg burdens in the livers were estimated at days 42 and 70 after digestion of the organs in 4% KOH solution, incubated for 16 h at 37°C. Aliquots of the final suspension were counted under the microscope.

**Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).** IL-4 and IFN- $\gamma$  were detected in sera (dilution 1:20) by sandwich ELISA. The antibody pairs for the detection of IL-4 (11B11 and biotinylated BVD6-24G2) and IFN- $\gamma$  [affinity purified R5-6 A2 monoclonal antibody (MoAb) and biotinylated XMG1-2] were purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA). The procedure used was as recommended by the supplier. Optical densities (OD) at 492 nm were measured using a multichannel spectrophotometer (Titertek multiskan MCC 1340). Results are expressed as OD values for IL-4 whereas concentrations of IFN- $\gamma$  were calculated by reference to a standard curve, constructed with known amounts of recombinant purified IFN- $\gamma$  diluted in naive murine serum.

**Measurement of collagen.** Sections of liver (10  $\mu$ m thick) were put on slides, deparaffinized and incubated with a saturated solution of picric acid in distilled water containing 0.1% Fast Green FCF (Sigma) which stains noncollagenous proteins, and 0.1% Sirius Red F3B (Gurr BDH, Chemicals Ltd, Poole, UK) which stains collagen. Sections were kept in the dark and incubated at room temperature for 2 h under continuous, mild agitation. Slides were rinsed with distilled water until the elution fluid was completely colour-free. Each section was then covered with 1 ml of 0.1N NaOH in absolute methanol until complete fading (usually within a few seconds). Fluids were then carefully withdrawn and read in a spectrophotometer (DU 64, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Fast Green has its maximal absorbance at 630 nm and Sirius Red at 540 nm. Values of collagen and protein levels were calculated according to the formula described previously [28]. For each liver, collagen was measured in triplicate. The Student's *t*-test and the coefficient of correlation were used in the statistical evaluation of the results. Data are reported as mean  $\pm$  SE of collagen per mg protein for each individual mice.

In order to assay the histopathological aspect of the liver, sections 6 µm thick were put on glass slides. After dewaxing and moisturizing, they were stained with Groat haematoxylin (nuclear dye, Gurr BDH) and Biebrich scarlet-acid fuchsin (cytoplasmic and basic protein dye, Sigma), then mounted in Entellan (Labonord, France).

**RNA preparation and reverse transcription (RT).** Total RNA was purified by the RNAsol procedure (Bioprobe, Montreuil-sous-Bois, France). Briefly, spleen cells were lysed with 1 ml of RNAsol and RNA was extracted using chloroform. The aqueous phase was then precipitated with isopropanol (v/v). The RNA pellet was washed twice with 70% ethanol and finally resuspended in 25 µl of RNase-free water.

The RT reaction was carried out as follows: 1 µg of total RNA in a final volume of 9 µl was mixed with 2 µl oligo dT primer (0.5 µg), RNasin (4 units) (Promega, Madison, WI, USA), heated for 5 min at 70°C and then cooled slowly to room temperature, 14 µl of a mixture of RNasin (4 units), 1 × reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), dithiothreitol (4 mM) (Gibco BRL, Epagny, France), dNTPs (2 mM) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 200 units Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MLV, Gibco BRL) were then added. Samples were incubated at 37°C for 45 min, denatured, heat inactivated at 95°C and cooled on ice. Two microlitres of the mixture RNasin (4 units), 1 × buffer and M-MLV (100 units) were added and the samples were incubated for an additional 30 min at 37°C, heat inactivated and stored at -20°C.

**Polymerase chain reaction (PCR).** The sequence of oligonucleotides, corresponding to the primers for β-actin, IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-5, used for amplification have been described previously [29]. The PCR reaction mixture was composed of 2.5 µl 10× PCR buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (w/v) gelatin, 2 pmol/µl primer, 0.2 mM each of dTTP, dATP, dCTP and dGTP, and 0.625 units Taq polymerase (Bioprobe). Reactions were carried out with a denaturation step at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min using a Perkin-Elmer DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Saint-Quentin, France). The number of cycles was 34 for β-actin, and 38 for the other pairs of primers tested. PCR products were analysed in a 1.5% agarose gel.

**In vitro cell culture and proliferation assays.** Spleen cells were isolated from infected mice and enriched for T cells by passage through a nylon wool column. Cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) supplemented with 5 × 10<sup>-5</sup> M β2-mercaptoethanol (Merck, Clevonot, France), 2 mM L-glutamine (Merck), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), antibiotics (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) (Specia, Paris, France), 20 mM Hepes (Sigma), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Boehringer, Meylan, France), at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

For the *in vitro* assays, 2.5 × 10<sup>5</sup> T cells and 2.5 × 10<sup>5</sup> irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 Al, 100 KU, 8 mA) syngeneic spleen cells, either from noninfected C57Bl/6 or from noninfected μMT mice, as antigen presenting cells (APC +/+ and APC -/-, respectively) were cultured with the adult worm or the egg antigenic extracts (SWAP and SEA, respectively), in a total volume of 200 µl in flat-bottomed culture plates (Polylabo, Strasbourg, France) at a final concentration of 20 µg/ml. Each condition was carried out in triplicate. The cells were incubated with 18.5 kBq of tritiated deoxythymidine (<sup>3</sup>H TdR) for the last 18 h of a 5-day culture period. Finally, cells were harvested by filtration on glass-fibre discs using a multiharvester (Skatron, Lierben, Norway) and the amount of incorporated (<sup>3</sup>H) TdR was measured using a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as E-C values (cpm) for each antigen and time point (E: stimulated values; C: background values).

**Antigens and mitogens.** Adult worm antigen (SWAP) was prepared by homogenizing adult worms in PBS using a Potter-Elvehjem homogenizer, followed by centrifugation of the homogenate at 10 000 × g for 20 min. Soluble egg antigen (SEA) was prepared according to the method described previously [6]. Con A (Sigma) was used as a positive control for T-cell activation.

## RESULTS

### *In vitro restimulation of splenic cells from *S. mansoni*-infected μMT and C57Bl/6 mice*

The consequence of the absence of B cells for the generation of antigen-specific T cells during the course of *S. mansoni* infection was assessed by comparing *in vitro* antigen-specific secondary proliferative responses of lymphocyte populations from μMT mice and C57Bl/6 mice.

The T-cell proliferations in response to SWAP and SEA were measured at days 28, 42 and 70 p.i. (Fig. 1).

At day 28 p.i. (Fig. 1A), T cells from C57Bl/6 mice (T +/+) showed a strong proliferative response when SWAP was presented by APC +/+, whereas APC -/- were not efficient in stimulating the T cells. The proliferation obtained in response to SEA was lower than that in response to SWAP and equivalent with both sources of APC.

In contrast, no proliferation of T cells from μMT mice (T -/-) was measured after SWAP restimulation with either APC +/+ or APC -/- as presenting cells. Nevertheless, T -/- cells were stimulated by SEA with APC +/+ and APC -/-.

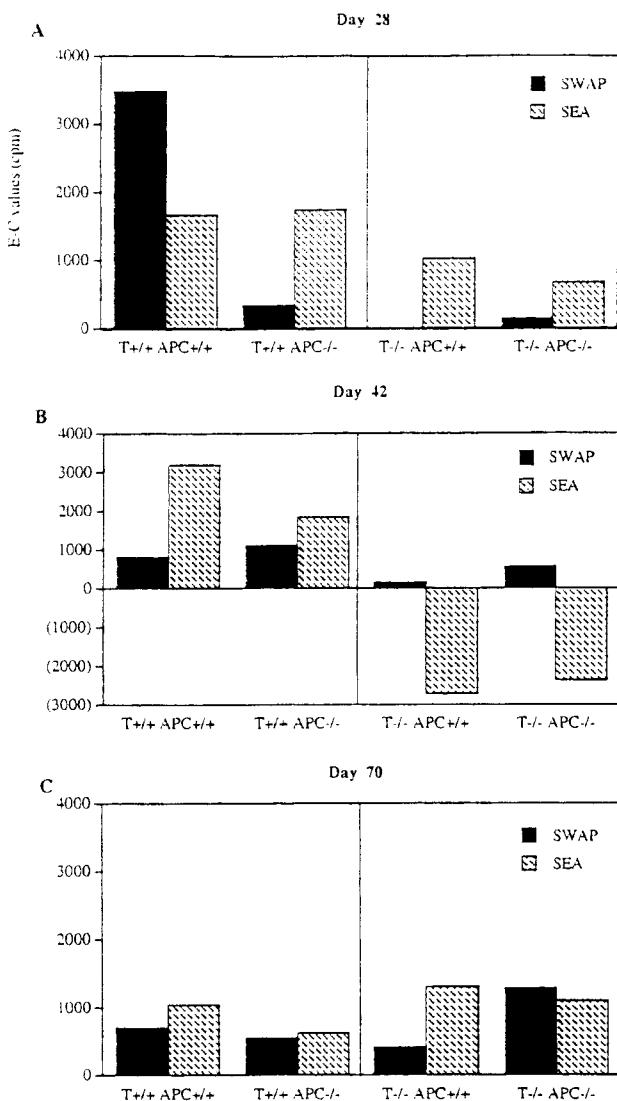
At day 42 p.i. (corresponding to the beginning of the egg laying) (Fig. 1B), T cells from C57Bl/6 mice proliferated in the presence of SEA whatever the origin of the APC. In striking contrast, cells from μMT mice exhibited no *in vitro* proliferation, either with SWAP or SEA, whatever the origin of the APC. Egg antigenic extract even induced lower levels of thymidine incorporation compared with proliferation without antigen.

At day 70 p.i. (Fig. 1C), the levels of proliferation were low in both groups of animals, regardless the antigenic stimulation or the origin of APC. In our experimental culture conditions, T cells generated in infected C57Bl/6 mice exhibited little or no proliferation to SWAP and SEA from late infection period (day 70), corresponding to the beginning of the immunomodulation of the granuloma around laid eggs. Thus, C57Bl/6 infected animals underwent the expected down-modulation of the response to SEA (comparing proliferation levels of T +/+ cells cultured with SEA at days 42 and 70). Considering μMT mice, the decrease of the SEA-induced specific response was not observed since T -/- cells exhibited a higher level of proliferation at day 70 than at day 42.

At each time point, cells from both groups of mice exhibited comparable levels of proliferation with Con A (data not shown).

### *Cytokine mRNA expression of splenic cells from *S. mansoni*-infected μMT mice and C57Bl/6 mice*

We used PCR technology to obtain insights into the cytokine

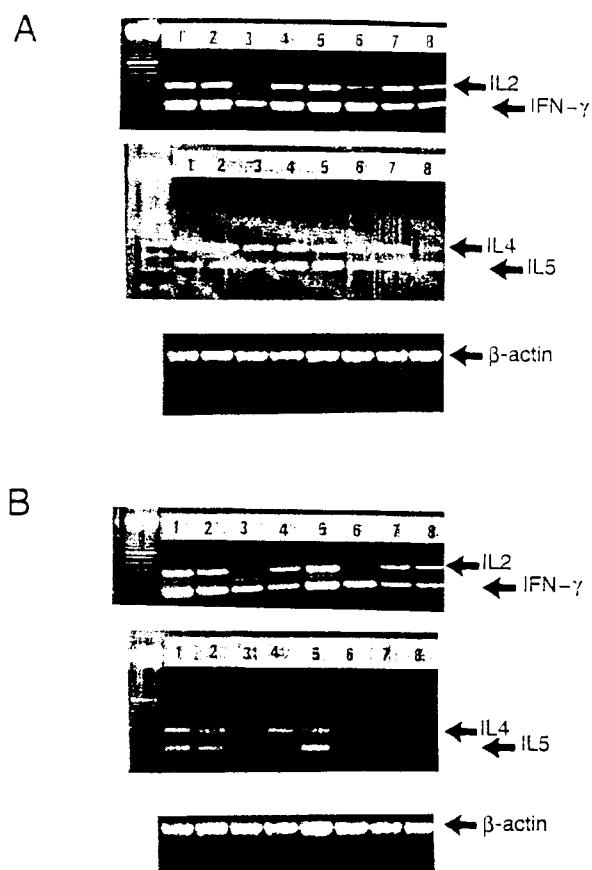


**Fig. 1.** *In vitro* proliferation assays of splenic T cells from *S. mansoni*-infected  $\mu$ MT mice ( $T^{-/-}$ ) and C57Bl/6 infected animals ( $T^{+/+}$ ) with adult worm (SWAP, ■) and eggs (SEA, ▨) parasitic antigenic extracts. Cells were cultured with antigen presenting cells (APC) from either uninfected  $\mu$ MT mice ( $APC^{-/-}$ ) or uninfected C57Bl/6 mice ( $APC^{+/+}$ ). Proliferation rates were assayed at day 28 (A), 42 (B) and 70 (C) p.i. Results are expressed as: (E-C) cpm values.

E: proliferation after antigenic stimulation, C: background proliferation without antigen. For each time point, cells were pooled from 3 mice of  $\mu$ MT or C57Bl/6 origin. Proliferation of unfractionated splenic cells was not assessed in our experiments. This experiment is representative of two independent experiments.

profiles in spleens of  $\mu$ MT and C57Bl/6 infected mice. mRNAs specific for IFN- $\gamma$ , IL-2 (for the Th1-type of profile), IL-4 and IL-5 (for the Th2-type of profile) were tested in splenic samples from control (Fig. 2A) and  $\mu$ MT mice (Fig. 2B), at days 28, 42 and 70 p.i.

At all time points tested, the IL-2/IFN- $\gamma$  profile was comparable between  $\mu$ MT and C57Bl/6 animals.



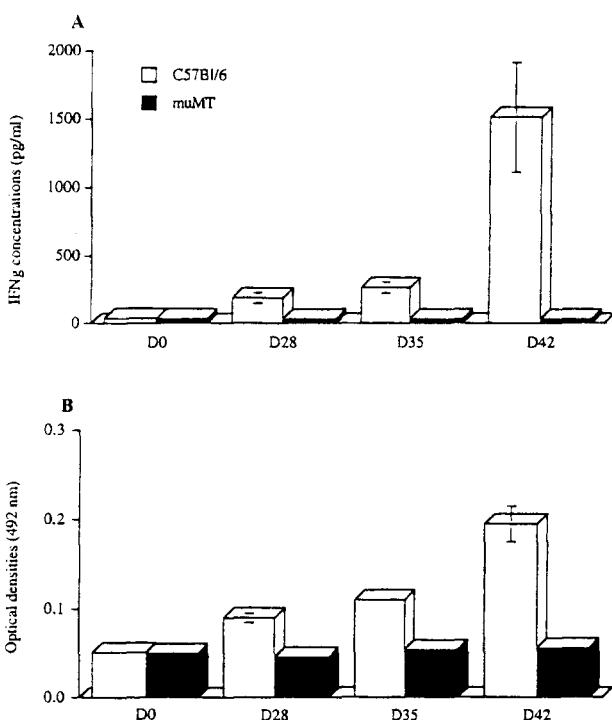
**Fig. 2.** Results of RT-PCR on splenic cells (pools of cells from 3 mice) from: (A) control mice and (B) B-cell-deficient mice at day 28, 42 and 70 postinfection. Lanes 1 and 2 correspond to day 28 p.i., lanes 3–5 to day 42 p.i., and lanes 6–8 to day 70 p.i. Lanes 1, 4 and 7: after *in vitro* presentation of the antigen to nylon wool-enriched T cells with APC<sup>+/+</sup>; lanes 2, 5 and 8: after *in vitro* presentation with APC<sup>-/-</sup>. Lanes 3 and 6: *ex vivo* analysis on total splenic cells without additional *in vitro* stimulation. SWAP was the antigen used for *in vitro* stimulation of day 28 cells and SEA was the antigen used for *in vitro* stimulation of days 42 and 70 cells. In both cases, the final concentration of the antigen was 20  $\mu$ g/ml and RNA were extracted after 48 h of culture.  $\beta$ -actin amplification of each cDNA samples was used as a positive control.

In contrast, detection of mRNA for both IL-4 and IL-5 was significantly lower in  $\mu$ MT mice. This was particularly striking for the *ex vivo* samples; namely without additional *in vitro* restimulation (lane 3 for day 42, lane 6 for day 70).

No difference was observed whether APC<sup>+/+</sup> or APC<sup>-/-</sup> were used for *in vitro* restimulations.

#### Detection of IFN- $\gamma$ and IL-4 in sera of infected mice

As shown in Fig. 3, there is a time-dependent increase of IFN- $\gamma$  and IL-4 in sera of C57Bl/6 infected mice (Fig. 3A,B, respectively). In contrast, no IFN- $\gamma$  or IL-4 is detectable in sera of infected  $\mu$ MT mice, at any of the times tested (none tested beyond day 42).



**Fig. 3.** Detection of: (A) IFN- $\gamma$  and (B) IL-4 in sera of control, infected mice (□) and B-cell deficient, infected mice (■) at days 0, 28, 35 and 42 p.i. Pooled sera (from 3 mice) were tested using specific ELISA at a dilution of 1/20. Results are expressed as pg/ml for IFN- $\gamma$  and as OD values for IL-4. The same observation was made for sera of an independent infection experiment.

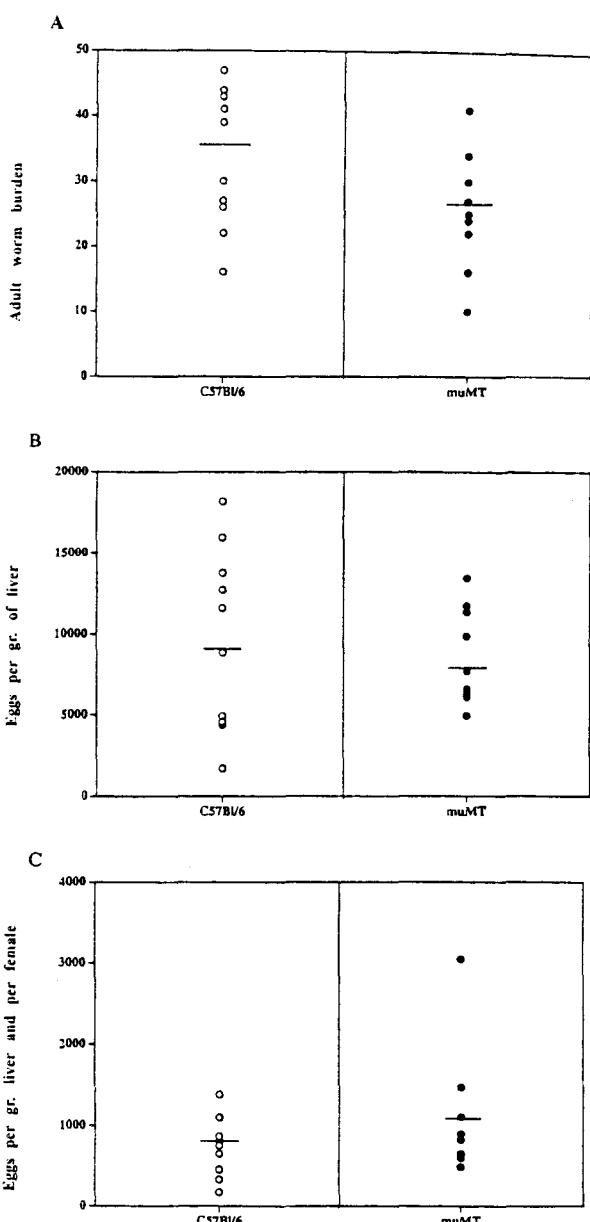
#### Intensity of infection: adult worm and egg burdens at day 42 p.i.

Mice were healthy throughout the experiments and no mice died before the day of sacrifice. At day 42, adult worms (male and female) were comparable between infected  $\mu$ MT and C57Bl/6 mice regarding their state of maturity (data not shown). In addition, there was no significant difference of the number of worms (Fig. 4A), eggs per g of liver tissue (Fig. 4B) and eggs per g of liver tissue and per female (Fig. 4C). The proportions of live and dead eggs in the liver (as observed under the microscope) were similar in both groups.

#### Hepatic pathology

Seven weeks after infection, hepatic fibrosis (assessed by determination of the collagen content) was similar in  $\mu$ MT and control mice (data not shown). Interestingly, at 10 weeks p.i. we noticed that granulomas were significantly larger in  $\mu$ MT mice (Fig. 5A), than in C56Bl/6 mice (Fig. 5B). In addition, determination of the level of collagen in livers of both groups showed that hepatic fibrosis was significantly more marked in MT mice (Fig. 5C).

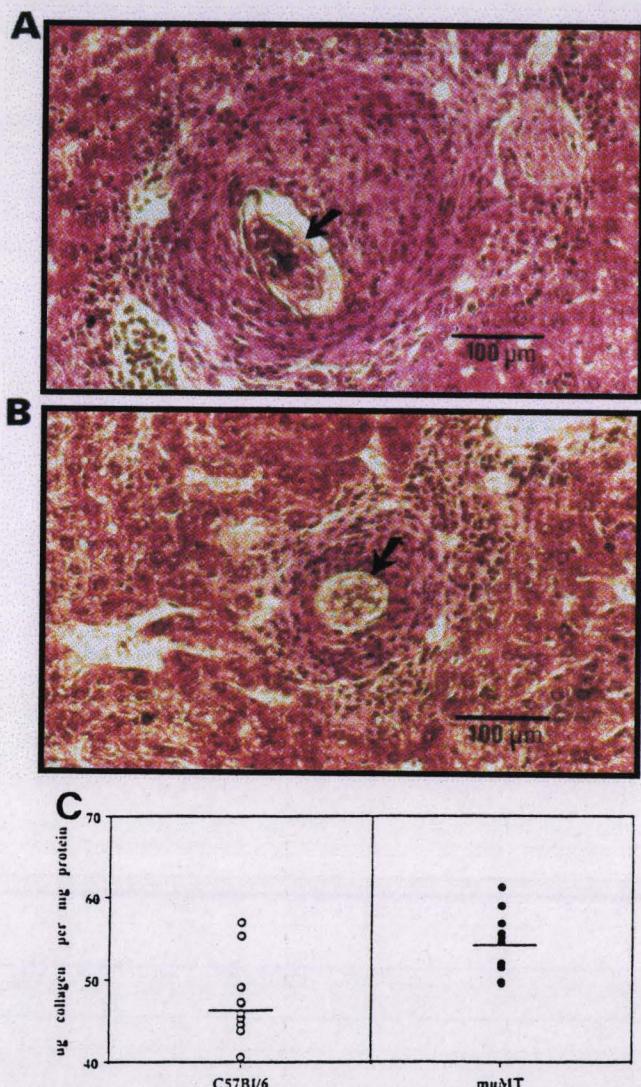
This could suggest that modulation of the late phase of the granuloma cellular reaction and the consecutive fibrosis, involved the participation of B cells either directly or indirectly.



**Fig. 4.** Determination of: (A) the total adult worm burden, (B) the number of eggs per g of infected liver, and (C) the number of eggs per g liver and per adult female, in control (○) and B-cell-deficient mice (●). Results represent each value for individual mouse.

#### DISCUSSION

In this study, we investigated the contribution of B cells to both the development and maturation of the parasite *S. mansoni* within its mammal host and to the development of the T-cellular immune response during a primary infection. Using B-cell-deficient mice ( $\mu$ MT mice [24]), we show that the absence of B cells has no effect on the development of the parasite as estimations of the adult worm and the egg burdens were comparable between  $\mu$ MT mice and controls. In addition, the maturity state of the parasites was identical, indicating that



**Fig. 5.** Staining of liver sections at day 70 postinfection in: (A) B-cell deficient and (B) control mice. Sections were stained using the haematoxylin and fuchsin reagents to visualize both the nuclei and collagen, respectively. The egg in the centre of the granulomatous reaction is indicated with an arrow. (C) The level of collagen in liver sections at day 70 postinfection in control, infected (○) and in μMT, infected (●) mice. Statistical analysis of the differences between both groups (Student's *t*-test) gave a value of high significance ( $P < 0.0023$ ). Data are presented for each individual mouse.

B cells had no effect on the migratory and/or maturation capabilities of the parasite.

From a strictly parasitological point of view, infection of B-cell-deficient mice with *S. mansoni* is completely similar to infection of B-cell-intact mice, despite the fact that the former lack circulating antischistosomal antibodies and both IL-4 and IFN- $\gamma$  for the duration of the primary infection.

In *S. mansoni* infection, delayed hypersensitivity is the predominant determinant of the granulomatous inflammation that develops around the parasite eggs [30] but there have been

repeated suggestions that immune complexes formed within granuloma are also important [18]. Our results suggest that B cells and/or antibody is not important in the initial stage of the granuloma formation at 7 weeks of infection.

There is an inverse relationship between antibody production and delayed-type hypersensitivity reaction [7, 31]. The development of divergent immune responses to antigens towards an humoral or a cellular response results from different patterns of cytokines produced by T cells [32].

In the case of *S. mansoni* infection, circulating antibodies to egg antigens (stimuli for the granuloma reaction [8]) peaked by the sixth and seventh week of the experimental infection and afterwards their titre tended to decrease remaining as a plateau up to the tenth week. Circulating antibodies to adult worm antigens showed an earlier peak, at the third or fourth week, then remained as a plateau [20]. In addition, earlier work [6] showed that during infection there is a gradual increase in the number of B cells until, in the chronic stage, the number almost reaches that of T cells. Furthermore, it was described that in a schistosome infection of athymic mice, the egg granuloma was partially mediated by B cells [33, 34]. A decrease in the granuloma size, coincident with higher levels of circulating antibodies has also been reported [10]. This strongly suggested that humoral mechanisms might be involved in the suppression of the cell-mediated immune reaction within the granuloma. In this view, the whole granulomatous structure could be seen as a very local antibody immune reaction. Our observation that the granuloma size at the tenth week of infection is not reduced in B-cell-deficient mice, compared with control mice, would greatly favour this hypothesis.

The second interpretation of our results takes into account the participation of B cells *per se*, as antigen presenting cells (APC) to T lymphocytes. To address this question experimentally, we tested T-cell proliferation *in vitro*, after antigen-specific challenge, at several time points postinfection. The results showed that the level of proliferation of T cells from μMT origin, was lower than for the C57BL/6 mice at days 28 and 42, but comparable at day 70. Moreover, when the APC used were of μMT origin, the level of proliferation was decreased (compared with APC from control mice) but never completely absent, thus indicating that there is no constitutive defect in APC function in B-cell-deficient mice. Nevertheless, irradiated μMT splenocytes used as APC, induced a lower level of proliferation of SWAP- and SEA-specific T cells of infected C57BL/6 mice (respectively at day 28 and day 70 postinfection). Thus, antigen-specific T cells are generated in B-cell-deficient mice, even if they are less efficient (this may be because specific B cells are among the most potent APC for T cells of the same specificity [35]).

The nature of the APC favouring more Th1 than Th2 is still being debated [25, 26], and no clear image has emerged. To obtain insights into the phenotype of T cells (Th1/Th2) emerging in B-cell-deficient mice, we analysed the cytokine profiles in the spleens of infected mice. Indeed, current information suggests that egg antigens released in the early schistosomal infection lead to the sensitization of both Th1- and Th2-type

responses. As the Th1 response fades, the significantly down-sized granuloma formation persists. Thus, the early Th1-type response appears to be critical in launching vigorous egg granuloma formation, where its subsequent decline offers a possible explanation for the down-regulation of egg-associated pathology and for the dominant Th2-type responses in the evolving disease [36].

In this work, we were able to demonstrate that fewer cytokines of the Th2 type were present in the spleens of  $\mu$ MT mice, especially late in infection and this was associated with larger granulomas and higher levels of hepatic collagen. With regards to T-cell subsets within the granuloma itself, our results could be interpreted by differential local priming of T cells. It would, therefore, be interesting to test the specificity (proliferation and cytokine production) of T lymphocytes within the granuloma itself, in  $\mu$ MT infected mice. Indeed, the basis of immunoregulation of granuloma has been partly attributed to T lymphocytes, or factors thereof, exhibiting a suppressor activity [37]. One could hypothesize that, because of the lack of B cells in the granuloma, this regulating population cannot emerge properly. Another explanation would be that Th2-type of T lymphocytes can not develop efficiently in B-cell-deficient mice, thus leading to an absence, or a delay, in Th1 down-regulation, and to a lack of granuloma size reduction at 10 weeks postinfection.

A third interpretation of our data, would be to consider that B220 positive cells (mainly B cells) are a major source of IL-10 in *S. mansoni*-infected mice [38]. IL-10 plays a role in the anergy of Th1 cells mediating the vigorous granulomatous response of acute stage schistosomiasis [39]. In B-cell-deficient mice, which lack this particularly potent source of IL-10, and in which our results show a reduction in type 2 cytokines, there would not be an efficient down-regulation of Th1 cells.

In conclusion, the results presented here provide evidence that B cells could participate in the fine regulation of the granulomatous reaction surrounding the parasite eggs. A previous report on MT mice injected with *S. mansoni* eggs, showed no difference in the development of egg granulomas in lungs [40]. Combined with our observations it could show that the regulatory influence of B cells on the modulation of the egg granuloma needs the immune response developing during an infection.

Of note is a study similar to ours conducted in JHD B-cell-deficient mice [41]. Those mice display a clear difference in Th1 and Th2 cytokine responses in mesenteric lymph nodes and, by contrast to the  $\mu$ MT, develop normal egg granulomas. Contrasting results between those models have also been reported when analysing the participation of B cells in the *in vivo* generation of T cells [40, 42]. The reason for this is not known, but it may be attributable to the knocked-out loci ( $\mu$ MT have intact variable heavy chain loci, while JHD have not) leading to as yet unidentified differences between B-cell minus mice, or to dissimilar experimental protocols.

Taken together, our results in the  $\mu$ MT B-cell-deficient mice, provided evidence that B cells are not essential for the development of the general immune response towards *S. mansoni*, in mouse. Nevertheless and interestingly, it showed that the cellular

response is somehow affected, and that B cells participate in the late regulation of the egg granulomatous reaction in the liver. Whether this is through their secretions (antibodies, cytokines), or because they favour the development of certain T-cell subsets involved in this regulation, is an open question. Our results, however, underline the potential role that B cells could play in the regulation of the immune reaction which is the most deleterious for the *S. mansoni* infected host: the granuloma.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs R. Pierce, P. Sutton and F. Trottein for stimulating discussions and critical reading of the manuscript. We greatly appreciated the assistance of E. Fleurbaix, M. Leroux, J.-M. Merchez and S. Vanwingene. The help of J.-L. Neyrinck for statistical studies on our experimental data, was greatly estimated.

## REFERENCES

- 1 Kagan IG. Serologic diagnosis of schistosomiasis. Bull New York Acad Med 1968;44:262-77.
- 2 Maddison SE, Norman L, Geiger SJ, Kagan IG. *Schistosoma mansoni* infection in the rat. I. Worm burden and serological response in infected, re-exposed and antigen-sensitized animals. J Parasitol 1970;56:1058-65.
- 3 Smithers SR, Terry RJ. Acquired resistance to experimental infections of *S. mansoni* in the albino rat. Parasitology 1965;55:711-17.
- 4 Capron A, Dessaint JP, Capron M, Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. Nature 1975;131:474-6.
- 5 Grzych J-M, Grezel D, Xu CB, Neyrinck J-L, Capron M, Ouma JH, Butterworth AE, Capron A. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. J Immunol 1993;150:527-35.
- 6 Boros DL, Warren KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J Exp Med 1970;13:488-507.
- 7 Parish CR. Immune response to chemically modified flagellin. II. Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity. J Exp Med 1971;134:21-47.
- 8 Grzych J-M, Pearce EJ, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. J Immunol 1991;146:1322-7.
- 9 Kullberg MC, Pearce EJ, Heiny S, Sher A, Berzofsky JA. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. J Immunol 1992;148:3264-70.
- 10 Boros DL, Pelley RP, Warren KS. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. J Immunol 1975;114:1437-41.
- 11 Stadeker MJ, Kamisato JK, Chikunguwo SM.. (1990). Induction of T helper cell unresponsiveness to antigen by macrophages from schistosomal egg granulomas. A basis for immunomodulation in schistosomiasis? J Immunol 1990;145:2697-700.
- 12 Bout D, Rousseaux R, Carlier Y, Capron A. Kinetics of classes and subclasses of total immunoglobulins and specific antibodies to

- Schistosoma mansoni* during murine infection. Parasitology 1980; 80:247–56.
- 13 Sher A, Smithers SR, MacKenzie P. Passive transfer of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in laboratory mice. Parasitology 1975;70:347–57.
  - 14 Smithers SR. Immunity to trematode infections with special reference to schistosomiasis and fascioliasis. In Cohen S, Sadun E, eds. Immunology of Parasitic Infections. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1976:296–232.
  - 15 Sher A. Immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Am J Trop Med Hyg 1977;26:20–7.
  - 16 Crowle AJ, Hu CC. Inhibition of the development of delayed hypersensitivity by treatment with antiserum. J Immunol 1965;94: 555–62.
  - 17 Amiri P, Haak-Fredenscho M, Robbins K, MacKerrow JH, Stewart T, Jardieu P. Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni*-infected normal and interferon- $\gamma$  knockout mice. J Exp Med 1994;180:43–51.
  - 18 El-Sherif AK, Befus D. Predominance of IgA deposits in glomeruli of *Schistosoma mansoni*-infected mice. Clin Exp Immunol 1988;71:39–44.
  - 19 Chensue SW, Boros DL. Population dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation and granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg 1979; 28:291–9.
  - 20 De Britto T, Hoshino-Shimizu S, DaSilva LC, Kanamura H, Costa CM, Pinto PS. Immunopathology of experimental schistosome (*S. mansoni*) egg granulomas in mice—possible defence mechanisms mediated by local immune complexes. J Pathol 1983;140:17–28.
  - 21 Maddison SE, Slemenda SB, Chandler FW, Kagan IG. *Schistosoma mansoni* infection in intact and B-cell deficient mice: the effect of pretreatment with BCG in these experimental models. Am J Trop Med Hyg 1978;27:966–75.
  - 22 Maddison SE, Slemenda SB, Chandler FW. Acquired immunity in B-cell-deficient mice to challenge exposure following primary infection with *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg 1981; 30:609–15.
  - 23 Koller BH, Smithies O. Altering genes in animals by gene targeting. Ann Rev Immunol 1992;10:705–30.
  - 24 Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K. A B-cell deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. Nature 1991;350:423–6.
  - 25 Kim KJ, Rollwagen F, Assofsky R, Lefkovits I. The abnormal function of T cells in chronically anti-mu-treated mice with no mature B cells. Eur J Immunol 1984;14:476–482.
  - 26 Fuchs EJ, Matzinger P. B cells turn off virgin but not memory T cells. Science 1992;258:1156–9.
  - 27 Smithers SR, Terry RJ. Immunity in schistosomiasis. Ann NY Acad Sci 1969;160:826–40.
  - 28 Lopez De Leon A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. J Histochem Cytochem 1985;33:737–43.
  - 29 Wolowczuk I, Delacre M, Roye O, Giannini SL, Auriault C. IL-7 in the skin of *Schistosoma mansoni* infected mice is associated with a decrease in interferon- $\gamma$  production and leads to a clinical aggravation of the disease. Immunology 1997;91:35–44.
  - 30 Warren KS, Domingo ES, Cowan RBT. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol 1967;51:735–48.
  - 31 Mackaness GB, Lagrange PH, Miller TE, Ishibashi T. Feedback inhibition of specifically sensitized lymphocytes. J Exp Med 1974;139:543–59.
  - 32 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986;136:2348–57.
  - 33 Cheever AW, Byram JE, Von Lichtenberg F. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* infection in athymic mice. Parasite Immunol 1985;7:387–98.
  - 34 Cheever AW, Duvall RH, Hallack TA. Differences in hepatic fibrosis and granuloma size in several strains of mice infected with *Schistosoma japonicum*. Am J Trop Med Hyg 1984;33:602–7.
  - 35 Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by Haptenspecific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. J Exp Med 1984;160:1102–13.
  - 36 Pearce EJ, Caspar P, Grzych J-M, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med 1991;173:159–66.
  - 37 Colley DG. T lymphocytes that contribute to the immunoregulation of granuloma formation in chronic murine schistosomiasis. J Immunol 1981;126:1465–68.
  - 38 Velupillai P, Harn D. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:18–22.
  - 39 Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol 1991;146: 3444–51.
  - 40 Epstein MM, Di Rosa F, Jankovic D, Sher A, Matzinger P. Successful T cell priming in B-cell deficient mice. J Exp Med 1995; 182:915–22.
  - 41 Hernandez HJ, Wang Y, Stadecker MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. J Immunol 1997;158:4832–7.
  - 42 Liu Y, Wu Y, Ramarathnam L, Guo Y, Huszar D, Trounstein M, Zhao M. Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response. Int Immunol 1995;7:1353–62.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ahsan M. K., Urano Y., Kato S., Oura H. and Arase S.** 1998. Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin. *J Med Invest.* 44; 179-84.
- Albanesi C., Cavani A. and Girolomoni G.** 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.* 162; 494-502.
- Alderson M. R., Tough T. W., Ziegler S. F. and Grabstein K. H.** 1991. Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med.* 173; 923-30.
- Alferink J., Tafuri A., Vestweber D., Hallmann R., Hammerling G. J. and Arnold B.** 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science.* 282; 1338-41.
- Allison J. P. and Havran W. L.** 1991. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol.* 9; 679-705.
- Anderson S., Shires V. L., Wilson R. A. and Mountford A. P.** 1998. In the absence of IL-12, the induction of Th1-mediated protective immunity by the attenuated schistosome vaccine is impaired, revealing an alternative pathway with Th2-type characteristics. *Eur J Immunol.* 28; 2827-38.
- Ansel J. C., Brown J. R., Payan D. G. and Brown M. A.** 1993. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 150; 4478-85.

- Appasamy P. M.** 1992. IL 7-induced T cell receptor-gamma gene expression by pre-T cells in murine fetal liver cultures. *J Immunol.* 149; 1649-56.
- Appasamy P. M.** 1993. Interleukin-7: biology and potential clinical applications. *Cancer Invest.* 11; 487-99.
- Aragane Y., Schwarz A., Luger T. A., Ariizumi K., Takashima A. and Schwarz T.** 1997. Ultraviolet light suppresses IFN-gamma-induced IL-7 gene expression in murine keratinocytes by interfering with IFN regulatory factors. *J Immunol.* 158; 5393-9.
- Ariizumi K., Meng Y., Bergstresser P. R. and Takashima A.** 1995. IFN-gamma-dependent IL-7 gene regulation in keratinocytes. *J Immunol.* 154; 6031-9.
- Armitage R. J., Ziegler S., Beckman M. P., Idzerda R. J., Park L. S. and Fanslow W. C.** 1991. Expression of receptors for interleukin-4 and interleukin-7 on human T-cells.
- Armour J. and Bruce R. G.** 1974. Inhibited development in Ostertagia ostertagi infections--a diapause phenomenon in a nematode. *Parasitology.* 69; 161-74.
- Arzt E., Paez Pereda M., Costas M., Sauer J., Renner U., Holsboer F. and Stalla G. K.** 1998. Cytokine expression and molecular mechanisms of their auto/paracrine regulation of anterior pituitary function and growth. *Ann N Y Acad Sci.* 840; 525-31.
- Asadullah K., Haeussler A., Friedrich M., Siegling A., Olaizola-Horn S., Trefzer U., Volk H. D. and Sterry W.** 1996. IL-7 mRNA is not overexpressed in mycosis fungoides and pleomorphic T- cell lymphoma and is unlikely to be an autocrine growth factor in vivo. *Arch Dermatol Res.* 289; 9-13.
- Asarnow D. M., Kuziel W. A., Bonyhadi M., Tigelaar R. E., Tucker P. W. and Allison J. P.** 1988. Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell.* 55; 837-47.



- Attallah A. M., Lewis F. A., Urritia S. A., Folks T. and Yeatman T. J. 1980. Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of Schistosoma mansoni infection. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 63; 351-4.
- Bagot M., Charue D., Boulland M. L., Gaulard P., Revuz J., Schmitt C. and Wechsler J. 1996. Interleukin-7 receptor expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol.* 135; 572-5.
- Baillet J. and Nortier E. 1992. Précis de physiologie humaine.
- Bancroft G. J., Bosma M. J., Bosma G. C. and Unanue E. R. 1986. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. *J Immunol.* 137; 4-9.
- Bancroft G. J., Kelly J. P. and McDonald V. 1994. Models of innate immunity and opportunistic infection in the SCID mouse. *Res Immunol.* 145; 344-7.
- Banga S. S., Hall K. T., Sandhu A. K., Weaver D. T. and Athwal R. S. 1994. Complementation of V(D)J recombination defect and X-ray sensitivity of scid mouse cells by human chromosome 8. *Mutat Res.* 315; 239-47.
- Barker J. N., Allen M. H. and MacDonald D. M. 1990. Alterations induced in normal human skin by in vivo interferon-gamma. *Br J Dermatol.* 122; 451-8.
- Bartosik J. 1992. Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 99; 53-8.
- Basham T. Y., Nickoloff B. J., Merigan T. C. and Morhenn V. B. 1985. Recombinant gamma interferon differentially regulates class II antigen expression and biosynthesis on cultured normal human keratinocytes. *J Interferon Res.* 5; 23-32.

- Batard M. L. and Wolowczuk I.** 1998. Infection du rat par le parasite *Schistosoma mansoni* : Effets de l'interleukine-7. *D.E.A de parasitologie, Université de Lille II.*
- Berger P. J.** 1966. Eleven-month "embryonic diapause" IN A MARSUPIAL. *Nature*. 211; 435-6.
- Bergstresser P. R., Cruz P. D., Jr. and Takashima A.** 1993. Dendritic epidermal T cells: lessons from mice for humans. *J Invest Dermatol*. 100; 80S-83S.
- Bergstresser P. R., Tigelaar R. E., Dees J. H. and Streilein J. W.** 1983. Thy-1 antigen-bearing dendritic cells populate murine epidermis. *J Invest Dermatol*. 81; 286-8.
- Borger P., Kauffman H. F., Postma D. S. and Vellenga E.** 1996. IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol*. 156; 1333-8.
- Boros D. L.** 1989. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microb Rev*. 2; 250-269.
- Bos J. D.** 1997. The skin as an organ of immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 107; 3-5.
- Bos J. D., de B. O., Tibosch E., Das P. K. and Pals S. T.** 1993. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res*. 285; 179-83.
- Bos J. D. and Kapsenberg M. L.** 1986. The skin immune system (SIS): its cellular constituents and their interactions. *Immunol. Today*. 7; 235.
- Bos J. D., Zonneveld I. and Das P. K.** 1987. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J. Invest. Dermatol*. 88; 569-573.
- Bosma G. C., Custer R. P. and Bosma M. J.** 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 301; 527-530.

- Bucana C. D., Munn C. G.,**
- Song M. J., Dunner K. J. and Kripke M.**
- L. 1992. Internalization of Ia molecules into Birbeck granule-like structures in murine dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 99; 365-73.
- Butterworth A. E., Sturrock R.**
- F., Houba V., Mahmoud A. A., Sher A.**
- and Rees P. H.** 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature.* 256; 727-9.
- Bossu M.** 1999. Développement du parasite *Schistosoma mansoni* chez des souris modifiées pour la fonction thyroïdienne : relations avec l'IL-7. *D.E.A sciences de la vie et de la santé.*
- Broder S., Edelson R. L.,**
- Lutzner M. A., Nelson D. L.,**
- MacDermott R. P., Durm M. E.,**
- Goldman C. K., Meade B. D. and**
- Waldmann T. A.** 1976. The Sezary syndrome: a malignant proliferation of helper T cells. *J Clin Invest.* 58; 1297-306.
- Brouet J. C., Flandrin G. and**
- Seligmann M.** 1973. Indications of the thymus-derived nature of the proliferating cells in six patients with Sezary's syndrome. *N Engl J Med.* 289; 341-4.
- Butterworth A. E., Vadas M. A.,**
- Martz E. and Sher A.** 1979a. Cytolytic T lymphocytes recognize alloantigens on schistosomula of *Schistosoma mansoni*, but fail to induce damage. *J Immunol.* 122; 1314-21.
- Butterworth A. E., Wassom D.**
- L., Gleich G. J., Loegering D. A. and**
- David J. R.** 1979b. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J Immunol.* 122; 221-9.
- Byram J. E. and von**
- Lichtenberg F.** 1977. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am J Trop Med Hyg.* 26; 944-56.

- C**andinas D., Belliveau S., Koyamada N., Miyatake T., Hechenleitner P., Mark W., Bach F. H. and Hancock W. W. 1996. T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation*. 62; 1920-7.
- Capron A., Capron M. and Dessaint J. P.** 1980a. ADCC as primary mechanisms of defence against metazoan parasites.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M. and Bazin H.** 1975. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*. 253; 474-5.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Joseph M., Ameisen J. C. and Tonnel A. B.** 1986. From parasites to allergy: the second receptor for IgE (FC $\epsilon$ RII). *Immunology Today*. 7; 15-18.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Joseph M. and Pestel J.** 1980b. Role of anaphylactic antibodies in immunity to schistosomes. *Am J Trop Med Hyg*. 29; 849-57.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Ouma J. H. and Butterworth A. E.** 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science*. 238; 1065-72.
- Capron M., Bazin H., Joseph M. and Capron A.** 1981. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J Immunol*. 126; 1764-8.
- Capron M., Nogueira Q. J., Papin J. P. and Capron A.** 1984a. Interactions between eosinophils and antibodies: in vivo protective role against rat schistosomiasis. *Cell Immunol*. 83; 60-72.
- Capron M., Spiegelberg H. L., Prin L., Bennich H., Butterworth A. E., Pierce R. J., Ouassis M. A. and Capron A.** 1984b. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J Immunol*. 132; 462-8.

- Carini C. and Fratazzi C.** 1996. CD23 expression in activated human T cells is enhanced by interleukin-7. *Int Arch Allergy Immunol.* 110; 23-30.
- Castellino F., Zhong G. and Germain R. N.** 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol.* 54; 159-69.
- Caughman S. W., Li L. J. and Degitz K.** 1992. Human intercellular adhesion molecule-1 gene and its expression in the skin. *J Invest Dermatol.* 61S-65S.
- Caux C., Dezutter D. C., Schmitt D. and Banchereau J.** 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 360; 258-61.
- Cesbron J. Y., Agut H., Gosselin B., Candotti D., Raphael M., Puech F., Grandadam M., Debre P., Capron A. and Autran B.** 1994. SCID-Hu mouse as a model for human lung HIV-1 infection. *C R Acad Sci III.* 317; 669-74.
- Cesbron J. Y., Leblond V. and Delhem N.** 1998. The SCID mouse mutant: Definition, and potential use as a model for immune disorders.
- Chazen G. D., Pereira G. M., LeGros G., Gillis S. and Shevach E. M.** 1989. Interleukin 7 is a T-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86; 5923-7.
- Cheever A. W., Williams M. E., Wynn T. A., Finkelman F. D., Seder R. A., Cox T. M., Hieny S., Caspar P. and Sher A.** 1994. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J Immunol.* 153; 753-9.
- Chensue S. W., Ruth J. H., Warmington K., Lincoln P. and Kunkel S. L.** 1995a. In vivo regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation. *J Immunol.* 155; 3546-51.

- Chensue S. W., Terebuh P. D., Warmington K. S., Hershey S. D., Evanoff H. L., Kunkel S. L. and Higashi G. I.** 1992. Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *J Immunol.* 148; 900-6.
- Chensue S. W., Warmington K., Ruth J., Lincoln P., Kuo M. C. and Kunkel S. L.** 1994a. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am J Pathol.* 145; 1105-13.
- Chensue S. W., Warmington K. S., Ruth J., Lincoln P. M. and Kunkel S. L.** 1994b. Cross-regulatory role of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and IL-10 in schistosome egg granuloma formation: in vivo regulation of Th activity and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 98; 395-400.
- Chensue S. W., Warmington K. S., Ruth J. H., Lincoln P. and Kunkel S. L.** 1995b. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of IFN-gamma, IL-10, and TNF. *J Immunol.* 154; 5969-76.
- Chiaramonte M. G., Donaldson D. D., Cheever A. W. and Wynn T. A.** 1999a. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response [In Process Citation]. *J Clin Invest.* 104; 777-85.
- Chiaramonte M. G., Schopf L. R., Neben T. Y., Cheever A. W., Donaldson D. D. and Wynn T. A.** 1999b. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol.* 162; 920-30.

- Chikunguwo S. M., Kanazawa T., Dayal Y. and Stadecker M. J.** 1991. The cell-mediated response to schistosomal antigens at the clonal level. In vivo functions of cloned murine egg antigen-specific CD4+ T helper type 1 lymphocytes. *J Immunol.* 147; 3921-5.
- Chirico J.** 1994. Prehibernating *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae)--an overwintering host for parasitic nematodes. *Vet Parasitol.* 52; 279-84.
- Chu A. C., Patterson J. A., Goldstein G., Berger C. L., Takezaki S. and Edelson R. L.** 1983. Thymopoietin-like substance in human skin. *J Invest Dermatol.* 81; 194-7.
- Clegg J. A. and Smithers S. R.** 1972. The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation in vitro. *Int J Parasitol.* 2; 79-98.
- Coffman R. L., Seymour B. W., Lebman D. A., Hiraki D. D., Christiansen J. A., Shrader B., Cherwinski H. M., Savelkoul H. F., Finkelman F. D., Bond M. W. and et al.** 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev.* 102; 5-28.
- Colley D. G., Magalhaes-Filho A. and Coelho R. B.** 1972. Immunopathology of dermal reactions induced by *Schistosoma mansoni* cercariae and cercarial extract. *Am J Trop Med Hyg.* 21; 558-68.
- Combes C.** 1995. Interactions durables : Ecologie et évolution du parasitisme. Masson.
- Constantinescu C. S., Hondowicz B. D., Elloso M. M., Wysocka M., Trinchieri G. and Scott P.** 1998. The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 28; 2227-33.

- Costello R., Brailly H., Mallet F., Mawas C. and Olive D.** 1993. Interleukin-7 is a potent co-stimulus of the adhesion pathway involving CD2 and CD28 molecules. *Immunology*. 80; 451-7.
- Costello R. T., Mallet F., Chambost H., Sainty D., Gastaut J. A. and Olive D.** 1999. Differential modulation of immune recognition molecules by interleukin-7 in human acute leukaemias. *Eur Cytokine Netw.* 10; 87-96.
- Cumberbatch M., Dearman R. J. and Kimber I.** 1997. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology*. 92; 388-95.
- Custer R. P., Bosma G. C. and Bosma M. J.** 1985. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol.* 120; 464-77.
- Czernielewski J. M. and Demarchez M.** 1987. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 88; 17-20.
- Czitrom A. A., Edwards S., Phillips R. A., Bosma M. J., Marrack P. and Kappler J. W.** 1985. The function of antigen-presenting cells in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 134; 2276-80.
- Dalloul A., Laroche L., Bagot M., Mossalayi M. D., Fourcade C., Thacker D. J., Hogge D. E., Merle-Beral H., Debre P. and Schmitt C.** 1992. Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest.* 90; 1054-60.
- Damian R. T.** 1984. Immunity in schistosomiasis: a holistic view. *Contemp Top Immunobiol.* 12; 359-420.
- Dardenne M. and Savino W.** 1996. Interdependence of the endocrine and immune systems. *Adv Neuroimmunol.* 6; 297-307.
- Das P. K.** 1988. Immune response in mycobacterioses related to dermatoses.
- Dawkins R.** 1982. The extended phenotype.

- Delespesse G., Sarfati M., Hofstetter H., Suter U., Nakajima T., Peleman R., Letellier M., Kilchherr E. and Frost H.** 1988. Structure, function and clinical relevance of the low affinity receptor for IgE. *Immunol Invest.* 17; 363-87.
- Delhem N., Hadida F., Gorochov G., Carpentier F., de Cavel J. P., Andreani J. F., Autran B. and Cesbron J. Y.** 1998. Primary Th1 cell immunization against HIVgp160 in SCID-hu mice coengrafted with peripheral blood lymphocytes and skin. *J Immunol.* 161; 2060-9.
- Demoulin J. B. and Renaud J. C.** 1998. Signalling by cytokines interacting with the interleukin-2 receptor gamma chain. *Cytokines Cell Mol Ther.* 4; 243-56.
- Di Santo J. P., Kuhn R. and Muller W.** 1995. Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol Rev.* 148; 19-34.
- Didierjean L. and Saurat J. H.** 1980. Epidermis and thymus. Similar antigenic properties in Hassall's corpuscle and subsets of keratinocytes. *Clin Exp Dermatol.* 5; 395-404.
- Dorshkind K., Keller G. M., Phillips R. A., Miller R. G., Bosma G. C., O'Toole M. and Bosma M. J.** 1984. Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease. *J Immunol.* 132; 1804-8.
- Edelson R. L. and Fink J. M.** 1985. The immunologic function of skin. *Sci Am.* 252; 46-53.
- Eedy D. J.** 1993. Neuropeptides in skin. *Br J Dermatol.* 128; 597-605.
- Egan C. L., Viglione S. M., Walsh L. J., Green B., Trojanowski J. Q., Whitaker M. D. and Murphy G. F.** 1998. Characterization of unmyelinated axons uniting epidermal and dermal immune cells in primate and murine skin. *J Cutan Pathol.* 25; 20-9.

**Era T., Ogawa M., Nishikawa S., Okamoto M., Honjo T., Akagi K., Miyazaki J. and Yamamura K.** 1991. Differentiation of growth signal requirement of B lymphocyte precursor is directed by expression of immunoglobulin. *Embo J.* 10; 337-42.

**Estaquier J., Marguerite M., Sahuc F., Bessis N., Auriault C. and Ameisen J. C.** 1997. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine Schistosoma mansoni parasite infection. *Eur Cytokine Netw.* 8; 153-60.

**Fahlman C., Blomhoff H. K., Veiby O. P., McNiece I. K. and Jacobsen S. E.** 1994. Stem cell factor and interleukin-7 synergize to enhance early myelopoiesis in vitro. *Blood.* 84; 1450-6.

**Falcone F. H., Dahinden C. A., Gibbs B. F., Noll T., Amon U., Hebestreit H., Abrahamsen O., Klaucke J., Schlaak M. and Haas H.** 1996. Human basophils release interleukin-4 after stimulation with Schistosoma mansoni egg antigen. *Eur J Immunol.* 26; 1147-55.

**Fallon P. G., Smith P. and Dunne D. W.** 1998. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute Schistosoma mansoni infection. *Eur J Immunol.* 28; 1408-16.

**Fernandez B. R., Wynn T. A., Hieny S., Caspar P., Chilton P. M. and Sher A.** 1995. Linked in vivo expression of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-4 in murine schistosomiasis. *Eur J Immunol.* 25; 649-56.

**Foss F. M., Koc Y., Stetler-Stevenson M. A., Nguyen D. T., O'Brien M. C., Turner R. and Sausville E. A.** 1994. Costimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells by interleukin-7 and interleukin-2: potential autocrine or paracrine effectors in the Sezary syndrome. *J Clin Oncol.* 12; 326-35.

**Foster C. A., Yokozeki H., Rappersberger K., Koning F., Volc P. B., Rieger A., Coligan J. E., Wolff K. and Stingl G.** 1990. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med.* 171; 997-1013.

- Foster M., Montecino-Rodriguez E., Clark R. and Dorshkind K.** 1998. Regulation of B and T cell development by anterior pituitary hormones. *Cell Mol Life Sci.* 54; 1076-82.
- Fraissinette A. d., Staquet M. J., Dezutter D. C., Schmitt D. and Thivolet J.** 1988. Langerhans cells in S-phase in normal skin detected by simultaneous analysis of cell surface antigen and BrdU incorporation. *J Invest Dermatol.* 91; 603-5.
- Fratazzi C. and Carini C.** 1996. Interleukin-7 modulates intracytoplasmatic CD23 production and induces adhesion molecule expression and adhesiveness in activated CD4+CD23+ T cell subsets. *Clin Immunol Immunopathol.* 81; 261-70.
- Fratazzi C. and Carini C.** 1997a. Interleukin-7 modulates CD23 and HLA-DR expression on CD4+ T cells and promotes a Th-2 type cytokine profile. *Allergol Immunopathol (Madr).* 25; 189-98.
- Fratazzi C. and Carini C.** 1997b. A new role for interleukin-7 in the induction of LFA-1 and VLA-4 adhesion molecules in Phorbol 12myristate 13acetate activated CD4+ CD23+ T-cell subset. *Clin Exp Allergy.* 27; 1335-43.
- Fratazzi C., Guerriero M. and Carini C.** 1997c. Interleukin 7 and sCD23 synergize in the induction of human T cell activation in HIV-1-infected subjects. *Int Arch Allergy Immunol.* 114; 120-9.
- Friend S. L., Hosier S., Nelson A., Foxworthe D., Williams D. E. and Farr A.** 1994. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol.* 22; 321-8.
- Fuhlbrigge R. C., Kieffer J. D., Armerding D. and Kupper T. S.** 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature.* 389; 978-81.

- Gajewski T. F., Pinnas M., Wong T. and Fitch F. W.** 1991. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol.* 146; 1750-8.
- Gawkrodger D. J., Carr M. M., McVittie E., Guy K. and Hunter J. A.** 1987. Keratinocyte expression of MHC class II antigens in allergic sensitization and challenge reactions and in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 88; 11-6.
- Gazzinelli R. T., Oswald I. P., James S. L. and Sher A.** 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. *J Immunol.* 148; 1792-6.
- Germann T., Gately M. K., Schoenhaut D. S., Lohoff M., Mattner F., Fischer S., Jin S. C., Schmitt E. and Rude E.** 1993. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol.* 23; 1762-70.
- Gessner A., Vieth M., Will A., Schroppel K. and Rollinghoff M.** 1993. Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Infect Immun.* 61; 4008-12.
- Gessner A., Will A., Vieth M., Schroppel K. and Rollinghoff M.** 1995. Stimulation of B-cell lymphopoiesis by interleukin-7 leads to aggravation of murine leishmaniasis. *Immunology.* 84; 416-22.
- Golvan Y.** 1974. Eléments de parasitologie médicale. Paris.
- Goodman R. E., Nestle F., Naidu Y. M., Green J. M., Thompson C. B., Nickoloff B. J. and Turka L. A.** 1994. Keratinocyte-derived T cell costimulation induces preferential production of IL-2 and IL-4 but not IFN- $\gamma$ . *J Immunol.* 152; 5189-98.
- Goodwin R. G., Friend D., Ziegler S. F., Jerzy R., Falk B. A., Gimpel S., Cosman D., Dower S. K., March C. J., Namen A. E. and et al.** 1990. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 60; 941-51.

**Goodwin R. G. and Namen A. E.**  
1989. The cloning and characterization of interleukin-7. *Year Immunol.* 6; 127-39.

**Grabstein K. H., Namen A. E., Shanebeck K., Voice R. F., Reed S. G. and Widmer M. B.** 1990. Regulation of T cell proliferation by IL-7. *J Immunol.* 144; 3015-20.

**Grzych J. M., Capron M., Bazin H. and Capron A.** 1982a. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J Immunol.* 129; 2739-43.

**Grzych J. M., Capron M., Bazin H. and Capron A.** 1982b. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-S. mansoni antibodies. *J Immunol.* 129; 2739-43.

**Grzych J. M., Pearce E., Cheever A., Caulada Z. A., Caspar P., Heiny S., Lewis F. and Sher A.** 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol.* 146; 1322-7.

**Havran W. L., Grell S., Duwe G., Kimura J., Wilson A., Kruisbeek A. M., O'Brien R. L., Born W., Tigelaar R. E. and Allison J. P.** 1989a. Limited diversity of T-cell receptor gamma-chain expression of murine Thy-1+ dendritic epidermal cells revealed by V gamma 3-specific monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86; 4185-9.

**Havran W. L., Poenie M., Tigelaar R. E., Tsien R. Y. and Allison J. P.** 1989b. Phenotypic and functional analysis of gamma delta T cell receptor-positive murine dendritic epidermal clones. *J Immunol.* 142; 1422-8.

**He Y. W. and Malek T. R.** 1996. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med.* 184; 289-93.

**He Y. W. and Malek T. R.** 1998. The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis. *Crit Rev Immunol.* 18; 503-24.

- Henderson G. S., Conary J. T., Summar M., McCurley T. L. and Colley D. G.** 1991. In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. I. IL-4 mRNA, not IL-2 mRNA, is abundant in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens of infected mice. *J Immunol.* 147; 992-7.
- Henderson G. S., Lu X., McCurley T. L. and Colley D. G.** 1992. In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. II. Quantification of IL-4 mRNA, IFN-gamma mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. *J Immunol.* 148; 2261-9.
- Herbelin A.** 1996. Les cytokines. Interleukine-7. Masson. Paris.
- Hernandez C. T., Martinez E. M., Sancho D., Rubio G. and Aparicio P.** 1995. Interleukin-7 rescues human activated T lymphocytes from apoptosis induced by glucocorticosteroids and regulates bcl-2 and CD25 expression. *Hum Immunol.* 43; 181-9.
- Heufler C., Topar G., Grasseger A., Stanzl U., Koch F., Romani N., Namen A. E. and Schuler G.** 1993. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med.* 178; 1109-14.
- Hoefsmit E. C., Duijvestijn A. M. and Kamperdijk E. W.** 1982. Relation between langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. *Immunobiology.* 161; 255-65.
- Hoerauf A., Solbach W., Rollinghoff M. and Gessner A.** 1995. Effect of IL-7 treatment on *Leishmania* major-infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. *Int Immunol.* 7; 1879-84.

- Hoffmann K. F., Caspar P., Cheever A. W. and Wynn T. A.** 1998. IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J Immunol.* 161; 4201-10.
- Hoffmann-Fezer G., Kranz B., Gall C. and Thierfelder S.** 1992. Peritoneal sanctuary for human lymphopoiesis in SCID mice injected with human peripheral blood lymphocytes from Epstein-Barr virus-negative donors. *Eur J Immunol.* 22; 3161-6.
- Holt P. G., Haining S., Nelson D. J. and Sedgwick J. D.** 1994. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol.* 153; 256-61.
- Hosoi J., Murphy G. F., Egan C. L., Lerner E. A., Grabbe S., Asahina A. and Granstein R. D.** 1993. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature.* 363; 159-63.
- Hsu S. Y., Hsu H. F., Mitros F. A., Helms C. M. and Solomon R. I.** 1980. Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. *Ann Trop Med Parasitol.* 74; 179-83.
- Hudson L. G. and McCawley L. J.** 1998. Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech.* 43; 444-55.
- Hunt P., Robertson D., Weiss D., Rennick D., Lee F. and Witte O. N.** 1987. A single bone marrow-derived stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. *Cell.* 48; 997-1007.
- Il'inskaia N. B.** 1965. [Salt resistance of pronymphs of the apple moth during activity and diapause]. *Tsitologiya.* 7; 538-46.

- Inada M., Yamashita J. and Ogawa M.** 1997. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046-Na) inhibits the growth of human lung cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficiency (scid) mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 97; 229-32.
- Jacobsen F. W., Veiby O. P. and Jacobsen S. E.** 1994. IL-7 stimulates CSF-induced proliferation of murine bone marrow macrophages and Mac-1+ myeloid progenitors in vitro. *J Immunol.* 153; 270-6.
- James S. L. and Glaven J.** 1989. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol.* 143; 4208-12.
- James S. L. and Sher A.** 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 155; 21-31.
- Jankovic D., Kullberg M. C., Noben-Trauth N., Caspar P., Ward J. M., Cheever A. W., Paul W. E. and Sher A.** 1999. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J Immunol.* 163; 337-42.
- Jeannin P., Delneste Y., Lecoanet H. S., Gretener D. and Bonnefoy J. Y.** 1998. Interleukin-7 (IL-7) enhances class switching to IgE and IgG4 in the presence of T cells via IL-9 and sCD23. *Blood.* 91; 1355-61.
- Joseph M., Auriault C., Capron A., Vorng H. and Viens P.** 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* 303; 810-2.
- Joseph M., Capron A., Butterworth A. E., Sturrock R. F. and Houba V.** 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula in vitro: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin Exp Immunol.* 33; 48-56.

- Joseph M., Tonnel A. B., Capron A. and Voisin C.** 1980. Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clin Exp Immunol.* 40; 416-22.
- Joshi P. C. and Choi Y. S.** 1991. Human interleukin 7 is a B cell growth factor for activated B cells. *Eur J Immunol.* 21; 681-6.
- Juhasz I., Lazarus G. S., Murphy G. F., Shih I. M. and Herlyn M.** 1993. Development of pemphigus vulgaris-like lesions in severe combined immunodeficiency disease mice reconstituted with lymphocytes from patients. *J Clin. Invest.* 92; 2401-2407.
- Kaminski M. J., Cruz P. D., Jr., Bergstresser P. R. and Takashima A.** 1993. Killing of skin-derived tumor cells by mouse dendritic epidermal T- cells. *Cancer Res.* 53; 4014-9.
- Kang K., Hammerberg C. and Cooper K. D.** 1996. Differential regulation of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in HaCaT keratinocytes by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *Exp Dermatol.* 5; 218-26.
- Katz S. I., Tamaki K. and Sachs D. H.** 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature.* 282; 324-6.
- Kerr L. A., Navsaria H. A., Barker J. N., Sakkas L. I., Leigh I. M., MacDonald D. M. and Welsh K. I.** 1990. Interferon-gamma activates co-ordinate transcription of HLA-DR, DQ, and DP genes in cultured keratinocytes and requires de novo protein synthesis. *J Invest Dermatol.* 95; 653-6.
- Khalife J., Capron M., Cesbron J. Y., Tai P. C., Taelman H., Prin L. and Capron A.** 1986. Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J Immunol.* 137; 1659-64.
- Kiess W. and Belohradsky B. H.** 1986. Endocrine regulation of the immune system. *Klin Wochenschr.* 64; 1-7.

- Komschlies K. L.,
- Kim Y. H., Woodley D. T., Wynn K. C., Giomi W. and Bauer E. A.** 1992. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa phenotype is preserved in xenografts using SCID mice: development of an experimental in vivo model. *J. Invest. Dermatol.* 98; 191-197.
- Kincade P. W., Lee G., Pietrangeli C. E., Hayashi S. and Gimble J. M.** 1989. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annu Rev Immunol.* 7; 111-43.
- Kirchgessner C. U., Patil C. K., Evans J. W., Cuomo C. A., Fried L. M., Carter T., Oettinger M. A. and Brown J. M.** 1995. DNA-Dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science.* 267; 1178-1183.
- Knopf P. M. and Soliman M.** 1980. Effects of host endocrine gland removal on the permissive status of laboratory rodents to infection by *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 10; 197-204.
- Grzegorzewski K. J. and Wiltrot R. H. 1995. Diverse immunological and hematological effects of interleukin 7: implications for clinical application. *J Leukoc Biol.* 58; 623-33.
- Kondo M., Takeshita T., Higuchi M., Nakamura M., Sudo T., Nishikawa S. and Sugamura K. 1994. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science.* 263; 1453-4.
- Kos F. J. and Mullbacher A. 1993. IL-2-independent activity of IL-7 in the generation of secondary antigen-specific cytotoxic T cell responses in vitro. *J Immunol.* 150; 387-93.
- Kroemer R. T., Doughty S. W., Robinson A. J. and Richards W. G. 1996a. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. *Protein Eng.* 9; 493-8.
- Kroemer R. T. and Richards W. G. 1996b. Homology modeling study of the human interleukin-7 receptor complex. *Protein Eng.* 9; 1135-42.

- Kullberg M. C., Pearce E. J., Hieny S. E., Sher A. and Berzofsky J. A.** 1992. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol.* 148; 3264-70.
- Kuziel W. A., Takashima A., Bonyhadi M., Bergstresser P. R., Allison J. P., Tigelaar R. E. and Tucker P. W.** 1987. Regulation of T-cell receptor gamma-chain RNA expression in murine Thy- 1+ dendritic epidermal cells. *Nature.* 328; 263-6.
- Kyoizumi S., Baum C. M., Kaneshima H., McCune J. M., Yee E. J. and Namikawa R.** 1992. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood.* 79; 1704-11.
- Laky K., Lefrancois L., von F., Jeffry U., Murray R. and Puddington L.** 1998. The role of IL-7 in thymic and extrathymic development of TCR gamma delta cells. *J Immunol.* 161; 707-13.
- Lalvani A., Dong T., Ogg G., Patham A. A., Newell H., Hill A. V., McMichael A. J. and Rowland J. S.** 1997. Optimization of a peptide-based protocol employing IL-7 for in vitro restimulation of human cytotoxic T lymphocyte precursors. *J Immunol Methods.* 210; 65-77.
- Lampert I. A.** 1984. Expression of HLA-DR (Ia like) antigen on epidermal keratinocytes in human dermatoses. *Clin Exp Immunol.* 57; 93-100.
- Lampert I. A., Suitters A. J. and Chisholm P. M.** 1981. Expression of Ia antigen on epidermal keratinocytes in graft-versus- host disease. *Nature.* 293; 149-50.
- Langerhans P.** 1868. Ueber die nerven der menschlichen haut. *Virchows. Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 44; 325.
- Launois P., Tacchini-Cottier F., Parra-Lopez C. and Louis J. A.** 1998. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. *Int Rev Immunol.* 17; 157-80.

- Lechler R. I.** 1988. MHC class II molecular structure--permitted pairs? *Immunol Today*. 9; 76-8.
- Lenz A., Heine M., Schuler G. and Romani N.** 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest*. 92; 2587-96.
- Lichtenberg F., Sher A., Gibbons N. and Doughty B. L.** 1976. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. *Am J Pathol*. 84; 479-500.
- Londei M., Verhoef A., Hawrylowicz C., Groves J., De B. P. and Feldmann M.** 1990. Interleukin 7 is a growth factor for mature human T cells. *Eur J Immunol*. 20; 425-8.
- Lotti T., Hautmann G. and Panconesi E.** 1995. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol*. 33; 482-96.
- Lukacs N. W., Chensue S. W., Strieter R. M., Warmington K. and Kunkel S. L.** 1994. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 152; 5883-9.
- Lupton S. D., Gimpel S., Jerzy R., Brunton L. L., Hjerrild K. A., Cosman D. and Goodwin R. G.** 1990. Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol*. 144; 3592-601.
- Macatonia S. E., Knight S. C., Edwards A. J., Griffiths S. and Fryer P.** 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med*. 166; 1654-67.
- Machado A. J., Gazzinelli G., Pellegrino J. and Dias de Silva W.** 1975. *Schistosoma mansoni*: the role of the complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp Parasitol*. 38; 20-9.

- Madrigal E. L., McManus R., Byrne B., Lynch S., Doherty D. G., Kelleher D., O'Donoghue D. P., Feighery C. and O'Farrelly C.** 1997. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol.* 58; 83-90.
- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M. G., Piccinni M. P., Maggi E., Trinchieri G. and Romagnani S.** 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 177; 1199-204.
- Marieb E. N.** 1993. Anatomie et physiologie humaines.
- Matsue H., Bergstresser P. R. and Takashima A.** 1993a. Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *J Immunol.* 151; 6012-9.
- Matsue H., Bergstresser P. R. and Takashima A.** 1993b. Reciprocal cytokine-mediated cellular interactions in mouse epidermis: promotion of gamma delta T-cell growth by IL-7 and TNF alpha and inhibition of keratinocyte growth by gamma IFN. *J Invest Dermatol.* 101; 543-8.
- Matsue H., Cruz P. D., Jr., Bergstresser P. R. and Takashima A.** 1993c. Profiles of cytokine mRNA expressed by dendritic epidermal T cells in mice. *J Invest Dermatol.* 101; 537-42.
- Mazingue C., Cottrez F., Auriault C., Cesbron J. Y. and Capron A.** 1991. Obtention of a human primary humoral response against schistosome protective antigens in severe combined immunodeficiency mice after the transfer of human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 21; 1763-6.
- Mc Cune J. M., Namikawa R., Kaneshima H., Schultz L. D., Lieberman M. and Weissman I. L.** 1988. The SCID-hu Mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science.* 241; 1632-1639.

- McInnes A. and Rennick D. M.**  
1988. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med.* 167; 598-611.
- McKenzie G. J., Fallon P. G., Emson C. L., Grencis R. K. and McKenzie A. N.** 1999. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med.* 189; 1565-72.
- Mertsching E., Burdet C. and Ceredig R.** 1995. IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *Int Immunol.* 7; 401-14.
- Mertsching E., Grawunder U., Meyer V., Rolink T. and Ceredig R.** 1996. Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen. *Eur J Immunol.* 26; 28-33.
- Mertsching E., Meyer V., Linares J., Lombard P. S. and Ceredig R.** 1998. Interleukin-7, a non-redundant potent cytokine whose over-expression massively perturbs B-lymphopoiesis. *Int Rev Immunol.* 16; 285-308.
- Metwali A., Elliott D., Blum A. M., Li J., Sandor M., Lynch R., Noben T. N. and Weinstock J. V.** 1996. The granulomatous response in murine Schistosomiasis mansoni does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. *J Immunol.* 157; 4546-53.
- Metwali A., Elliott D., Blum A. M. and Weinstock J. V.** 1993a. Granuloma eosinophils enhance IL-5 production by lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 151; 7048-56.
- Metwali A., Elliott D., Mathew R., Blum A. and Weinstock J. V.** 1993b. IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 150; 536-42.

- Mommaas M., Mulder A., Vermeer B. J. and Koning F.** 1994. Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *J Invest Dermatol.* 103; 807-10.
- Montecino-Rodriguez E., Clark R. G., Powell-Braxton L. and Dorshkind K.** 1997. Primary B cell development is impaired in mice with defects of the pituitary/thyroid axis. *J Immunol.* 159; 2712-9.
- Morrissey P. J., Goodwin R. G., Nordan R. P., Anderson D., Grabstein K. H., Cosman D., Sims J., Lupton S., Acres B. and Reed S. G.** 1989. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med.* 169; 707-16.
- Mosier D. E., Gulizia R. J., Baird S. M. and Wilson D. B.** 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature.* 335; 256-9.
- Mountford A. P., Shires V. L. and Anderson S.** 1998. Interleukin-12 and protective immunity to schistosomes. *Braz J Med Biol Res.* 31; 163-9.
- Muegge K., Vila M. P. and Durum S. K.** 1993. Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science.* 261; 93-5.
- Munn S. E., McGregor J. M., Jones A., Amlot P., Rustin M. H., Russell Jones R. and Whittaker S.** 1996. Clinical and pathological heterogeneity in cutaneous gamma-delta T-cell lymphoma: a report of three cases and a review of the literature. *Br J Dermatol.* 135; 976-81.
- Murray A. G., Khodadoust M. M., Pober J. S. and Bothwell A. L.** 1994. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity.* 1; 57-63.

- Mutis T., De Bueger M., Bakker A. and Ottenhoff T. H.** 1993. HLA class II+ human keratinocytes present *Mycobacterium leprae* antigens to CD4+ Th1-like cells. *Scand J Immunol.* 37; 43-51.
- Namen A. E., Lupton S., Hjerrild K., Wignall J., Mochizuki D. Y., Schmierer A., Mosley B., March C. J., Urdal D. and Gillis S.** 1988a. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature.* 333; 571-3.
- Namen A. E. and Mire-Sluis A. R.** 1998. Cytokines. Interleukin-7. Thorpe éd.
- Namen A. E., Schmierer A. E., March C. J., Overell R. W., Park L. S., Urdal D. L. and Mochizuki D. Y.** 1988b. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med.* 167; 988-1002.
- Namikawa R., Kaneshima H., Lieberman M., Weissman I. L. and McCune J. M.** 1988. Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science.* 242; 1684-6.
- Namikawa R., Weilbaecher K. N., Kaneshima H., Yee E. J. and McCune J. M.** 1990. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med.* 172; 1055-63.
- Nestle F. O., Filgueira L., Nickoloff B. J. and Burg G.** 1998. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol.* 110; 762-6.
- Nestle F. O. and Nickoloff B. J.** 1995. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. *Adv Exp Med Biol.* 378; 111-6.
- Nestle F. O., Turka L. A. and Nickoloff B. J.** 1994. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 94; 202-9.

- Nickoloff B. J.** 1988. Role of interferon-gamma in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch Dermatol.* 124; 1835-43.
- Nickoloff B. J.** 1993a. Dermal immune system.
- Nickoloff B. J., Mitra R. S., Lee K., Turka L. A., Green J., Thompson C. and Shimizu Y.** 1993b. Discordant expression of CD28 ligands, BB-1, and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J Pathol.* 142; 1029-40.
- Nickoloff B. J. and Naidu Y.** 1994a. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 30; 535-46.
- Nickoloff B. J. and Turka L. A.** 1994b. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today.* 15; 464-9.
- Nicolas J.-F. and Thivolet J.** 1997. Immunodermatologie.
- Niedecken H., Lutz G., Bauer R. and Kreysel H. W.** 1988. Differential expression of major histocompatibility complex class II antigens on human keratinocytes. *J Am Acad Dermatol.* 19; 1030-7.
- Nyame A. K., Pilcher J. B., Tsang V. C. and Cummings R. D.** 1996. Schistosoma mansoni infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells. *Exp Parasitol.* 82; 191-200.
- Oswald I. P., Gazzinelli R. T., Sher A. and James S. L.** 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol.* 148; 3578-82.
- Oswald I. P., Wynn T. A., Williams M. E., Eltoum I., Cheever A. W., James S. L. and Sher A.** 1993. Regulatory and immunopathological roles of IL4 in experimental schistosomiasis. *Res Immunol.* 144; 643-8.

- Pancre V., Joseph M., Mazingue C., Wietzerbin J., Capron A. and Auriault C.** 1987. Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon-gamma. *J Immunol.* 138; 4490-5.
- Pang X. P., Hershman J. M., Chung M. and Pekary A. E.** 1989. Characterization of tumor necrosis factor-alpha receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin. *Endocrinology.* 125; 1783-8.
- Park L. S., Friend D. J., Schmierer A. E., Dower S. K. and Namen A. E.** 1990. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7- dependent cell line. *J Exp Med.* 171; 1073-89.
- Pearce E. J., Caspar P., Grzych J. M., Lewis F. A. and Sher A.** 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med.* 173; 159-66.
- Pemberton R. M., Smythies L. E., Mountford A. P. and Wilson R. A.** 1991a. Patterns of cytokine production and proliferation by T lymphocytes differ in mice vaccinated or infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunology.* 73; 327-33.
- Pemberton R. M., Smythies L. E., Mountford A. P. and Wilson R. A.** 1991b. Patterns of cytokine production and proliferation by T lymphocytes differ in mice vaccinated or infected with *Schistosoma mansoni*. *Immunology.* 73; 327-33.
- Pentland A. P., George J., Moran C. and Needleman P.** 1987. Cellular confluence determines injury-induced prostaglandin E2 synthesis by human keratinocyte cultures. *Biochim Biophys Acta.* 919; 71-8.
- Peschon J. J., Morrissey P. J., Grabstein K. H., Ramsdell F. J., Maraskovsky E., Gliniak B. C., Park L. S., Ziegler S. F., Williams D. E., Ware C. B. and et a. l.** 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 180; 1955-60.

- Phillips S. M. and Colley D. G.**  
 1978. Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: resistance, immunopathology, and eosinophil involvement. *Prog Allergy*. 24; 49-182.
- Picut C. A., Lee C. S. and Lewis R. M.** 1987. Ultrastructural and phenotypic changes in Langerhans cells induced in vitro by contact allergens. *Br J Dermatol.* 116; 773-84.
- Pober J. S., Collins T., Gimbrone M. J., Libby P. and Reiss C. S.** 1986. Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation*. 41; 141-6.
- Pope M., Betjes M. G., Hirmand H., Hoffman L. and Steinman R. M.** 1995. Both dendritic cells and memory T lymphocytes emigrate from organ cultures of human skin and form distinctive dendritic-T-cell conjugates. *J Invest Dermatol.* 104; 11-7.
- Ramaswamy K., He Y. X. and Salafsky B.** 1997. ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 86; 118-32.
- Rich B. E., Campos T. J., Tepper R. I., Moreadith R. W. and Leder P.** 1993. Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. *J Exp Med.* 177; 305-16.
- Rich B. E. and Leder P.** 1995. Transgenic expression of interleukin 7 restores T cell populations in nude mice. *J Exp Med.* 181; 1223-8.
- Rossiter H., Alon R. and Kupper T. S.** 1997. Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med Today*. 3; 214-22.
- Rowden G., Colp P., Dean S., Auger F. and Lopes-valle C.** 1992. Comparative epidermal Langerhans cell migration studies in epidermal/dermal equivalent grafts. *J. Invest. Dermatol.* 99; 59-61.

- Roye O., Delhem N., Trottein F., Remoue F., Nutten S., Decavel J. P., Delacre M., Martinot V., Cesbron J. Y., Auriault C. and Wolowczuk I.** 1998. Dermal endothelial cells and keratinocytes produce IL-7 in vivo after human *Schistosoma mansoni* percutaneous infection. *J Immunol.* 161; 4161-8.
- Rubenfeld M. R., Silverstone A. E., Knowles D. M., Halper J. P., De S. A., Fenoglio C. M. and Edelson R. L.** 1981. Induction of lymphocyte differentiation by epidermal cultures. *J Invest Dermatol.* 77; 221-4.
- Russel S. W., Baker N. F. and Raizes G. S.** 1966. Experimental *Obeliscoides cuniculi* infections in rabbits: comparison with *Trichostrongylus* and *Ostertagia* infections in cattle and sheep. *Exp Parasitol.* 19; 163-73.
- Sabin E. A., Kopf M. A. and Pearce E. J.** 1996. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med.* 184; 1871-8.
- Sabin E. A. and Pearce E. J.** 1995. Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol.* 155; 4844-53.
- Saed G., Fivenson D. P., Naidu Y. and Nickoloff B. J.** 1994. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile [see comments]. *J Invest Dermatol.* 103; 29-33.
- Samaridis J., Casorati G., Traunecker A., Iglesias A., Gutierrez J. C., Muller U. and Palacios R.** 1991. Development of lymphocytes in interleukin 7-transgenic mice. *Eur J Immunol.* 21; 453-60.
- Sandhu J., Shpitz B., Gallinger S. and Hozumi N.** 1994. Human primary immune response in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol.* 152; 3806-13.

- Savage C. O., Hughes C. C., Pepinsky R. B., Wallner B. P., Freedman A. S. and Pober J. S.** 1991. Endothelial cell lymphocyte function-associated antigen-3 and an unidentified ligand act in concert to provide costimulation to human peripheral blood CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 137; 150-63.
- Savidge T. C., Morey A. L., Ferguson D. J., Fleming K. A., Shmakov A. N. and Phillips A. D.** 1995. Human intestinal development in a severe-combined immunodeficient xenograft model. *Differentiation.* 58; 361-71.
- Schauer E., Trautinger F., Kock A., Schwarz A., Bhardwaj R., Simon M., Ansel J. C., Schwarz T. and Luger T. A.** 1994. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest.* 93; 2258-62.
- Schistosomiasis W. E. C.** 1993. Public health impact of schistosomiasis: disease and mortality. *Bull. WHO.* 71; 657.
- Schleussner C., Fisher A. and Ceredig R.** 1991. Culture conditions dictate whether mouse fetal thymus lobes generate predominantly gamma/delta or alpha/beta T cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 173; 25-8.
- Schreiber S., Kilgus O., Payer E., Kutil R., Elbe A., Mueller C. and Stingl G.** 1992. Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures. *J Immunol.* 149; 3524-34.
- Schuhmachers G., Ariizumi K., Mathew P. A., Bennett M., Kumar V. and Takashima A.** 1995. Activation of murine epidermal gamma delta T cells through surface 2B4. *Eur J Immunol.* 25; 1117-20.
- Schwarz T. and Luger T. A.** 1989. Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production. *J Photochem Photobiol B.* 4; 1-13.

- Sher A., Coffman R. L., Hieny S. and Cheever A. W.** 1990. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol.* 145; 3911-6.
- Sher A., Fiorentino D., Caspar P., Pearce E. and Mosmann T.** 1991. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol.* 147; 2713-6.
- Shimada S. and Katz S. I.** 1988. The skin as an immunologic organ. *Arch Pathol Lab Med.* 112; 231-4.
- Shiohara T., Moriya N., Hayakawa J., Arahari K., Yagita H., Nagashima M. and Ishikawa H.** 1993. Bone marrow-derived dendritic epidermal T cells express T cell receptor- alpha beta/CD3 and CD8. Evidence for their extrathymic maturation. *J Immunol.* 150; 4323-30.
- Sieling P. A., Sakimura L., Uyemura K., Yamamura M., Oliveros J., Nickoloff B. J., Rea T. H. and Modlin R. L.** 1995. IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen. *J Immunol.* 154; 2775-83.
- Silberberg S. I., Thorbecke G. J., Baer R. L., Rosenthal S. A. and Berezowsky V.** 1976. Antigen-bearing langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol.* 25; 137-51.
- Smith E. M., Phan M., Kruger T. E., Coppenhaver D. H. and Blalock J. E.** 1983. Human lymphocyte production of immunoreactive thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80; 6010-3.
- Smithers S. R. and Terry R. J.** 1969. Immunity in schistosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 160; 826.
- Smythies L. E., Coulson P. S. and Wilson R. A.** 1992. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. *J Immunol.* 149; 3654-8.

- Sontheimer R. D.** 1989. Perivascular dendritic macrophages as immunobiological constituents of the human dermal perivascular unit. *J. Invest. Dermatol.* 93; 96S-101S.
- Soslau G., Morgan D. A., Jaffe J. S., Brodsky I. and Wang Y.** 1997. Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function. *Cytokine*. 9; 405-411.
- St L. J., Lederer J. A. and Lichtman A. H.** 1993. Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy. *J Exp Med.* 178; 1597-605.
- Stadecker M. J. and Colley D. G.** 1992. The immunobiology of the schistosome egg granuloma. *Parasitology Today*. 8; 218-220.
- Stadecker M. J. and Flores V. P.** 1994. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. *Immunol Today*. 15; 571-4.
- Staquet M. J.** 1995a. [Adhesion and migration of epidermal dendritic cells]. *Pathol Biol (Paris)*. 43; 858-62.
- Staquet M. J., Kobayashi Y., Dezutter D. C. and Schmitt D.** 1995b. Role of specific successive contacts between extracellular matrix proteins and epidermal Langerhans cells in the control of their directed migration. *Eur J Cell Biol.* 66; 342-8.
- Stenger R. J., Warren K. S. and Johnson E. A.** 1967. An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Exp Mol Pathol.* 7; 116-32.
- Stingl G. and Bergstresser P. R.** 1995. Dendritic cells: a major story unfolds. *Immunol Today*. 16; 330-3.
- Stonans I., Stonane E., Russwurm S., Deigner H. P., Bohm K. J., Wiederhold M., Jager L. and Reinhart K.** 1999. HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine*. 11; 151-6.

- Streilein J. W.** 1978. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *J. Invest. Dermatol.* 71; 167-171.
- Streilein J. W.** 1983. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80; 12S-16S.
- Streilein J. W., Alard P. and Niizeki H.** 1999. A new concept of skin-associated lymphoid tissue (SALT): UVB light impaired cutaneous immunity reveals a prominent role for cutaneous nerves. *Keio J Med.* 48; 22-7.
- Strobl H., Riedl E., Bello F. C. and Knapp W.** 1998. Epidermal Langerhans cell development and differentiation. *Immunobiology.* 198; 588-605.
- Suda T. and Zlotnik A.** 1991. IL-7 maintains the T cell precursor potential of CD3-CD4-CD8- thymocytes. *J Immunol.* 146; 3068-73.
- Sudo T., Nishikawa S., Ohno N., Akiyama N., Tamakoshi M., Yoshida H. and Nishikawa S.** 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90; 9125-9.
- Takashima A., Matsue H., Bergstresser P. R. and Ariizumi K.** 1995. Interleukin-7-dependent interaction of dendritic epidermal T cells with keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 105; 50S-53S.
- Tamaki K., Stingl G. and Katz S. I.** 1980. The origin of Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 74; 309-11.
- Tang A., Amagai M., Granger L. G., Stanley J. R. and Udey M. C.** 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 361; 82-5.
- Tary-Lehmann M. and Saxon A.** 1992. Human mature T cells that are anergic in vivo prevail in SCID mice reconstituted with human peripheral blood. *J Exp Med.* 175; 503-16.

- Tary-Lehmann M., Saxon A. and Lehmann P. V.** 1995. The human immune system in hu-PBL-SCID mice. *Immunol Today*. 16; 529-33.
- Teunissen M. B.** 1992. Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells. *Histochem J*. 24; 697-716.
- Thangavelu M., Finn W. G., Yelavarthi K. K., Roenigk H. H., Jr., Samuelson E., Peterson L., Kuzel T. M. and Rosen S. T.** 1997. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood*. 89; 3371-7.
- Touw I., Pouwels K., van A. T., van G. R., Budel L., Hoogerbrugge H., Delwel R., Goodwin R., Namen A. and Lowenberg B.** 1990. Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 75; 2097-101.
- Trottein F., Nutten S., Papin J. P., Leportier C., Poulain-Godefroy O., Capron A. and Capron M.** 1997. Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J Immunol*. 159; 804-11.
- Uehira M., Matsuda H., Hikita I., Sakata T., Fujiwara H. and Nishimoto H.** 1993. The development of dermatitis infiltrated by gamma delta T cells in IL- 7 transgenic mice. *Int Immunol*. 5; 1619-27.
- Uehira M., Matsuda H., Nakamura A. and Nishimoto H.** 1998. Immunologic abnormalities exhibited in IL-7 transgenic mice with dermatitis. *J Invest Dermatol*. 110; 740-5.
- Van Leeuwen A. W., Meijer C. J. and de Man J. C.** 1975. T-cell membrane characteristics of "mycosis cells" in the skin and lymph node. *J Invest Dermatol*. 65; 367-9.

- Vella A. T., Hulsebosch M. D. and Pearce E. J.** 1992a. Schistosoma mansoni eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *J Immunol.* 149; 1714-22.
- Vella A. T. and Pearce E. J.** 1992b. CD4+ Th2 response induced by Schistosoma mansoni eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J Immunol.* 148; 2283-90.
- Velupillai P. and Harn D. A.** 1994. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91; 18-22.
- Verwaerde C., Joseph M., Capron M., Pierce R. J., Damonneville M., Velge F., Auriault C. and Capron A.** 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for Schistosoma mansoni. *J Immunol.* 138; 4441-6.
- Viac J., Schmitt D., Reano A. and Thivolet J.** 1982. Expression of common cytoplasmic antigens by epithelial cells of thymus and epidermis. *Arch Dermatol Res.* 274; 113-21.
- Vignali D. A., Crocker P., Bickle Q. D., Cobbold S., Waldmann H. and Taylor M. G.** 1989. A role for CD4+ but not CD8+ T cells in immunity to Schistosoma mansoni induced by 20 krad-irradiated and Ro 11-3128-terminated infections. *Immunology.* 67; 466-72.
- Volc P. B., Stingl G., Wolff K., Hinterberg W. and Schnedl W.** 1984. Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient [letter]. *N Engl J Med.* 310; 1123-4.
- Von-Freeden-Jeffry U., Moore T. A., Zlotnik A. and Murray R.** 1998. IL-7 knockout mice and the generation of lymphocytes.

**Von-Freeden-Jeffry U., Vieira P., Lucian L. A., McNeil T., Burdach S. E. and Murray R.** 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med.* 181; 1519-26.

**Wahab M. F., Warren K. S. and Levy R. P.** 1971. Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis.* 124; 161-71.

**Wang J. and Klein J. R.** 1996. Hormone regulation of murine T cells: potent tissue-specific immunosuppressive effects of thyroxine targeted to gut T cells. *Int Immunol.* 8; 231-5.

**Watson J. D., Morrissey P. J., Namen A. E., Conlon P. J. and Widmer M. B.** 1989. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J Immunol.* 143; 1215-22.

**Weigent D. A. and Blalock J. E.** 1989. Expression of growth hormone by lymphocytes. *Int Rev Immunol.* 4; 193-211.

**Welch P. A., Namen A. E., Goodwin R. G., Armitage R. and Cooper M. D.** 1989. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J Immunol.* 143; 3562-7.

**Wheater P. R. and Wilson R. A.** 1979. Schistosoma mansoni: a histological study of migration in the laboratory mouse. *Parasitology.* 79; 49-62.

**Williams I. R. and Kupper T. S.** 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* 58; 1485-507.

**Williams I. R., Rawson E. A., Manning L., Karaoli T., Rich B. E. and Kupper T. S.** 1997. IL-7 overexpression in transgenic mouse keratinocytes causes a lymphoproliferative skin disease dominated by intermediate TCR cells: evidence for a hierarchy in IL-7 responsiveness among cutaneous T cells. *J Immunol.* 159; 3044-56.

**Wiryana P., Bui T., Faltynek C. R. and Ho R. J.** 1997. Augmentation of cell-mediated immunotherapy against herpes simplex virus by interleukins: comparison of in vivo effects of IL-2 and IL-7 on adoptively transferred T cells. *Vaccine*. 15; 561-3.

**Wrone-Smith T. and Nickoloff B. J.** 1996. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J. Clin. Invest.* 98; 1878-87.

**Wynn T. A., Cheever A. W., Jankovic D., Poindexter R. W., Caspar P., Lewis F. A. and Sher A.** 1995. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*. 376; 594-6.

**Wynn T. A., Morawetz R., Scharton-Kersten T., Hieny S., Morse H. C., 3rd, Kuhn R., Muller W., Cheever A. W. and Sher A.** 1997. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. *J Immunol.* 159; 5014-23.

**Yamada K., Shimaoka M., Nagayama K., Hiroi T., Kiyono H. and Honda T.** 1997. Bacterial invasion induces interleukin-7 receptor expression in colonic epithelial cell line, T84. *Eur J Immunol.* 27; 3456-60.

**Yamamura M., Uyemura K., Deans R. J., Weinberg K., Rea T. H., Bloom B. R. and Modlin R. L.** 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions [published erratum appears in Science 1992 Jan 3;255(5040):12]. *Science*. 254; 277-9.

**Yan H. C., Juhasz I., Pilewski J., Murphy G. F., Herlyn M. and Albelda S. M.** 1993. Human/severe immunodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. *J. Clin. Invest.* 91; 986-96.

**Yonish R. E., Schmitt D., Viac J., Knowles R., Cordier G. and Brochier J.** 1984. Monoclonal anti thymic cell antibodies detecting epidermal cells. *Thymus*. 6; 67-78.

**Yssel H., Schneider P. V. and Lanier L. L.** 1993. Interleukin-7 specifically induces the B7/BB1 antigen on human cord blood and peripheral blood T cells and T cell clones. *Int Immunol.* 5; 753-9.

**Ziegler S. F., Tough T. W., Franklin T. L., Armitage R. J. and Alderson M. R.** 1991. Induction of macrophage inflammatory protein-1 beta gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7. *J Immunol.* 147; 2234-9.

